

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

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ШАКИРОВ ЗАИР СААТОВИЧ**

**ЎЗБЕКИСТОННИНГ *AZOSPIRILLUM* АВЛОДИГА МАНСУБ  
АССОЦИАТИВ БАКТЕРИЯЛАРИ ВА КСЕРОФИТ ДУККАКЛИ  
ЎСИМЛИКЛАРИНИНГ ТУГАНАК БАКТЕРИЯЛАРИ**

**03.00.04 – Микробиология ва вирусология  
(биология фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2015 йил**

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

Шакиров Заир Саатович Ўзбекистоннинг <i>Azospirillum</i> авлодига мансуб ассоциатив бактериялари ва ксерофит дуккакли ўсимликларининг туганак бактериялари	5
Шакиров Заир Саатович Ассоциативные бактерии рода <i>Azospirillum</i> и клубеньковые бактерии ксерофитных бобовых растений Узбекистана	29
Shakirov Zair Associative bacteria of <i>Azospirillum</i> genus and nodule bacteria of xerophyte leguminous plants of Uzbekistan	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**

---

**МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ШАКИРОВ ЗАИР СААТОВИЧ**

**ЎЗБЕКИСТОННИНГ *AZOSPIRILLUM* АВЛОДИГА МАНСУБ  
АССОЦИАТИВ БАКТЕРИЯЛАРИ ВА КСЕРОФИТ ДУККАКЛИ  
ЎСИМЛИКЛАРИНИНГ ТУГАНАК БАКТЕРИЯЛАРИ**

**03.00.04 – Микробиология ва вирусология  
(биология фанлари)**

**ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ**

**Тошкент – 2015 йил**

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси хузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.5.В89 рақами билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Микробиология институтида бажарилган.  
Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси «www.nuu.uz» ва «Ziynet» таълим ахборот тармоғида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

**Илмий маслаҳатчи:** **Ходжибаева Санабар Мирзаевна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Расмий оппонентлар:** **Юнусханов Шавкат**  
биология фанлари доктори, профессор

**Ахмедова Захро Рахматовна**  
биология фанлари доктори, профессор

**Исмаилов Зафар Файзуллаевич**  
биология фанлари доктори

**Етакчи ташкилот:** **Ўсимлик ва ҳайвонат олами генофонди институти**

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети ва Микробиология институти хузуридаги 16.07.2013.В.01.03 рақамли Илмий кенгашнинг «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 й. соат 10<sup>00</sup> даги мажлисида бўлади. (100174, Тошкент ш., Олмазор тумани, Университет-4 кўч., тел.:+ 998 71 227 12 24, факс:+ 998 71 246 53 21; +998 71 246 02 24, E-mail: rector@nuu.uz).

Докторлик диссертацияси Ўзбекистон Миллий университети ахборот-ресурс марказида №М14905 рақами билан рўйхатга олинган, диссертация билан АРМда танишиш мумкин (100174, Тошкент ш., Олмазор тумани, Университет-4 кўч.).

Диссертация автореферати 2015 йил «\_\_\_» \_\_\_\_\_ да тарқатилди  
(2015 йил \_\_\_\_\_ даги № \_\_\_ рақамли реестр баённомаси).

**К. Давранов**  
Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш раиси ўринбосари,  
биология фанлари доктори, профессор

**С.М. Насметова**  
Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш илмий котиби,  
биология фанлари номзоди, катта илмий ходим

**Т.Г. Гулямова**  
Фан доктори илмий даражасини берувчи  
илмий кенгаш хузуридаги илмий семинар раиси,  
биология фанлари доктори, профессор

## Кириш (докторлик диссертацияси аннотацияси)

**Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати.** Қишлоқ хўжалиги ўсимликларининг ҳосилдорлигини ошиши, минерал ўғитлар ва ўсимликларни ҳимоя қилиш воситаларининг чекланган даражада қўлланилиши, шу билан бирга ўсимликларнинг агроиқлим ва антропоген ноқулай шароитларга чидамлилигининг ошиб бориши қишлоқ хўжалиги учун, ҳамда экологик муаммоларини ечиш ва атроф-муҳит муҳофазаси учун долзарб ҳисобланади. Ушбу вазифаларни ечиш учун фаннинг турли йўналишларида, шу жумладан, микробиология, ўсимликшунослик, тупроқшунослик ва экология соҳаларида кўплаб олимлар илмий изланишлар олиб бормоқдалар.

Шу сабабли, атмосфера молекуляр азотни ўзлаштирувчи, дуккакли бўлмаган ўсимликлар билан ассоциатив симбиоз ҳосил қилувчи ризосфера микроорганизмларига бўлган қизиқиш ортиб бормоқда. Ассоциатив бактериялар орасида *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактерияларга катта эътибор қаратилмоқда. Бу эса уларнинг молекуляр азотни ўзлаштириш қобилияти, фитогормонлар ҳосил қилиши, бир қатор витаминлар синтез қилиши, фунгистатик фаолликга эга бўлган моддаларни ҳосил қилиши, ўсимликларни бактериялар билан инокуляция қилинганда ўсимликларни минерал моддалар билан озикланишини кучайиши ва сув балансининг яхшиланишига олиб келиши билан боғлиқдир.

Шундай қилиб, ўсимликларни азоспирилл ёрдамида инокуляция қилиш дуккакли ва дуккакли бўлмаган ўсимликларнинг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигининг ошишига, ҳамда қимматбаҳо, экологик ноқулай анъанавий минерал ўғитларнинг алмашилишига олиб келади. *Azospirillum* авлодига мансуб бактериялар ўзига хос углеродли ва азотли метаболизмини намоён қилиши, уларни ризосфера атрофидаги ноқулай рақобатбардош шароитларга мослашилишига ва ривожланишига ёрдам беради.

Мутуалистик симбиозлар орасида дуккакли ўсимликлар билан молекуляр азотни ўзлаштирувчи *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* авлодларига мансуб бўлган туганак бактерияларнинг ўзаро муносабати натижасида ҳосил бўлувчи дуккакли-ризобиал симбиоз алоҳида ўрин тутаяди. Дуккакли-ризобиал симбиоз жараёни натижасида дуккакли ўсимликлар илдизида туганаклар ҳосил бўлиб ва туганаклар ичидаги бактериод шаклини олган туганак бактериялар атмосферадан молекуляр азотни ўзлаштириб ўсимликни азот билан таъминлайди ва тупроқни табиий азотга бойитади.

Ҳозирги кунда Ўзбекистон территориясининг 80% га яқинини чўл, ярим чўллар ташкил этади, бундан ташқари 50% дан ошиқ суғориладиган ерлар иккиламчи шўрланишга учраган. Шу сабабли, чўлга айланишни олдини олиш ва шўрланишга қарши курашиш бизнинг Республикамизда жуда муҳим аҳамият касб этади. Бундай шароитларда чўл, ярим чўл ва арид зоналари тупроқларини биологик азот билан бойитувчи дуккакли ўсимликлар яшаш ареалининг қисқариб бораётганлигини ҳисобга олинандиган бўлса,

*Ammodendron conollyi*, *Astragalus villosissimus*, *Astragalus unifoliolatus*, *Onobrychis transcaucasica*, *Onobrychis chorassanica* ёввойи ксерофит чўл дуккакли ўсимликларининг дуккакли-ризобиал симбиоз жараёнларини, ўсимликларни нормал ўсиши ва ривожланишини, маҳсулдорлигини сақлаб қолиш каби вазифаларни ўрганишга табиий зарурат туғилади.

Табиатда ассоциатив ва дуккакли-ризобиал симбиоз жараёнларининг ўта зарурлигини ҳисобга олган холда *Azospirillum* авлодига мансуб ассоциатив бактерияларни ва чўл дуккакли ўсимликларининг туганак бактерияларини ўрганиш илмий-амалий ва экологик аҳамият касб этади.

Ушбу диссертация доирасидаги илмий-тадқиқот ишларининг бажарилиши Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2008 йил 19 сентябрдаги № 212-сонли қароридаги «2008—2012 йилларда Ўзбекистон Республикасининг атроф муҳитни муҳофаза қилиш ишлари дастури» ва 2013 йил 27 майдаги № 142-сонли қароридаги «2013 - 2017 йилларда Ўзбекистон Республикасининг атроф муҳитни муҳофаза қилиш ишлари дастури» қарорларида кўрсатилган вазифалар атроф-муҳитни муҳофаза қилиш комплекс меъёрларини бажаришга йўналтирилган, экологик хавфсизликни амалга ошириш, табиий тизимларнинг хилма-хиллигини ва ўз-ўзини бошқариш қобилиятини сақлаб қолиш ва қайта тиклашга жавоб беради.

**Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланишининг асосий устувор йўналишларига боғлиқлиги.** Ушбу илмий иш Ўзбекистон Республикаси 2012-2020 йй. илм ва технологиялар ривожланишининг устувор йўналишларига тегишли тадқиқотларга мос равишда бажарилган: №5 Қишлоқ-хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳитни муҳофаза қилиш. ПФИ-5. Микроорганизмлар систематикаси ва эволюцияси, физиологик фаол моддалар продуценти сифатида микроорганизмлардан фойдаланишнинг физиологик-биокимёвий асослари.

**Диссертациянинг мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи.** Дунёнинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасаларида, жумладан, Indiana University (USA), Ghent University (Belgium), Pasteur Institute (France), The University of Lyon (France), The Hebrew University of Jerusalem (Israel), Centre of Microbial and Plant Genetics (Belgium), Northwestern Center of Biological Research (Mexico), РФА Ўсимлик ва микроорганизмлар биокимёси ва физиологияси институтида (Россия) *Azospirillum* авлодига мансуб бактериялар ва туганак бактерияларини дон бошоқли ва дуккакли ўсимликлар ҳосилдорлигини ошириши бўйича илмий тадқиқот ишлари олиб борилмоқда.

Бактерияларнинг молекуляр азотни ўзлаштириш механизмлари, фитогормонлар (ауксин, гиббереллин, цитокинин) биосинтези (Centre of Microbial and Plant Genetics, Belgium), ассоциатив ва дуккакли - ризобиал симбиознинг ҳосил бўлиши, туганак бактериялар ва дуккакли ўсимликларнинг симбиози жараёнига жавоб берувчи генларнинг молекуляр биологияси батафсил аниқланган (Pasteur Institute, France). *Azospirillum* авлодига мансуб бактериялар ва туганак бактериялар асосида яратилган биопрепаратлар қишлоқ хўжалигида экинларини биологик азот билан

таъминловчи ва фитостимуляторлар сифатида қўлланилган, ҳамда экологик мақсадларда қурғоқчилик минтақаларда тупроқ эрозиясини олдини олишда ишлатилган (The Hebrew University of Jerusalem, Israel).

Дуккакли ўсимликларнинг *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* авлодларига мансуб бактериялар ёрдамида туганак ҳосил бўлиши, шўрланиш шароитларида бактерияларнинг молекуляр азотни ўзлаштириши, ассоциатив ва дуккакли-ризобиал симбиоз ҳолатидаги ўсимликларни шўрланишга бўлган адаптациясини кучайиши, дуккакли бўлмаган ўсимликларда ассоциатив симбиоз жараёнини ҳосил бўлиши бўйича устувор йўналишларда илмий изланишлар олиб борилмоқда.

**Муаммонинг ўрганилганлик даражаси.** *Azospirillum* авлодига мансуб бактерияларни ажратиш ва уларнинг молекуляр таксономияси (Elmerich С., Okon Y., Lai R.), бошоқли ўсимликларнинг ассоциатив симбиозини ўрганиш (Vanderleyden J., Игнатов В.В., Антонюк Л.П.), маданий ўсимликларнинг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигига *Azospirillum* нинг таъсири (Bashan Y., Holguin G., Levanony H., Whitmoyer E.), туганак бактерияларни ажратиш, туганак ҳосил бўлиши, дуккакли ўсимликларнинг самарадор симбиозини (Holsters M., Симаров Б.В., Проворов Н.А., Саимназаров Ю.Б.) ўрганишга кўп миқдордаги илмий изланишлар бағишланган.

Адабиётларда *Azospirillum* бактериясининг яшовчанлик қобилиятига шўрланишнинг таъсири ҳақида ягона маълумотлар мавжуд, *Azospirillum* авлодига мансуб бактерияларнинг бир хужайрали яшил сув ўтлари билан ассоциатив симбиоз модели ҳосил қилиши ҳақида маълумотлар йўқ. Шунинг айтиб ўтиш лозимки, ҳозирги кунга қадар Ўзбекистон Республикасида *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган ассоциатив бактериялар ўрганилган эмас.

Ёввойи чўл ксерофит дуккакли ўсимликларида (Чўл акацияси *Ammodendron conollyi*, Сершоҳ астрагал *Astragalus villosissimus*, Ягона баргли астрагал *Astragalus unifoliolatus*, Кавказ эспарцети *Onobrychis transcaucasica*, Хорасан эспарцети *Onobrychis chorassanica*) *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* авлодига мансуб бўлган бактериялар ёрдамида туганаклар ҳосил бўлишини ўрганиш, ҳамда аралаш культуралар (*Rhizobium* ва *Azospirillum*) иккиламчи инокуляциясининг чўл дуккакли ўсимликларининг ўсиши ва ривожланишига таъсири ҳақида маълумотлар йўқ.

Шўрланиш шароитларида дуккакли ўсимликлар ва уларнинг туганак бактерияларининг стресс ҳолатларига жавоб берувчи ферментларни (альдегидоксидаза, ксантиндегидрогеназа ва глутаминсинтетаза) ўрганиш ҳақидаги маълумотлар ҳам йўқ.

**Диссертация мавзусининг диссертация бажарилаётган илмий-тадқиқот муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги:**

5-Ф илмий фундаментал лойиҳа «*Azospirillum* авлодига мансуб бўлган ассоциатив бактерияларнинг биологик азотни ўзлаштиришининг молекуляр-бикимёвий томонларини ўрганиш» (1998-2002);

Ф-4.1.23 «Шўрланиш ва қурғоқчилик шароитларида молекуляр азотни

ўзлаштирувчи *Onobrychis* симбиозининг кучайиши» (2003-2007);

Халқоро лойиҳалар доирасида:

INCO-Copernicus ERBIC15 CT98 0136 «Дуккакли дарахтларнинг стресс шароитларларга мослашувини яхшилаш биотехнологияси» (1998 - 2001);

USAID/CDR/CAR №TA-MOU-98-CA17-032 «Ўсимликларнинг стресс шароитларга мослашувини кучайтириш учун микроорганизмларнинг симбиотик биохилма-хиллигини қўллаш» (1999-2002);

USAID/CDR/CAR № TA-MOU-02-CA21-022 «*Onobrychis* адаптацияси, Марказий Осий чўлларининг шўрланиш ва қурғоқчиликга чидамли кўп йиллик дуккакли ўтларининг маҳсулдорлиги ва чўлга айланишга қарши кураш» (2003-2006).

**Тадқиқотнинг мақсади** *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган ассоциатив ва ксерофит дуккакли ўсимликлар туганак бактерияларини ажратиш, уларнинг морфологик-культурал ҳамда физиологик-биокимёвий хусусиятларини, ассоциатив ва дуккакли-ризобиал симбиозини, уларнинг бошоқли дон ва дуккакли ўсимликларнинг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигига таъсирини аниқлаш.

**Тадқиқотнинг вазифалари** куйидагилардан иборат:

*Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактерияларнинг маҳаллий штаммларини ажратиш, уларнинг морфологик-культурал ва физиологик-биокимёвий хусусиятларини ўрганиш, 16S рРНК гени ёрдамида таксономик ҳолатини таҳлил қилиш ва плазмид таркибини аниқлаш, *Azospirillum* бактерияларнинг молекуляр азотни ўзлаштириш қобилиятини ва уларни шўрланган шароитда тупроқни молекуляр азот ўзлаштириш потенциалга қўшган ҳиссасини аниқлаш;

*Azospirillum* бактерияларининг ассоциатив симбиоз ҳосил қилиши ва унинг қишлоқ хўжалиги ўсимликларининг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигига таъсирини ўрганиш;

*A. conollyi*, *A. villosimus* ва *A. unifoliolatus* ксерофит дуккакли ўсимликлари туганак бактериялари штаммларини ажратиш ва уларнинг морфологик-культурал ва физиологик-биокимёвий хусусиятларини ўрганиш, ажратиб олинган туганак бактерияларининг симбиотик хусусиятларини аниқлаш, скрининг натижасида юқори самарадор штаммларни танлаш ва 16S рРНК гени асосида уларнинг филогениясини тузиш;

чўл дуккакли ўсимликлари симбиозининг ўсиши ва ривожланишига шўрланиш ва қурғоқчиликнинг таъсири тадқиқоти, бактериялар ва туганакларнинг ёруғлик ва электрон микроскопиясини ўтказиш, ўсимликлар ва уларнинг туганак бактериялари глутаминсинтетазасини ўрганиш;

кўп йиллик дуккакли ўтлар *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* туганак бактерияларини ажратиш ва уларнинг морфологик - культурал, физиологик-биокимёвий ва симбиотик хусусиятларини ўрганиш; уларнинг молекуляр-генетик таҳлилини ўтказиш, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсиши ва ривожланишига стресс омилларнинг (шўрланиш, қурғоқчилик) таъсирини ўрганиш ва шўрланиш шароитида ўсимликлар ва туганак бактерияларнинг альдегидоксидаза ва ксантиндегидрогеназа ферментларини ўрганиш;



*Azospirillum* авлодига масуб бўлган бактериялар маҳаллий штаммлари ва *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* туганак бактерияларининг ассоциатив ва дуккаккли-ризобиал симбиотик самарадорлигини чўл шароити дала тажрибаларида қиёсий баҳолаш.

**Тадқиқотнинг объекти** бўлиб дон бошоқли ўсимликлардан ажратилган *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактерияларнинг маҳаллий штаммлари ва *Ammodendron conollyi*, *Astragalus villossimus* ва *Astragalus unifoliolatus* чўл дуккаккли ўсимликларидан, *Onobrychis transcaucasica* ва *Onobrychis chorassanica* кўп йиллик дуккаккли ўтларидан ажратиб олинган туганак бактериялари ҳисобланади.

**Тадқиқотнинг предмети.** Ўзбекистон шароитида ассоциатив ва дуккаккли-ризобиал симбиозининг дон бошоқли ва ксерофит чўл дуккаккли ўсимликларининг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигидаги роли.

**Тадқиқотнинг усуллари.** Тадқиқотларни бажариш жараёнларида микробиологик, физиологик, биокимёвий, молекуляр-генетик, филогенетик ва агрономик усуллар қўлланилди.

**Диссертация тадқиқотларининг илмий янгилиги** қуйидагилардан иборат:

илк бор Ўзбекистонда буғдой, маккажўхори, шоли илдизи юзасидан ва уларнинг ризосферасидан *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган молекуляр азотни ўзлаштирувчи ассоциатив бактерияларнинг маҳаллий штаммлари ажратилган, морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий хусусиятлари ва молекуляр-генетик таксономияси асосида ажратиб олинган бактерияларнинг (*Azospirillum* авлодига, *A. brasilense* ва *A. lipoferum* турларига хос) систематик ҳолати аниқланган;

илк бор буғдой илдизи юзасидан иккита янги бактерия турлари *Azospirillum* sp.A13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) *Azospirillum* sp.C10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) ажратиб олинган ва аниқланган;

биринчи марта буғдой ва шоли уруғлари *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган ассоциатив бактериялар билан ишлов берилганда буғдой илдизида пара-туганакларнинг ҳосил бўлиши аниқланган, шоли ўсимлиги илдизи ён тукларининг кучли ўсиши ва кўп сонли бўлиши исботланган;

илк бор *Azospirillum* авлодига хос бўлган бактериялар бир хужайрали яшил сувўти *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 билан ассоциатив симбиоз ҳосил қилишини аниқлаш усули яратилган;

илк бор *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* туганакларидан туганак бактериялар ажратилган;

биринчи марта *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимликларининг туганакларида *Rhizobium*, *Sinorhizobium* авлодларига мансуб туганак бактериялари билан бир қаторда, ўсимлик илдизларида биологик азотни ўзлаштирувчи бошқа синф авлодлари *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*), *Gammproteobacteria* (*Enterobacter*, *Pantoea*) турлари борлиги аниқланган;

*A. conollyi*, *A. villossimus* ва *A. unifoliolatus* ўсимликларининг *Rhizobium* sp. AC1-1, AV3 ва AU3-1, AU30-1 штаммлари билан бўлган дуккакли – ризобиал симбиози ўсимликларнинг NaCl нинг 200 дан 300 мМ гача шўрланишига адаптациясини кучайтирган, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимликларини *Rhizobium* sp. OT111, OT117 ва OC107, OC109 штаммлари билан ишлов берилганда шўрланишга бўлган чидамлилиқ 150 мМ кўтарилган, шу билан бир қаторда *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимликларида элементларнинг (Na, Mg, Fe, Ca, P, K) аккумуляция бўлиши кўрсатилган;

*A. conollyi*, *A. villossimus* ва *A. unifoliolatus* ўсимликларининг дуккакли-ризобиал симбиоз нормал ўсиши ва ривожланиши учун 6,41% тупроқ намлиги ва *O. transcaucasica*, *O. chorassanica* учун 8,65 % ли намлик етарли экани аниқланган;

бактериялар ва ўсимликларнинг глутаминсинтетаза, альдегидоксидаза ва ксантиндегидрогеназа ферментларининг фаоллиги ўстириш шароитларига боғлиқлиги кўрсатилган.

**Тадқиқотнинг амалий натижалари** қуйидагилардан иборат:

*Azospirillum* авлодига мансуб бактериялар ва *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica* ксерофит дуккакли ўсимликларнинг турлича шўрланишга чидамли туганак бактерияларнинг коллекцияси яратилган;

*A. brasilense* A1-3 ва *A. brasilense* A13-6 штаммларининг буғдой илдизида пара-туганаклар ҳосил қилишининг илмий-амалий жихатдан аҳамияти катта бўлиб, келажакда дон бошоқли ўсимликларда дуккакли ўсимликлар сингари ўзини-ўзи атмосфера азоти билан таъминлайдиган туганаклар ҳосил қилиши мумкинлиги аниқланган ва *A. brasilense* A1-3, A13-6 ва *A. lipoferum* C1-1; C2, C3-3 штаммларни қишлоқ хўжалигида дон бошоқли ўсимликларни ҳосилдорлигини оширишда фойдаланиш мумкинлиги кўрсатилган;

олинган натижалар дуккакли ўсимликларда туганак ҳосил бўлиши ҳақидаги билимларимизни кенгайтиради, шу жумладан табиатда дуккакли ўсимликлар биологик азотни ўзлаштирувчи туганакларни фақатгина альфапротеобактерияларгина (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*) эмас, балки беттапротеобактериялар (*Burkholderia*, *Achromobacter*), гаммапротеобактериялар (*Enterobacter*, *Panoea*) вакиллари ҳам ҳосил қилиши кўрсатилган;

туганак бактерияларнинг самарадор симбиози дуккакли ўсимлик-хўжайинни 150 дан 300 мМ гача бўлган NaCl ли шўрланишга чидамлилигини оширган. *Onobrychis transcaucasica* дуккакли-ризобиал симбиози мўътадил шўрланган суғориладиган ерлар унумдорлигини қайта тикланишида беда ўсимлигига альтернатив ўсимлик сифатида қўллаш мумкинлиги кўрсатилган;

олинган натижалар мажмуи Ўзбекистон чўлларида уч қатламли «Ўрмон – ўтлоқ» яшил зоналар яратиш учун асос яратди, бу эса чўл тупроқларини биологик азотга бойитади, чўлга айланиш жараёнини олдини олишда қўллаш мумкин.

**Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги** барча рақамлар билан кўрсатилган физиологик, биокимёвий ва агрономик тадқиқотлар маълумотлари замонавий компьютер технологияларининг қўлланилишига асосланган.

**Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти.**

Олинган натижаларнинг илмий янгилиги қуйидагиларни ўз ичига олади, яъни яратилган ўсимлик-микроб ассоциацияси ўзига хос табиий экологик адаптацияга эга бўлиб, шўрланган суғориладиган ерлар ва чўл зоналари унумдорлигини оширишда қўлланиши мумкин. Шўрланиш ва чўлга айланишга қарши курашиш бўйича туғилган масалалар, турли стрессларга чидамли ўз-ўзини қайта тикловчи фойдали микроорганизмлар (азоспириллар ва туганак бактериялар) ассоциациясини натижасида ечилиши мумкин, яъни улар шўрланган тупроқларни биологик азот ва фосфор билан бойитади, фитогормонлар синтез қилиши ҳисобига ўсимликлар илдизларнинг ривожланишини ва озиқланишини яхшилайдди.

Ишнинг амалий аҳамияти қуйидагиларни ўз ичига олаган бўлиб, олинган фундаментал натижаларни Республикамиз қишлоқ хўжалигида мавжуд бўлган муаммоларни ечишда, тупроқ ва ўсимликларга комплекс таъсир этиши билан ажралиб турадиган, шубҳасиз, мажмуида шўрланган суғориладиган тупроқларнинг унумдорлигини қайта тиклайдиган, қишлоқ хўжалиги экинларини шўрланишга бўлган чидамлилигини ва ҳосилдорлигини ошира оладиган янги, самарадор, экологик тоза биопрепаратларнинг янги авлодларини тайёрлаш ва қўллаш мумкин.

**Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши.** Кўп йиллик чўл дуккакли ўсимликлар уруғларини ундириш, ундирилган ўсимлик ўсимталарини *Azospirillum* ва туганак бактериялар билан ишлов бериш, вегетацион ва чўл шароити дала тажрибаларда ўсимликларни ўстиришнинг янги усуллари УНТЦ №Р-225 «Қумни турғунлаштириш техникасини ўрганиш» (2005–2008) халқаро лойиҳасида чўл шароитида ўсимликларни самарали униб чиқишида қўлланилган. Унинг натижаси ўсимлик уруғларининг униб чиқиши 90–95 фоизни ташкил этган (табиий шароитда 5–10 фоиз ташкил этади) ҳамда вегетацион ва чўл дала тажрибаларида ўстирилган ўсимликлар 4 ойда табиий шароитда ўсган 2–3 йиллик ўсимликларга тенглашгани аниқланган (Фан ва технологияларни ривожлантиришни мувофиқлаштириш қўмитасининг 2015 йил 22 майдаги ФТК-0213/350-сон маълумотномаси);

*Azospirillum brasilense* A13-6 бактерияси асосида яратилган «Azos-Uz» биопрепарати амалиётга жорий этилган, жумладан, Дон ва дуккакли экинлар илмий-тадқиқот институти илмий-тажриба станциясида 8 гектар шоли майдони ва Бухоро вилояти, фермер хўжаликларида буғдой майдонига жорий қилинган. Буғдой ҳосилдорлиги 6% га ва шоли ҳосилдорлиги эса 6,2% га ошган (Ўзбекистон Республикаси Қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлигининг 2015 йил 8 июндаги 02/20-502-сонли маълумотномаси).

**Тадқиқот натижаларининг апробацияси.** Тадқиқот ишининг асосий натижалари 20 та илмий-амалий конференцияларда, шу жумладан, 12 та

халқаро симпозиумлар, конгресслар, конференцияларда, яъни «5<sup>th</sup> International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation» (Luso, Portugal, 1998); «X<sup>th</sup> Congress of Bacteriology and Applied Microbiology» (Paris, France, 2002); «International Congress Rhizosphere, Perspectives and Challenges – A Tribute to Lorenz Hiltner» (Munich, Germany, 2004); «Биотехнология микробов» (Москва, Россия, 2004); Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». (Москва, Россия, 2009); «9<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference» (Geneva, Switzerland, 2010); «Биология наука XXI века» (Пушино, Россия, 2012). «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков» (Новосибирск, Россия, 2014) ва 6 та Республика конференцияларида, қисман, «Замонавий микробиология ва биотехнология муаммолари» (Тошкент, 2003); «Ўзбекистон микробиологлари III съезди» (Тошкент, 2005); «Ўзбекистон микробиологлари IV съезди» (Тошкент, 2008); «Ўзбекистон микробиологлари V-съезди» (Тошкент, 2012).

**Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши.** Диссертация ишининг асосий мазмуни 38 та илмий ишларда ифодаланган, шу жумладан, 18 та мақола илмий журналларда, улардан 4 таси халқаро нашрларда, 20 та тезислар маҳаллий ва хорижий конференция ва конгресс материалларида эълон қилинган.

**Диссертациянинг ҳажми ва тузилиши.** Диссертация иши кириш қисми ва 6 та боб, хулоса, адабиётлар рўйхати ва 204 та саҳифадан иборат бўлиб, 48 та расм ва 31 та жадвални ўз ичига олади.

## ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

**Кириш қисмида** диссертация ишининг долзарблиги, тадқиқотнинг мақсад ва вазифалари аниқланган, ишнинг илмий ва амалий аҳамияти кўрсатилган, химояга олиб чиқиладиган асосий ҳолатлар аниқланган.

Диссертация ишининг **биринчи бобида** *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактерияларнинг тарқалиши ва систематикаси, ассоциатив симбиозларнинг ҳосил бўлиши, *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактерияларнинг ўсимликларнинг ўсиши, ривожланиши ва ҳосилдорлигига таъсири, туганак бактериялар ва дуккакли ўсимликлар систематикаси, дуккакли-ризобиал симбиознинг ҳосил бўлиши, молекуляр азотни ўзлаштириш биокимёси ва ризосфера бактерияларининг шўрланиш шароитларига осмоадаптациясининг замонавий ҳолати кенг ёритилган.

**Иккинчи бобда** *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактериялар ва туганак бактериялар тадқиқотларининг куйидаги усуллари кўрсатиб ўтилган: бактерияларни ажратиш, ўстириш, морфологик-культурал ва физиологик-биокимёвий хусусиятларини ўрганиш, 16S рРНК генининг таҳлили, плазмидаларни аниқлаш, бактериялар филогенияси, электрон микроскоп, молекуляр азотни ўзлаштириш фаоллигини ва индолил-3-сирка кислотасини аниқлаш, глутаминсинтетаза, альдегидоксидаза, ксантиндегидрогеназа ферментларини ўрганиш, ҳамда шўрланиш ва қурғоқчиликка бўлган

чидамлилигини аниқлаш усуллари ва микровегетацион, вегетацион ва дала тажрибаларини ўтказиш.

**Диссертациянинг учинчи боби** *Azospirillum* авлодига мансуб ассоциатив бактерияларга бағишланган.

Илк бор Ўзбекистон Республикасининг суғориладиган ерларда ўсган буғдой, шоли, маккажўхори илдизлари юзасидан ва ризосферасидан *Azospirillum* авлодига мансуб 100 та культура ажратиб олинди ва бактериологик тозаланди. Бактерияларни картошка экстракти агарли озуқа мухитида ўстирилганда пайдо бўлган колониялар белгилари *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган бактериялар белгилари таърифига мос тушди. Бактериялар 28°C температурада 2-3 кун давомида ўстирилганида ярим тиник, метал сифат ялтирашли, маркази қуюқлашган, доира шаклида, диаметри 2-3 мм бўлган колониялар шакилланди. Азоспирил изолятлари ҳужайраларининг морфологик белгилари бир-бирига ўхшаш бўлиб: калта, бир оз эгилган ва монополяр ёки биполяр монотрихал хивчинларга эга эканлиги аниқланди.

