

O`ZBEKISTON RESPUBLIKASI
OLIY VA O`RTA MAXSUS TA'LIM VAZIRLIGI

MIRZO ULUG`BEK NOMIDAGI
O`ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI

SAMADOVA MADINA ZARIF QIZI

**EKZOPOLISAXARIDLARNI RIZOBAKTETIALAR
FAOLIYATIDAGI ROLINI TAHLIL QILISH**

5140100-Biologiya ta'lim yo'nalishi

BITIRUV MALAKAVIY ISHI

Ilmiy rahbar:

b.f.d. prof. Q. Davranov

TOSHKENT-2015

MUNDARIJA

KIRISH.....	3
I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI.....	4
1.1. Rhizobiy EPSlarining strukturasi va biosintizi tamoyillari	4
1.2. Rhizobiy ekzopolisaxaridlari biosintezining genetikasi.....	8
1.3. Erkin holdagi Rhizobiylar ekzopolisaxaridlarning funksiyalari va ularning tugunaklar hosil bo'lishdagi ahamiyati.....	25
II BOB. TADQIQOT MATERIALLARI VA METODLARI.....	31
2.1 Tadqiqot ob'yektlari	31
2.2 Bakteriyalarni o'stirish uchun tayyorlash	31
2.3 Bakteriyalarni o'sishi va EPS sintez qilishiga harorat va vaqt davomiyligining ta'siri	32
2.4 Ekzopolisaxaridlarni ajratib olish.....	32
2.5 Ekzopolisaxaridlarning o'simlik hayotidagi ahamiyatini o'rganish.....	32
III BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING TAHLILI.....	34
3.1 Bakteriyalarni o'sishida harorat va vaqtning ta'siri.....	34
3.2 Ekzopolisaxaridlarni ajratib olish	35
3.3 Ekzopolisaxaridlarning o'simlik hayotidagi ahamiyatini o'rganish	37
XULOSALAR.....	40
FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI.....	41

KIRISH

Mavzuning dolzarbligi: EPS funksiyalari:

1. Ekzopolisaxaridlar hujayrani tashqi ta'sirdan himoya qiladi;
2. Hujayrani oziqlanishiga yordam beradi;
3. Hujayrani antigenlik hususiyatini namoyon qiladi;
4. Hujayralararo munosabatda molekulyar signal vazifasini bajaradi;
5. Simbiotik bakteriyalar (*Rhizobakteriyalar*) o'simlik-bakteriya aloqasida qatnashadi;

Eslatma: Erkin va simbioz hollarda yashovchi bakteriyalar EPS larini strukturalarini qiyosiy o'zgarish, bakteriya bilan ozuqa muhit orasidagi munosabatlarni tahlil qilishga yordam beradi.

Tadqiqot maqsadi: Rhizobiylar turkumiga mansub Bakteriyalarga EPS miqdori boshqa rizofera bakteriyalar, ya'ni o'simliklar bilan assatsiativ simbioz hosil qiluvchi bakteriyalarga nisbatan ko'p bo'ladi. Shuning uchun tadqiqotning maqsadi tugunak bakteriyalarga mansub *Rhizobium* turkumi vakillarining EPS hosil qilishini *Bacillus* turkumiga mansub rizofera bakteriyalariga nisbatan qiyosiy o'rganishdan iborat bo'ladi.

Tadqiqot vazifalari:

-Ekzopolisaxaridlar hosil qiluvchi bakteriyalarni (*Rhizobium* va *Bacillus*) o'sishini optimal sharoitlarini (pH, t° , tebratish tezligi, ozuqa muhiti ta'siri) o'rganish;

-Ekzopolisaxaridlarni ajratib olish;

-Ekzopolisaxaridlarning rhizobakteriyalar faoliyatidagi rolini tahlil qilish:

Bitiruv malakaviy ishi kirish, adabiyotlar sharhi (I bob), tadqiqot materiallari va metodlari (II bob), olingan natijalar va ularning tahlili (III bob), xulosalar va 60 nomdagi foydalanilgan adabiyotlar ro'yxatidan iborat bo'lib, jami 44 sahifani tashkil qiladi. Ishni yuritish uchun 5 ta jadval va 7 ta rasmdan foydalanilgan.