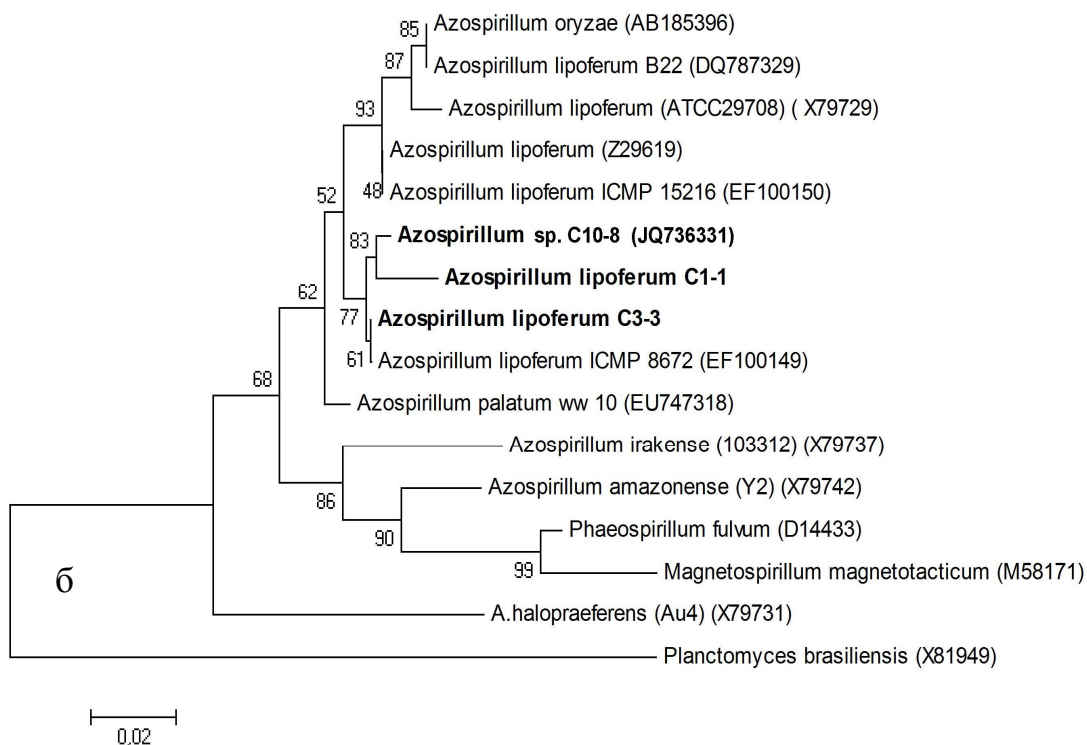
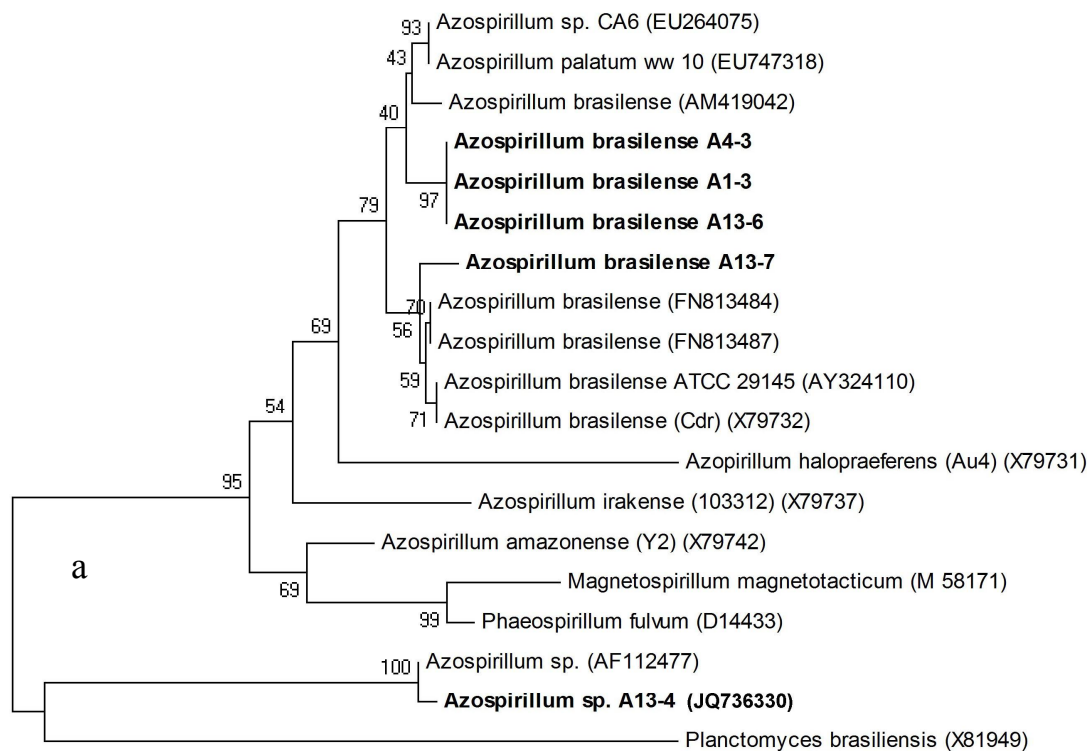
Бактериялар плазмидаларининг таркибини 0,4% агароза гелида ўрганилганда, молекуляр оғирлиги 90, 120 МДа ва 2 та 300 МДа дан юқори бўлган мегаплазмидалар борлиги аниқланди.

Фенотипик ўзига хослиги асосида олинган таксономик натижаларни яна бир бор тасдиқлаш учун бактерияларни 16S рРНК гени усули орқали текширилди. Бактериялар 16S рРНК гени нуклеотидлари кетма-кетлигини BLAST анализ орқали қиёсий ўрганилганда А1-3, А4-1, А13-6 бактериялар 97% *Azospirillum brasilense* (AM419042) га ўхшашлиги кўрсатилди. Бактерия С3-3 98% *Azospirillum lipoferum* ICMP 8672 (EF100149) га айнан ўхшаш эканлиги аниқланди.

*A. brasilense* турига тааллуқли бўлган бактериялар шожара дарахтда 3 та кластерни (гуруҳни) ҳосил қилди (расм 1 а). Биринчи кластер таркибига *A. brasilense* А1-3, А4-1, А13-6, иккинчи ва учинчи кластерда мос равишда А13-7 ва А13-4 штаммлар жойлашган. *A. lipoferum* С1-1, С3-3, С10-8 штаммлар шожара дарахтда ягона шохланган кластерни ҳосил қилди (расм 1 б). Миллий Биотехнология Маълумотлар Маркази (NCBI, USA) GenBank тасдиқлаши бўйича *Azospirillum* бактериясининг 2 та янги тури: *Azospirillum* sp. А13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) ва *Azospirillum* sp. С10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) аниқланди.

Олиб борилган тадқиқотлар асосида ассоциатив бактериялар *Alphaproteobacteria* синфига, *Rhodospirillales* тартибига, *Rhodospirillaceae* оиласига, *Azospirillum* авлодига, *A. brasilense* (А1-3, А4-3, А13-1, А13-5, А13-6, А13-7), *A. lipoferum* (С1-1, С2, 3-3, С4-3, С6-1, С7-1, С11-3) турларига тааллуқли эканлиги аниқланди.

Бактерияларнинг атмосфера молекуляр азотни ўзлаштириш фаоллиги (500 - 4200 нмоль С<sub>2</sub>Н<sub>4</sub>/флакон/кун) микроаэрофил шароитда кетиши кўрсатилди. Бактерияларнинг 200 мМ NaCl ли шўрланишда молекуляр азотни ўзлаштириш фаоллиги бошланғич фаолликка нисбатан 22-40% камайиши аниқланди. Таркибида 150 мМ NaCl тутган стерил бўлмаган



**1-расм. *Azospirillum brasilense* (a) и *Azospirillum lipoferum* (б) штамларининг шожара дарахти 16S рРНК гени тадқиқотлари натижаларига асосланган. Шохланган шожара дарахти “қўшнининг боғланиш” усули орқали яратилган. GenBank намуналари тартиб рақамлари қавис ичида кўрсатилган.**

тупроққа *A. brasilense* A1-3 суспензияси кўшилганда тупроқнинг потенциал молекуляр азот ўзлаштириш фаоллиги (900 мкМ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/флаконт/соат) стерил бўлган тупроққа нисбатан (160 мкМ C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/флаконт/соат) 5 баробар юқори бўлиши аниқланди.

*Azospirillum* бактерияларининг шўрланиш шароитида азотни ўзлаштириш хусусиятининг сақланиши, яшаш муҳити сув потенциалининг ўзгаришига жавоб тариқасида намоён бўлади.

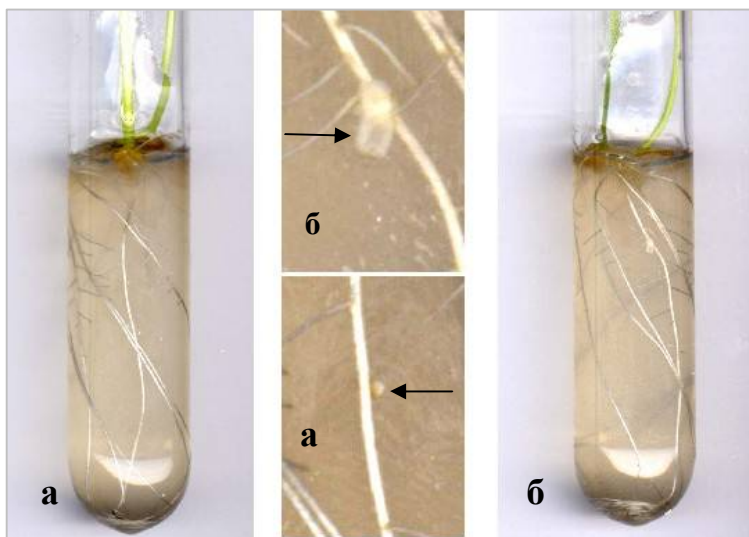
Стерил микровегетацион тажрибаларда «Унумдор буғдой» навини *A. brasilense* A1-3, A13-6, A13-7, *A. lipoferum* C2, C4-3, C7-1 штаммлари билан ишлов берилганда ўсимликлар биомассаси назорат ўсимликлар биомассасига нисбатан 20-38% га ва «Карлик 85» буғдой навининг биомассаси эса 19,6-63% га ошиши аниқланди. Ассоциатив симбиознинг «азоспирилл-буғдой» молекуляр азотни ўзлаштириш фаоллиги диапазони 45 дан 370 гача нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ўсимлик/кун ташкил қилди. Бу тажриба ўтказилаётган вақтда *A. brasilense* A1-3 ва A13-6 штаммлари билан ишлов берилган «Унумдор буғдой» ўсимликлари илдизида спонтан ҳолатда 1,0-1,5 мм ўлчамда паратуганаклар ҳосил бўлиши кузатилди (2-расм). Бундай жараён дуккакли бўлмаган ўсимликлар учун ноёб ҳодиса бўлиб ҳисобланади. Шу сабабли, бу ҳодисани аниқлаштириш мақсадида махсус тажриба қўйилди, яъни «Унумдор буғдой» нави уруғлари *A. brasilense* A1-3 ва A13-6 штаммлари билан ишлов берилиб 28°C температурада 3 кун мобайнида стерил шароитда ўстирилди. Тажриба натижаларига кўра, 25-30% буғдой ўсимталари илдизида 1-2 дан паратуганаклар ҳосил бўлиши кузатилди. Олинган натижалар ишончли даражада шуни кўрсатдики, буғдой илдизида туганакларнинг ҳосил бўлиши тасодифий ҳолат бўлмай, балки *A. brasilense* A1-3 ва A13-6 штаммларининг буғдой ўсимлиги билан бўлган ўзаро табиий муносабатининг натижаси эканлиги аниқланди.

«Авангард» шоли нави ўсимталари *A. brasilense* A1-3, A13-4, A13-5, A13-6, A13-7 и *A. lipoferum* C1-1; C2-2; C4-3; C10-4; C10-8; C11-5 штаммлари билан ишлов берилганда ўсимликлар биомассаси назорат ўсимликларга нисбатан 10-46,9% га ошиши аниқланди.

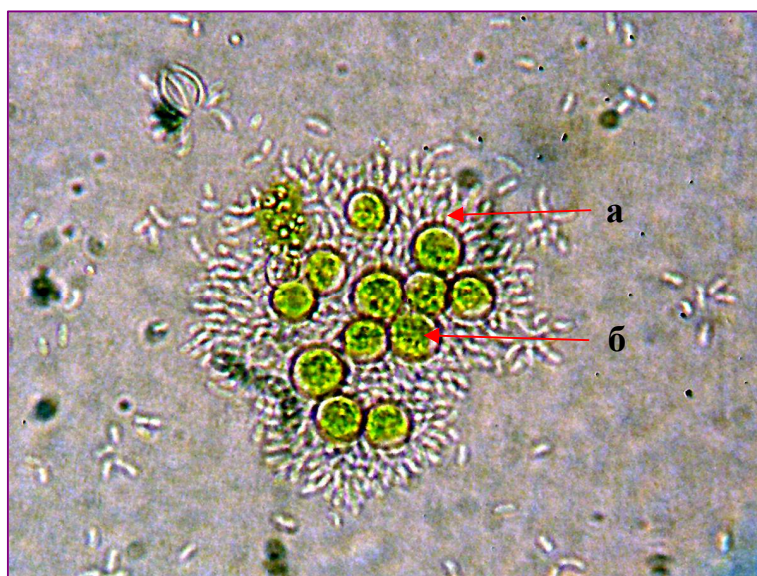
Илк бор *A. brasilense* A13-6 бактерияси бир хужайрали яшил сув ўти *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 билан ассоциатив симбиоз ҳосил қилиш модели лаборатория шароитида *in situ* кузатилди (3-расм) <https://www.youtube.com/watch?v=eTz6An1P7ro> .

Углерод манбаи сифатида таркибида триптофан тутган суяқ озуқа муҳитида *Azospirillum* штаммлари ўстирилганда, культурал суяқликда индолил-3-сирка кислотасининг синтези кучайиб 0,7-5 мг/л ни ташкил қилди.

Таркибида 50 мМ дан 250 мМ гача NaCl тутган ярим суяқ азотсиз Доберейнер озуқа муҳитида C10-8 штамми 3 кун довомида ўстирилганда батериал “доира” ҳосил қилиб кислород миқдори кам бўлган томонга ҳаракат қилиши кузатилди, яъни батериал “доира” нинг ҳаракати озуқа муҳитидаги кислород миқдори градиентига боғлиқлиги аниқланди. Бактерияларнинг кучли хемотаксис хусусияти асосан органик дикарбон кислоталарига нисбатан кузатилди.



2 -расм. *A. brasilense* A13-3 (а) и A13-6 (б) штаммлари билан “Унумдор буғдой” навиға ишлов берилганда буғдой илдизида пара-туганакларнинг ҳосил бўлиши. Пара-туганаклар стрелка билан кўрсатилган.



3-расм. *A. brasilense* A13-6 (а) ва *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 (б) ўртасида ҳосил бўлган ассоциатив симбиоз модели.

«Авангард» шоли ва «Старшина» буғдой навларини *A. brasilense* A13-6 бактерияси асосида яратилган «Azos-Uz» биопрепарати билан ишлов бериб ўтказилган саноат-синов тажрибалар дон бошоқли экинлар ҳосилдорлигини сезиларли даражада ошишига олиб келди. «Авангард» шоли нави «Azos-Uz» биопрепарати билан ишлов берилганда ҳосилдорлик 6,2 % ошиб 780000 сўм/га иқтисодий самарадорликга эришилди. «Старшина» буғдой нави ҳосилдорлиги эса 6% ошиб даромад 250000 сўм/га иқтисодий самарадорликга эришилди.

Олинган натижалар асосида, фаол ассоциатив симбиоз ҳосил қилувчи, *Azospirillum* авлодига мансуб маҳаллий штаммлар билан Ўзбекистонда етиштириладиган турли дон бошоқли экинлар уруғликларини экишдан олдин ишлов беришга тавсия этиш мумкин.

Диссертациянинг тўртинчи бобида чўл ксерофит дуккакли ўсимликлари, жумладан дарахт *Ammodendron conollyi*, бута *Astragalus villosimus* ва бутасимон *Astragalus unifoliolatus* туганак бактерияларнинг тадқиқотлари натижалари келтирилган.

Илмий тадқиқот ишлари Қизил-Қум чўли табиий шароитда ўсган



ксерофит дуккакли ўсимликлар туганакларини излаб топиш ва уларни йиғишдан бошланди.

Ўсимликлар туганакларидан 150 та туганак бактерияларнинг изолятлари ажратиб олинди. *A. villossimus* туганак бактерия изолятлари (AV) асосан тез ўсувчи бактериялар ва *A. conollyi* (AC), *A. unifoliolatus* (AU) ўсимликларнинг туганак бактериялари тез, ҳамда секин ўсувчи бактериялардан ташкил топди. Бактерияларнинг бўлиниб кўпайиш вақти 20-45 минутга тенг бўлиб, ўсиш температура диапазони 12-40°C ни ташкил қилди. Оптимал ўсиш температураси 28°C га тенг бўлиши аниқланди. Электрон-микроскопик тақиқотлар натижасида бактериялар монополяр, монотрихиял, таёқчасимон шаклга эга бўлган бактериялар эканлиги аниқланди.

Дуккакли ўсимликлар уруғларини ундириш учун оптимал усуллар қўлланди, яъни уруғларни сульфат кислотасида ишлов берилиши ва стерил шароитда уруғларнинг илдиз қисмини скарификация қилиниши, уруғларни 90-95% униб чиқишини таъминлади.

Туганак бактерияларнинг дуккакли-ризобиял симбиоз жараёни вегетацион тажрибаларда ўрганилди. Ўсимликларни икки ой мобайнида ўстирилганда ҳар бир вариант ўсимликлари илдизида туганак ҳосил бўлиши кузатилди (1- жадвал). *A. conollyi* туганаклари тўқ пушти рангли бўлиб, туганак диаметри 7 мм гача бўлиши кузатилди. *A. conollyi* ўсимлигининг юқори молекуляр азот ўзлаштириш фаоллиги (4,77-6,91 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ўсимлик /соат) *A. conollyi* туганакларидан ажратилган AC1-1, AC2, AC12-1, AC18-1, AC21 туганак бактериялар билан ишлов берилганда кузатилди. *A. conollyi* ўсимлигида самарадор дуккакли-ризобиял симбиоз AC1-1, AC8-1, AC11, AC12-1, AC18-1, AV1, AV8-1, AV9-1, AV30 туганак бактериялар билан ишлов берилганда кузатилди ва ўсимликларнинг ер устки биомассаси назорат ўсимлик биомассасига нисбатан 43-68,8% га ошиши аниқланди (1 жадвал). *Astragalus villossimus* симбиозининг атмосфера азотини ўзлаштириш фаоллиги AV15, AV36-1, AC8-1, AC11, туганак бактериялар билан ишлов берилганда юқори бўлди (3,04-5,64 нмоль C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ўсимлик/соат) ва AV1, AV3, AV8-1, AV9, AC8-1 туганак бактерияларининг симбиоз самарадорлиги назорат ўсимлик биомассасига нисбатан 21,5-28,4 % га ошганлиги аниқланди. *A. unifoliolatus* ўсимлигида фаол симбиоз самарадорлиги ўзининг туганак бактериялари AU23, AU28, AU30-1 ва *A. villossimus* туганак бактериялари (AV1, AV2, AV6-1, AV8-1 и AV9-1) билан ишлов берилганда кузатилди.

Шундай қилиб, олинган натижалар асосида хулоса қилиш мумкинки, табиий танланиш жараёнида ксерофит дуккакли ўсимликлар фавқулодда чўл шароитга мослашган бўлиб, бу хусусият вегетацион тажрибаларда *A. conollyi*, *A. villosissimus*, *A. unifoliolatus* ўсимликларини ўсиши, ривожланиши ва туганак ҳосил қилиши учун табиий шароитга яқин шароитни талаб қилишида аниқланди.

Туганак бактериялар ва дуккакли ўсимликларнинг глутаминситаза (ГС) ферментини ўрганиш шуни кўрсатдики, туганак бактерияларда фақат битта глутаминситаза формаси ва ўсимликларда эса 2 та формаси (ГС<sub>1</sub>, ГС<sub>2</sub>) борлиги аниқланиб, уларни электрофоретик ҳаракати ва

**Вегетацион тажрибаларда ксерофит чўл дуккакли ўсимликлар туганак бактерияларининг симбиотик хусусиятларини аниқлаш**

<i>Ammodendron conollyi</i>				<i>Astragalus villosissimus</i>				<i>Astragalus unifoliolatus</i>			
Туганак бактериялар	Ўртача туганак. сони 1та ўсимлик.	АРФ нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ўсимлик /соат	Симбиоз самарадорлиги, %	Туганак бактериялар	Ўртача туганак. сони 1та ўсм.	АРФ нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ўсимлик /соат	Симбиоз самарадорлиги, %	Туганак бактериялар	Ўртача туганак. сони 1та ўсм.	АРФ нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ўсимлик /соат	Симбиоз самарадорлиги, %
АС1-1	5±2,64	6,91±0,44*	147,7	AV1	18±2,16	1,72±0,99	121,5	AU2-1	19±2,0	0,47±0,21	62,5
АС2	5±3,0	5,59±0,25*	108,9	AV2	17±2,16	2,52±0,73*	102,5	AU3-1	41±5,29	3,33±0,96*	103,5
АС4-1	2±1,73	2,81±0,63	98,5	AV3	18±3,26	2,95±0,77*	122,4	AU4	19±4,58	1,5±0,51	62,5
АС8-1	3±1,0	2,5±0,43	143,2	AV6-1	5±1,0	0,61±0,27	95,6	AU7	19±2,64	1,44±0,78	65,1
АС11	4±1,0	2,34±0,19*	158,2	AV8-1	11±2,0	0,73±0,35	122,4	AU17-1	20±7,54	1,81±0,71*	116,0
АС12-1	5±3,0	6,91±0,32*	143,2	AV9	25±10,0	2,87±0,55*	123,2	AU20-1	23±4,58	1,58±0,45	109,8
АС13-1	3±1,0	2,82±0,63	108,9	AV9-1	10±1,63	1,31±0,65	106,8	AU23	32±8,54	4,02±0,52*	136,6
АС15	4±1,73	3,2±0,75	89,7	AV26-1	17±2,64	1,93±0,86*	104,3	AU28	24±6,55	1,87±0,68	136,6
АС18-1	4±2,64	4,67±0,38*	147,7	AV30	19±3,26	2,25±0,68	99,1	AU30-1	20±2,64	4,15±0,92*	151,7
АС21	5±1,0	4,67±0,67*	119,4	AV36-1	20±2,64	3,13±0,99*	114,6	AU30-2	21±3,46	1,42±0,64	121,4
AV1	4±1,0	4,77±0,57*	153,7	АС8-1	15±5,29	5,64±0,78*	128,4	AV1	32±4,35	4,41±0,99*	151,7
AV3	2±1,0	2,0±0,55*	134,3	АС11	20±3,6	3,04±0,85	114,6	AV2	35±5,29	3,07±0,4*	139,2
AV6-1	4±1,73	3,93±0,45*	132,8	АС15	29±5,29	5,44±0,91*	111,2	AV3	27±4,0	3,26±0,45*	116,0
AV8-1	4±2,64	2,43±0,7	150,7	АС21	15±4,0	0,7±0,44	121,5	AV6-1	28±4,0	2,46±0,41*	154,4
AV9	1±0,0	1,24±0,32	134,3	АС1-1	10±5,0	1,19±0,61	94,8	AV8-1	35±9,84	4,66±0,68*	157,1
AV9-1	3±1,0	1,77±0,39	168,6	AU17-1	12±5,56	0,86±0,47	103,4	AV9	26±3,6	2,77±0,24	125,0
AV30	3±1,0	3,03±0,79*	140,2	AU30-1	18±5,0	1,42±0,69	80,1	AV9-1	25±6,08	3,54±0,54*	145,5
Назорат	-	-	100	Назорат	-	-	100	Назорат	-	-	100

Изоҳ: \* - аҳамиятга эга фарқ (P<0,05), такрорланиш n = 3, АРФ – ацетилен- редуктаза фаоллиги, АС- *Ammodendron conollyi* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар; AV- *Astragalus villosissimus* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар; AU - *Astragalus unifoliolatus* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар

баъзи физико-кимёвий хусусиятлари юзасидан бир-биридан фарқ қилиши аниқланди. Туганак бактерияларнинг глутаминситетаза ферменти симбиоз жараёнида иштирок этиши аниқланган.

Самарали туганак бактерияларда (AC15, AV1, AV3, AV8-1, AV9, AV9-1) молекула оғирлиги 118, 370 ва 515 Кб бўлган учта плазмида борлиги аниқланди.

Юқори миқдорда меланин ҳосил бўлиши AU30-1, AV30 штаммларда ва оз миқдорда AC11, AU17-1, AU30-2, AV1 ва AV6-1 штаммларда кузатилди.

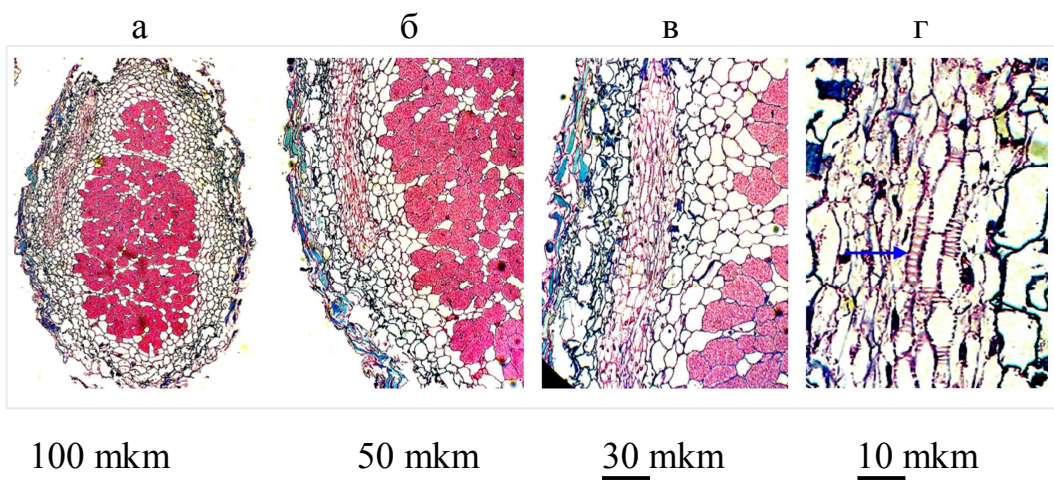
AC1-1, AC8-1, AC21, AV1, AV3, AU3-1, AV8-1, AV9, AU30-1 штаммлари 16S рРНК генининг нуклеотид кетма-кетлиги қиёсий BLAST (NCBI) анализи натижаларига кўра *Rhizobium* sp. GGNM 66 (EF420109) гени билан 97% га ўхшаш экан. AC15, AU17-1, AU30-2, AU7 бактерияларнинг гени *Burkholderia cepacia* NBRAJG97 гени билан 97% мос тушди. AC11 ва AV6-1 бактериялари эса *Achromobacter xylosoxidans* (FM163487) бактерияси билан 98% га ўхшаш эканлиги аниқланди.

Ўранилаётган бактерияларнинг 16S рРНК гени натижалари асосида яратилган шожара дарахти 4 та гуруҳни ташкил қилди: AU7 штамм 1 чи гуруҳни, AC11 ва AV6-1 штаммлар 2 чи гуруҳни, AC15, AU17-1, AU30-2 бактериялар 3 чи гуруҳни ва AC1-1, AC8-1, AC21, AV1, AV3, AV8-1, AV9, AU3-1, AU30-1 штаммлар 4 чи катта гуруҳни ташкил қилди.

Шундай қилиб олинган натижалар асосида ҳулоса қилиш мумкинки, ўрганилаётган бактерияларнинг 16S рРНК генларининг ўзаро ўхшашлиги гуруҳлар ичида юқори бўлиб, *Alphaproteobacteria* (*Rhizobium*) ва *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*) синфларга тааллуқли эканлиги аниқланди.

*A. conollyi* ўсимлиги *Rhizobium* sp. AC1-1 билан инокуляция қилинганда ўсимликни шўрланишга бўлган чидамлилиги 300 мМ NaCl гача ошди ва ўсимликнинг биомассаси назорат ўсимлик биомассасига нибатан 6,6% га камайиши кузатилди. *A. vilosissimus* ўсимлигининг *Rhizobium* sp. AV3 билан бўлган дуккакли-ризобиал симбиози ўсимликни 200 мМ гача бўлган шўрланишга чидамлилигини ва симбиоз самарадорлигини 4,4% оширди. *A. unifoliolatus* ўсимлигини *Rhizobium* sp. AU3-1 штамми билан бўлган симбиози ҳам ўсимликни 200 мМ NaCl гача бўлган шўрланишга чидамлилигини оширди. 300 мМ NaCl ли шўрланиш шароитида ҳам ўсимликлар илдизда туганаклар ҳосил бўлиши кузатилди.

*A. vilosissimus* ўсимлигининг дифференциал бўялган туганак қирқмалари ҳужайраларда бактерияларнинг шохланиб кетган тўри (қизил ранг) ва бактериал инфекцион ипи маркази ҳосил бўлганлиги кузатилди (4-расм). Бактерияларни кўпайиши натижасида ўсимлик туганаги ҳужайралари ичи туганак бактерияларнинг бактериоидлари билан тўлиши кўрсатилди. *A. conollyi* ўсимлигини самарадор туганак бактериялар AC8-1, AV1, AU30-1 билан ҳосил қилган туганакларининг структураси ўрганиш учун электрон-микроскопик тадқиқотлар ўтказилди. Ўсимлик туганаклари ҳужайралари ичидаги туганак бактерияларнинг бактериоидлари шакли турлича кўринишга, яъни таёқчасимон, тўғноғичсимон, овал, думолоқ ва



**4-расм. *Rhizobium* sp. AV1 штамми билан инокуляция қилинган *A.villossimus* туганаклари қирқмаларини ёруғлик микроскопияси: а, б – туганакнинг узунасига қирқилгани, в – туганак устки қатламидаги бактериал тўр, г –хужайралар ичидаги “нарвон-сифат” инфекция ип (улар стрелка билан кўрсатилган).**

турлича тасодифий шаклларга эга эканлиги кузатилди. Олинган натижалар асосида хулоса қилиш мумкинки, дуккакли-ризобиал симбиоз натижасида туганак бактерияларида ҳам, хўжайин ўсимлик туганаклари хужайраларида ҳам шаклан қайта ўзгариш жараёнлари кечади.

Шундай қилиб, чўл ксерофит дуккакли ўсимликларининг туганак ҳосил қилувчи бактерияларга нисбатан кенг ўзига хослиги, ўсимликларни чўл шароитига эволюцион мослашишининг натижасидир, яъни ўсимликлар чўлнинг экстремал шароитида яшовчи турли синф ва авлодларга мансуб бўлган бактериялар (*Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*) билан атмосфера молекуляр азотни ўзлаштирувчи туганаклар ҳосил қилиши бунинг исботидир.