I BOB. ADABIYOTLAR SHARHI

Ko'pgina bakteriyalar hususan, *Rhizobiaceae* oilasiga kiruvchi bakteriyalar ham ekzopolisaxaridlarni sintezlash xususiyatiga ega. Hujayralarning tashqi tomonida qobiq hosil qiluvchi qand polimerlari kapsulaviy polisaxaridlar deyiladi.

Ekzopolisaxaridlar (EPS) atamasi esa hujayra bilan sust bog'langan makromolekulalarga nisbatan qo'llaniladi. Monosaxaridlar ketma-ketligi orasidagi bog'lar va nouglevodlar almashinuvining o'zgaruvchanligi hisobiga bu makromolekulalar juda xilma-xildir. Ekzopolisaxaridlarni biologik xususiyatlari ularning strukturasi va molekulyar massasiga bog'liq. Bu xususiyatlar, shuningdek EPS ning joylashuvi (lokalizatsiyasi) hujayralarning atrof muhit ta'siridan himoyasida katta rol o'ynaydi. Oziqlanishida va ularni antigen xususiyatlar namoyon bo'lishida muhimdir. EPS tarkibidagi polisaxaridlarning strukturaviy xilma-xilligi, ularga shuningdek hujayralararo ta'sirlashuvlarda signal molekula sifatida ham faoliyat ko'rsatishiga imkon beradi. Va nihoyat, *Rhizobiaceae* oilasining ko'pgina simbiotik bakteriyalarida oligosaxaridlar bakteriyalarning xo'jayin o'simliklar bilan ta'sirlashuvida muhim rol o'ynaydi.

Quyida EPS larining funksiyasi va biosintizining molekulyar mexanizmlari haqida adabiyotlar keltiriladi va muhokama qilinadi.

Bakteriyalar orasida yaxshi o'rganilgan *Sinorhizobium meliloti* misolida EPSni o'rganishning genetik va biokimyoviy yondoshuvlari ko'rib chiqiladi.

1.1 Rhizobiy EPSlarining strukturasi va biosintizi tamoyillari. EPSlarining xilma-xil bo'lishiga qaramay ular uchun umumiy bo'lgan va struktura biosintizini xarakterlovchi umumiy tamoyillarini keltirish mumkin.

1.1.1 Strukturasi. Bakteriyalar EPS-bu bir xil qandlarning hosilalaridan iborat bo'lgan gomopolimer yoki bir nechta har xil xildagi qandlardan iborat bo'lgan geteropolimerlardir. Rhizobiylar EPSlarida aniqlangan uglevod komponentlari asosan D- glyukoza, D-galaktoza, D-mannoza, D-glyukuron kislota va D-galokturon kislota kabi monosaxaridlardan iborat. Nouglevod qismi odatda O-atsetil guruh tutadi, shuningdek keto- birikkan piruvatlar va suksinil yarim efir guruhlari ham ega. Kam hollarda gidroksi butanol, propionil va glitserol tutadi.