**Диссертациянинг бешинчи боби** дуккакли кўп йиллик ўт ўсимликлар *Onobrychis transcaucasica* ва *Onobrychis chorassanica* туганак бактерияларини ўрганишга бағишланди.

Табиий шароитда ўсган *Onobrychis* ўсимликлари туганакларидан 110 та туганак бактерия изолятлари ажратиб олинди. Бактерияларни микроскопик ўрганиш шуни кўрсатдики, ўрганилаётган бактериялар типик таёкчасимон бўлиб, уларнинг эни 0,5 - 0,8 ва узунлиги 1-1,5 микронни ташкил қилди. Тез ўсувчи бактерияларнинг колониялари 3-4 кунда ва секин ўсувчи бактерияларнинг колониялари 7-10 кун мобайнида ҳосил бўлди. Уч кунлик колонияларнинг размери 2 - 6 мм ни ташкил қилди. Бактериялар 600 мМ гача NaCl ли шўрланишга чидамли эканлиги аниқланди. Эспарцет бактериялари моно- ва дисахарид, сахароспирт ва аминокислоталарни ўзлаштириш хусусиятларини намоён қилди. Уларни фаол ўсиш муҳити интервали рН 5- 8,5, ўсиш температура диапазони 4°C - 41°C ни ва оптимум температураси 28°C ташкил қилди. Олиб борилган тадқиқотлар натижасида танлаб олинган туганак бактерияларни шартли равишда *Rhizobium* авлодига

киргазилди.

*Onobrychis* ўсимликларининг симбиотик хусусиятларини, яъни хўжайин ўсимликларга нисбатан ўзига ҳослиги, молекуляр азот ўзлаштириш фаоллиги, самарадорлиги ва бошқа хусусиятларини вегетацион тажрибаларда ўрганилди. Тажрибалар натижасида ҳамма вариант ўсимликларида туганаклар ҳосил бўлганлиги кузатилди. *O. transcaucasica* ўсимлиги яшил биомассасининг максимал ортиши (21,2% - 36,1%) ОТ102, ОТ103, ОТ111, ОТ117, ОТ130 ва ОТ139 туганак бактериялари штаммлари билан инокуляция қилинганда кузатилди (2-жадвал). *O. chorassanica* ўсимлигининг юқори симбиотик самарадорлиги ОС104, ОС106, ОС107, ОС109, ОС112 штаммлари билан инокуляция қилинганда аниқланди. Бунда ўсимликни яшил биомассасининг ортиши назорат ўсимликка нисбатан 20,5-34% ни ташкил қилди (жадвал 3). *O. transcaucasica* ўсимлигининг ацетилен-редуктаза фаоллиги 33 - 63 нмолей  $C_2H_4$ /ўсимлик/соат бўлса, *O. chorassanica* 31- 48  $C_2H_4$ /ўсимлик/соат ташкил қилди. Азотфиксация ва самарадорлик ўртасидаги ижобий корреляция *O. transcaucasica* ўсимлигининг ОТ117, ОТ139 туганак бактериялари билан бўлган симбиозда, *O. chorassanica* ўсимлигида эса ОС106, ОС109 бактериялари билан бўлган ишлов берилганда кузатилди. Вегетацион тажрибаларда *O. transcaucasica* 4 та (ОТ102, ОТ103, ОТ117, ОТ121) ва *O. chorassanica* 3 та (ОС104, ОС107, ОС109) юқори фаол штаммлари танлаб олинди, яъни бу штаммлар ўсимликлар яшил биомассасини инокуляция қилинмаган ўсимликларга нисбатан барқарор оширди.

ОТ102, ОТ123, ОТ136, ОТ140, ОС104, ОС107, ОС109 и ОС111 штаммлари 16S рРНК гени нуклеотид кетма-кетлигини қиёсий BLAST (NCBI) анализи шуни кўрсатдики, улар *Rhizobium* sp. EGY2 (AY693662) 16S рРНК генига 99% ўхшаш экан. ОТ114, ОТ124, ОТ148 бактерияларнинг гени *Pantoea agglomerans* GS2 (GQ374474) 99% мос тушди. ОС112 штамми 99% *Burkholderia caryophylli* WAB1944 (AM184283), ОС106 штамми 97% *Pantoea agglomerans* HXJ (HM016799), ОС138 штамми 98% *Enterobacter* sp.RF-100 (GQ205104) ва ОС113 штамми 97% *Enterobacter* sp. B-13M3 (AJ874743) ўхшаш эканлиги аниқланди.

*O. transcaucasica* туганак бактерияларининг 16S рРНК гени нуклеотидлари кетма-кетлиги асосида яратилган шожара дарахти анализ қилинганда ОТ102, ОТ103, ОТ111, ОТ115, ОТ117, ОТ123, ОТ136, ОТ139, ОТ140 бактериялар *Alphaproteobacteria* синфига мансуб эканлиги (биринчи гуруҳ) (расм 5. I а) ва ОТ114, ОТ124, ОТ148 бактериялар эса *Gamma*proteobacteria синфга мансуб эканлиги (иккинчи гуруҳ) аниқланди (расм 5. I в). *O. chorassanica* туганак бактерияларининг филогенетик дарахти учта гуруҳни ташкил қилди.

ОС104, ОС107, ОС109, ОС111 штаммлар *Alphaproteobacteria* (биринчи гуруҳ) синфга мансуб эканлиги (расм 5. II а), ОС112 штамм – *Betaproteobacteria* синфга мансуб иккинчи гуруҳни (расм 5. II б) ва ОС106, ОС103, ОС138 бактериялар – *Gamma*proteobacteria (расм 5. II в) учинчи гуруҳни ташкил қилди.

## 2-жадвал

***O. transcaucasica* ўсимлигини туганак бактериялар билан ишлов берилганда ўсимлик илдизида туганаклар ҳосил бўлиши**

Туганак бактериялар	Ўсимликни ўртача курук биомассаси, мг	Ўсимликда ўртача туганаклар сон	АРФ нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /ўсимлик/соат	Симбиоз самарадорлиги, %
Назорат	81,5 ± 2,14	-	-	100
ОТ102 <sup>(1)</sup>	104,0 ± 3,98*	2,0 ± 1,0	46,0 ± 11,0	127,6
ОТ103	103,0 ± 1,99*	2,3 ± 1,5	48,0 ± 4,58*	126,3
ОТ111	98,8 ± 2,27	1,6 ± 1,15	51,0 ± 10,58	121,2
ОТ114	89,8 ± 5,57	2,6 ± 0,52	49,0 ± 8,18*	110,1
ОТ117	111,0 ± 3,97*	2,6 ± 1,96	59,0 ± 3,0*	136,1
ОТ121	101,0 ± 8,08	10,0 ± 2,64	63,0 ± 8,88	123,9
ОТ123	93,6 ± 6,86	2,3 ± 0,57	51,0 ± 5,6*	114,8
ОТ130	107,0 ± 4,17*	2,3 ± 0,51	33,0 ± 14,17	131,2
ОТ136	102,2 ± 5,38*	3,0 ± 1,0	49,0 ± 4,58*	125,3
ОТ139	103,8 ± 5,62*	2,3 ± 1,12	57,0 ± 3,0*	127,3
ОТ140	99,6 ± 6,69	3,3 ± 0,51	62,0 ± 9,16*	122,2
ОС107 <sup>(2)</sup>	92,6 ± 3,00	2,3 ± 0,57	53,0 ± 5,56*	113,6

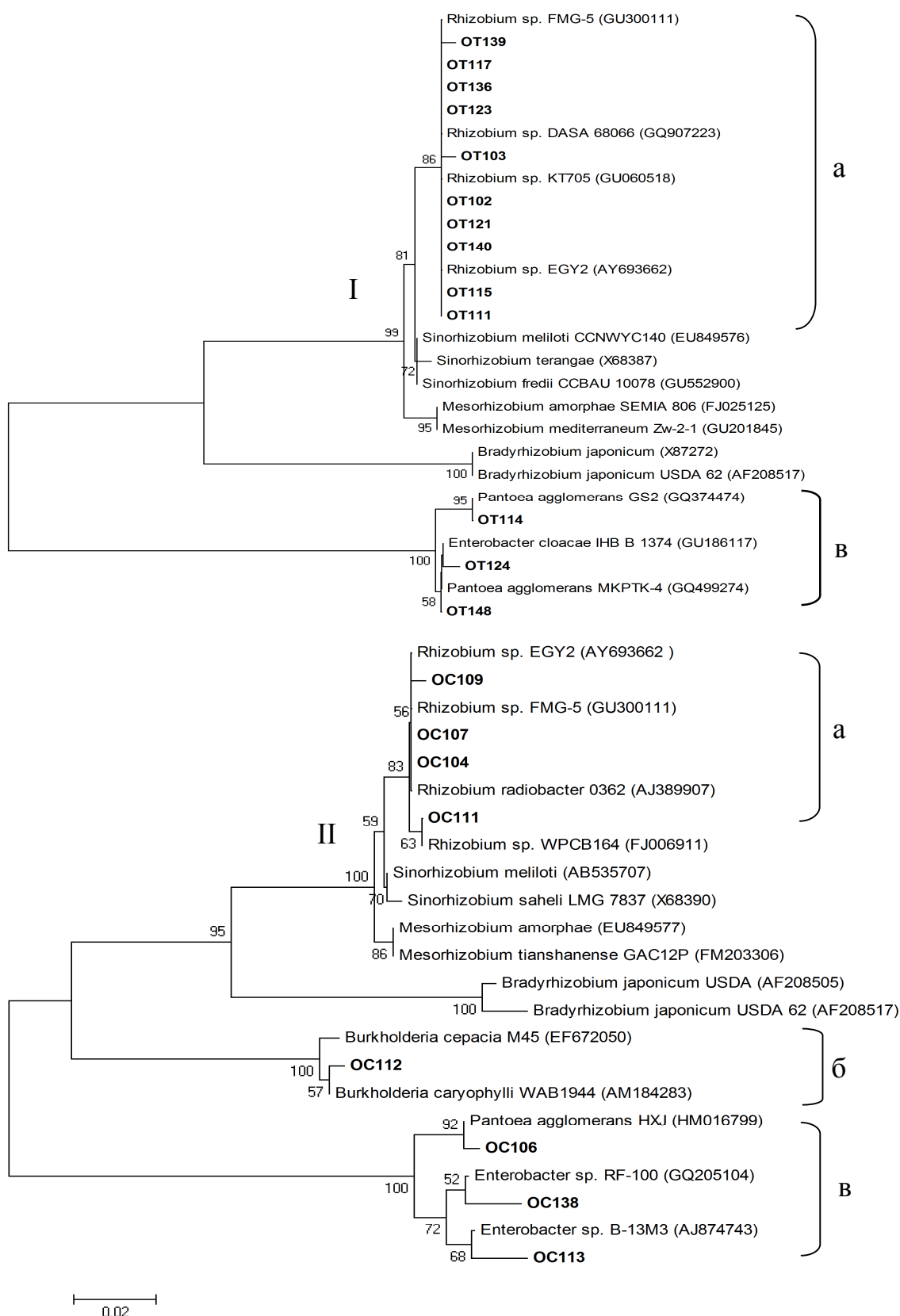
Изоҳ: \*-аҳамиятга эга фарк (P<0,05), такрорланиш n = 3, АРФ – ацетилен- редуктаза фаоллиги, ОТ<sup>(1)</sup> - *O. transcaucasica* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар, ОС<sup>(2)</sup> - *O. chorassanica* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар

## 3-жадвал

***O. chorassanica* ўсимлигини туганак бактериялар билан ишлов берилганда ўсимлик илдизида туганаклар ҳосил бўлиши**

Туганак бактериялар	Ўсимликни ўртача курук биомассаси, мг	Ўсимликда ўртача туганаклар сон	АРФ нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /ўсимлик/соат	Симбиоз самарадорлиги, %
Назорат	75,3 ± 3,30	-	-	100
ОС104	101,4 ± 8,48*	2,6 ± 0,57	46,0 ± 4,58*	134,0
ОС106	94,8 ± 5,18*	1,6 ± 0,57	47,0 ± 6,08*	125,0
ОС107	95,6 ± 2,85*	1,6 ± 1,15	43,0 ± 7,0	126,9
ОС109	97,1 ± 7,01*	2,3 ± 1,15	45,0 ± 3,0*	128,9
ОС112	90,8 ± 3,63*	2,6 ± 1,09	41,0 ± 6,0*	120,5
ОС113	81,4 ± 6,50	1,3 ± 0,57	37,0 ± 6,24	108,1
ОС138	78,6 ± 2,89	1,7 ± 0,64	40,0 ± 3,6*	104,3

Изоҳ: \*-аҳамиятга эга фарк (P<0,05), ОС<sup>(1)</sup> - *O. chorassanica* туганакларидан ажратилган туганак бактериялар



**5-расм. *O. transcaucasica* (I) ва *O. chorassanica* (II) туганак бактериялари штаммларининг 16S рРНК генини ўрганишга асосланган шожара дарахтлари: а-*Alphaproteobacteria*, б- *Betaproteobacteria*, в- *Gammaproteobacteria*. Шожара дарахтини “қўшнига боғланиш” усули орқали яратилган.**

Туганак бактерияларнинг плазмидаларини ўрганиш шуни кўрсатди, *Rhizobium* sp. OT102 бактериясида битта 1500 kb (Sym-плазида), *Rhizobium* sp. OT103 штаммида – иккита (1500 kb, 500 kb) ва OC109 штаммида эса 1500 kb, 500 kb, 200 kb 3 та плазида борлиги аниқланди. Кейинги тадқиқотларда *Burkholderia* sp. OC112 штаммида туганак ҳосил қилишига жавоб берадиган *nodC* гени аниқланди. Ўзида *nodC* гени сақловчи pGEM-T плазмидани рестрикция қилинганда 900, 850 и 450 bp ДНК фрагментларига бўлинди. ДНК 850 bp фрагментининг BLAST (NCBI) анализи шуни кўрсатдики, бу фрагмент *Bradyrhizobium* sp. ISLU256 (AJ560651) штамми *nodC* генига 99% ўхшаш бўлиб, бу ген N-ацетилглюкозаминилтрансфераза ферменти синтезига жавоб беради.

*O. transcaucasica* ўсимлигини *Rhizobium* sp. OT111, OT117 штаммлар билан ва *O. chorassanica* ўсимлигини эса *Rhizobium* sp. OC107, OC109 штаммлар билан ишлов берилганда фаол дукакли-ризобиал симбиоз натижасида ўсимликларни шўрланишга бўлган чидамлилиги 150 mM NaCl ли шўрланишгача ошиши аниқланди. Шу ўринда айтиш мумкинки, *Onobrychis* ўсимлигининг икки тури ҳам бедага (50-80 mM NaCl) нисбатан шўрга 2 марта чидамлилиги, ўсимликларни ер устки ва ер остки биомассаларини юқори бўлиши қишлоқ хўжалигида алмашлаб экишда беда ўсимлигига альтернатив ўсимликлар эканлигидан далолат беради.

Юқоридаги тажрибаларда турли шўрланишда ўстирилган *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* ўсимликларида Na, Mg, Fe, Ca, P, K элементларини аккумуляция бўлиши аниқланган. Ўсимликларда элементларни максимал аккумуляция бўлиши 150 mM NaCl ли шўрланишда кузатилди. Шу ўринда такидлаш лозимки, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимликларини фаол туганак бактериялар билан симбиоз ҳолатда ўртамеёна шўрланган суғориладиган ерларда ўстирилганда ва ўсимликларнинг ер устки қисмини бир неча марта ўриб олиниши натижасида тупроқни шўрдан тозалаш мумкин.

Маълумки, ташқи муҳитнинг турли стресс таъсирларига жавоб тариқасида адаптация жарёнларида альдегидоксидаза (АО; ЕС 1.2.3.1) ва ксантиндегидрогеназа (КДГ; ЕС 1.2.1.37) ферментлари иштирок этади. Шўрланиш (150 mM NaCl) шароитида ўстирилган *O. transcaucasica* ўсимлигининг ер устки ва илдиз қисмида битта АО борлиги ва *O. chorassanica* ўсимлигининг барги ва поясида иккита АО формаси (АО1 ва АО2) борлиги аниқланди.

*O. transcaucasica* ўсимлигининг ер устки қисмида битта фаоллиги паст КДГ ва *O. chorassanica* ўсимлиги барги ва поясида КДГ ферментининг фаоллиги юзасидан кескин фарқ қилувчи 2 та формаси борлиги аниқланди. *Rhizobium* sp. OT103 ва *Rhizobium* sp. OC107 туганак бактерияларида альдегидоксидаза йўқлиги ва фақат ягона КДГ ферменти бўлиб, унинг фаоллиги ўсиш шароитига боғлиқлиги аниқланди, яъни таркибида 400 mM NaCl ли озуқа муҳитида ўстирилган бактерияларнинг КДГ фаоллиги назорат вариантга нисбатан сезиларли даражада юқори бўлиши аниқланди. Такидлаш лозимки, шўрланиш кучайган сари бактерияларнинг



КДГ фаоллигини ошиб бориши, шўрланиш стрессига жавоб тариқасида амалга ошиши аниқланди.

Дала тажрибаларида *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимлиги симбиозини ўсиши ва ривожланишига ўртамеена шўрланиш (75 мМ NaCl) ва минимал суғориш таъсирини ўрганиш шуни кўрсатдики, минимал суғориш ўртамеена шўрланишга нисбатан ўсимликларни ўсиши ва ривожланишига салбий таъсир этиши аниқланди.

*Onobrychis* ўсимликларини қурғоқчиликка чидамлилигини 6,15% дан 8,65% гача бўлган тупроқ намлигида ўрганилди. Ўсимликларни максимал ер устки биомассаси *O. transcaucasica* учун 9,1 г/ўсимлик ва *O. chorassanica* - 12,3 г/ ўсимлик тупроқ намлиги 8,65% бўлганда кузатилди. 8,65 % намликда ўсган ўсимликлар биомассасига нисбатан 6,15% намликда ўсган *O. transcaucasica* биомассаси 6 мартага (1,49 г/ўсимлик), *O. chorassanica* биомассаси эса 11 мартага (1,1 г/ ўсимлик) камайиши аниқланди. Тупроқнинг намлигини 8,65% дан 6,15% гача пасайиши ўсимликлар биомассасини сезиларли даражада камайишига олиб келди.

Шундай қилиб, кўп йиллик дуккакли *Onobrychis* ўсимликлари стрессларга бўлган чидамlilik потенциали беда ўсимлигига нисбатан юқори бўлиб, суғориладиган шўрланган ерларни ва чўлга айланган ерларни қайта тиклашда, экологик нобоп ерларда алмашлаб экишда беда ўсимлигига альтернатив ўсимлик сифатида фойдаланиш мумкин.

**Диссертациянинг олтинчи бобида** *A. conollyi*, *A. vilossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* маҳаллий туганак бактерия штамmlарининг симбиотик фаоллигининг қиёсий якуний баҳоси чўл дала тажриба моделида ўрганилди.

Чўл дала тажрибаларда ўсимликлар уруғини бактериялар билан ишлов бериш учун вегетацион тажрибаларда танлаб олинган *Azospirillum* авлодига мансуб бактериялар ва туганак бактериялардан фойдаланилди. Маълумки, дуккакли ўсимликлар уруғларини туганак бактериялари билан ишлов бериш ўсимликлар ҳосилдорлигини ошишининг гаровидир. Чўл дала тажрибаларда ўсимликлар биомассасининг ошиши назорат ўсимликларга нисбатан ўртача кўрсаткичи, чўл акациясида *A. conollyi* 19,1%, бута *A. vilossimus* 24,5% ва ярим бутасимон *A. unifoliolatus* 11,2% ташкил қилди. *A. conollyi* ўсимлигининг юқори симбиотик самарадорлиги *Rhizobium* sp. AC1-1, AC8-1 штамmlари билан, *A. vilossimus* ўсимлиги– *Rhizobium* sp. AV3, AV9 штамmlар билан ва *A. unifoliolatus* - *Rhizobium* sp. AU30-1 штамми билан ишлов берилганда кузатилди. Кўп йиллик дуккакли ўтсимон *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica* ўсимликлари туганак бактериялар билан ишлов берилганда биомассасининг ўртача кўпайиши 17,2% ва 36,1% ташкил қилди. *O. transcaucasica* биомассасининг максимал ошиши (30%) *Rhizobium* sp. OT136 культураси билан ишлов берилганда, *O. chorassanica* максимал биомассаса (46,8%) *Rhizobium* sp. OC107 штамми билан ишлов берилганда, *O. chorassanica* ўсимлиги *Rhizobium* sp. OT102 штамми билан ишлов берилганда эса ўсимлик биомассаси назорат вариантга нисбатан 57,7% га ошиши кузатилди. *O. transcaucasica* ва *O. chorassanica*

Ўсимликларини фаол туганак бактериялар билан ишлов берилганда ўсимликлар илдизида кўп сонли туганаклар ҳосил бўлиши (1та ўсимликда 200-500 туганаклар) кузатилди. Табиий шароитда ўсган ўсимликларда кўп сонли туганаклар ҳосил бўлиши кузатилмади.

Чўл дала тажрибаларда дуккакли ўсимликларни аралаш культуралар (*Rhizobium* ва *Azospirillum*) билан ишлов берилганда, бактериялар ўсимликларни ўсиши ва ривожланишига ижобий таъсир этиб, *A. conollyi* ўсимлиги биомассасининг ортиши назорат ўсимликларга нисбатан 10,7%–72,8% ни ташкил қилди (ўртача кўрсаткич 29,9%), *A. vilosissimus* ўсимлигида 3,4% дан 67,1% гача биомасса ошиши кузатилди (ўртача кўрсаткич 32,9%), *A. unifoliolatus* ўсимлиги биомассаси ошиши 6,7-30% ни ташкил қилди (ўртача кўрсаткич 18,5%). *Onobrychis* ўсимликларини аралаш культуралар билан ишлов берилганда, барча вариантларда ўсимликларининг биомассаси назорат ўсимликларга нисбатан юқори бўлиши кузатилди (6-расм). *O. transcaucasica* ўсимлиги биомассасининг ўртача ошиши 34,9% ва *O.*



**6-расм. Иккинчи йил, эрта баҳор, Қизилқум биостанцияси тажриба майдонидаги *Onobrychis transcaucasica* ўсимлигининг вегетацияси (модел ўтлоқ) (ЎзР ФА "Ўсимлик ва хайвонат олами генофонди" институти).**

*chorassanica* - 59,7% ташкил қилди. *Onobrychis* ўсимликларининг 2 чи йил вегетациясида барқарор ўсиши кузатилди. Шу билан бирга тақдирлаш лозимки, ўтган йилда ҳосил бўлган уруғлардан ёш ниҳолларни униб чиқиши кузатилди.

Олинган натижаларга асосланган ҳолда Ўзбекистоннинг чўл зоналарида ксерофит дуккакли ўсимликларнинг ўз ўзини қайта тикловчи, уч қатламли сунъий яшил минтақа «Ўрмон-ўтлоқ» яратиш мумкин. «Ўрмон-ўтлоқ» яшил минтақанинг биринчи қатлами кум акацияси *Ammodendron conollyi*, иккинчи

қатлами бута *Astragalus villosimus* ва бутасимон *Astragalus unifoliolatus*, учинчи қатлами эса кўп йиллик дуккакли ўтлар *Onobrychis transcaucasica* ва *Onobrychis chorassanica* ташкил топган бўлиши мумкин. Ксерофит дуккакли ўсимликлар ҳамкорлигидаги сунъий яшил минтақа "Ўрмон-ўтлоқ" чўлнинг суғорилаган ерлари билан чегарадош қисмларида ва аҳоли яшайдиган пунктлар атрофида яратилса, ерларни чўлга айланишини олди олинади, қумларни кўчиб юриши тўхтатилади, тупроқлар табиий азотга бойида ва Ўзбекистон чўл зоналари экологиясини яхшилайдди.

Шундай қилиб, *Azospirillum* авлодига мансуб маҳаллий самарадор бактериялар ва туганак бактериялар билан дон бошоқли ва дуккакли ўсимликлар ишлов берилганда, ассоциатив ва дуккакли-ризобиал симбиозлар ҳосил бўлиши ҳисобига ўсимликлар ҳосилдорлиги ошади ва шўрланган ерлар биологик қайта тиклаб унумдорлигини кўтарилади. Олинган натижалар бактерияларни кишлок хўжалигида ва экологик мақсадларда қўллаш учун тавсия сифатида хизмат қилиши мумкин.

## ХУЛОСА

1. Биринчи марта Ўзбекистоннинг турли даражада шўрланган тупроқларда ўсган буғдой, шоли, маккажўхори илдизи юзаси ва ризосферасидан *Azospirillum* авлодига мансуб бўлган ассоциатив бактериялар ажратиб олинди. Маҳаллий *Azospirillum* авлодига мансуб бактерияларнинг морфологик-культурал, физиологик-биокимёвий хусусиятлари ва 16S рРНК генлари ўрганилиб, уларни туригача аниқланди – *Azospirillum brasilense* (A1-3, A4-3, A13-1, A13-5, A13-6, A13-7); *Azospirillum lipoferum* (C1-1, C2, 3-3, C4-3, C6-1, C7-1, C11-3).

2. Илк бор Миллий Биотехнология Маълумотлар Маркази (NCBI, USA) GenBank тасдиқлаши бўйича *Azospirillum* бактериясининг 2 та янги тури: *Azospirillum* sp.A13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) ва *Azospirillum* sp.C10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) аниқланди.

3. *Azospirillum* культураларини 400 мМ NaCl ли шўрланишга чидамли эканлиги ва 200 мМ NaCl ли озука муҳитида культураларнинг молекуляр азот ўзлаштириш фаоллигини 60-78% гача сақланиб қолиши аниқланди. Азоспириллар индолил-3-сирка кислотаси (ИСК) (3,1-5 мг/л культурал суюқлик) ҳосил қилувчи потенциал продуцентлар эканлиги кўрсатилди. *A. brasilense* A13-6 ва *A. lipoferum* C3-3 штамларида 4 та плазида (90, 120 МДа ва 2 та 300 МДа дан юқори бўлган) борлиги аниқланди.

4. Илк бор *Azospirillum* бактериясининг бир хужайрали яшил сув ўти *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 билан *in situ* ассоциатив симбиоз модели яратилди. *Azospirillum brasilense* A1-3 ва A13-6 штамлари билан ишлов берилган буғдой илдизида пара-туганаклар ҳосил бўлиши кузатилди.

5. Микровегетацион тажрибаларда буғдой ва шоли ўсимликларини *Azospirillum* культуралари билан ишлов берилганда «Унумдор буғдой» нави ўсимлиги биомассаси назорат ўсимликка нисбатан 38% гача ва «Авангард»

шоли нави биомассаси эса 47% гача ошиши кузатилди, дала тажрибаларида «Старшина» буғдой нави ҳосилдорлиги 6% ва «Авангард» шоли нави ҳосилдорлиги эса 6,2% ошиши кузатилди.

6. *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica* дуккакли ўсимликларидан туганак бактериялар ажратиб олинди ва тозаланди. Бактериялар таксономиясини ўрганиш натижасида, дуккакли ўсимликлар илдизида молекуляр азот ўзлаштирувчи туганаклар ҳосил қилувчи *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Alphaproteobacteria*) бактериялари билан бир қаторда *Betaproteobacteria* синфига кирувчи *Burkholderia*, *Achromobacter* ва *Gammaproteobacteria* синфига кирувчи *Enterobacter*, *Pantoea* авлод вакиллари борлиги аниқланди.

7. Чўл дуккакли ўсимликлар илдизида молекуляр азот тўпловчи туганаклар ҳосил бўлиш учун табиий шароитга яқин бўлган шароит талаб қилиниши аниқланди. *A. conollyi* ва *A. villossimus* туганакларини электрон микроскопик ўрганилиб бактериоидларнинг турлича шаклга эга эканлиги ва 300 мМ NaCl шўрланиш таъсирида туганакларда бактериоидларнинг йўқолиб кетиши аниқланди.

8. *A. conollyi* ўсимлигини AC1-1 штамми билан, *A. villossimus* AV3 штамми билан ва *Astragalus unifoliolatus* AU3-1, AU30-1 штаммлари билан фаол симбиоз ҳосил қилиши ўсимликларни NaCl нинг 200 мМ дан ва 300 мМ гача бўлган шўрланишга чидамлилигини кучайтириши, *O. transcaucasica* OT111, OT117 штаммлари ва *O. chorassanica* OC107, OC109 штаммлари билан ҳосил қилган симбиози эса ўсимликларни 150 мМ NaCl гача бўлган шўрланишга чидамлилигини оширди.

9. *O. transcaucasica* ўсимлигида альдегидоксидаза ва ксантиндегидрогеназа ферментларининг фақат битта формаси ва *O. chorassanica* ўсимлигида эса альдегидоксидаза ва ксантиндегидрогеназа иккита формаси борлиги аниқланди. *Rhizobium* sp. OT103 ва *Rhizobium* sp. OC107 штаммларда фақат битта ксантиндегидрогеназа ферменти борлиги аниқланди. Дуккакли ўсимликларнинг ер устки қисмида глутаминсинтетаза ферментининг иккита формаси, илдиз қисми ва уларнинг бактерияларида фақат битта формаси борлиги аниқланди. Ферментларнинг фаоллиги ўсимлик ва туганак бактерияларнинг ўсиш шароитига боғлиқлиги кўрсатилди.

10. Чўл дала шароитида дуккакли ўсимликлар фаол туганак бактериялари билан ишлов берилганда (моноинокуляция) ўсимлик биомассасини ошиши, назорат ўсимликка нисбатан ўртача қуйидагиларни ташкил қилди: *A. conollyi* 19,1%, *A. villossimus* 24,5%, *A. unifoliolatus* 11,2%, *O. transcaucasica* 17,2%, *O. chorassanica* 36,1%. Ўсимликларни азоспирилл ва туганак бактериялари аралашмаси билан ишлов берилганда (иккиламчи инокуляция) ўсимлик биомассаси ҳосилдорлигини ошиши ўртача қуйидагиларни ташкил қилди: *A. conollyi* 29,9%, *A. villossimus* 32,9%, *A. unifoliolatus* 18,5%, *O. transcaucasica* 34,4%, *O. chorassanica* 59,7%.

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

---

**ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ**

**ШАКИРОВ ЗАИР СААТОВИЧ**

**АССОЦИАТИВНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *AZOSPIRILLUM* И  
КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ КСЕРОФИТНЫХ БОБОВЫХ  
РАСТЕНИЙ УЗБЕКИСТАНА**

**03.00.04 – Микробиология и вирусология  
(биологические науки)**

**АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ**

**Ташкент – 2015 год**

**Тема докторской диссертации зарегистрирована под номером №30.09.2014/В2014.5.В89 в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан.**

Докторская диссертация выполнена в Институте микробиологии  
Автореферат диссертации на трех языках (узбекском, русском, английском) размещен на веб-странице Научного совета «www.nuu.uz» и на информационно-образовательном портале «Ziyonet» (www.ziyonet.uz).

**Научный консультант:** **Ходжибаева Санабар Мирзаевна**  
доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Юнусханов Шавкат**  
доктор биологических наук, профессор

**Ахмедова Захро Рахматовна**  
доктор биологических наук, профессор

**Исмаилов Зафар Файзуллаевич**  
доктор биологических наук

**Ведущая организация:** **Институт генофонда растений и животных**

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 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, тел.: +998 71 227 12 24, факс: +998 71 246 53 21; +998 71 246 02 24, E-mail: rector@nuu.uz).