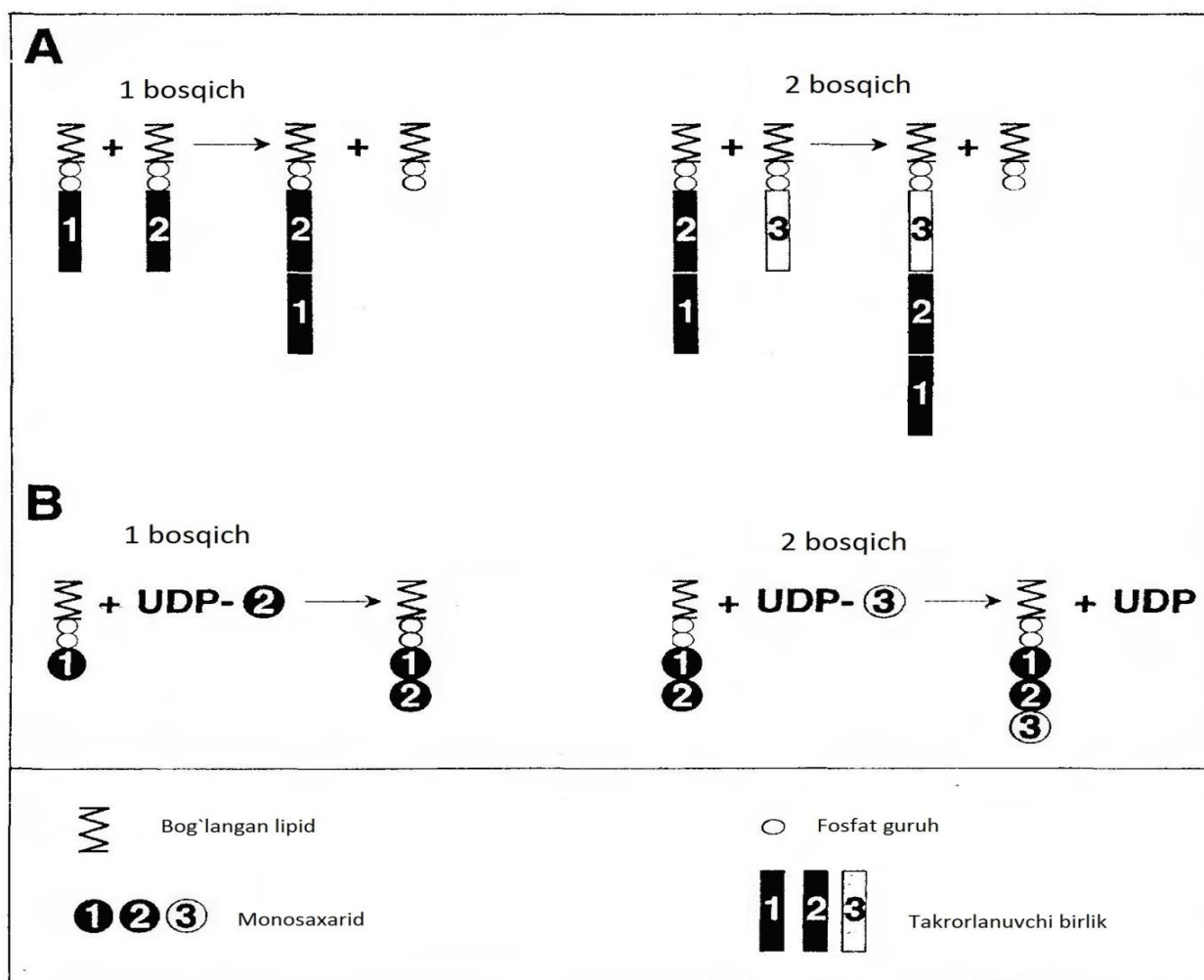
Uron kislotalar bilan birga, rhizobial EPS tarkibiga manfiy zaryadli radikallar kirib, ularning kislotali xususiyatlarini belgilab beradi. Geterosaxaridlarning doimiy strukturasi ulardagi takrorlanmas birliklar mavjudligi bilan belgilanadi. EPS larning chiziqli polimerlari bilan birga shoxlangan zanjirli molekulalari ham aniqlangan.

1.1.2 Biosintezi. EPS biosintezi bir nechta ketma-ket bosqichlarni o'z ichiga oladi. Nukleotid –difosfoqandlar faollashgan qandlar bo'lib polisaxaridlarning boshlang'ich mahsuloti hisoblanadi. Ular biosintezi turli usullari keltirilgan.