Докторская диссертация зарегистрирована в информационно-ресурсном центре Национального университета Узбекистана за №М14905, с которой можно ознакомиться в ИРЦ (адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, ул. Университетская-4).

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

(протокол рассылки № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_ 2015 г.).

**К. Давранов**  
Заместитель председателя Научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук,  
доктор биологических наук, профессор

**С.М. Насметова**  
Ученый секретарь Научного совета по присуждению  
ученой степени доктора наук,  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

**Т.Г. Гулямова**  
Председатель научного семинара при Научном совете  
по присуждению ученой степени доктора наук,  
доктор биологических наук, профессор

## Введение (аннотация докторской диссертации)

**Актуальность и востребованность темы диссертации.** Повышение урожайности сельскохозяйственных растений, ограниченное использование удобрений и средств защиты растений, наряду с усилением адаптации растений к неблагоприятным агроклиматическим и антропогенным условиям, являются актуальными для сельского хозяйства, а также для решения экологических проблем и охраны окружающей среды. Над решением данных вопросов работают многие ученые различных направлений науки, включая микробиологию, растениеводство, почвоведение, экологию.

В связи с этим, особый интерес проявляется к ризосферным азотфиксирующим микроорганизмам, состоящим в ассоциативном симбиозе с небобовыми растениями. Среди ассоциативных бактерий большое внимание уделяется бактериям рода *Azospirillum*. Это связано с их способностью к азотфиксации, продукции фитогормонов, синтеза ряда витаминов, продуцированию веществ, обладающих фунгистатической активностью, стимулированию минерального питания и улучшению водного баланса инокулированных растений. Следовательно, инокуляция растений азоспириллами может привести к усилению роста, развитию и повышению урожайности небобовых и бобовых растений, а также к замене дорогостоящих, экологически неблагоприятных традиционных минеральных удобрений. Бактерии рода *Azospirillum* проявляют гибкий углеродный и азотный метаболизм, что позволяет им адаптироваться и развиваться в конкурентоспособной окружающей среде ризосферы при неблагоприятных условиях.

Среди мутуалистических симбиозов, образующихся между почвенными микроорганизмами и растениями особое место занимает бобово-ризобиальный симбиоз, происходящий в корнях бобовых растений в тесном взаимодействии с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* и *Mesorhizobium*. В бобово-ризобиальном симбиотическом сообществе клубеньковые бактерии на корнях бобовых растений образуют клубеньки, внутри клубенька фиксируют молекулярный азот ( $N_2$ ) из атмосферы и передают его растению в доступной для него минеральной форме, а также обогащают почву естественным азотом.

В настоящее время около 80% территории Узбекистана занимают пустыни, полупустыни, а более 50% орошаемых земель подвержено вторичному засолению. В связи с этим, борьба с опустыниванием и засолением занимает первостепенное значение в нашей Республике. Если учесть, что в таких условиях происходит постепенное сокращение ареала сообществ бобовых растений пустынь, полупустынь и аридных зон, обогащающих почву биологическим азотом, то возникает естественная необходимость изучения бобово-ризобиального симбиоза, обеспечения его нормального функционирования, сохранения продуктивности дикорастущих ксерофитных пустынных бобовых растений *Ammodendron conollyi*, *Astragalus*

*villosimus*, *Astragalus unifoliolatus*, *Onobrychis transcaucasica*, *Onobrychis chorassanica*.

Учитывая чрезвычайную важность существования ассоциативных и бобово-ризобийных симбиозов в природе, изучение ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий пустынных бобовых растений имеет как научно-практическую, так и экологическую значимость.

Востребованность выполнения научно-исследовательских работ в рамках данной диссертации отвечает задачам, указанным в Постановлениях Кабинета Министров Республики Узбекистан: «О программе действий по охране окружающей среды Республики Узбекистан на 2008 - 2012 годы» от 19 сентября 2008 года № 212 и «О программе действий по охране окружающей среды Республики Узбекистан на 2013 - 2017 годы» от 27 мая 2013 года № 142, направленных на осуществление комплексных мер по охране окружающей среды, обеспечению экологической безопасности, сохранению и восстановлению природных систем, их биологического разнообразия и способности к саморегуляции.

**Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан.**

Настоящая работа выполнена в соответствии с приоритетными направлениями развития науки и технологии Республики Узбекистан на 2012-2020 гг.: № 5. Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды. ПФИ-5. изучение систематики и эволюции микроорганизмов, физиолого-биохимических основ использования микроорганизмов как продуцентов физиологических активных веществ.

**Международный обзор научных исследований по теме диссертации.**

Бактерии рода *Azospirillum* и клубеньковые бактерии бобовых растений интенсивно изучаются во многих научных центрах, высших образовательных учреждениях зарубежных стран, в том числе Indiana University (USA), Ghent University (Belgium), Pasteur Institute (France), The University of Lyon (France), The Hebrew University of Jerusalem (Israel), Centre of Microbial and Plant Genetics (Belgium), Northwestern Center of Biological Research (Mexico), Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Россия), в связи с их способностью увеличивать урожайности злаковых и бобовых растений.

Детально изучены механизмы фиксации молекулярного азота бактериями, биосинтез фитогормонов (ауксин, гиббереллин, цитокинин) (Centre of Microbial and Plant Genetics, Belgium), образование ассоциативного и бобово-ризобийного симбиоза, молекулярная биология генов бактерий и растений, ответственных за образование симбиоза (Pasteur Institute, France). Биопрепараты бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий используются в сельском хозяйстве в качестве биологического азота и фитостимуляторов растений, а также в экологических целях, в частности, в предотвращении эрозии почв в засушливых регионах (The Hebrew University of Jerusalem, Israel).

В настоящее время приоритетным направлением является изучение



клубенькообразования бобовых растений бактериями, относящимися к родам *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, изучение азотфиксации бактерий и усиление адаптации ассоциативных и бобово-ризобияльных симбиоза в условиях засоления, а также изучение образования ассоциативного симбиоза не бобовых растений

**Степень изученности проблемы.** Многочисленные исследования посвящены выделению и молекулярной таксономии бактерий рода *Azospirillum* (Elmerich C., Okon Y., Lai R.), изучению ассоциативного симбиоза злаковых растений (Vanderleyden J., Игнатов В.В., Антонюк Л.П.), влиянию *Azospirillum* на рост, развитие и урожайность культурных растений (Bashan Y., Holguin G., Levanony H., Whitmoyer E.), выделению клубеньковых бактерий, клубенькообразованию, эффективности симбиоза бобовых растений (Holsters M., Симаров Б.В., Проворов Н.А., Саимназаров Ю.Б.).

В литературе имеются лишь единичные сведения по влиянию засоления на жизнеспособность бактерий рода *Azospirillum* (Rai R.), отсутствуют работы по изучению модельного образования ассоциативного симбиоза бактерий рода *Azospirillum* с одноклеточными зелеными водорослями. Следует отметить, что работы по ассоциативным бактериям рода *Azospirillum* в Республике Узбекистана до настоящего времени не проводились.

Отсутствуют данные по изучению клубенькообразования дикорастущих ксерофитных пустынных бобовых растений (Песчаной акации *Ammodendron conollyi*, Астрагал ветвистый *Astragalus villossimus*, Астрагал однолисточковый *Astragalus unifoliolatus*, Эспарцет закавказский *Onobrychis transcaucasica*, Эспарцет хорасанский *Onobrychis chorassanica*) бактериями, относящимися к родам *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, а также влиянию двойной инокуляции смешанных культур (*Rhizobium* и *Azospirillum*) на рост и развитие пустынных бобовых растений.

Отсутствует изучение ферментов (альдегидоксидазы, ксантиндегидрогеназы и глутаминсинтетазы), ответственных за стрессовые условия бобовых растений и их клубеньковых бактерий в условиях засоления.

**Связь диссертационной работы с тематическими планами научно-исследовательских работ** отражена в следующих проектах:

в фундаментальных научных проектах: 5-Ф «Изучение молекулярно-биохимических аспектов биологической азотфиксации у ассоциативных бактерий рода *Azospirillum*» (1998-2002);

Ф-4.1.23 «Усиление адаптации азотфиксирующего симбиоза *Onobrychis* в условиях засоления и засухи» (2003-2007);

в рамках международных грантов:

INCO-Copernicus ERBIC15 CT98 0136 «Биотехнология для улучшения адаптации бобовых деревьев в условиях стресса» (1998 – 2001);

USAID/CDR/CAR №TA-MOU-98-CA17-032 «Использование симбиотического биоразнообразия микроорганизмов для усиления адаптации растений к условиям стресса» (1999-2002);

USAID/CDR/CAR № TA-MOU-02-CA21-022 «Адаптация *Onobrychis*, вида соле- и засухоустойчивой многолетней бобовой травы Центрально-

Азиатских пустынь для продукции культуры и борьбы с запустыниванием» (2003-2006).

**Целью исследования является** выделение ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий ксерофитных бобовых растений, изучение их морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, ассоциативного и бобово-ризобияльного симбиоза, его влияния на рост, развитие и урожайность злаковых и бобовых растений.

Для достижения цели работы поставлены следующие **задачи исследования:**

выделить местные штаммы бактерий рода *Azospirillum*, изучить их морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства, определить таксономический статус путем анализа 16S рРНК гена и плазмидного состава, выявить азотфиксирующую способность бактерий рода *Azospirillum* и их вклад в потенциальную азотфиксацию почв в условиях засоления;

исследовать образование ассоциативного симбиоза бактерий *Azospirillum* и его влияние на рост, развитие и урожайность сельскохозяйственных растений;

выделить и изучить морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства штаммов клубеньковых бактерий ксерофитных бобовых растений *A. conollyi*, *A. villossimus* и *A. unifoliolatus*, выявить симбиотические свойства выделенных клубеньковых бактерий, на основе скрининга отобрать наиболее высокоэффективные штаммы и установить их филогению на основе 16S рРНК гена;

исследовать влияние засоления и засухи на рост и развитие симбиоза пустынных бобовых растений, провести световую и электронную микроскопию бактерий и клубеньков растений, изучить глутаминсинтетазы растений и их клубеньковых бактерий;

выделить и изучить культурально-морфологические, физиолого-биохимические и симбиотические свойства клубеньковых бактерий многолетних бобовых трав *O. transcaucasica* и *O. chorassanica*; провести их молекулярно-генетический анализ, выявить влияние стрессовых факторов (засоления, засухи) на рост и развитие *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* и изучить ферменты альдегидоксидазы и ксантиндегидрогеназы растений и клубеньковых бактерий в условиях засоления;

провести сравнительную оценку ассоциативной и бобово-ризобияльной симбиотической эффективности местных штаммов бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* в полевых пустынных условиях.

**Объектом исследования** являются местные штаммы бактерий рода *Azospirillum*, выделенные из злаковых растений и клубеньковые бактерии - из пустынных бобовых растений *Ammodendron conollyi*, *Astragalus villossimus* и *Astragalus unifoliolatus*, многолетних бобовых трав *Onobrychis transcaucasica* и *Onobrychis chorassanica*.

**Предмет исследования.** Роль ассоциативных и бобово-ризобиальных симбиозов на рост, развитие и урожайность злаковых и пустынных ксерофитных бобовых растений в условиях Узбекистана.

**Методы исследования.** В процессе исследования были использованы микробиологические, физиологические, биохимические, молекулярно-генетические, филогенетические и агрономические методы.

**Научная новизна** диссертационного исследования заключается в следующем:

впервые в Узбекистане с поверхности корней пшеницы, кукурузы, риса и их ризосферы выделены местные штаммы ассоциативных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum*; на основе изучения морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств и молекулярно-генетической таксономии установлено систематическое положение выделенных бактерий: они отнесены к роду *Azospirillum*, видам *A. brasilense* и *A. lipoferum*; впервые с поверхности корней пшеницы выделены два новых вида бактерий рода *Azospirillum* sp.A13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) и *Azospirillum* sp.C10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>);

впервые установлено, что при инокуляции семян пшеницы и риса местными ассоциативными бактериями рода *Azospirillum* наблюдается образование пара-клубеньков на корнях растений пшеницы; а на корнях риса обнаруживается обильное увеличение количества и роста волосков боковых корней;

впервые разработан метод определения образования ассоциативного симбиоза бактерий рода *Azospirillum* с одноклеточными зелеными водорослями *Chlorella sorokiniana* UTEX-260;

впервые из клубеньков *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* выделены клубеньковые бактерии;

впервые установлено, что в клубеньках растений *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica*, наряду с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, обнаружены представители родов других классов *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*), *Gammateobacteria* (*Enterobacter*, *Pantoea*), способные образовывать азотфиксирующие клубеньки на корнях растений;

показано, что бобово – ризобиальный симбиоз растений *A. conollyi*, *A. villossimus* и *A. unifoliolatus* со штаммами *Rhizobium* sp. AC1-1, AV3 и AU3-1, AU30-1 усиливает адаптацию растений к засолению от 200 до 300 мМ NaCl, а симбиоз *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* со штаммами *Rhizobium* sp. OT111, OT117 и OC107, OC109 – до 150 мМ NaCl, в то же время установлена аккумуляция элементов (Na, Mg, Fe, Ca, P, K) растениями *O. transcaucasica* и *O. chorassanica*;

установлено, что бобово-ризобиальный симбиоз обеспечивает нормальный рост и развитие растений *A. conollyi*, *A. villossimus* и *A. unifoliolatus* при 6,41%-ной почвенной влаги, а для *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* достаточно 8,65 %- ной почвенной влаги;

выявлена зависимость активности ферментов глутаминсинтетазы, альдегидоксидазы и ксантинегидрогеназы бактерий и растений от условий выращивания.

**Практические результаты** исследования заключаются в следующем:

создана коллекция, бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий ксерофитных бобовых растений *A.conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica* с различной солеустойчивостью;

образование пара-клубеньков на корнях пшеницы штаммами *A. brasilense* A1-3 и *A. brasilense* A13-6 имеет перспективы в прикладных аспектах для создания в будущем, аналогично бобовым растениям, образовывать азотфиксирующие клубеньки для самообеспечения злаковых растений азотом из атмосферы. Штаммы *A. brasilense* A1-3, A13-6 и *A. lipoferum* C1-1; C2, C3-3 могут быть использованы в сельском хозяйстве для повышения урожайности злаковых растений;

полученные результаты расширяют наши знания о клубенькообразовании бобовых растений, а именно в природе бобовые растения образуют азотфиксирующие клубеньки не только с альфапротеобактериями (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*), но также с представителями беттапротеобактерий (*Burkholderia*, *Achromobacter*) и гаммапротеобактерий (*Enterobacter*, *Panoea*);

эффективный симбиоз клубеньковых бактерий усиливает адаптацию растения-хозяина к засолению от 150 до 300 мМ NaCl, что может быть использовано в борьбе с опустыниванием умеренно-засоленных земель. Бобово-ризобиальный симбиоз растений *Onobrychis transcaucasica* может служить альтернативой люцерне в севообороте для биовосстановления умеренно засоленных орошаемых земель;

в совокупности полученных результатов имеется основание для создания возобновляемого трехярусного зеленого пояса “Лес-пастбище” в пустынях Узбекистана, который состоит из сообществ симбиоза ксерофитных бобовых растений, обеспечивающих себя азотом и, одновременно, обогащающих пустынную почву биологическим азотом, что может быть использовано в борьбе с опустыниванием почв.

**Достоверность полученных результатов** обосновывается тем, что все цифровые данные физиологических, биохимических и агрономических исследований обработаны с использованием современных компьютерных технологий.

**Теоретическая и практическая значимость результатов исследования.**

Теоретическая значимость полученных результатов исследований заключается в том, что созданные растительно-микробные ассоциации, которые обладают гибкой природной экологической адаптацией, способны участвовать в повышении плодородия засоленных орошаемых почв и пустынных зон. Вопросы борьбы с засолением и опустыниванием могут быть решены при комплексном использовании ассоциации солеустойчивых самовозобновляемых полезных микроорганизмов (азоспирилл и

клубеньковых бактерий), которые обеспечивают засоленные почвы и растения биологически доступными формами азота и фосфора, улучшают корневое питание за счет продукции фитогормонов.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные фундаментальные данные позволят в дальнейшем использовать их для решения существующих проблем сельского хозяйства в Республике путем создания новых, эффективных, экологически чистых бактериальных удобрений и биопрепаратов нового поколения, отличающихся комплексным действием на почву и растения, которые, несомненно, в совокупности будут способствовать восстановлению плодородия засоленных орошаемых почв, повышению урожайности и устойчивости сельскохозяйственных культур к засолению.

**Внедрение результатов исследования.** Разработанные нами методы по проращению семян диких многолетних ксерофитных бобовых растений, инокуляции растений бактериями рода *Azospirillum* и клубеньковыми бактериями, их выращивание в вегетационных и полевых пустынных условиях были использованы в международном проекте УНТЦ № P-225 «Изучение техники стабилизации песка». Установлено, что проращение семян составляло 90-95%, в то время как в естественных условиях всхожесть семян составляла 5-10%. 4-месячные растения выращенных в вегетационные и пустынных полевых опытах соответствовали 2-3-х годичным растениям, растущим в естественных пустынных условиях (Справка № ФТК-0213/350 от 22.05.2015 г. Комитета по координации развития науки и технологий при Кабинете Министров Республики Узбекистан). Биопрепарат “Azos-Uz,” созданный на основе *Azospirillum brasilense* A13-6, внедрен в Ташкентской научно-опытной станции риса, зерна и зернобобовых культур на площади 8 гектар и в фермерском хозяйстве Бухарской области, Рамитанском районе на площади 4 гектара, с которых получен прибавочный урожай пшеницы (6%) и риса (6,2%) (Справка о внедрении диссертационных исследований от 08.06.2015 г. Министерства сельского и водного хозяйства Республики Узбекистан).

**Апробация работы.** Основные положения, изложенные в диссертации, представлены и доложены на 20 научно-практических конференциях, в том числе 12 международных симпозиумах, конгрессах, конференциях, в частности, на «5<sup>th</sup> International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation» (Luso, Portugal, 1998); «X<sup>th</sup> Congress of Bacteriology and Applied Microbiology» (Paris, France, 2002); «International Congress Rhizosphere, Perspectives and Challenges – A Tribute to Lorenz Hiltner» (Munich, Germany, 2004); «Биотехнология микробов» (Москва, Россия, 2004); Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». (Москва, Россия, 2009); «9<sup>th</sup> European Nitrogen Fixation Conference» (Geneva, Switzerland, 2010); «Биология наука XXI века» (Пушино, Россия, 2012). «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков» (Новосибирск, Россия, 2014) и 7 республиканских, в частности, «Проблемы современной микробиологии и

биотехнологии» (Ташкент, 2003); «III съезд микробиологов Узбекистана» (Ташкент, 2005); «IV съезд микробиологов Узбекистана» (Ташкент, 2008); «V съезд микробиологов Узбекистана» (Ташкент, 2012).

**Опубликованность результатов.** Основное содержание диссертации отражено в 38 научных работах, в том числе 18 статьях в научных журналах, из них 4 статьи за рубежом, 20 тезисах докладов в материалах отечественных и зарубежных конференций и конгрессов.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, списка цитируемой литературы и содержит 204 страниц текста, включающего 48 рисунков и 33 таблицы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Во введении** обоснована актуальность диссертационной работы, изложены цель и задачи исследования, отмечено научное и практическое значение работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** диссертационной работы представлен широкий анализ современного состояния исследований по распространению и систематике бактерий рода *Azospirillum*, образованию ассоциативных симбиозов, влиянию бактерий рода *Azospirillum* на рост, развитие и урожайность растений, систематике клубеньковых бактерий и бобовых растений, образованию бобово-ризобияльного симбиоза, биохимии азотфиксации и осмоадаптации ризосферных бактерий к условиям засоления.

**Во второй главе** описаны следующие методы исследований бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий: выделение, выращивание, изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств, анализ 16S рРНК, определение плазмид, филогения бактерий, электронная микроскопия, определение азотфиксирующей активности, ИУК, глутаминсинтетазы, альдегидоксидазы, ксантиндегидрогеназы, а также методы определения солеустойчивости, засухоустойчивости и проведения микровегетационных, вегетационных и полевых опытов.

**Третья глава** диссертации посвящена ассоциативным бактериям рода *Azospirillum*.

Впервые с поверхности корней пшеницы, риса, кукурузы и их ризосферы, произрастающих на орошаемых почвах Республики Узбекистан, выделено и очищено 100 культур, которые были отнесены к роду *Azospirillum*. Колонии бактерий, выявленные на агаризованной картофельной среде, по культуральным признакам соответствовали описанию бактерий рода *Azospirillum* (Шиляева и Яковлева, 1988), которые через 2-3 суток росли при температуре 28°C, формировали однородные, полупрозрачные, бесцветные колонии с металлическим блеском, уплотненные в центре, округлые по форме, с диаметром 2-3 мм. Все изоляты азоспирилл являлись микроаэрофилами, сходными морфологическими признаками: короткие, слегка изогнутые с монополярными и биполярными, и с монотрихальными жгутиками.

Сравнительный анализ плазмидного состава бактерий *Azospirillum* показал наличие четырех мегаплазмид с молекулярной массой 90, 120 и двух более, чем 300 МДа, в 0,4% агарозном геле.

Для подтверждения полученных по таксономии результатов на основе фенотипических особенностей бактерии подвергали генетическому анализу 16S рРНК гена. В результате сравнительного BLAST анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК гена бактерий установлено, что бактерии А1-3, А4-1, А13-6 на 97% идентичны с *A. brasilense* (AM419042). Нуклеотидная последовательность 16S рРНК гена, бактерий С3-3 на 98% идентична генам бактерий *A. lipoferum* ICMP 8672 (EF100149).

Филогенетическое дерево бактерий относящейся к виду *Azospirillum brasilense*, образовывали три кластера (рис. 1 а). В первый кластер входили бактерии *Azospirillum brasilense* А1-3, А4-1, А13-6, во втором и третьем кластере находились А13-7 и А13-4, соответственно. Филогенетическое дерево штаммов *A. lipoferum* С1-1, С3-3, С10-8 образовывали единственный разветвленный кластер (рис. 1 б). На основании подтверждения GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI, USA) были обнаружены два новых вида бактерий: - *Azospirillum* sp.А13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) и *Azospirillum* sp.С10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>).

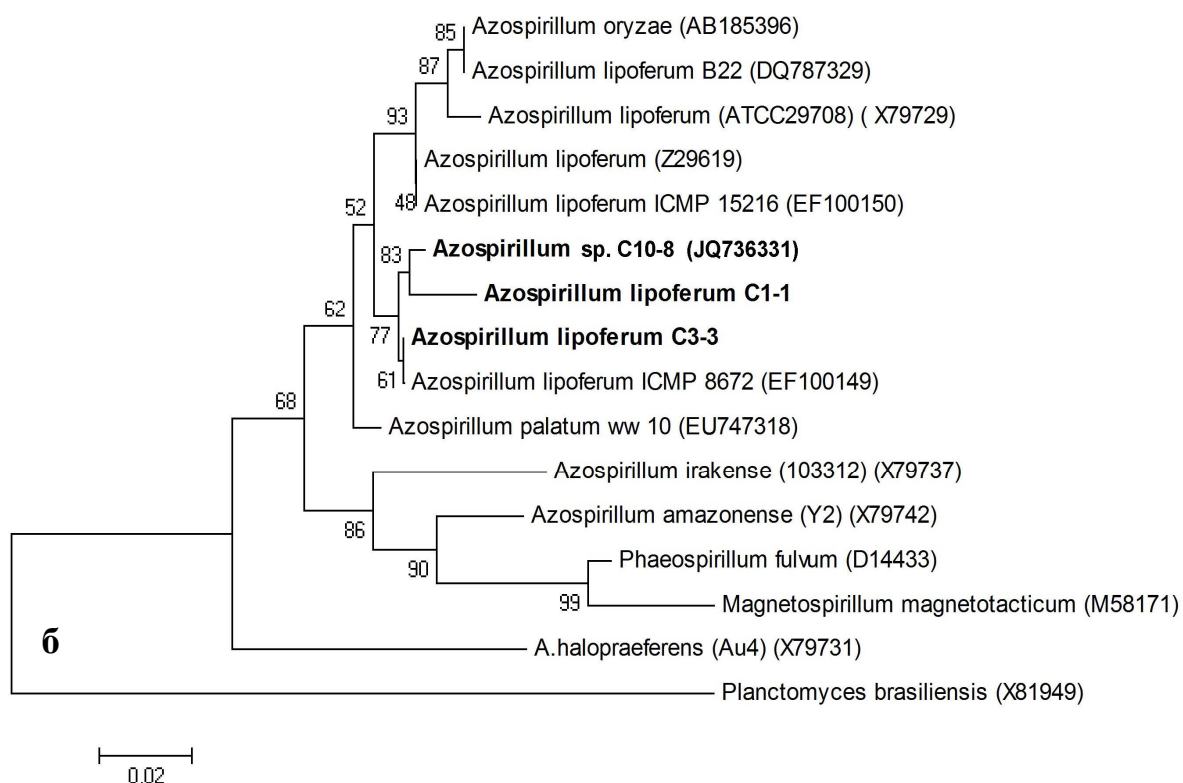
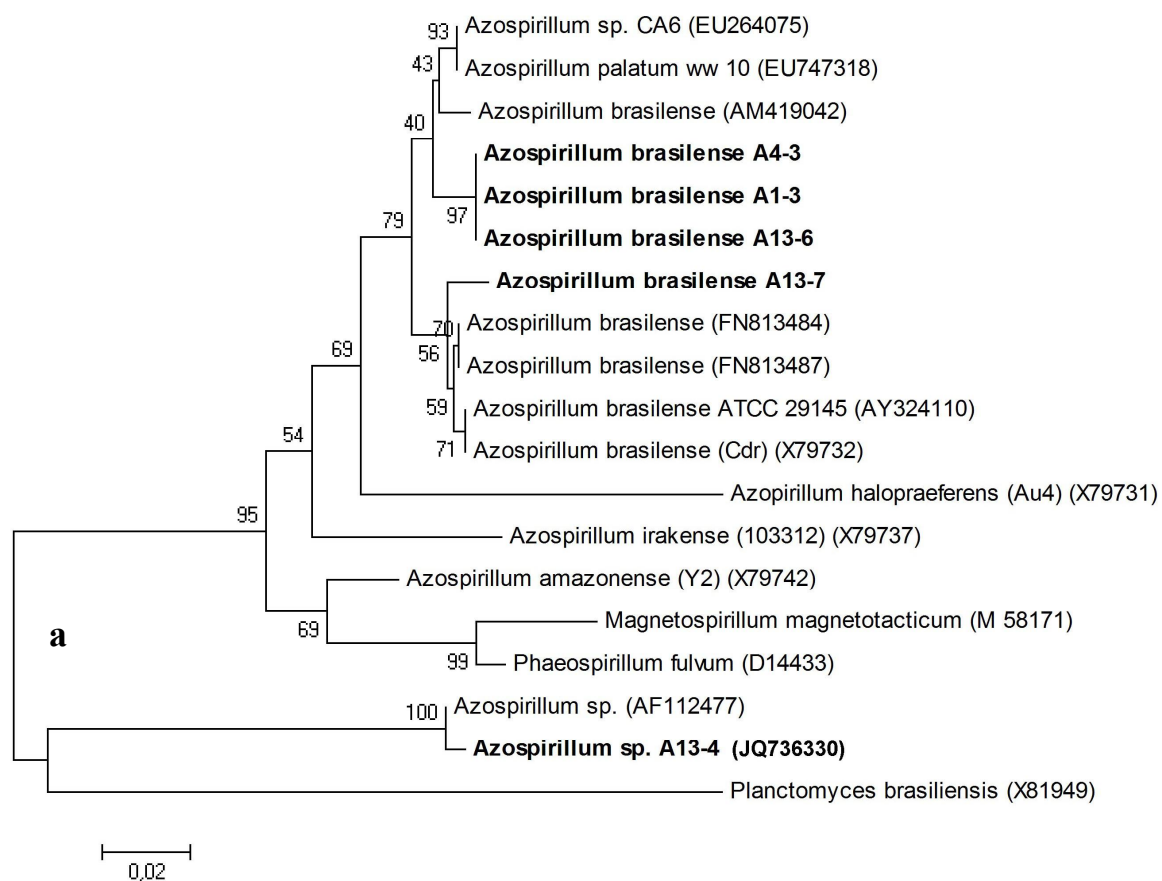
На основании проведенных исследований ассоциативные бактерии отнесены к классу *Alphaproteobacteria*, порядку *Rhodospirillales*, семейству *Rhodospirillaceae*, роду *Azospirillum*, видам *A. brasilense* (А1-3, А4-3, А13-1, А13-5, А13-6, А13-7), *A. lipoferum* (С1-1, С2, 3-3, С4-3, С6-1, С7-1, С11-3).

Азотфиксирующая активность бактерий выявлялась в микроаэрофильных условиях (500 - 4200 нмоль  $C_2H_4$  /флакон /сутки). Установлено, что азотфиксирующая активность бактерий при концентрации соли, равной 200 мМ NaCl, снижалось на 22-40% по отношению к исходной активности.

Потенциальная азотфиксация почвенных образцов в присутствии суспензии *A. brasilense* А1-3 показала, что при 150 мМ NaCl активность азотфиксации нестерильной почвы почти в 5 раз (900 мкМ  $C_2H_4$ /флакон/час) превосходит соответствующую активность стерильной почвы (160 мкМ  $C_2H_4$ /флакон/час).

Азотфиксирующая активность бактерий рода *Azospirillum* в условиях засоления является адаптационным ответом к изменению водного потенциала на среде обитания.

В стерильных микровегетационных опытах биомасса пшеницы сорта «Унумдор бугдой» в вариантах, инокулированных штаммами *A. brasilense* А1-3, А13-6, А13-7, *A. lipoferum* С2, С4-3, С7-1 на 20-38% превышала контрольный вариант, а биомасса пшеницы сорта «Карлик 85» увеличивалас на 19,6-63% по сравнению с контролем. Азотфиксирующая активность ассоциативного симбиоза «азоспириллы - пшеница» варьировала в диапазоне от 145 до 370 нмоль  $C_2H_4$ /растения/сутки. В ходе эксперимента сорта «Унумдор бугдой», инокулированных штаммами *A. brasilense* А1-3 и А13-6, отмечено образование спонтанных пара-клубеньков



**Рис. 1. Филогенетическое дерево, основанное на анализе 16S рРНК гена штаммов *Azospirillum brasilense* (а) и *Azospirillum lipoferum* (б). Разветвленный образец получен методом «присоединения соседа». Номера образцов GenBank указаны в скобках.**



размером 1,0-1,5 мм на корнях растений (рис. 2). Это явление считается уникальным для не бобовых растений. В связи с этим, нами были поставлены специальные опыты, в которых семена пшеницы сорта «Унумдор бугдой» инокулировали бактериями А1-3, А13-6 и выращивали в стерильных условиях в течение 3 дней при температуре 28°C. Результаты опытов показали, что 25-30% проростков пшеницы образовали по 1-2 пара-клубеньку. Полученные результаты убедительно доказывают, что клубенькообразование в корнях проростков пшеницы не имело случайный характер, а скорее всего являлось закономерностью взаимодействия между бактериями рода *Azospirillum* А1-3, А13-6 и растениями пшеницы.

Инокуляция проростков риса сорта «Авангард» штаммами *A. brasilense* А1-3, А13-4, А13-5, А13-6, А13-7 и *A. lipoferum* С1-1; С2-2; С4-3; С10-4; С10-8; С11-5 показала, что биомасса растений риса увеличивалась на 10-46,9% по сравнению с контрольными растениями.

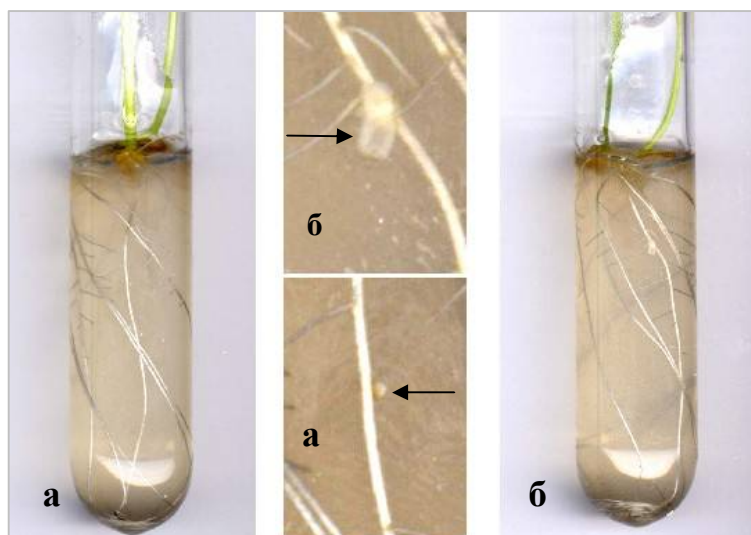
Впервые модельное образование ассоциативного симбиоза *A. brasilense* А13-6 с одноклеточными зелеными водорослями *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 наблюдали *in situ* в лабораторных условиях <https://www.youtube.com/watch?v=eTz6An1P7ro> (рис. 3).

При выращивании бактерий различных штаммов *Azospirillum* на жидкой среде, содержащей триптофан в качестве единственного источника углерода, выявлено усиление продуцирования индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) от 0,7 до 5 мг/л культуральной жидкости.

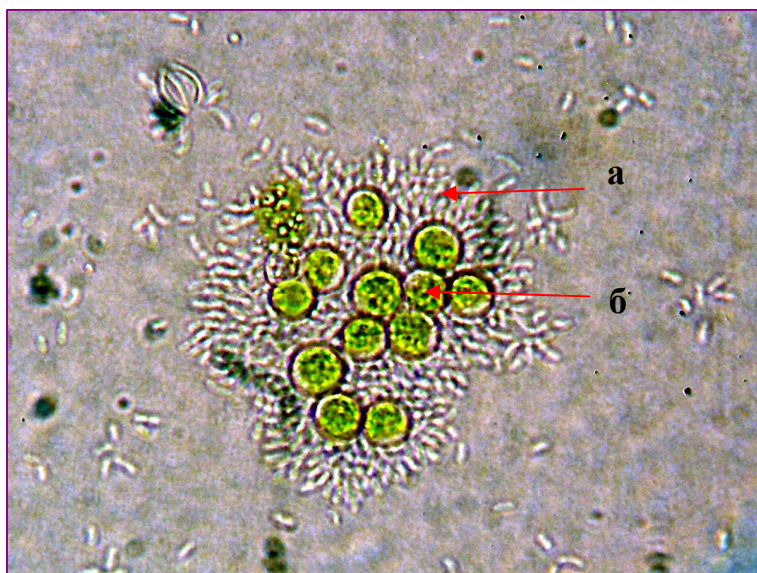
Изучение аэротаксиса солеустойчивого штамма С10-8 в полужидких безазотных средах Доберейнера, содержащих концентрации NaCl от 50 мМ до 250 мМ, показало, что при выращивании бактерий в течение 3-х суток, образуется «формирование» бактериальных колец, подвижность которых зависела от градиента кислорода на среде выращивания.

Хемотаксисные свойства бактерий наблюдали, в основном, в отношении солей органических дикарбоновых кислот.

Проведенные производственные испытания по инокуляции растений



**Рис. 2. Образование пара-клубеньков на корнях пшеницы сорта «Унумдор бугдой» при инокуляции *A. brasilense* А1-3 (а) и А13-6 (б). Стрелками показано пара-клубеньки.**



**Рис. 3. Модель образования ассоциативного симбиоза между *A. brasilense* A13-6 (а) и *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 (б).**

риса сорта «Авангард» и пшеницы сорта «Старшина» с биопрепаратом «Azos-Uz», созданным на основе *Azospirillum brasilense* A13-6, привели к существенному увеличению урожайности зерна растений. Инокуляция риса сорта «Авангард» биопрепаратом «Azos-Uz» увеличивала урожайность риса на 6,2%, при этом экономическая эффективность составляла 780000 сум/га. А инокуляция пшеницы сорта «Старшина» биопрепаратом «Azos-Uz» увеличивала урожайность на 6% и при этом чистый доход составлял 250000 сум/га.

На основании полученных данных показано, что местные штаммы бактерий рода *Azospirillum* формируют эффективный ассоциативный симбиоз с однодольными растениями, что можно рекомендовать для предпосевной обработки семян различных злаковых растений, возделываемых в Узбекистане.

**В четвертой главе** приведены результаты исследований клубеньковых бактерий пустынного ксерофитного бобового дерева *Ammodendron conollyi*, кустарника *Astragalus villosissimus* и полукустарника *Astragalus unifoliolatus*.

Научно-исследовательские работы были начаты с поиска корневых клубеньков ксерофитных пустынных бобовых растений, растущих в естественных условиях в пустыне Кызыл-Кум.

Из клубеньков бобовых растений выделено 150 изолятов клубеньковых бактерий. Изоляты клубеньковых бактерий *A. villosissimus* (AV), были в основном, быстрорастущими бактериями, в то время как бактерии *A. conollyi* (AC) и *A. unifoliolatus* (AU) состояли из быстро- и медленно растущих бактерий. Время удвоения изолятов составляло от 20 до 45 мин. Все бактерии росли в диапазоне температур 12 - 40°C, оптимальная температура – 28°C. При электронно-микроскопическом изучении типичных образцов штаммов клубеньковых бактерий были выявлены монополярные монотрихальные палочковидные формы бактериальных клеток.

Для прорастания семян растений была подобрана оптимальная комбинация, включающая обработку семян серной кислотой и последующей

скарификацией корневой части семян, при которой происходило 90-95% - ное прораствание семян ксерофитных бобовых растений в стерильных условиях.

Изучение бобово-ризобияльного симбиоза клубеньковых бактерий проводили в вегетационных опытах. В вегетационных опытах наблюдался интенсивный рост и развитие растений. После 2 месяцев выращивания во всех вариантах обнаружено клубенькообразование (табл. 1). Клубеньки *A. conollyi*, сформированные после инокуляции, были розовые и большие достигали 7 мм в диаметре.

Высокая азотфиксирующая активность *A. conollyi* выявлена при прямой инокуляции клубеньковыми бактериями AC1-1, AC2, AC12-1, AC18-1, AC21, AV1 (4,77-6,91 нмоль  $C_2H_4$  растения/час), выделенными из клубеньков растений *A. conollyi*. Высокоэффективный бобово-ризобильный симбиоз растений *A. conollyi* наблюдался при инокуляции бактериями AC1-1, AC8-1, AC11, AC12-1, AC18-1, AV1, AV8-1, AV9-1, AV30 и биомасса надземной части растений увеличивалась от 43% до 68,8 % по сравнению с контролем (табл.1). Высокая азотфиксирующая активность растений *Astragalus villosissimus* наблюдалась при инокуляции бактериями AC8-1, AC11, AV15, AV36-1 (3,04-5,64 нмоль  $C_2H_4$  растения/час), при этом симбиотическая эффективность составляла от 21,5% до 28,4 % при инокуляции штаммами AV1, AV3, AV8-1, AV9 и AC8-1 (табл. 1). Высокая эффективность симбиоза *A. unifoliolatus* наблюдалась при прямой инокуляции штаммами AU23, AU28, AU30-1 и перекрестной инокуляции штаммами AV1, AV2, AV6-1, AV8-1 и AV9-1.

Таким образом, показано, что в процессе естественного отбора ксерофитные бобовые растения в природе исключительно адаптировались к пустынным условиям, и это было доказано при изучении клубенькообразования растений *A. conollyi*, *A. vilosissimus* и *A. unifoliolatus* в вегетационном опыте, в котором требуются условия, близкие к природным.

При изучении глутаминсинтетазы (ГС) установлено, что клубеньковые бактерии содержали одну форму ГС, а растительная часть бобовых растений две формы глутаминсинтетазы (ГС<sub>1</sub>, ГС<sub>2</sub>), которые различаются по электрофоретической подвижности и некоторым физико-химическим свойствам. Глутаминсинтетазы клубеньковых бактерий играют определенную роль в образовании бобово-ризобияльного симбиоза.

При исследовании плазмидного состава эффективных клубеньковых бактерий (AC15, AV1, AV3, AV8-1, AV9, AV9-1) было выявлено наличие трех плазмид с молекулярной массой 118, 370 и 515 Кб.

Обильное образование меланина наблюдалось у штаммов AU30-1, AV30; меньшее - отмечено у штаммов AC11, AU17-1, AU30-2, AV1 и AV6-1.

Сравнительный BLAST - анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК генов местных штаммов клубеньковых бактерий показали, что гены штаммов AC1-1, AC8-1, AC21, AV1, AV3, AU3-1, AV8-1, AV9, AU30-1 на 97% были идентичны генам *Rhizobium* sp. GGNM 66 (EF420109). Гены бактерий AC15, AU17-1, AU30-2, AU7 на 97% совпадали с таковыми

Таблица 1

**Симбиотические свойства клубеньковых бактерий ксерофитных пустынных бобовых растений в  
вегетационном опыте**

<i>Ammodendron conollyi</i>				<i>Astragalus villosissimus</i>				<i>Astragalus unifoliolatus</i>			
Клубень- ковые бактерии	Сред. кол-во клубень. на 1 раст.	АРА нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> флакон /час	Эффек- тивность симбиоза, %	Клубень- ковые бактерии	Сред. кол-во клубень. на 1 раст	АРА нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> пробирка /час	Эффек- тивность симбиоза, %	Клубень- ковые бактерии	Сред. кол-во клубень. на 1 раст	АРА нмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> пробирка /час	Эффек- тив- ность симбио- за, %
АС1-1	5±2,64	6,91±0,44*	147,7	AV1	18±2,16	1,72±0,99	121,5	AU2-1	19±2,0	0,47±0,21	62,5
АС2	5±3,0	5,59±0,25*	108,9	AV2	17±2,16	2,52±0,73*	102,5	AU3-1	41±5,29	3,33±0,9*	103,5
АС4-1	2±1,73	2,81±0,63	98,5	AV3	18±3,26	2,95±0,77*	122,4	AU4	19±4,58	1,5±0,51	62,5
АС8-1	3±1,0	2,5±0,43	143,2	AV6-1	5±1,0	0,61±0,27	95,6	AU7	19±2,64	1,44±0,78	65,1
АС11	4±1,0	2,34±0,19*	158,2	AV8-1	11±2,0	0,73±0,35	122,4	AU17-1	20±7,54	1,81±0,71*	116,0
АС12-1	5±3,0	6,91±0,32*	143,2	AV9	25±10,0	2,87±0,55*	123,2	AU20-1	23±4,58	1,58±0,45*	109,8
АС13-1	3±1,0	2,82±0,63	108,9	AV9-1	10±1,63	1,31±0,65	106,8	AU23	32±8,54	4,02±0,52*	136,6
АС15	4±1,73	3,2±0,75	89,7	AV26-1	17±2,64	1,93±0,86*	104,3	AU28	24±6,55	1,87±0,68*	136,6
АС18-1	4±2,64	4,67±0,38*	147,7	AV30	19±3,26	2,25±0,68	99,1	AU30-1	20±2,64	4,15±0,92*	151,7
АС21	5±1,0	4,67±0,67*	119,4	AV36-1	20±2,64	3,13±0,99*	114,6	AU30-2	21±3,46	1,42±0,64	121,4
AV1	4±1,0	4,77±0,57*	153,7	АС8-1	15±5,29	5,64±0,78	128,4	AV1	32±4,35	4,41±0,99*	151,7
AV3	2±1,0	2,0±0,55*	134,3	АС11	20±3,6	3,04±0,85	114,6	AV2	35±5,29	3,07±0,4	139,2
AV6-1	4±1,73	3,93±0,45*	132,8	АС15	29±5,29	5,44±0,91*	111,2	AV3	27±4,0	3,26±0,45*	116,0
AV8-1	4±2,64	2,43±0,7	150,7	АС21	15±4,0	0,7±0,44	121,5	AV6-1	28±4,0	2,46±0,41*	154,4
AV9	1±0,0	1,24±0,32	134,3	АС1-1	10±5,0	1,19±0,61	94,8	AV8-1	35±9,84	4,66±0,68*	157,1
AV9-1	3±1,0	1,77±0,39	168,6	AU17-1	12±5,56	0,86±0,47	103,4	AV9	26±3,6	2,77±0,24*	125,0
AV30	3±1,0	3,03±0,79*	140,2	AU30-1	18±5,0	1,42±0,69	80,1	AV9-1	25±6,08	3,54±0,54*	145,5
Контроль	-	-	100	Контроль	-	-	100	Контроль	-	-	100

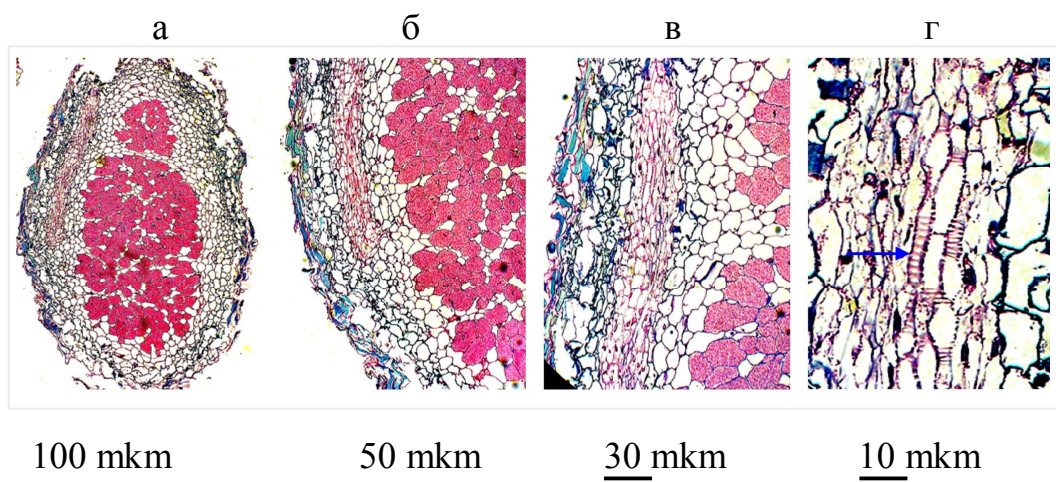
Примечание: \*- различия относительно данных контрольной группы значимы (\*P<0,05), число повторов n = 3; АРА - ацетилен-редуктазная активность. АС - клубеньковые бактерии выделенные из клубеньков *Ammodendron connollyi*; AV- клубеньковые бактерии выделенные из клубеньков *Astragalus vilosissimus*; AU - клубеньковые бактерии, выделенные из клубеньков *Astragalus unifoliolatus*.

бактерий как *Burkholderia cepacia* NBRAJG97, штаммы AC11 и AV6-1 на 98% были идентичны с бактериями *Achromobacter xylosoxidans* (FM163487).

Филогенетическое дерево, созданное на основе 16S рРНК гена показало, что исследуемые бактерии образовывали 4 кластера: штамм AU7 образовал первый кластер, во вторую группу входили штаммы AC11, AV6-1, штаммы AC15, AU17-1 и AU30-2 создали третью группу и, наконец, штаммы клубеньковых бактерий AC1-1, AC8-1, AC21, AV1, AV3, AV8-1, AV9, AU3-1 и AU30-1 образовывали четвертую большую группу. Из полученных данных можно заключить, что нуклеотидные последовательности 16S рРНК гена исследуемых бактерий были высоко идентичны между собой внутри группы, а также бактерии, выделенные из каждого бобовых растений, относились как к классу *Alphaproteobacteria* (*Rhizobium*), так и классу *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*).

При инокуляции штаммом *Rhizobium* sp. AC1-1 устойчивость *A. conollyi* к засолению усиливалась до 300 мМ NaCl. При этом биомасса надземной части растений уменьшалась всего на 6,6% по сравнению с контролем. Бобово-ризобиальной симбиоз *A. villosissimus* штаммами *Rhizobium* sp. AV3 предотвращал отрицательное влияние 200 мМ NaCl засоления, прибавка зеленой биомассы растений при этом составила 4,4%. Аналогичные результаты получены по отношению к растению *A. unifoliolatus* со штаммами *Rhizobium* sp. AU3-1. Образование клубеньков наблюдалось у исследуемых растений в присутствии 300 мМ хлорида натрия.

При дифференциальном окрашивании срезов клубеньков (препараты световой микроскопии) *A. villosissimus* была видна разветвленная (окрашенная в розовый цвет) бактериальная сеть в наружных покровных клетках клубенька (рис. 4), далее следует зона образования и развития



**Рис. 4.** Световая микроскопия среза клубенька растения *A. villosissimus*, инокулированного штаммом *Rhizobium* sp. AV1: а, б - общая картина продольной части клубенька, в - наружная бактериальная сеть в растительной корковой части. г – «лестница-подобные» внутриклеточные инфекционные нити (они указаны стрелкой).

центров инфекционных нитей, которая приводила к формированию полностью колонизированных (плотно-колонизированных) глубинных внутренних растительных клеток клубеньков растений с бактериоидами клубеньковых бактерий (рис. 4). Изучение более тонких структур клубеньков *A. conollyi*, инокулированных с эффективными штаммами клубеньковых бактерий (AC8-1, AV1, AU30-1), проводили электронно-микроскопическим исследованием. В целом, бактериоиды представлены полиморфными структурными формами - от глобулярных (сферических) до булавовидных и многих других случайных форм.

На основании представленных данных можно полагать, что в результате бобово-ризобиального симбиоза произошли структурные перестройки, как клубеньковых бактерий, так и в клетках клубеньков бобовых растений – хозяина.

Таким образом, широкая специфичность пустынных ксерофитных бобовых растений по отношению к клубенькообразующим бактериям является результатом эволюционного приспособления растений к пустынным условиям, то есть, в корнях растений при экстремальных условиях максимально образуются азотфиксирующие клубеньки с бактериями, относящимися к различным классам и родам (*Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*), обитающим в почвах пустыни.

**Пятая глава** посвящена исследованию клубеньковых бактерий многолетних бобовых трав *Onobrychis transcaucasica* и *Onobrychis chorassanica*. Из клубеньков растений *Onobrychis*, растущих в естественных условиях, было изолировано 110 изолятов клубеньковых бактерий. Микроскопические исследования бактерий показали, что изучаемые клетки представляли собой типичные палочки, их ширина варьировала от 0,5 до 0,8 микрон и длина – от 1 до 1,5 микрон. Колонии быстрорастущих клубеньковых бактерий на плотных средах появлялись на 3-4 сутки роста, а медленнорастущих – на 7-10 сутки. Размер колонии 3-х дневных бактерий составлял от 2 мм до 6 мм. Бактерии были устойчивыми к 600 мМ NaCl. Клубеньковые бактерии эспарцета обладали способностью усваивать моно- и дисахара, сахароспирты и аминокислоты. Величина pH для активного роста выделенных клубеньковых бактерий эспарцета варьировала в интервале pH от 5,0 до 8,5, в то время как физиологические величины температуры находились в интервале от 4°C до 41°C с оптимумом - 28°C. На основании проведенных исследований отобранные клубеньковые бактерии предварительно можно было отнести к роду *Rhizobium*.

Изучение симбиотических свойств изолятов клубеньковых бактерий проводили в вегетационных опытах, которые позволили выявить целый комплекс симбиотических признаков: хозяйскую специфичность, азотфиксирующую активность, эффективность и др.

Как показали результаты опытов, клубенькообразование обоих видов растений *Onobrychis* наблюдалось во всех вариантах опытов. Максимальная прибавка зеленой биомассы растений *O. transcaucasica* (21,2% - 36,1%) наблюдалась при инокуляции штаммами клубеньковых бактерий OT102,

OT103, OT111, OT117, OT130 и OT139 (табл. 2). Наибольшая симбиотическая эффективность у *O. chorassanica* выявлена при инокуляции штаммами бактерий OC104, OC106, OC107, OC109, OC112 (табл. 3), при этом прибавка надземной части растений была от 20,5% до 34% по сравнению с контролем. Ацетилен-редуктазная активность растений *O. transcaucasica* варьировала в диапазоне от 33 до 63 нмоль  $C_2H_4$ /растения/час, в то время как для *O. chorassanica* - 31- 48  $C_2H_4$ /растения/час (табл. 3). Корреляция между азотфиксацией и эффективностью наблюдали при симбиозе растений *O. transcaucasica* с клубеньковыми бактериями OT117, OT139, а у *O. chorassanica* – OC106, OC109. В результате вегетационных опытов было отобрано 4 высокоактивных местных штамма *O. transcaucasica* (OT102, OT103, OT117, OT121) и три штамма *O. chorassanica* (OC104, OC107, OC109), которые при инокуляции достоверно повышали биомассу надземной части бобовых растений по сравнению с контролем без инокуляции.

Результаты сравнительного BLAST анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК гена штаммов OT102, OT103, OT121, OT117, OC104, OC107, OC109 и OC111 показали, что они на 99% были аналогичным 16S рРНК гена *Rhizobium* sp. EGY2 (AY693662). Гены бактерий OT114, OT124, OT148 на 99% совпадали с бактериями *Pantoea agglomerans* GS2 (GQ374474). Штамм OC112 на 99% был идентичен с бактерией *Burkholderia caryophylli* WAB1944 (AM184283), OC106 на 97% совпадал с *Pantoea agglomerans* HXJ (HM016799), OC138 на 98% совпадал с *Enterobacter* sp. RF-100 (GQ205104) и OC113 97% был идентичен *Enterobacter* sp. B-13M3 (AJ874743).

При анализе филогенетического дерева, созданного на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК гена бактерий, установлено, что изучаемые клубеньковые бактерии *O. transcaucasica* OT102, OT103, OT111, OT115, OT117, OT123, OT136, OT139, OT140 относятся к классу *Alphaproteobacteria* (первый кластер) (рис 5. I а), бактерии OT114, OT124, OT148 (второй кластер) – классу *Gammaproteobacteria* (рис 5. I в). На филогенетическом дереве *O. chorassanica* образовало три кластера (группы). Штаммы OC104, OC107, OC109 и OC111, входящие в первый кластер, относились *Alphaproteobacteria* (рис 5. II а), второй кластер (OC112) – *Betaproteobacteria* (рис 5. II б), и штаммы OC106, OC103, OC138 третьего кластера относились к классу *Gammaproteobacteria* (рис 5. II в).

Изучение плазмидного состава клубеньковых бактерий показало, что у штамма *Rhizobium* sp. OT102 обнаружена 1 мегаплазида размером 1500 kb (Sym-плазида), у штамма *Rhizobium* sp. OT103 – две (1500 kb, 500 kb), в клетках штаммов *Rhizobium* sp. OC107 и OC109 обнаружено по три плазмиды размером 1500 kb, 500 kb и 200 kb. В дальнейших исследованиях определяли *nodC* гена штамма *Burkholderia* sp. OC112. При рестрикции плазмиды pGEM-T, содержащей *nodC* ген, обнаружено три фрагмента ДНК размером около 900, 850 и 450 bp. BLAST (NCBI) анализ показал,

Таблица 2

**Клубенькообразование растений *O. transcaucasica* при инокуляции клубеньковыми бактериями, выделенными из растений *Onobrychis***

Клубеньковые бактерии	Средняя сухая биомасса на растение, мг	Среднее количество клубеньков 1 растения	АРА нмоли C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /растения /час	Эффективность симбиоза, %
Контроль	81,5 ± 2,14	-	-	100
ОТ102 <sup>(1)</sup>	104,0 ± 3,98*	2,0 ± 1,0	46,0 ± 11,0	127,6
ОТ103	103,0 ± 1,99*	2,3 ± 1,5	48,0 ± 4,58*	126,3
ОТ111	98,8 ± 2,27*	1,6 ± 1,15	51,0 ± 10,58*	121,2
ОТ114	89,8 ± 5,57	2,6 ± 0,52	49,0 ± 8,18*	110,1
ОТ117	111,0 ± 3,97*	2,6 ± 1,96	59,0 ± 3,0*	136,1
ОТ121	101,0 ± 8,08	10,0 ± 2,64	63,0 ± 8,88	123,9
ОТ123	93,6 ± 6,86	2,3 ± 0,57	51,0 ± 5,6*	114,8
ОТ130	107,0 ± 4,17*	2,3 ± 0,51	33,0 ± 14,17	131,2
ОТ136	102,2 ± 5,38*	3,0 ± 1,0	49,0 ± 4,58*	125,3
ОТ139	103,8 ± 5,62*	2,3 ± 1,12	57,0 ± 3,0*	127,3
ОТ140	99,6 ± 6,69	3,3 ± 0,51	62,0 ± 9,16*	122,2
ОС107 <sup>(2)</sup>	92,6 ± 3,00*	2,3 ± 0,57	53,0 ± 5,56*	113,6

Примечание: Примечание: \*- различия относительно данных контрольной группы значимы (\*P<0,05), n = 3; АРА – ацетилен- редуктазная активность. ОТ<sup>(1)</sup> - клубеньковые бактерии, выделенные из клубеньков *O. transcaucasica*; ОС<sup>(2)</sup> - клубеньковые бактерии, выделенные из клубеньков *O. chorassanica*.

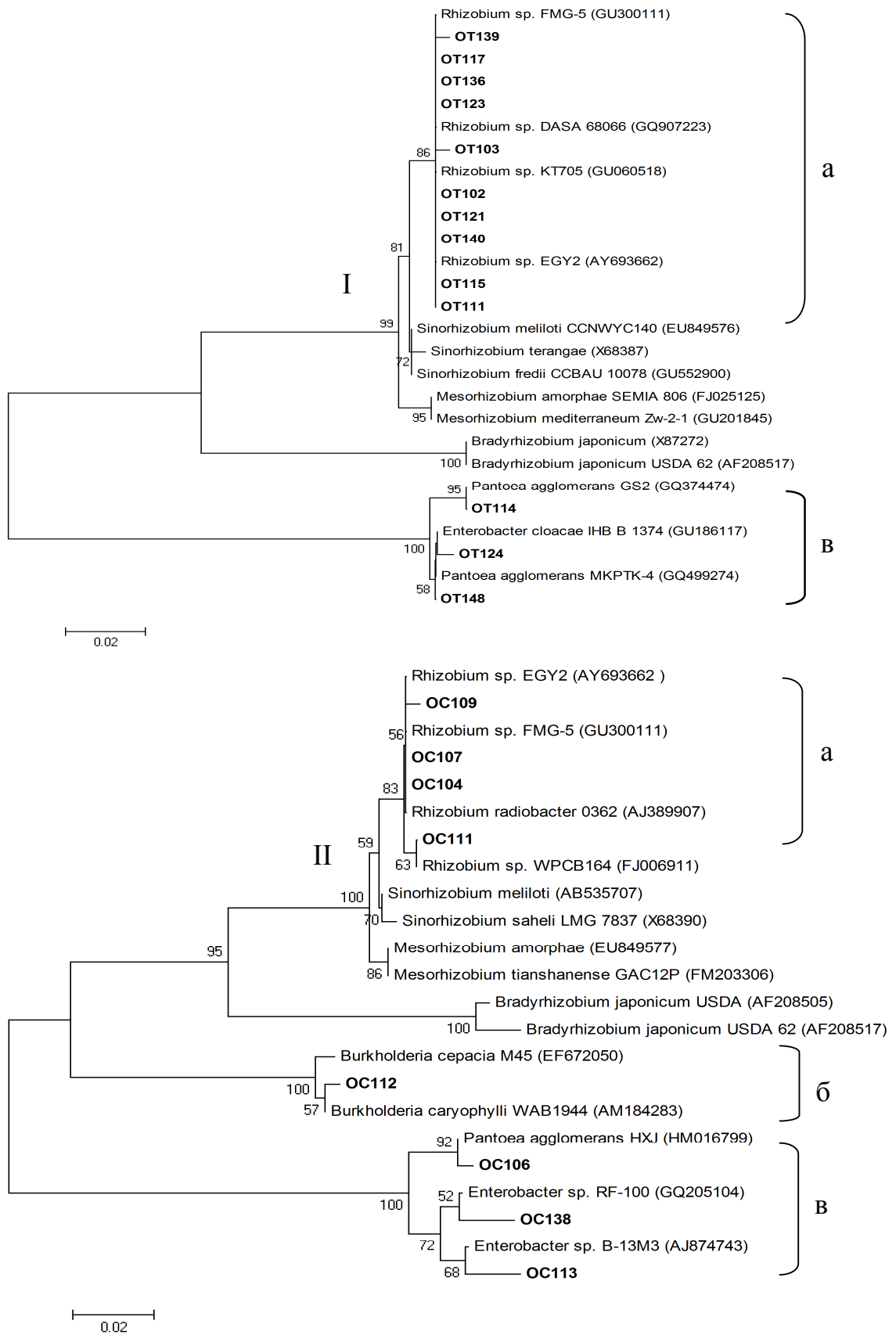
Таблица 3

**Клубенькообразование растений *O. chorassanica* при инокуляции клубеньковыми бактериями, выделенными из растений *Onobrychis***

Клубеньковые бактерии	Средняя сухая биомасса на растение, мг	Среднее количество клубеньков 1 растения	АРА нмоли C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /растения /час	Эффективность симбиоза, %
Контроль	75,3 ± 3,30	-	-	100
ОС104	101,4 ± 8,48*	2,6 ± 0,57	46,0 ± 4,58*	134
ОС106	94,8 ± 5,18*	1,6 ± 0,57	47,0 ± 6,08*	125
ОС107	95,6 ± 2,85*	1,6 ± 1,15	43,0 ± 7,0*	126,9
ОС109	97,1 ± 7,01*	2,3 ± 1,15	45,0 ± 3,0*	128,9
ОС112	90,8 ± 3,63*	2,6 ± 1,09	41,0 ± 6,0*	120,5
ОС113	81,4 ± 6,50	1,3 ± 0,57	37,0 ± 6,24	108,1
ОС138	78,6 ± 2,89	1,7 ± 0,64	40,0 ± 3,6*	104,3

Примечание: Примечание: \*- различия относительно данных контрольной группы значимы (\*P<0,05), n = 3





**Рис. 5. Филогенетическое дерево, основанное на изучении гена 16S рРНК штаммов клубеньковых бактерий *O. transcaucasica* (I) и *O. chorassanica* (II): а-*Alphaproteobacteria*, б- *Betaproteobacteria*, в- *Gammaproteobacteria***

что фрагмент ДНК 850 bp на 100% идентичен *nodC* гену штамма *Bradyrhizobium* sp. ISLU256 (AJ560651), который является ответственным за синтез фермента N-ацетилглюкозаминилтрансферазы. Изучение солеустойчивости растений показало, что *O.transcaucasica* при инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. OT111, OT117 и *O.chorassanica* при инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. OC107, OC109 устойчивость к засолению усиливалась до 150 mM NaCl. Следует отметить, что оба вида растений *Onobrychis* в 2 раза превышали показатели солеустойчивости люцерны (50-80 mM NaCl) как по биомассе надземной, так и подземной части растений, что свидетельствует о том, что растения *Onobrychis* являются лучшей альтернативой люцерне при севообороте в сельском хозяйстве.