Ko'pgina gomopolimerlar uchun o'sayotgan polisaxarid zanjiriga qandlarning birikishi o'rganilgan. Polimerlanishning bu usuli redutsirlanmaydigan uchidan boshlab o'sib boruvchi polisaxarid zanjiri hosil bo'lishiga olib keladi (1-rasm). Ikkinchi guruh KPS *E.coli*ning K1 va K5 (Rohr, Troy, 1980) shtammlaridagi ikkinchi guruh KPS lar salitsil kislotasidan iborat bo'lib, ular *E.coli* 0.9 shtammidagi mannon-O polisaxaridi bunday polimerlanishiga misol bo'ladi. Ko'pgina gomopolimerlar uchun fosfat guruhi polimerlanish akseptori hisoblanadi, lekin ayrim hollar bundan mustasno. Masalan, *E.coli* K5 shtammidagi KPS sintezi vaqtida bog'langan oraliq mahsulot mavjudligi aniqlanmagan (Finke, 1991). *E.coli* K1 (Weisgerber, Troy, 1990) shtammining KPSning redutsirlanuvchi uchi bilan oqsillar va bir qancha baktartiyalarni β -glyukogon (Breedveld, Miller, 1994) biosintezining oraliq mahsulotlari bilan bog'langan oqsillar aniqlanganligini, bu oqsillar polisaxaridlar polimerizatsiyasiga potensial akseptor sifatida muhim vazifa bajarilishini isbotlaydi.

Biosintizning 2-usulida oraliq mahsulotlar hosil bo'ladi va ular bloklar tomonidan polimerlanadi, bu esa geteropolisaxarid hosil bo'lishiga olib keladi. Uzayib borayotgan lipid-bog'langan polimerning dastlabki monomer lipid-bog'langan polimerning redutsirlanmaydigan oxirgi uchiga birikishi redutsirlanuvchi uchidan uzayuvchi polimer zanjir hosil bo'lishiga olib keladi (1-rasm). Bunday mexanizmning jadallik bilan kechishini *Xanthomonas campestris*da kontakt biosintizini misol qilish mumkin (Colpin, Cook, 1990).

Shuningdek, lipid bog'langan oraliq mahsulotlar ishtirok etmaydigan akseptorga



1-rasm. Ekzopolisaxaridlar polimerizatsiyasi mexanizmi. A-blokli polimerizatsiya. Redutsirlanmagan uchi lipid bilan bog'langan, o'suvchi polimer molekulasining redutsirlangan uchiga lipid bilan bog'langan qaytaruvchi subbirliklar o'tkaziladi. B-monosaxaridlarni ketma-ketlikda o'tkazish va o'suvchi zanjir redutsirlanmagan uchiga birlashtirish (UDP=UDF) (Becker, Puhler, 1997).

bog'liq bo'lmagan polimerlanish usullariga ham misollar olingan. *Acetobacter xylinum* dagi sellulyoza biosintezi sellulyoza sintaza tomonidan amalga oshiriladi, ya'ni u polimerlanish vaqtida ham ferment bilan bog'langan holatda qoladi. Sellyuloza sintaza ichki membranada joylashgan. Membrana bilan bog'langan va polimerlanishda ishtirok etuvchi oqsillar *Pseudomonas aeruginosa* aniqlangan lipidlar bilan bog'langan oraliq mahsulotlar alginat biosintezida aniqlanmagan.

Lipid tashuvchilar va membrana oqsillarining ishtirok etishi EPS sintezi ichki membranadagi sitoplazmatik nukleotid difosfatlardan hosil bo'lishidan darak beradi. Polimerlanish ichki membranada yoki sitoplazmatik membraning tashqi

yuzasida sodir boʻladi. Bu kabi polimerda *E.coli* 09 shtammi mannoza polimeri misol boʻladi. Shu bilan birga *Salmonella enterica* va O-antigen B guruh oltingugurt bakteriyalarida oraliq lipid bogʻlangan mahsulotlarning sintezi ichki qismida sodir boʻladi. Blokli polimerlanish esa periplazmatik (Mc Gath, Osborn, 1991) tomonga amalga oshadi.