В этом же эксперименте была изучена аккумуляция элементов (Na, Mg, Fe, Ca, P, K) симбиоза *O. transcaucasica* и *O. chorassanica*, выращенных при различной концентрации NaCl. Максимальная аккумуляция элементов растениями происходила при концентрации 150 mM NaCl. Следует отметить, что выращивание растений *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* в симбиозе с эффективными клубеньковыми бактериями в умеренно засоленных орошаемых землях, возможно, приводит к обессоливанию почвы за счет многочисленного укоса надземной части растений.

Известно, что ферменты альдегидоксидаза (АО; ЕС 1.2.3.1) и ксантиндегидрогеназа (КДГ; ЕС 1.2.1.37) принимают участие в адаптационном процессе в ответ на стрессовое воздействие внешней среды. При изучении АО *O. transcaucasica*, подвергнутых солевому стрессу (150 mM NaCl), обнаружено наличие одной формы АО как в надземной части, так и в корнях растений. Две формы АО (АО1 и АО2) обнаружены в надземной части растений *O. chorassanica*.

В надземной части и корнях *O. transcaucasica* обнаружена только одна форма КДГ с низкой активностью, в то время как в надземной части *O.chorassanica* обнаружено наличие двух форм КДГ, отличающихся активностью.

АО у клубеньковых бактерий *Rhizobium* sp. OT103 и *Rhizobium* sp. OC107 не обнаружена, в то же время эти штаммы имели по одной форме КДГ, и интенсивность активности фермента зависела от условий выращивания бактерий. Активность КДГ клубеньковых бактерий была значительно выше при выращивании на средах, содержащих 400 mM NaCl, чем в контрольных вариантах. Следует отметить, что при увеличении концентрации NaCl активность ферментов растений и бактерий закономерно увеличивалась в ответ на солевой стресс.

Сравнительное изучение умеренного влияния стресса - засоления (в концентрации 75 mM NaCl) и минимального полива - на рост и развитие симбиоза растений *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* в полевых условиях показало, что минимальное орошение растений *Onobrychis* более отрицательно влияет на рост и развитие растений, чем засоление.

Засухоустойчивость растений *Onobrychis* изучали при почвенной влажности от 6,15% до 8,65%. Максимальная биомасса надземной части инокулированных растений *O. transcaucasica* была 9,1 г/растение и для *O. chorassanica* - 12,3 г/растение (при влажности 8,65 %). При влажности 6,15 % биомасса *O. transcaucasica* снижалась более чем в 6 раз (1,49г/растение), в то время как биомасса *O. chorassanica* – 11 раз (1,1 г растение) по сравнению с растениями, выращенными в почве при влажности 8,65 %. Незначительное снижение почвенной влаги (от 8,65% до 6,15%) приводило к значительному уменьшению биомассы растений.

Таким образом, многолетняя бобовая трава *Onobrychis* обладает гораздо большим потенциалом устойчивости к стрессам (засолению и засухе), чем люцерна, и может быть применена для рекультивации и восстановления орошаемых засоленных почв и запустыненных земель, как альтернатива люцерне в севообороте экологически неблагоприятных земель.

**В шестой главе** диссертации приведена заключительная оценка симбиотической эффективности местных штаммов клубеньковых бактерий *A. conollyi*, *A. vilossumus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* в модельных пустынных полевых опытах.

Для инокуляции семян растений использовали эффективные штаммы бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий, отобранных в вегетационных опытах. Инокуляция семян бобовых растений клубеньковыми бактериями способствует повышению продуктивности растений. В среднем, по всем штаммам величина увеличения биомассы надземной части пустынной акации *A. conollyi* составила 19,1%, кустарника *A. vilossumus* – 24,5%, полукустарника *A. unifoliolatus* – 11,2%. Высокая симбиотическая эффективность *A. conollyi* была выявлена при инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. AC1-1, AC8-1, *A. vilossumus* – *Rhizobium* sp. AV3, AV9 и *A. unifoliolatus* - *Rhizobium* sp. AU30-1. Средняя прибавка биомассы многолетних бобовых трав *O. transcaucasica* и *O. chorassanica* при инокуляции штаммами клубеньковых бактерий составила 17,2% и 36,1%, соответственно. Максимальное увеличение биомассы (30%) *O. transcaucasica* выявлено при инокуляции штаммами *Rhizobium* sp. OT136, в то время как наиболее высокая прибавка биомассы (46,8%) *O. chorassanica* наблюдалась при прямой инокуляции штаммом *Rhizobium* sp. OC107 и перекрестной инокуляции штаммом *Rhizobium* sp. OT102 (57,7%) по сравнению с растениями без инокуляции. Обнаружены многочисленные клубеньки на корнях растений *O. transcaucasica* (число клубеньков на каждом растении превышало 500 на 1 растение), так и *O. chorassanica* (более 200 клубеньков/растение) при инокуляции растений эффективными бактериями, однако у растений, растущих в естественных условиях, такого клубенькообразования практически не наблюдалось. Рост, развитие и высота четырехмесячных растений *Ammodendron conollyi*, инокулированных эффективными штаммами клубеньковых бактерий соответствовала высоте двух-трехгодичных растений, прорастающих в пустынных условиях.

Результаты полевых опытов по изучению влияния смешанных культур (*Rhizobium* и *Azspirillum*) на рост и развитие бобовых растений в условиях пустыни показали, что прибавка надземной части растений *A. conollyi* варьировала в диапазоне 10,7%–72,8% (в среднем 29,9%). При двойной инокуляции *A. vilosissimus* прибавка биомассы растений варьировала от 3,4% до 67,1% (в среднем 32,9%), а для *A. unifoliolatus* - от 6,7% до 30% (в среднем 18,5%). При двойной инокуляции по всем вариантам среднее увеличение биомассы *O. transcaucasica* составляло 34,4%, а для *O. chorassanica* – 59,7% по сравнению с неинокулированными растениями. На второй год вегетации растений *Onobrychis* наблюдался устойчивый рост. При этом интересно отметить, что, наряду с взрослыми растениями, наблюдается появление многочисленных молодых растений из прошлогодних опавших семян (рис. 6).



**Рис. 6. 2-ой год, ранняя весна, вегетация растений *Onobrychis transcaucasica* на опытном участке (модельное пастбище) Кызылкумской биостанции (Институт генофонда растений и животных АН РУз).**

На основании совокупности полученных результатов можно создать возобновляемый трехярусный зеленый пояс “Лес-пастбище”, состоящий из сообществ симбиоза ксерофитных бобовых растений в пустынных зонах Узбекистана. Первый растительный ярус сообщества ксерофитных бобовых растений состоит из песчаной акации *Ammodendron conollyi*, второй ярус из кустарника *Astragalus villosissimus* и полукустарника *Astragalus unifoliolatus* и третий ярус – из многолетних бобовых трав *Onobrychis transcaucasica* и *Onobrychis chorassanica*. Создание искусственной зеленой полосы типа “Лес-пастбище” из сообществ ксерофитных бобовых растений особенно важно в тех местах пустыни, где

орошаемая земля граничит с пустыней для предотвращения опустынивания населенных пунктов и сельскохозяйственных орошаемых земель, и зеленая полоса “Лес-пастбище” обогащает пустынные почвы естественным азотом и улучшает экологическую обстановку аридных зон Узбекистана.

Таким образом, выделенные нами местные эффективные штаммы рода *Azospirillum* и клубеньковые бактерии могут применяться для инокуляции злаковых и бобовых растений с последующим образованием ассоциативного и бобово-ризобиального симбиоза, тем самым, способствуя для повышения урожайности культур и биовосстановлению плодородия засоленных орошаемых земель. Полученные результаты могут служить конкретной рекомендацией для применения указанных бактерий в сельском хозяйстве и экологических целях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые с поверхности корней и ризосферы пшеницы, риса и кукурузы, произрастающих на орошаемых почвах Республики Узбекистан с различной засоленностью, выделены местные штаммы рода *Azospirillum*. Изучены морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства и 16S рРНК гены местных штаммов рода *Azospirillum* и определена их видовая принадлежность – *Azospirillum brasilense* (A1-3, A4-3, A13-1, A13-5, A13-6, A13-7); *Azospirillum lipoferum* (C1-1, C2, 3-3, C4-3, C6-1, C7-1, C11-3).

2. Впервые на основании подтверждения GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI, USA) были обнаружены два новых вида бактерий: (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) *Azospirillum* sp.A13-4 и (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) *Azospirillum* sp.C10-8.

3. Отобранные местные штаммы бактерий рода *Azospirillum* были устойчивы к концентрациям хлорида натрия до 400 мМ, при концентрации 200 мМ NaCl азотфиксирующая активность сохранялась на 60-78% по отношению к исходной активности. Показано, что азоспириллы являются потенциальными продуцентами индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) (3,1-5 мг/л культуральной жидкости). Установлено наличие 4-х плазмид (90, 120 и двух более чем 300 МДа) в штаммах *A. brasilense* A13-6 и *A. lipoferum* C3-3.

4. Впервые продемонстрирована модель образования ассоциативного симбиоза бактерий рода *Azospirillum* с одноклеточными зелеными водорослями *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 *in situ* и образование пара-клубеньков на корнях растений пшеницы, инокулированных штаммами *A. brasilense* A1-3, A13-6.

5. Установлено, что инокуляция растений пшеницы и риса штаммами *Azospirillum* увеличивала биомассу растений пшеницы сорта «Унумдор бугдой» до 38% и риса сорта «Авангард» до 46,9% по сравнению с контролем в микровегетационных опытах, а в полевых опытах средняя прибавка урожайности зерна составляла для сорта пшеницы «Старшина» 6 %, а для риса сорта «Авангард» – 6,2%.

6. Выделены и очищены клубеньковые бактерии бобовых растений *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica*. Впервые при таксономии клубеньковых бактерий ксерофитных бобовых растений установлено, что наряду с клубеньковыми бактериями родов *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, среди выделенных бактерий обнаружены также представители родов других классов *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*) и *Gamma*proteobacteria (*Enterobacter*, *Pantoea*), которые способны образовывать азотфиксирующие клубеньки на корнях бобовых растений.

7. Установлено, что для клубенькообразования ксерофитных бобовых растений необходимы условия, близкие к природным (песок в качестве посадочного материала). Проведены микроскопические исследования клубеньков *A. conollyi* и *A. villossimus*, показан полиморфизм бактериоидов внутри клубеньков и отсутствие бактериоидов в клубеньках при засолении 300 мМ NaCl.

8. Эффективный симбиоз растений *A. conollyi* со штаммом AC1-1, *A. villossimus* со штаммом AV3 и *A. unifoliolatus* - штаммами AU3-1, AU30-1 усиливал адаптацию растений к засолению от 200 до 300 мМ NaCl, в то время как симбиоз *O. transcaucasica* со штаммами OT111, OT117 и *O. chorassanica* - штаммами OC107, OC109 усиливал устойчивость растений к засолению до 150 мМ NaCl.

9. Обнаружено наличие одной формы альдегидоксидазы и ксантиндегидрогеназы растений *O. transcaucasica* и по двух форм ферментов у *O. chorassanica*. Штаммы *Rhizobium* sp. OT103 и *Rhizobium* sp. OC107 имели по одной форме ксантиндегидрогеназы. Выявлены две формы глутаминсинтетазы надземной части бобовых растений и по одной форме глутаминсинтетазы в корнях растений и их клубеньковых бактерий. Интенсивность активности ферментов зависела от условия выращивания бактерий и их растения-хозяина.

10. Установлено, что при инокуляции семян бобовых растений эффективными штаммами клубеньковых бактерий в пустынных условиях в среднем по всем штаммам величина прибавки биомассы растений составляла: *A. conollyi* 19,1%, *A. villossimus* 24,5%, *A. unifoliolatus* 11,2%, *O. transcaucasica* 17,2%, *O. chorassanica* 36,1%. При инокуляции растений с смешанной культурой *Azospirillum* и клубеньковых бактерий (двойная инокуляция) прибавка биомассы растений достоверно увеличивалась и составляла: *A. conollyi* 29,9%, *A. villossimus* 32,9%, *A. unifoliolatus* 18,5%, *O. transcaucasica* 34,4%, *O. chorassanica* 59,7%.

**SCIENTIFIC COUNCIL ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREE OF  
DOCTOR OF SCIENCE 16.07.2013.B.01.03 AT THE NATIONAL  
UNIVERSITY OF UZBEKISTAN AND INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**  

---

**INSTITUTE OF MICROBIOLOGY**

**SHAKIROV ZAIR SAATOVICH**

**ASSOCIATIVE BACTERIA OF *AZOSPIRILLUM* GENUS AND NODULE  
BACTERIA OF XEROPHYTE LEGUMINOUS PLANTS OF UZBEKISTAN**

**03.00.04 – Microbiology and virology  
(Biological sciences)**

**ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION**

**T a s h k e n t – 2015**

**This Post Doctorate thesis has been registered with the number 16.07.2013. B.01.03 at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan.**

Doctoral dissertation is carried out at the Institute of microbiology.

The abstract of dissertation in three languages (Uzbek, Russian, English) is placed on web page to address [www.nuu.uz](http://www.nuu.uz) and information-educational portal ZIYONET to address [www.ziyonet.uz](http://www.ziyonet.uz).

**Scientific consultant:**

**Khodzhibaeva Sanabar Mirzaevna**  
doctor of sciences in biology, professor

**Official opponents:**

**Yunus Khanov Shavkat**  
doctor of sciences in biology, professor

**Akhmedova Zahro Rahmatovna**  
doctor of sciences in biology, professor

**Ismailov Zafar Fayzullaevich**  
doctor of sciences in biology

**Leading organization:**

**Institute of Gene Pool of Plants and Animals**

Defense will take place « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 at \_\_\_\_\_ at the meeting of Scientific council number 16.07.2013. B.01.03 at the National University of Uzbekistan and Institute of microbiology (address: str. Universitet-4, Almazar district, Tashkent city, 100214), Ph.: +998 71 227 12 24, fax:+998-71 246 53 21; 998 71 246 02 24, E-mail: [rector@nuu.uz](mailto:rector@nuu.uz)

The doctoral dissertation is registered at Information-resource center of National University of Uzbekistan, №M14905, it is possible to review it in the IRC (address: str. Universitet-4, Almazar district, Tashkent city, 100214)

Abstract of dissertation sent out on « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 year

(mailing report № \_\_\_\_\_ dated \_\_\_\_\_ 2015)

**K. Davranov**

Chairman of Scientific Council on award of scientific degree of doctor of sciences, doctor of sciences in biology, professor

**S.M. Nasmotova**

Scientific secretary of Scientific Council on award of scientific degree of doctor of sciences, doctor of philosophy, senior researcher

**T.G. Gulyamova**

Chairman of scientific seminar under Scientific Council on award of scientific degree of doctor of sciences, doctor of sciences in biology, professor



## Introduction (annotation of the doctoral dissertation)

**Topicality and demand of the subject of dissertation.** Higher yields of agricultural crops, limited use of fertilizers and plant protection products, along with the strengthening of plant adaptation to adverse agro-climatic and anthropogenic conditions are significant for agriculture, as well as environmental issues and environmental protection. To resolve these issues, many scientists are working in different areas of science, including microbiology, crop, soil science, ecology.

In this connection, special interest is in the rhizosphere nitrogen-fixing microorganisms, consisting of an associative symbiosis with non-leguminous plants. Among the associative bacteria much attention is paid to bacteria of the genus *Azospirillum*. It is due to their ability to fix nitrogen, the production of phytohormones, synthesis of a number of vitamins, production of substances with fungistatic activity, stimulation of mineral nutrition and improving the water balance of the inoculated plants. Consequently, *Azospirillum* inoculation plants can lead to increased growth, development and improvement of non-legume crop yields and legumes, as well as to replace costly, environmentally unfriendly traditional fertilizers. Bacteria of the genus *Azospirillum* shows a flexible carbon and nitrogen metabolism that allows them to adapt and develop in the competitive environment of the rhizosphere under adverse conditions.

Among mutualistic symbioses formed between soil microorganisms and plants, legume-rhizobial symbiosis has special place, occurring in the roots of leguminous plants in close cooperation with nitrogen-fixing rhizobia genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and *Mesorhizobium*. The legume-Rhizobium symbiotic community nodule bacteria on the roots of leguminous plants forms nodules, within nodule molecular nitrogen (N<sub>2</sub>) from the atmosphere is fixed and transferred to the plant in accessible mineral form, so naturally enriches soil with nitrogen.

Currently, about 80% of the territory of Uzbekistan is desert, semi-desert, and more than 50% of irrigated land is subject to secondary salinization. Therefore, combating desertification and salinization takes paramount importance in our Republic. If we consider that in such circumstances there is a gradual reduction in the range of communities legumes deserts, semi-deserts and arid zones, enriching the soil with biological nitrogen, there is a need to study the natural legume-Rhizobium symbiosis, ensuring its normal functioning, preservation of productivity of wild xerophytic desert legumes *Ammodendron conollyi*, *Astragalus villosimus*, *Astragalus unifoliolatus*, *Onobrychis transcaucasica*, *Onobrychis chorassanica*.

Given the critical importance of the existence of associative and legume-Rhizobium symbiosis in nature, the research of associative bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria of leguminous plants desert has both theoretical and practical, and ecological significance.

The requirement for realization of scientific-research work, within the framework of this thesis, meets the objectives stated in the Cabinet of Ministers of

the Republic of Uzbekistan “About the program of actions for the protection of environment of the Republic of Uzbekistan for 2008 – 2012” from september 19, 2008 № 212 and “about the program of actions for the protection of environment of the Republic of Uzbekistan for 2013 – 2017” from may 27, 2013 №142, to implement the comprehensive measures for environmental protection, environmental safety, conservation and restoration of natural systems and their biodiversity and the capacity for self-regulation.

**Conformity of research to priority directions of development of science and technologies of the Republic of Uzbekistan.** This work was performed under the priority areas of science and technology of the republic of Uzbekistan for 2012-2020.: №5. Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection. PFI-5. The study of the systematics and evolution, physiological and biochemical basis of the use of microorganisms as producers of physiologically active substances.

**International review of research on the topic of the thesis.** Bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria of leguminous plants intensively studied in many scientific centers, higher educational institutions of foreign countries, including the Indiana University (USA), Ghent University (Belgium), Pasteur Institute (France), The University of Lyon (France), The Hebrew University of Jerusalem (Israel), Centre of Microbial and Plant Genetics (Belgium), Northwestern Center of Biological Research (Mexico). Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences (Russia), due to their ability to increase the yield of cereals and legumes.

In recent years the mechanisms of molecular nitrogen fixing bacteria, the biosynthesis of plant hormones (auxin, gibberellin, cytokinin) (Centre of Microbial and Plant Genetics, Belgium), the formation of associative and legume-Rhizobium symbiosis, molecular biology and plant genes of bacteria responsible for the formation of symbiosis, (Pasteur Institute, France) have been studied in detail. Biologicals from bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria are used in agriculture as biological nitrogen and phyto-stimulators of plants as well as for environmental purposes, in particular in the prevention of soil erosion in arid regions (The Hebrew University of Jerusalem, Israel).

Currently, priorities are the following: to study nodule formation legume bacteria belonging to the genus *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, and the study of nitrogen fixation bacteria and strengthen adaptation associative and legume-Rhizobium symbiosis under saline conditions. Despite numerous studies, the study of the formation of associative symbiosis between leguminous plants is not still relevant, because the mechanisms of adsorption of bacteria on the root surface and the deformation of plant roots are not fully understood.

**The extent of knowledge of the problem.** Numerous studies are devoted to the isolation and molecular taxonomy of bacteria of the genus *Azospirillum* (Elmerich C., Okon Y., Lai R.), the study of associative symbiosis of cereals (Vanderleyden J., Ignatov V.V., Antoniuk L.P.), the effect of *Azospirillum* on growth, development and yield of crops (Bashan Y., Holguin G., Levanony H.,

Whitmoyer E.), the allocation of nodule bacteria nodule formation, efficiency symbiosis legumes (Holsters M., Simara B.V., Provorov N.A., Saimnazarov Y.B.).

In the literature there are only few details on the effect of salinity on the viability of *Azospirillum* (Rai R.), no work on the study of the model of education associative symbiosis with bacteria of the genus *Azospirillum* unicellular green algae. It should be noted that work on associative bacteria *Azospirillum* genus in the republic of Uzbekistan has not yet been carried out.

It lacks data on the study of wild nodule formation xerophytic desert legumes (sandy acacia *Ammodendron conollyi*, branchy *Astragalus villossimus*, one leaved *Astragalus unifoliolatus*, *Transcaucasian Sainfoin*, *Onobrychis transcaucasica*, *Khorasan Sainfoin*, *Onobrychis chorassanica*) bacteria belonging to the genus *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea* and the effect of double inoculation of mixed cultures (*Rhizobium* and *Azospirillum*) on the growth and development of the desert legumes.

No study of enzymes (aldehyde oxidase, xantindegidro-dehydrogenase and glutamine synthetase) responsible for the stressful conditions of leguminous plants and nodule bacteria under saline conditions.

**Communication thesis thematic plans of research work are reflected in the following projects:**

in fundamental research projects 5-F “Study of molecular biochemical aspects of associative biological nitrogen fixation in bacteria of the genus *Azospirillum*”(1998-2002);

F-4.1.23 “Enhancing adaptation nitrogen-fixing symbiosis *Onobrychis* in conditions of salinity and drought”(2003-2007);

within the framework of international grants:

INCO-Copernicus ERBIC15 CT98 0136 “Biotechnology for improving the adaptation of leguminous trees under stress” (1998 - 2001);

USAID / CDR / CAR №TA-MOU-98-CA17-032 “Using the symbiotal biodiversity of microorganisms to enhance plant adaptation to stress conditions” (1999-2002);

USAID / CDR / CAR № TA-MOU-02-SA21-022 “Adaptation of *Onobrychis*, type of salt and drought-resistant perennial grasses of the Central Asian deserts for the production of culture and combating desertification” (2003-2006).

**Purpose of research** was the selection of associative bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria of leguminous xerophytic plants, studying their morphological and cultural, physiological and biochemical properties, associative and legume-*Rhizobium* symbiosis, its impact on growth, development and yield of cereals and legumes.

**The following objectives** of research were put ahead, to achieve performance goals:

to highlight local strains of bacteria of the genus *Azospirillum*, study their morphological, cultural, physiological and biochemical properties, determine the taxonomic status by analysis of the 16S rRNA gene and the plasmid composition reveal the nitrogen-fixing ability of bacteria of the genus *Azospirillum* and their contribution to nitrogen fixation potential of soils under saline conditions;

to explore the formation of associative symbiosis of bacteria *Azospirillum* and its impact on growth, development and yield of crops;

to isolate and study the morphological and cultural, physiological and biochemical properties of the strains of nodule bacteria of leguminous xerophytic plants *A. conollyi*, *A. villossimus* and *A. unifoliolatus*, identify symbiotic properties of selected nodule bacteria on the basis of screening to select the most effective strains and to establish their phylogeny based on 16S rRNA gene;

to investigate the effect of salinity and drought on growth and development of symbiosis desert legumes, conduct light and electron microscopy of bacteria and tubers of plants, explore the glutamine syntetase plants and nodule bacteria;

to identify and explore the culture-morphological, physiological and biochemical characteristics and symbiotic nodule bacteria perennial legumes *O. transcaucasica* and *O. chorassanica*; make their molecular genetic analysis, reveal the influence of stress factors (salinity, drought) on the growth and development of *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* and explore enzymes aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase plants and nodule bacteria under saline conditions;

comparative evaluation of the associative and legume-Rhizobium symbiotic efficiency of local strains of bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* field desert conditions.

**Objects of the research** are the local strains of bacteria of the genus *Azospirillum*, derived from cereals and nodule bacteria - from the desert legumes *Ammodendron conollyi*, *Astragalus villossimus* and *Astragalus unifoliolatus*, perennial legumes *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica*.

**Subject of the study.** The role of the associative and legume-Rhizobium symbiosis on growth, development and yield of grain and leguminous plants xerophytic desert in Uzbekistan.

**Research methods.** In the course of the study were used microbiological, physiological, biochemical, molecular genetic, phylogenetic and agronomic practices.

**Scientific novelty** of the research is as follows:

for the first time in Uzbekistan with the roots of wheat, corn, rice and rhizosphere isolated local strains of associative nitrogen-fixing bacteria of *Azospirillum*; by studying the morphological and cultural, physiological and biochemical properties and molecular genetic taxonomy established systematic position of isolated bacteria: they belong to the genus *Azospirillum*, type *A. brasilense* and *A. lipoferum*;

two new species of bacteria of the genus *Azospirillum* sp. A13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) and *Azospirillum* sp. C10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) were isolated from the roots of wheat for the first time;

for the first time it was found that inoculation of seeds of wheat and rice by local associative bacteria of the genus *Azospirillum*, the formation of para-nodules on the roots of wheat plants is observed; and on the roots of rice is found excessive increase in the amount of hair growth and lateral roots;

for the first time it was developed the method of determining the formation of associative symbiosis with bacteria of the genus *Azospirillum* unicellular green algae *Chlorella sorokiniana* UTEX-260;

for the first time from nodules *A. conollyi*, *A. villosimum*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* isolated nodule bacteria;

for the first time in the nodules of plant *A. conollyi*, *A. villosimum*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica*, along with nodule bacteria of the genus *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, found the genera of other classes *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*), *Gammaproteobacteria* (*Enterobacter*, *Pantoea*), capable of forming nitrogen-fixing nodules on the roots of plants;

shown, that the legume - rhizobial symbiosis plants *A. conollyi*, *A. villosimum* and *A. unifoliolatus* strains *Rhizobium* sp. AC1-1, AV3 and AU3-1, AU30-1 enhanced the adaptation of plants to salinity from 200 to 300 mM NaCl, and the symbiosis of *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* with strains of *Rhizobium* sp. OT111, OT117 and OC107, OC109 to 150 mM NaCl, while the set accumulation elements (Na, Mg, Fe, Ca, P, K) and plants *O. transcaucasica*, *O. chorassanica*;

was found that legume-rhizobial symbiosis provides a normal growth and development of plants *A. conollyi*, *A. villosimum* and *A. unifoliolatus* at 6.41% strength of soil moisture, while *O. chorassanica* and *O. transcaucasica* enough 8.65% soil moisture;

dependence of the activity of the enzyme glutamine synthetase, aldehyde oxidase and xantinehydrogenase bacteria and plants from growing conditions was observed.

**Practical results** of the research are following:

created collection of bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria xerophytic legumes *A. conollyi*, *A. villosimum*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica* with different salt tolerance;

formation of para-nodules on the roots of wheat *A. brasilense* strains A1-3 and A13-6 has prospects in the applied aspects for the future establishment of similar leguminous plants form nitrogen-fixing nodules for self-sufficiency of cereals (wheat, rice, rye, etc.) with nitrogen from the atmosphere. *A. brasilense* A1-3, A13-6, *A. lipoferum* C1-1; C2, S3-3 can be used in agriculture to increase yields of cereals;

results extended our knowledge of nodule formation of leguminous plants, namely the nature of leguminous plants form nitrogen-fixing nodules not only with alfaproteobacteria (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*), but also with representatives betaproteobacteria (*Burkholderia*, *Achromobacter*) and gammaproteobacteria (*Enterobacter*, *Pantoea*);

effective symbiosis of nodule bacteria enhanced adaptation of the host plant to salinity from 150 to 300 mM NaCl, which can be used in combating desertification of moderately saline land. Legume-rhizobial symbiosis of plant *Onobrychis transcaucasica* can serve as an alternative to alfalfa in the rotation for the bioremediation of moderately saline irrigated lands;

in general there is a basis for creating a renewable three-tiered green belt “wood-pasture” in the deserts of Uzbekistan, which is made up of communities of xerophytic legume symbiosis, providing itself with nitrogen and, at the same time, enrich the desert soil biological nitrogen that can be used in the fight desertification of soils.

**The reliability of the results** based on the fact that all of the digital data of physiological, biochemical and agronomic research are processed using advanced computer technology.

**Theoretical and practical significance of the research results.**

Theoretical significance of the research findings is that, plant-microbial associations having flexible natural ecological adaptation, the fertility of saline soils and irrigated desert areas can be improved. Problem of salinity and desertification can be solved by using a complex association of salt-tolerant self-recreating beneficial microorganisms (*Azospirillum* and nodule bacteria) that provide saline soils and plants with bioavailable forms of nitrogen and phosphorus, thus improving root nutrition due to production phyto-hormones.

The practical significance of the work lies in the fact that the fundamental data obtained will help in the future to use them to solve the problems of agriculture in republic by creating new, efficient, environmentally friendly bacterial fertilizers and biological agents of the new generation, characterized by a complex effect on the soil and plants, which undoubtedly, together will help restore fertility of irrigated saline soils, improve productivity and sustainability of crops to salinity.

**Implementation of research results.** We have developed methods for seed germination of wild perennial xerophytic legumes, inoculation of bacteria of the genus *Azospirillum* plants and rhizobia, their cultivation in pot and field desert conditions were used in international projects: USTC number P-225 “Research of sand stabilization technique” and had the following results: seed germination is 90-95%, while in natural conditions germination of seeds is 5-10%, and 4-month-old plants grown in vegetation and desert field experiments conform to 2-3 one-year plants growing under natural desert conditions. Project Executing Institute the gene pool of plants and animals of RUz AS, 2005-2008. (Reference № FTC-0213/350 from 05.22.2015 the committee for coordination of science and technology under the Cabinet of Ministers); biological agent “Azos-Uz” created on the basis of *Azospirillum brasilense* A13-6 introduced in the Tashkent scientific research center of rice, grain and leguminous crops on the area of 8 ha and farm of Bukhara region Ramitan area on the area of 4 ha, which produced surplus wheat crop (6%) and rice (6,2%) (Reference of dissertation research implementation from 06.08.2015, Ministry of Agriculture and Water Resources of Uzbekistan).

**Work approbation.** The main provisions contained in thesis presented and reported 20 scientific conferences, including 12 international Symposium, congresses, conferences, in particular on the “5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation” (Luso, Portugal, 1998); “10th Congress of Bacteriology and Applied Microbiology” (Paris, France, 2002); “International Congress Rhizosphere, Perspectives and Challenges - A Tribute to Lorenz Hiltner” (Munich, Germany, 2004); “Biotechnology microbes” (Moscow, Russia, 2004);

Moscow International Congress “Biotechnology: state and prospects of development”. (Moscow, Russia, 2009); “9th European Nitrogen Fixation Conference” (Geneva, Switzerland, 2010); “Biology Science of XXI Century” (Pushchino, Russia, 2012). “Agricultural science and agro-business at the turn of the century” (Novosibirsk, Russia, 2014) and 7 national, in particular, “The problems of modern microbiology and biotechnology” (Tashkent, 2003); “III Congress of microbiologists of Uzbekistan” (Tashkent, 2005); “IV Congress of microbiologists of Uzbekistan” (Tashkent, 2008); “V Congress of microbiologists of Uzbekistan” (Tashkent, 2012).

**Publication of the results.** The main content of the thesis is reflected in 38 scientific papers, including 18 papers in scientific journals, of which 4 articles abroad, 20 abstracts in materials of domestic and international conferences and congresses.

**The structure and volume of work.** The thesis consists of an introduction, 6 chapters, conclusions, list of references and contains 204 pages of text, including 48 pictures and 31 tables.

## THE MAIN CONTENT OF RESEARCH

**In the introduction** it was proved the urgency of the thesis, set out the purpose and objectives of the study, noted the scientific and practical significance of the work, stated the position to be defended.

**In the first chapter** of the thesis wide analysis of the current state of research on the distribution and taxonomy of bacteria of the genus *Azospirillum*, formation of associative symbioses, influence of bacteria of the genus *Azospirillum* on growth, development and productivity of plants, systematics of nodule bacteria and legumes, formation of legume-rhizobium symbiosis, biochemistry of nitrogen fixation and osmo-adaptation of rhizosphere bacteria to conditions of salinity is presented.

**The second chapter** describes the following methods of research bacteria of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria: isolation, cultivation, the study of morphological and cultural, physiological and biochemical properties, 16S rRNA analysis, determination of plasmids, phylogeny of bacteria, electron microscopy, determination of the nitrogen-fixing activity and the IAA, glutamine, aldehyde, xanthine dehydrogenase, as well as methods for determining salt tolerance, drought tolerance and carrying microvegetative, pot and field experiments.

**The third chapter** of the thesis is devoted to species of associative bacteria *Azospirillum*.

For the first time from the surface of the wheat, rice, maize roots and their rhizosphere grown in irrigated soils of the Republic of Uzbekistan, are isolated and purified 100 bacteriological cultures that were assigned to the genus *Azospirillum*. Colonies of bacteria identified in potato agar medium, the culture features matched the description of bacteria of *Azospirillum* (Shilyaeva and Yakovlev, 1988), which grew up in 2-3 hours at a temperature of 28° C, to form a homogeneous, translucent, colorless colonies with a metallic sheen, sealed in the center, rounded

in shape, with a diameter of 2-3 mm. All isolates were *Azospirillum* microaerophiles with similar morphological features: short, slightly curved with monopolar and bipolar with monotrihal flagella.

Comparative analysis of the bacterial plasmid composition showed the presence of four *Azospirillum* megaplasmids with a molecular weight of 90, 120 and more than two MDA 300 in 0,4% agar gel.

To confirm the results obtained by the taxonomy based on phenotypic characteristics of bacteria subjected to genetic analysis of the 16S rRNA gene. A comparative BLAST nucleotide sequence analysis of 16S rRNA gene of bacteria was carried, which established that bacteria A1-3, A4-1, A13-6 97% are identical with *A. brasilense* (AM419042). The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of bacteria C3-3 is 98% identical to the genes of the bacteria *A. lipoferum* ICMP 8672 (EF100149).

Phylogenetic tree of bacteria pertaining to the species *A. brasilense*, formed three clusters (fig. 1 a). The first cluster consisted of bacterium *A. brasilense* A1-3, A4-1, A13-6, the second and third clusters are A13-7 and A13-4 respectively. Strains of *A. lipoferum* C1-1, C3-3, C10-8 formed only a branched cluster (fig 1b). On the basis of confirmation of GenBank of the National Center for Biotechnology information (NCBI, USA) were discovered two new species of bacteria – *Azospirillum* A13-4 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) and *Azospirillum* C10-8 (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>).

On the basis of the research association of bacteria are classified as *Alphaproteobacteria*, order *Rhodospirillales*, family *Rhodospirillaceae*, genus *Azospirillum*, type *A. brasilense* (A1-3, A4-3, A13-1, A13-5, A13-6, A13- 7) *A. lipoferum* (C1-1, C2, C3-3, C4-3, C6-1, C7-1, C11-3).

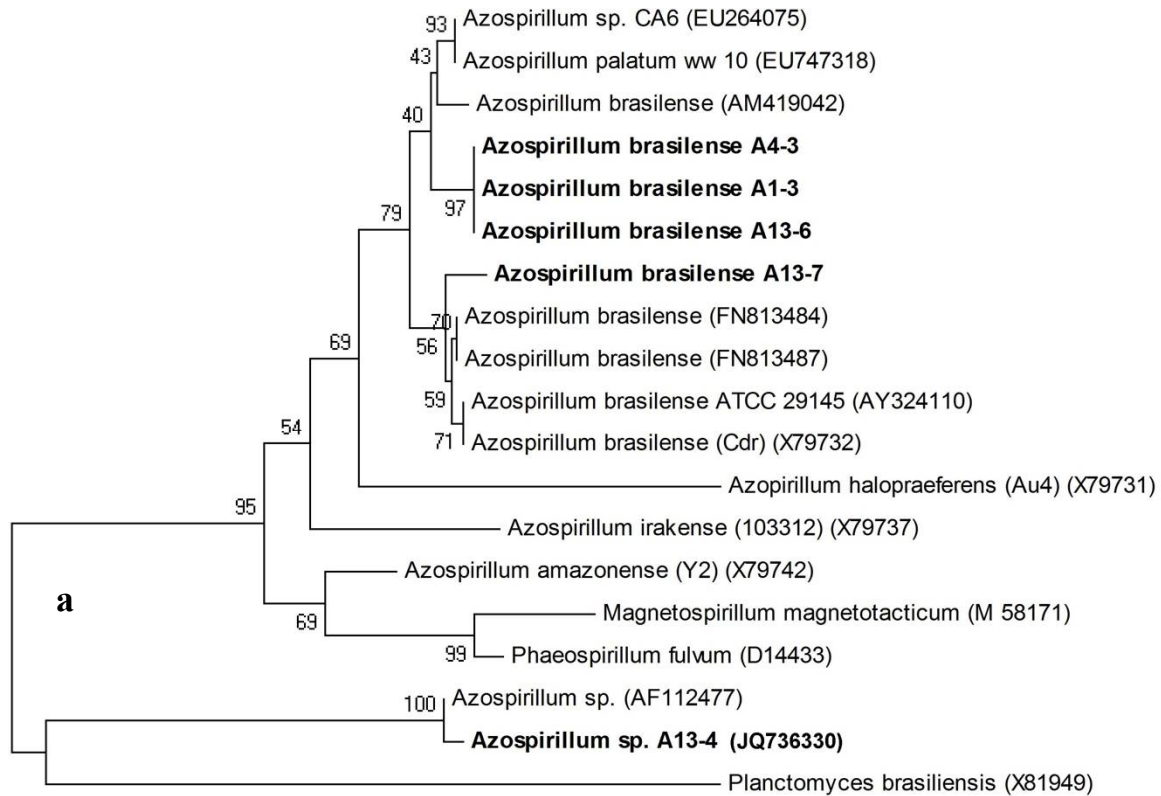
Nitrogen-fixing activity of bacteria was detected in microaerophilic conditions (500 - 4200 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/ bottle/day). It is found that the nitrogen-fixing activity of the bacteria at a salt concentration of 200 mM NaCl, was reduced by 22-40% relative to the initial values.

Potential nitrogen fixation of soil samples in the presence of a suspension of *A. brasilense* A1-3 showed that at 150 mM NaCl unsterile soil nitrogen fixation activity exceeds almost 5 times (900 uM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/bottle/h) the corresponding activity sterile soil (160 uM C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/bottle/h).

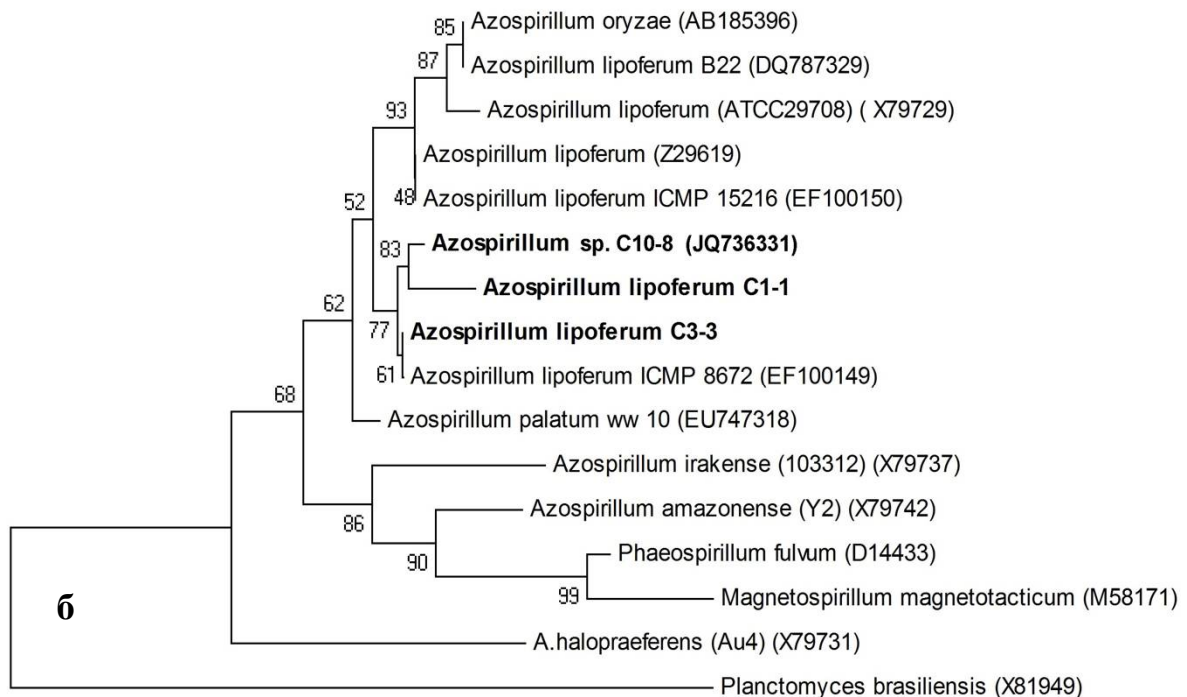
Nitrogen-fixing bacteria of *Azospirillum* activity under saline conditions is an adaptive response to change in water potential in the environment.

Under sterile micro-vegetation experiments, biomass of wheat varieties "Unumdor bug'doy" in variants inoculated with *A. brasilense* strains A1-3, A13-6, A13-7, *A. lipoferum* C2, C4-3, C7-1 on 20-38% was higher than the control. Alternatively, the biomass of wheat varieties and "Karlik 85" increased by 19,6-63% compared with the control. Nitrogen-fixing activity of associative symbiosis "azospirillum-wheat" ranged from 145 to 370 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plant/day. In the A1-3 and A13-6, observed spontaneous formation of para-nodules 1,0-1,5 mm on the roots of plants (fig. 2). This phenomenon is considered to be unique for non-leguminous plants. In this regard, we have special experiments in which wheat





0.02



0.02

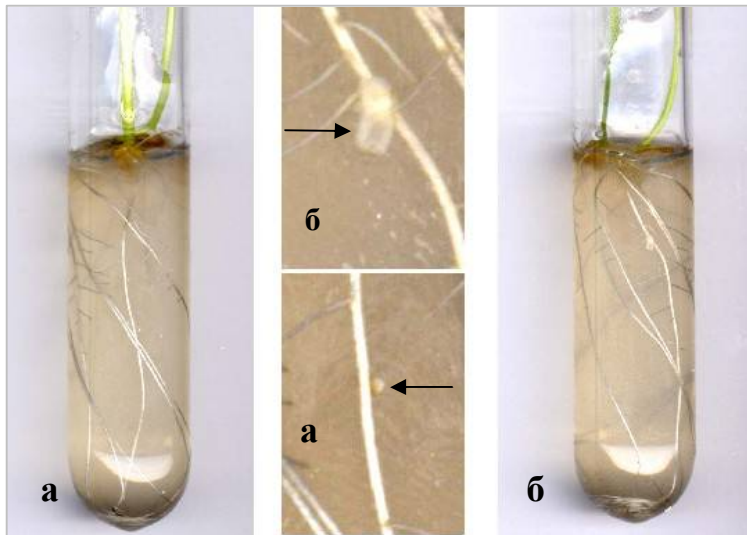
**Fig. 1. Phylogenetic tree based on the analysis of 16S rRNA gene strains of *Azospirillum brasilense* (a) *Azospirillum lipoferum* (b). Branched sample is obtained by "joining the neighbour". Non GenBank samples are shown in parentheses.**

seeds are inoculated with bacteria A1-3, A13-6 and grown in sterile conditions for 3 days at 28° C. The results showed that 25-30% of wheat germ formed 1-2 paranodules. The results proved conclusively that nodule formation in wheat seedling roots are not accidental, but rather is a natural interaction between the bacteria of the genus *Azospirillum* A1-3, A13-6 and wheat plants.

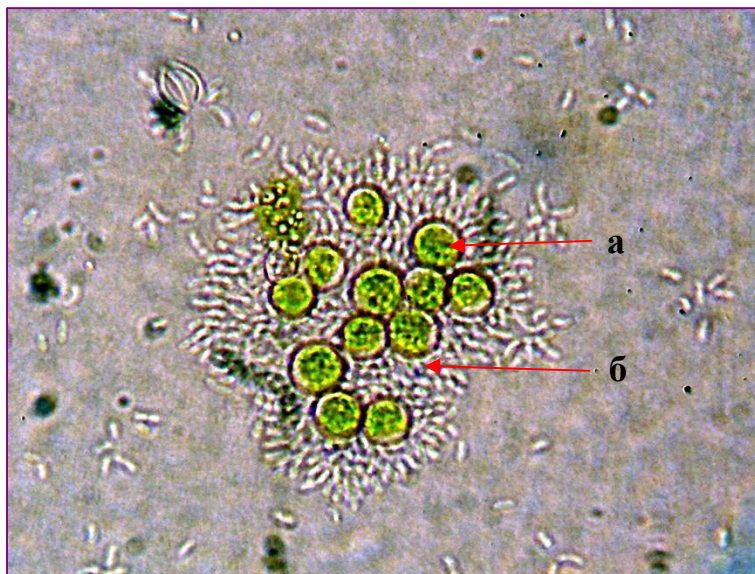
Inoculation of rice seedlings strains of *A. brasilense* (A1-3, A13-4, A13-5, A13-6, A13-7) and *A. lipoferum* (C1-1; C2-2; C4-3; C10-4; C10 -8; C11-5) showed that the plant biomass rice varieties “Avangard” increased from 10% to 46.9% in comparison with the control plants.

The first model of associative symbiosis formation with bacteria of the genus *Azospirillum* unicellular green algae *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 observed *in situ* in laboratory conditions <https://www.youtube.com/watch?v=eTz6An1P7ro> (fig. 3).

Growing bacteria of different strains of *Azospirillum* in a liquid medium



**Fig. 2. Formation of paranodules on the roots of wheat genus “Unumdor bug'doy” by inoculation with *A. brasilense* A1-3 (a) and A13-6 (b). Paranodules shown with arrows.**



**Fig. 3. Model of associative symbiosis formation between *A. brasilense* A13-6 (a) and *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 (b).**

containing tryptophan as the sole carbon source revealed increased production of indole-3-acetic acid (IAA) from 0,7 to 5 mg / l of culture medium.

Study of aerotaxis salt tolerant strain C10-8 in nitrogen-free Dobereyner environments containing NaCl concentration from 50 mM to 250 mM, shows that while growing the bacteria within 3 days, bacteria “formed” bacterial ring which mobility is dependent on the gradient of oxygen growing medium.

Chemotactic properties of bacteria was observed, mainly in relation to the salts of organic dicarboxylic acids.

Conducting field experiments on the inoculation of cereals and rice varieties “Avangard” and the cultivar “Starshina” with *Azospirillum brasilense* A13-6 (Azos-Uz) led to a significant increase in grain yield. Inoculation of rice varieties, “Avangard” biological agent “Azos-Uz” increased rice yield by 6,2%, while economic efficiency was 780,000 UZS/ha. Inoculation of wheat varieties “Starshina” biologic “Azos-Uz” increased productivity by 6% while net income amounted to 250,000 UZS/ha.

Based on these data, the local strains of the genus *Azospirillum*-efficient associative symbiosis with monocots can be recommended for pre-treatment of seeds of different cereals grown in Uzbekistan.

**In the fourth chapter** presented the results of research of nodule bacteria desert xerophytic beanstalk *Ammodendron conollyi*, shrubs *Astragalus villosimus* and dwarf shrubs *Astragalus unifoliolatus*.

Research and development work was started with the search for the root nodules of xerophytic desert plants’ legumes growing in the wild in the desert Kyzyl Kum. From nodules of leguminous plants allocated 150 isolates of nodule bacteria. Isolated nodule bacteria (AV) *A.villosimus*, were mostly fast growing bacteria, whereas the bacteria (AC) *A.conollyi* and (AU) *A.unifoliolatus* consisted of slowly and rapidly growing bacteria. The doubling time of rapidly and slowly increasing isolates ranged from 20 to 45 minutes. All bacteria are grown in the temperature range 12 - 40° C, the optimum temperature 28° C. Electron-microscopic study of representative samples of nodule bacteria strains were identified as monopolar monotrichal stick-shaped bacterial cells.

For seed germination was selected the optimal combination, including seed treatment with sulfuric acid and for subsequent scarification root of the seeds at which 90-95% seed germination of wild desert xerophytic perennial legume plants under sterile conditions.

Research of legume-rhizobium symbiotic nodule bacteria was carried out in pot experiments. In pot experiments it was observed intense growth and development of plants, after 2 months of rearing, in all cases, we found nodule formation (Table 1). Nodules *A. conollyi* formed after inoculation were pink and large 7 mm in diameter. High nitrogen-fixing activity detected by direct inoculation of rhizobia AC1-1, AC2, AC12-1, AC18-1, AC21, AV1 (4,77-6,91 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> pant/hour) isolated from nodules of plants *A. conollyi*. High legume-rhizobium symbiosis of plants *A. conollyi* observed when inoculated with bacteria AC1-1, AC8-1, AC11, AC12-1, AC18-1, AV1, AV8-1, AV9-1, AV30 and biomass of the aerial part of the plant increased from 43% to 68,8% compared to

controls (Table 1). High nitrogen-fixing activity of the plant *Astragalus villosissimus* observed when inoculated with bacteria AC8-1, AC11, AV15, AV36-1 (3,04-5,64 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> pant/hour), while symbiotic efficiency varied from 21,5% to 28,4% when inoculated strains AV1, AV3, AV8-1, AV9 and AC8-1 (Table 1). The high efficiency of the symbiosis *A. unifoliolatus* observed with direct inoculation strains AU23, AU28, AU30-1 and cross-inoculation strains AV1, AV2, AV6-1, AV8-1 and AV9-1.

In the process of natural selection, xerophytic legumes in nature exclusively adapted to desert conditions, it was proven by studies of nodule formation of plants *A. conollyi*, *A. vilosissimus* and *A. unifoliolatus* in a pot experiment, which required conditions close to natural.

According to the study of glutamine synthetase (GS) it was found that nodule bacteria contained one form of WAN, and plant parts of leguminous plants are two forms of glutamine synthetase (GS1, SWS2), which differed in electrophoretic mobility and some physico-chemical properties. Glutamine nodule bacteria played a role in the formation of legume-Rhizobium symbiosis.

The study of plasmid formulation of effective nodule bacteria (AC15, AV1, AV3, AV8-1, AV9, AV9-1) revealed the presence of three plasmids with molecular weight 118, 370, and 515 KB.

Excessive formation of melanin was observed in strains AU30-1, AV30; less - was observed in strains AC11, AU17-1, AU30-2, AV1 and AV6-1.

Comparative BLAST - analysis of the nucleotide sequence 16S rRNA genes of the local strains of nodule bacteria showed that the genes of strains AC1-1, AC8-1, AC21, AV1, AV3, AU3-1, AV8-1, AV9, AU30-1 97% were identical to genes of *Rhizobium* sp. GGNM 66 (EF420109). The genes of bacteria AC15, AU17-1, AU30-2, AU7 97% coincided with those of bacteria like *Burkholderia cepacia* NBRAJG97, AV6-1 strains AC11 and 98% were identical to bacteria *Achromobacter xylosoxidans* (FM163487).

The phylogenetic tree, created on the basis of 16S rRNA gene showed that the studied bacteria formed 4 clusters: AU7 strain formed the first cluster, the second group included strains AC11, AC15 and AV6-1, strains AC15, AU17-1 and AU30-2 formed the third group, finally, the strains of nodule bacteria AC1-1, AC8-1, AS21; AV1, AV3, AV8-1, AV9 and AU3-1; AU30-1 formed the fourth largest group. From the data obtained it can be concluded that the nucleotide sequence of 16S rRNA gene of the studied bacteria were highly identical to one another within the group, and the bacteria isolated from each legume plants were treated as class *Alphaproteobacteria* (*Rhizobium*), and class *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*).

*A. conollyi* when inoculated with a strain of *Rhizobium* sp. AC1-1 intensified resistance to salinity up to 300 mM NaCl. Thus biomass aboveground parts of plants decreased only by 6,6% compared with the control. Legume-*Rhizobium* symbiosis *A. vilosissimus* strains of *Rhizobium* sp. AV3 prevented the negative impact of 200 mM NaCl salinity, increased green biomass plants at the same time amounted to 4,4%. Same results were obtained with respect to the plant *A.*

Table 1

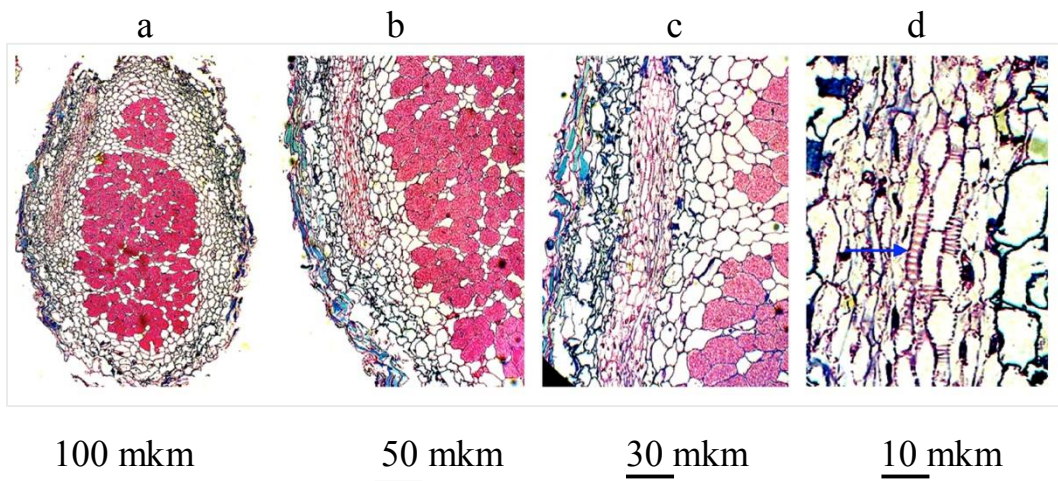
## Symbiotic properties of nodule bacteria of leguminous plants xerophytic desert in a pot experiment

<i>Ammodendron conollyi</i>				<i>Astragalus villosissimus</i>				<i>Astragalus unifoliolatus</i>			
Nodule bacteria	Nodule bacteria aver. quant. per 1pl	APA nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> pot /hour	Symbiosis efficiency, %	Nodule bacteria	Nodule bacteria aver. quant. per 1pl	APA nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> pot /hour	Symbiosis efficiency, %	Nodule bacteria	Nodule bacteria aver. quant. per 1pl	APA nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> pot /hour	Symbiosis efficiency, %
AC1-1	5±2,64	6,91±0,44*	147,7	AV1	18±2,16	1,72±0,99	121,5	AU2-1	19±2,0	0,47±0,21	62,5
AC2	5±3,0	5,59±0,25*	108,9	AV2	17±2,16	2,52±0,73*	102,5	AU3-1	41±5,29	3,33±0,96*	103,5
AC4-1	2±1,73	2,81±0,63	98,5	AV3	18±3,26	2,95±0,77*	122,4	AU4	19±4,58	1,5±0,51	62,5
AC8-1	3±1,0	2,5±0,43	143,2	AV6-1	5±1,0	0,61±0,27	95,6	AU7	19±2,64	1,44±0,78	65,1
AC11	4±1,0	2,34±0,19*	158,2	AV8-1	11±2,0	0,73±0,35	122,4	AU17-1	20±7,54	1,81±0,71*	116,0
AC12-1	5±3,0	6,91±0,32*	143,2	AV9	25±10,0	2,87±0,55*	123,2	AU20-1	23±4,58	1,58±0,45	109,8
AC13-1	3±1,0	2,82±0,63	108,9	AV9-1	10±1,63	1,31±0,65	106,8	AU23	32±8,54	4,02±0,52*	136,6
AC15	4±1,73	3,2±0,75	89,7	AV26-1	17±2,64	1,93±0,86*	104,3	AU28	24±6,55	1,87±0,68	136,6
AC18-1	4±2,64	4,67±0,38*	147,7	AV30	19±3,26	2,25±0,68	99,1	AU30-1	20±2,64	4,15±0,92*	151,7
AC21	5±1,0	4,67±0,67*	119,4	AV36-1	20±2,64	3,13±0,99*	114,6	AU30-2	21±3,46	1,42±0,64	121,4
AV1	4±1,0	4,77±0,57*	153,7	AC8-1	15±5,29	5,64±0,78*	128,4	AV1	32±4,35	4,41±0,99*	151,7
AV3	2±1,0	2,0±0,55*	134,3	AC11	20±3,6	3,04±0,85	114,6	AV2	35±5,29	3,07±0,4*	139,2
AV6-1	4±1,73	3,93±0,45*	132,8	AC15	29±5,29	5,44±0,91*	111,2	AV3	27±4,0	3,26±0,45*	116,0
AV8-1	4±2,64	2,43±0,7	150,7	AC21	15±4,0	0,7±0,44	121,5	AV6-1	28±4,0	2,46±0,41*	154,4
AV9	1±0,0	1,24±0,32	134,3	AC1-1	10±5,0	1,19±0,61	94,8	AV8-1	35±9,84	4,66±0,68*	157,1
AV9-1	3±1,0	1,77±0,39	168,6	AU17-1	12±5,56	0,86±0,47	103,4	AV9	26±3,6	2,77±0,24	125,0
AV30	3±1,0	3,03±0,79*	140,2	AU30-1	18±5,0	1,42±0,69	80,1	AV9-1	25±6,08	3,54±0,54*	145,5
Control	-	-	100	Control	-	-	100	Control	-	-	100

Note: \* - significant differences to control group (P <0,05), number of repetitions n = 3; ARA - acetylene-reductase activity. AC - nodule bacteria isolated from nodules *Ammodendron connollyi*; AV- nodule bacteria isolated from nodules of *Astragalus vilosissimus*; AU - nodule bacteria isolated from nodules of *Astragalus unifoliolatus*.

*unifoliolatus* strains *Rhizobium* sp. AU3-1. The formation of nodules was observed in the test plants in the presence of 300 mM sodium chloride.

Differential staining sections of nodules (light microscopy preparations) *A. villosimus* can be seen branched (colored pink) network in bacterial outer cover nodule cells (fig. 4), followed by area of formation and development centers of infection threads, which led to the formation of a fully colonized (densely colonized) deep internal plant cell nodules plants bacterioid nodule bacteria (fig. 4). In order to study and monitor the finer structures of nodule *A. conollyi*, inoculated with effective strains of nodule bacteria (AC8-1, AV1, AU30-1) conducted electron microscopy studies. Generally, bacterioids presented



**Fig. 4. Light microscopy cut nodule plant *A. villosimus*, inoculated with a strain of *Rhizobium* AV1: a, b - longitudinal part of the overall nodule, c - visible bacterial outer cortical network in plant parts, d - area of infectious thread; see the "ladder-like" intracellular infectious thread (they are indicated by an arrow).**

polymorphic structural forms - from globular (spherical) to clavate and many other random shapes. Based on the submitted data it can be assumed that as a result of legume-*Rhizobium* symbiosis occurred structural changes as nodule bacteria and cell nodules of leguminous plants - of the owner.

Thus, a broad specificity of xerophytic leguminous plants to nodule formation bacteria is the result of evolutionary adaptation of plants to desert conditions, i.e. in the roots of plants under the most extreme conditions form nitrogen-fixing nodules with bacteria belonging to different classes and childbirth (*Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*) living in the soil of the desert.

**The fifth chapter** is devoted to the research of nodule bacteria perennial legumes *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica*. From nodule plants *Onobrychis* grown in natural conditions 110 isolates were isolated nodule bacteria. Microscopic examination of bacterial cells showed that cells studied were typical sticks, their width ranged from 0,5 to 0,8 microns and length - from 1 to 1,5 microns. Colonies growing nodule bacteria on solid media appeared on 3-4 days of growth, and slow-growing ones - for 7-10 days. The size of the colony 3-day

strains ranged from 2 mm to 6 mm. The bacteria were resistant to 600 mM NaCl. Nodule bacteria sainfoin had the capacity to absorb mono- and disaccharides, sugar alcohols and amino acids. The pH of active growth of root nodule bacteria isolated sainfoin varied in the range pH 5 to 8,5, while the value of the physiological temperature ranged from 4° C with an optimum 41°C to - 28°C. On the basis of studies pre-selected nodule bacteria can be attributed to the genus *Rhizobium*.

The research of symbiotic nodule bacteria isolates properties was carried out in pot experiments that can detect a whole range of symbiotic characteristics: host specificity, nitrogen-fixing activity, efficacy, and others.

As results of experiments nodule formation showed, both species of *Onobrychis* observed in all cases. The maximum increment of green biomass plants *O. transcaucasica* (21,2% - 36,1%) was observed when inoculated strains of nodule bacteria OT102, OT103, OT111, OT117, OT130 and OT139 (Table 2). The most efficient symbiosis found in *O. Chorasanica*, inoculated plants with bacterial strains OC104, OC106, OC107, OC109, OC112 (Table 3), with the increase of above-ground parts of plants was from 20,5% to 34% compared with the control. Acetylene-reductase activity *O. transcaucasica* plants ranged from 33 to 63 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plants/hour, whereas for *O. chorassanica* - 31- 48 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/plants/hour (Table 3). The correlation between nitrogen fixation and

**Table 2**

**Nodule formation in plants *O. transcaucasica* when inoculated with nodule bacteria isolated from plants *Onobrychis***

Nodule bacteria	Average dry biomass per plant, mg	Average quantity of nodules 1plant	APA nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / plant /hour	Efficiency of symbiosis, %
Control	81,5 ± 2,14	-	-	100
OT102 <sup>(1)</sup>	104,0 ± 3,98*	2,0 ± 1,0	46,0 ± 11,0	127,6
OT103	103,0 ± 1,99*	2,3 ± 1,5	48,0 ± 4,58*	126,3
OT111	98,8 ± 2,27	1,6 ± 1,15	51,0 ± 10,5	121,2
OT114	89,8 ± 5,57	2,6 ± 0,52	49,0 ± 8,18*	110,1
OT117	111,0 ± 3,97*	2,6 ± 1,96	59,0 ± 3,0*	136,1
OT121	101,0 ± 8.08	10,0 ± 2,64	63,0 ± 8,88	123,9
OT123	93,6 ± 6,86	2,3 ± 0,57	51,0 ± 5,6*	114,8
OT130	107,0 ± 4,17*	2,3 ± 0,51	33,0 ± 14,17	131,2
OT136	102,2 ± 5,38*	3,0 ± 1,0	49,0 ± 4,58*	125,3
OT139	103,8 ± 5.62*	2,3 ± 1,12	57,0 ± 3,0*	127,3
OT140	99,6 ± 6,69	3,3 ± 0,51	62,0 ± 9,16*	122,2
OC107 <sup>(2)</sup>	92,6 ± 3,00	2,3 ± 0,57	53,0 ± 5,56*	113,6

Note: \* - significant differences to control group (P <0,05), n = 3; ARA – acetylene-reductase activity. OT<sup>(1)</sup> – nodule bacteria isolated from *Onobrychis transcaucasica* nodules; OC<sup>(2)</sup> – nodule bacteria isolated from *Onobrychis chorassanica* nodules.

Table 3

**Nodule formation of *O. chorassanica* when inoculated with rhizobia isolated from *Onobrychis***

Nodule bacteria	Average dry biomass per plant, mg	Average quantity of nodules 1 plant	APA nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /plant /hour	Efficiency of symbiosis, %
Контроль	75,3 ± 3,30	-	-	100
OC104	101,4 ± 8,48*	2,6 ± 0,57	46,0 ± 4,58*	134
OC106	94,8 ± 5,18*	1,6 ± 0,57	47,0 ± 6,08*	125
OC107	95,6 ± 2,85*	1,6 ± 1,15	43,0 ± 7,0	126,9
OC109	97,1 ± 7,01*	2,3 ± 1,15	45,0 ± 3,0*	128,9
OC112	90.8 ± 3.63*	2.6 ± 1.09	41.0 ± 6.0*	120.5
OC113	81.4 ± 6.50	1.3 ± 0.57	37.0 ± 6.24	108.1
OC138	78.6 ± 2.89	1.7 ± 0.64	40.0 ± 3.6*	104.3

Note: \* - significant differences to control group (P <0,05), n = 3

efficiency was observed at the plant *O. transcaucasica* symbiosis with nodule bacteria OT117, OT139, and at *O. chorassanica* - OC106, OC109. As a result, greenhouse experiments were selected 4 highly active local strains of *O. transcaucasica* (OT102, OT103, OT117, OT121) and three strains of *O. chorassanica* (OC104, OC107, OC109), inoculated significantly increased the biomass of the aerial part of leguminous plants compared to the control without inoculation.

BLAST results of the comparative analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene strains OT102, OT123, OT136, OT140 found that they were 99% identical to those of the 16S rRNA gene of *Rhizobium* sp. EGY2 (AU693662). The genes of bacteria OT114, OT124, OT148 99% matched with the bacteria *Pantoea agglomerans* GS2 (GQ374474). The study of the 16S rRNA gene of nodule bacteria *O. chorassanica* showed that the nucleotide sequence of strains OC104, OC107, OC109 and OC111 99% coincided with genes *Rhizobium* sp. EGY2 (AY693662). OC112 strain was 99% identical with the bacterium *Burkholderia caryophylli* WAB1944 (AM184283), OC106 97% coincided with *Pantoea agglomerans* HXJ (HM016799), OC138 98% coincided with *Enterobacter* sp. RF-100 (GQ205104) OC113 97% and was identical *Enterobacter* sp. B-13M3 (AJ874743).

In the analysis of phylogenetic tree that is based on the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of bacteria, it was found that the studied nodule bacteria *O. transcaucasica* OT102, OT103, OT111, OT115, OT117, OT123, OT136, OT139, OT140 belonged to the class *Alphaproteobacteria* (first cluster) (fig. 5. I a), bacteria OT114, OT124, OT148 – class *Gammaproteobacteria* (second cluster) (in fig. 5. I b). On the phylogenetic tree of nodule bacteria *O. chorassanica* formed three clusters (groups). Strains OC104, OC107, OC109 and OC111 included in the



first cluster refers *Alphaproteobacteria* (fig. 5. II a), the second cluster (OC112) - *Betaproteobacteria* (fig. 5. II b), and strains OC106, OC103, OC138 third cluster treated class *Gammaproteobacteria* (fig. 5. II c).

The study of plasmid structure of nodule bacteria showed that the strain of *Rhizobium sp.* OT102 found 1 mega-plasmid 1500 kb (Sym-plasmid), the strain *Rhizobium sp.* OT103 - two (1500 kb, 500 kb), cells strains of *Rhizobium sp.* OC107 and OC109 found three plasmids 1500 kb, 500 kb and 200 kb. Further research determined *nodC* gene strain *Burkholderia sp.* OS112. When restriction of plasmid pGEM-T, comprising *nodC* gene revealed three DNA fragments of about 900, 850 and 450 bp. BLAST (NCBI) analysis showed that the 850 bp DNA fragment is 100% identical with *nodC* gene strains *Bradyrhizobium sp.* ISLU256 (AJ560651), which is responsible for the synthesis of the enzyme N-asetilglucosaminiltransferazy. The study of salt tolerance showed that *O. transcaucasica* when inoculated with strains *Rhizobium sp.* OT111, OT117 and *O. chorassanica* when inoculated with strains of *Rhizobium sp.* OC107, OC109 intensified resistance to salinity up to 150 mM NaCl. It should be noted that both plant species of *Onobrychis* were 2 times more salt resistant than alfalfa (50-80 mM NaCl) as the above-ground biomass and underground parts of plants, indicated that plants are the best alternative *Onobrychis* when alfalfa crop rotation in agriculture.

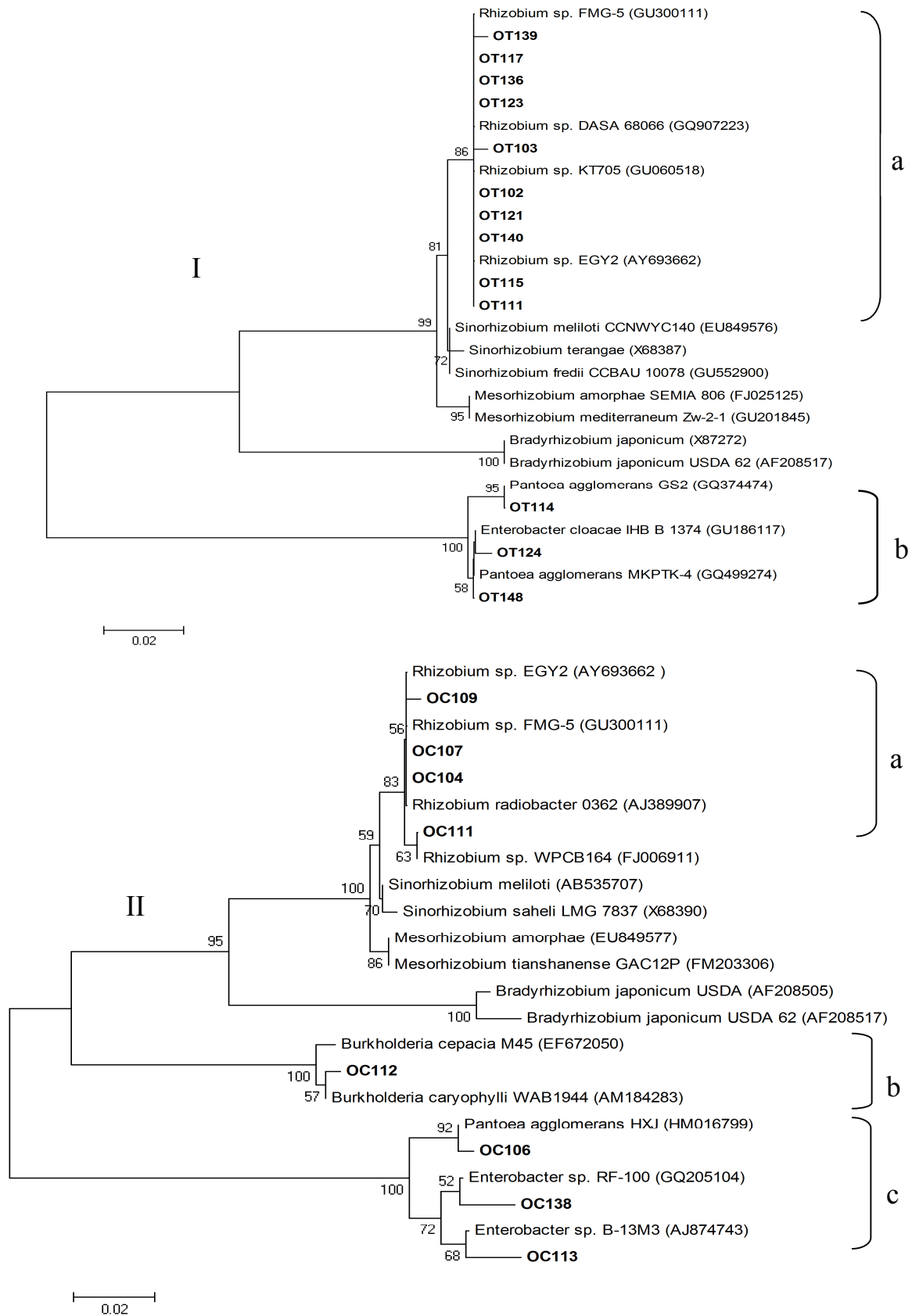
In the same experiment it was studied accumulation elements (Na, Mg, Fe, Ca, P, K) and symbiosis of *O. transcaucasica* and *O. chorassanica*, grown with different concentrations of NaCl. Maximum accumulation of plants' elements occurred at a concentration of 150 mM NaCl. It's worth to mention that the cultivation of plants *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* in effective symbiosis with rhizobia in moderately saline irrigated land may lead to the desalination of the soil due to the numerous mowing of above-ground parts of plants.

It is known that enzymes aldehyde oxidase (AO, EC 1.2.3.1) and xanthine dehydrogenase (XDH; EC 1.2.1.37) are involved in the process of adaptation in response to stressful environmental influences. When studying AO *O. transcaucasica*, subjected to salt stress (150 mM NaCl), revealed the presence of one form of AO in the aerial part and the roots of plants. Two forms of AO (AO1 and AO2) are found in the aerial parts of plants *O. chorassanica*.

In the aerial parts and roots of *O. transcaucasica* found only one form of XDH with low activity, while in the aerial part *O. Chorassanica* revealed the presence of two distinct forms of XDH activity.

AO at the nodule bacteria *Rhizobium sp.* OT103 and *Rhizobium sp.* OC107 is not detected, while these strains had one form of XDH, and the intensity of the enzyme activity was dependent on the conditions of cultivation of bacteria. Activity of XDH of nodule bacteria was significantly higher when grown in media containing 400 mM NaCl, than in control embodiments. It should be noted that with increasing NaCl concentration and enzyme activity of plant bacteria naturally increased as a response to salt stress.

Comparative study of the effect of moderate stress - salinity (at a concentration of 75 mM NaCl) and drought (watering minimum) on the growth



**Fig. 5. The phylogenetic tree based on the study of 16S rRNA gene strains of nodule bacteria *O. transcaucasica* (I) and *O. chorassanica* (II): a-*Alphaproteobacteria*, b- *Betaproteobacteria*, c- *Gammaproteobacteria***

and development of plants symbiosis *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* in the field has shown that the minimum irrigation plants *Onobrychis* had a negative impact on growth and development of plants than salinization.

Drought resistance of *Onobrychis* was studied by soil moisture from 6,15 to 8,65%. The maximum biomass of the aerial part of the plants inoculated with *O. transcaucasica* was 9,1 g/plant and *O. chorassanica* – 12,3 g/plant (at 8,65% moisture). At 6,15% moisture biomass of *O. transcaucasica* decreased more than 6 times (1,49 g / plant), while the biomass of *O. Chorassanica* -11 times (1,1 g plant) compared to plants grown in soil moisture at 8,65%. The slight decrease of soil moisture (from 8,6% to 6,15%) caused a significant reduction in plant biomass.

Thus, perennial legume grass of *Onobrychis* has much greater potential resistance to stress (salinity and drought) than alfalfa, and can be used for remediation and restoration of saline and desert land, as an alternative to alfalfa in the rotation at environmentally unfriendly land.

**In the sixth chapter** of thesis it is presented the symbiotic effectiveness of local strains of nodule bacteria *A. conollyi*, *A. vilosissimus*, *A. unifoliolatus*, *O. chorassanica* and *O. transcaucasica* model in desert field experiments.

Effective strains of bacteria of *Azospirillum* and nodule bacteria selected in pot experiments were used to inoculate the seeds of plants. Inoculation of plants' seed with nodule bacteria assisted to increase the productivity of all plant species. On average, the value of all strains increase of aerial part biomass of the desert acacia *A. conollyi* was 19,1%, shrub *A. vilosissimus* - 24,5%, dwarf shrubs *A. unifoliolatus* - 11,2%. High symbiotic effectiveness of *A. conollyi* was found when inoculated with strains of *Rhizobium* sp. AC1-1, AC8-1, *A. vilosissimus* - *Rhizobium* sp. AV3, AV9 and *A. unifoliolatus* - *Rhizobium* sp. AU30-1. Average growth of biomass of perennial legumes of *O. transcaucasica* and *O. chorassanica* inoculated with strains of nodule bacteria was 17,2% and 36,1%, respectively. The maximum increase in biomass (30%) *O. transcaucasica* was found in inoculated strains of *Rhizobium* sp. OT136, while the highest increase of biomass (46,8%) *O. chorassanica* observed with direct inoculation strain of *Rhizobium* sp. And the OC107 cross inoculation strain *Rhizobium* sp. OT102 (57,7%) compared with plants without inoculation. Numerous nodules were found on plant roots *O. transcaucasica* (number of tubers per plant than 500 to 1 plant) and *O. chorassanica* (more than 200 nodules / plant) the plants were inoculated with effective bacteria, but the plants growing in the wild, with such nodule formation is practically not observed. Growth, development and height of four-month *Ammodendron conollyi* plants inoculated with effective strains of nodule bacteria matched the height of 2-3 year plants germinating in desert conditions.

The results of field experiments on the influence of mixed cultures (*Rhizobium* and *Azospirillum*) on growth and development of xerophytic leguminous plants in the desert have shown that increase of the aerial parts of the plants *A. conollyi* varied in the range of 10,7% -72,8% (average of 29, 9%). Double inoculation of *A. vilosissimus* increased plant biomass ranged from 3,4% to 67,1% (average 32,9%), while *A. unifoliolatus* - from 6,7% to 30% (average 18,5%). When the double inoculation of all the options the average increase in biomass *O.*

*transcaucasica* was 34,4%, while for *O. chorassanica* – 59,7% compared with non-inoculated plants. In the second year of vegetation *Onobrychis* steady increase was observed. It is interesting to note that along with the older plants, there is the emergence of numerous young plants from last year's fallen seeds (fig. 6).



**Fig. 6. The second year, in early spring, plant vegetation *O.transcaucasica* on the experimental plot (pasture model) on the Kyzylkum Biological Station (Institute of Gene Pool of Plants and Animals of RU AS)**

Based on the totality of the results, you can create artificially renewable three-tiered green belt “wood-pasture”, consisting of a symbiotic community of xerophytic leguminous plants in desert areas of Uzbekistan. The first tier of the xerophytic legumes plant community should consist of sand acacia *Ammodendron conollyi*, the second tier of the bush and *Astragalus villosimus* and dwarf shrubs *Astragalus unifoliolatus* and third tier - from perennial legumes *Onobrychis transcaucasica* and *Onobrychis chorassanica*. Creating artificial green band of “wood-pasture” of leguminous plants of xerophytic communities is very important in desert areas, where irrigated land is on the border with the desert in order to prevent desertification, human settlements and agricultural land irrigated, and green band “wood-pasture” enriches desert soils with natural nitrogen and improve the ecological environment in arid zones of Uzbekistan.

Thus, selected local effective strains of the genus *Azospirillum* and nodule bacteria can be used to inoculate grains and legumes, followed by the formation of the association and the legume-rhizobium symbiosis, thus contributing to increase yields of legumes and bioremediation of saline irrigated land fertility. The results can serve as a specific recommendation for the use of these bacteria in agriculture and environmental purposes.

## CONCLUSION

1. For the first time local strains of the genus *Azospirillum* are isolated from the surface of roots and rhizosphere of wheat, rice and maize grown on the irrigated soils of the Republic of Uzbekistan with different salinity. The morphological, cultural, physiological and biochemical properties are studied and 16S genes pRNK local strains of the genus *Azospirillum*, determined their species - *Azospirillum brasilense* (A1-3, A4-3, A13-6, A13-7) and *Azospirillum lipoferum* (C1-1, C3-3).

2. For the first time on the basis of confirmation of GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) were discovered two new species of bacteria: (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736330/browser/genbank>) *Azospirillum* sp.A13-4, (<http://www.straininfo.net/sequences/JQ736331/browser/genbank>) *Azospirillum* sp.C10-8.

3. Selected local genus *Azospirillum* strains of bacteria were resistant to the concentrations of sodium chloride up to 400 mM, with a concentration of 200 mM NaCl nitrogen-fixing activity remained at 60-78% relative to the initial values. It is shown that *Azospirillum* are potential producers of indolyl-3-acetic acid (IAA) (3,1-5 mg / l culture broth). The presence of 4-plasmids (90, 120, and two more with more than 300 MDA) in strains of *A. brasilense* A13-6 and *A. lipoferum* C3-3 is established.

4. For the first time demonstrated the formation model of associative symbiosis with bacteria of the genus *Azospirillum* unicellular green algae *Chlorella sorokiniana* UTEX-260 *in situ* and the formation of para-nodules on the roots of non-leguminous plants of wheat inoculated with *A. brasilense* strains A1-3, A13-6.

5. It is found that inoculation of plants (wheat, rice) strains of *Azospirillum* on average increased the biomass of plants of the cultivar "Unumdor bug'doy" at 38% and the rice varieties "Avangard" on 46,9% compared with control experiments in micro-vegetation and in field experiments the average grain yield increase was for wheat "Starshina" 6% and the rice varieties "Avangard" – 6,2%.

6. Isolated and purified nodule bacteria xerophyte wild-growing legumes *A. conollyi*, *A. villosimus*, *A. unifoliolatus*, *O. transcaucasica*, *O. chorassanica*. For the first time in the taxonomy of nodule bacteria of leguminous xerophytic plants found that along with rhizobia genera *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, among isolated bacteria are also found the genera of other classes *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*) and *Gammaproteobacteria* (*Enterobacter*, *Pantoea*), which are capable of forming nitrogen-fixing nodules on the roots of leguminous plants.

7. Established that for nodule formation of xerophytic legume plants necessary condition is similar to natural (sand as soil). Conducted microscopic examination desert legume nodules, shows polymorphism of bacteroids within nodules and bacteroids absence of nodules under saline 300 mM NaCl.

8. Effective symbiosis of plants with the strain *A. conollyi* AC1-1, *A. villosimus* with the strain and AV3 *A. unifoliolatus* - strains AU3-1, AU30-1 enhanced the adaptation of plants to salinity from 200 to 300 mM NaCl, while

symbiosis of *O. transcaucasica* strains OT111, OT117 and *O. chorassanica* - strains OC107, OC109 strengthened plant resistance to salinity up to 150 mM NaCl.

9. Presence of one form of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase of plants *O. transcaucasica* and two forms of the enzyme at *O. chorassanica* is identified. Strains *Rhizobium* sp. OT103 and *Rhizobium* sp. OC107 had one form of XDH. Identified two forms of glutamine of aboveground plant parts *A. conollyi*, *A. villossimus*, *A. unifoliolatus* and one form of glutamine synthetase in plant roots and root nodule bacteria. The intensity of the enzyme activity depended on the conditions of cultivation of bacteria and their host plant.

10. It was found that the inoculating legume plants' seeds with effective nodule bacteria strains in desert conditions, the average increase of plants' biomass for all strains was: *A. conollyi* 19,1%, *A. villossimus* 24,5%, *A. unifoliolatus* 11 2%, *O. transcaucasica* 17,2%, *O. chorassanica* 36,1%. When the inoculation of plants with mixed culture of *Azospirillum* and nodule bacteria (double inoculation) increase plant biomass significantly increased and amounted to: *A. conollyi* 29,9%, *A. villossimus* 32,9%, *A. unifoliolatus* 18,5%, *O. transcaucasica* 34,4%, *Onobrychis chorassanica* 59,7%.

**ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ**  
**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ**  
**LIST OF PUBLISHED WORKS**

**I бўлим (I часть; I part)**

1. Шакиров З.С., Расулов А.С. Регуляция изоферментов ГС клубеньковых бактерий люцерны // Узб. биол. журн. –Ташкент, 1993. – № 2. – С.16-19. (№5. 03.00.00)
2. Шакиров З.С., Расулов А.С. Свойства глутаминсинтетазы *Rhizobium meliloti* // Узб. биол. журн. Ташкент, 1994. – № 2. –С. 3-6. (№5. 03.00.00)
3. Аль-Ханаши Х.М., Шакиров З.С., Расулов А.С. Потенциальная азотфиксирующая активность почв различных областей Республики Йемен // Узб. биол. журн. – Ташкент, 1995. – № 2. – С. 38-42. (№5. 03.00.00)
4. Аль-Ханаши Х.М., Шакиров З.С., Расулов А.С. Отзывчивость Ташкентских сортов люцерны на инокуляцию клубеньковыми бактериями из различных географических зон // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 1995. – №.7. – С. 66-69. (№6. 03.00.00)
5. Шакиров З.С., Аль-Ханаши Х.М., Расулов А.С., Буриханов Ш.С., Хакимов С.А. Факторы влияющие на потенциальную азотфиксацию и урожайность сельскохозяйственных культур // Узб. биол. журн. –Ташкент, 1996. – № 4. – С. 11-14. (№5. 03.00.00)
6. Кабилов Г.У., Хакимов С.А., Шакиров З.С., Абдуллаев А.К., Буриханов Ш.С., Умаров Б.Р. Влияние засоления на рост, развитие и симбиотические свойства бобово-ризобияльного симбиоза люцерны // Узб. биол. журн. –Ташкент, 2003. – № 3-4. – С.13-19. (№5. 03.00.00)
7. Абдуллаев А.К., Шакиров З.С., Хакимов С.А., Буриханов Ш.С. Азотфиксация и ассоциация бактерий рода *Azospirillum* с пшеницей в условиях засоления // Узб. биол. журн. –Ташкент, 2003. –№ 3-4. – С. 20-26. (№5. 03.00.00)
8. Абдуллаев А.К., Шакиров З.С., Буриханов Ш.С., Хакимов С.А. Азоспириллы засоленных почв Узбекистана // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2003. – № 5. – С. 72-76. (№6. 03.00.00)
9. Шакиров З.С., Абдуллаев А.К., Хакимов С.А., Буриханов Ш.С., Умаров Б.Р. Влияние бактерий рода *Azospirillum* на продуктивность пшеницы // Узб. биол. журнал. – Ташкент, 2003. – № 5-6. – С. 3-10. (№5. 03.00.00)
10. Кабилов Г.У., Хакимов С.А., Шакиров З.С., Абдуллаев А.К., Буриханов Ш.С. Таксономическое изучение свойств выделенных клубеньковых бактерий люцерны засоленных почв Узбекистана // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2004. – № 2. – С. 80-84. (№6. 03.00.00)
11. Шакиров З.С. Фитостимулирующее действие бактерий рода *Azospirillum* на рост и развитие злаковых растений // Узб. биол. журнал. – Ташкент, 2006. – № 1-2. – С. 71-76. (№5. 03.00.00)

12. Shakirov Z.S. Azospirilli of Uzbekistan soils and their influence on growth and development of wheat plants // Plant and Soil. 2006, –P.137- 145. (№40. Research Gate. IF-3,24)
13. Shakirov Z.S., Khakimov S.A. Symbiosis of nodule bacteria with perennial Xerophyte leguminous plants of Central Asia // Agricultural Sciences. 2010. – Vol.1. – № 1. – P. 24-38. (№4. Journal Citation Reports. IF-0,73).
14. Shakirov Z.S., Khakimov S.A., Shomurodov K.F., Umarov B.R. Nodulation in *Onobrychis* perennial legume plants // American Journal of Plant Sciences. 2010. – Vol. 1. – № 2. – P. 119-130. (№2.03.00.00)
15. Shakirov Z.S., Khakimov S.A., Shomurodov K.F. Effect of salinity and drought on symbiotal and biochemical properties of *Onobrychis* and alfalfa // Agricultural Sciences, 2012. –Vol. 3. – № 3. – P. 444-454. (№4. Journal Citation Reports. IF- 0,73).
16. Шакиров З.С. Глутаминсинтетаза растений *Ammodendron conollyi*, *Astragalus villosimus*, *Astragalus unifoliolatus* и их клубеньковых актерий // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2012. – № 2.– С. 53-56. (№6. 03.00.00)
17. Шакиров З.С. Филогенетический анализ местных штаммов бактерий рода *Azospirillum* // Доклады Академии Наук РУз. – Ташкент, 2012. – № 1.– С.75-79. (№6. 03.00.00)
18. Шакиров З.С. Галоаккумуляция растений *Onobrychis* // Узб. биол. журнал, Специальный выпуск: Микробиология, 2012, -С. 69-72. (№5. 03.00.00)

#### II бўлим (II часть; II part)

19. Shakirov Z.S., Burikhanov Sh. S., Khakimov S.A., West H., Cocking E.C. Influence of *Azorhizobium coulinodans*, mycorrhiza on wheat yield capacity // Abst. of 5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation. – Luso. Portugal, 1998. – P. 223.
20. Burikhanov Sh.S., Shakirov Z.S. Some studies of diazotrophic bacteria *Azospirillum* sp. on cotton growth and yield // Abst. of 5th International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation. – Luso. Portugal, 1998. – P. 224.
21. Shakirov Z.S., Khakimov S.A., Santero E.S., Soares M.I., Lips S.H. Model biotechnological ecosystem to combat desertification and restore deserted lands. Вестник, Серия Биологическая, Каз. Гос. Нац. Унив. им. Аль-Фараби. 2000. -№3.– С.106.
22. Kabilov G.Y., Khakimov S.A., Shakirov Z.S., Burikhanov Sh. S. Symbiotal *Rhizobium meliloti* sp. Nodule bacteria under salinity // Abst. of Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. – Paris. France, 2002. – P. 151.
23. Shakirov Z.S., Abdullaev A.K. Khakimov S.A. Burikhanov Sh.S. Associative bacteria of *Azospirillum* genusi from salinized soils of Uzbekistan // Abst. of Xth International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. – Paris, France, 2002. – P. 173.



24. Шакиров З.С., Хакимов С.А. Клубеньковые бактерии многолетних бобовых растений пустыни Кызыл-кум // Сборник трудов Республиканской научно-технической конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии». – Ташкент, 2003. – С. 96-97.

25. Абдуллаев А.К., Шакиров З.С., Тухлиев Д.Т. Выделение ассоциативных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* из почв Узбекистана // Сборник трудов Республиканской научно-технической конференции «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии», Ташкент, 2003. – С. 7.

26. Shakirov Z.S. Nitrogen fixation and salt-resistance of *Azospirillum* // Abst. of Int. Congress Rhizosphere, Perspectives and Challenges – A Tribute to Lorenz Hiltner. – Munich. Germany, 2004. – P. 84.

27. Shakirov Z.S., Khakimov S.A. Growth and nodulation of alfalfa in saline conditions // Abst. of Int. Congress Rhizosphere, Perspectives and Challenges – A Tribute to Lorenz Hiltner. – Munich. Germany, 2004. – P. 91.

28. Каршиева Д.Х., Кабилов Г.У., Абдуллаев Ф.К., Шакиров З.С., Хакимов С.А., Давранов К.Д. Повышение плодородия обедненных и засоленных с/х почв путем использования симбиотического биоранообразия ризосферных микроорганизмов // Сборник материалов Всероссийского симпозиума «Биотехнология микробов». – Москва. Россия, 2004. – С. 42.

29. Абдуллаев А.К., Шакиров З.С. Выделение ассоциативных азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* из почв Узбекистана // Сборник тезисов докладов III съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, 2005. – С. 3.

30. Шакиров З.С., Хакимов С.А. Симбиоз многолетних бобовой травы *Onobrychis transcaucasica* // Сборник тезисов докладов IV съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, 2008. – С. 134-135.

31. Шомуродов Х.Ф., Хакимов С.А., Шакиров З.С., Джуманиязова Г.И., Бегимов Н.Б. Фиторемедиация загрязнённых нефтью почв с использованием ризосферных микроорганизмов // Сборник трудов Республиканской научно-технической конференции «Достижения и перспективы комплексной химической переработки топливно – минерального сырья Узбекистана» Ташкент, 2008. – С. 307-309.

32. Shomurodov Kh.F., Begimov N.B., Mirzamakhmudov J.T., Khakimov S.A., Shakirov Z.S., Djumaniyazova G.I., Sagdieva M.G. The Perspective Plants for Phytoremediation of Oil Polluted soils of Uzbekistan // Сборник материалов V Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. Россия, 2009. – С. 242.

33. Umarov B.R., Shakirov Z. S. Population *Rhizobium* (*Onobrychis* sp.) in the arid zones Central Asia // Abst. of 9th European Nitrogen Fixation Conference. – Geneva. Switzerland, 2010. – P. 79.

34. Шакиров З.С. Филогения местных бактерий рода *Azospirillum* // Сборник тезисов докладов V съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, 2012. – С. 101-102.

35. Абдуллаев А.К., Шакиров З.С. Плазмидный состав штаммов *A. brasilense* Узбекистана // Сборник тезисов докладов конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». – Пущино. Россия, 2012. – С. 6-7.

36. Расулов Б.А., Шакиров З.С. Влияние бактерий рода *Azospirillum* и клубеньковых бактерий на рост и развитие ксерофитных бобовых растений // Сборник тезисов докладов конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». – Пущино. Россия, 2012. – С. 34-35.

37. Шакиров З.С. Влияние клубеньковых бактерий и бактерий рода *Azospirillum* на рост и развитие пустынных бобовых растений // Сборник материалов V Международной научно-практической конференции «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков». – Новосибирск. Россия, 2014. – С. 33-37.

38. Shakirov Z.S., Model of associative symbiosis of bacteria of the genus *Azospirillum* with microalgae // Environmental Science (An Indian Journal), 2014. –V.10. –№4. –P.121-124.

Автореферат «Ўз МУ хабарлари» журналида таҳрирдан ўтказилди  
(18.06.2015).

**Босишга руҳсат этилди: 24.06.2015**  
**Бичими 60x84 1/8. «Times Uz» гарнитураси. Офсет усулида босилди.**  
**Шартли босма табағи 4,5. Нашр босма табағи 4,5.**  
**Тиражи 100. Буюртма: №52 .**

**«Top Image Media» босмахонасида чоп этилди.**  
**Тошкент шаҳри, Я.Ғуломов кўчаси, 74-уй**