Polisaxaridlar modifikatsiyasi lipid bogʻlangan dastlabki mahsulot darajasidan to polimerlanish darajasigacha amalga oshishi mumkin. Polisaxaridlarning hujayra yuzasida eksporti kam oʻrganilgan. Transportyorlarning ATF bogʻlovchi lassetalari (ABS) ichki membranada hosil boʻluvchi gomopolimerlar transportida ishtirok etishi mumkin. Tashqi membrana oqsillari 2-guruh KPS (May va b., 1991) va alginat sintezida qatnashsa ham polisaxaridlarning tashqi membrana orqali oʻtkazilishi yaxshi oʻrganilmagan. Bu jarayonda membranaviy adgeziya saytlarining ishtiroki haqida maʼlumotlar mavjud. Masalan, Rizobial EPS orasida suksinoglyukan koʻproq oʻrganilgan boʻlib, u *Sinorhizobium meliloti*, *Agobacterium* va *Alcaligenes* kabi shtammlar tomonidan hosil qilinadi. SU47 *S. meliloti* shtammi va uning Rm1021 hosilasi shuningdek, *S. meliloti* YE-2 shtammi sintezlovchi suksinoglyukan strukturasi atroflicha oʻrganilgan (2-rasm). Suksinoglyukan bitta galaktoza va yettita glukoza qoldigini tutib, β -1 $\rightarrow$ 3, β -1 $\rightarrow$ 4 yoki β 1 $\rightarrow$ 6 glikozid bogʻlari yordamida birikkan takrorlanib keluvchi oktasaxaridlardan iborat. Takrorlanuvchi birlik shuningdek, atsetil, piruvil yoki suksinil guruhlarini tutishi mumkin. EPS-1 yaʼni suksinoglyukandan tashqari *S. meliloti* shtammlari galaktoglyukan deb nomlanuvchi EPS-2 ni ham hosil qiladi. (2-rasm). EPS-2 1:1 nisbatda glyukoza va galaktoza qoldigini tutadi. Ular α -1 $\rightarrow$ 3 va β -1 $\rightarrow$ 3 glikozid bogʻlari yordamida birikkan va tarkibida atsetil va piruvil guruhleri mavjud. Galaktoglyukagen shuningdek, *Agobacterium radiobacter* oʻstirilyotgan muhitdan ham ajratib olinadi.

Rhizobium sp. ning NG234 shtammi hosil qiluvchi EPS suksinoglyukan bilan oʻxshash (2-rasm) : bu EPSlarning takrorlanuvchi birliklaridagi redutsirlanuvchi uchidagi 5-ta qandlar bir xil. NG234 shtammi EPSda, shuningdek atsetil va piruvil

qoldiqlar aniqlangan *R. leguminosarum* biotipidagi ko'pgina shtammlar asosiy EPS (2-rasm) lari o'xshash, biroq almashinuvchi guruhlar tarkibi har xil bo'lishi mumkin. *R. etlining* ayrim shtammlari boshqacha asosli EPSlar hosil qiladi.

Bradyrhizobium japonicum shtammlari hosil qiluvchi EPS tarkibida glyukoza, mannoza, galaktoza, glyukuron kislota va 4-o-metilglyukoza tutadi. *B. elkanii* esa ramnoza va 4-o-metilglyukuron kislota tutuvchi EPS hosil qiladi (2-rasm). *B. japonicum* va *B. elkaniining* ayrim shtammlari *Glycine max* (Newcomb, 1981) tugunaklarida ko'p miqdorda polisaxarid hosil qiladi. Bu polisaxaridlar simbiosomada to'planadi va NPS (tugunak polisaxaridi) deb ataladi. *B. elkaniining* EPS va NPS lari strukturasi o'xshash, lekin *B. japonicum* NPS toza kulturada hosil bo'luvchi EPSdan strukturaviy jihatdan farq qiladi (Mort, Bauer, 1982).

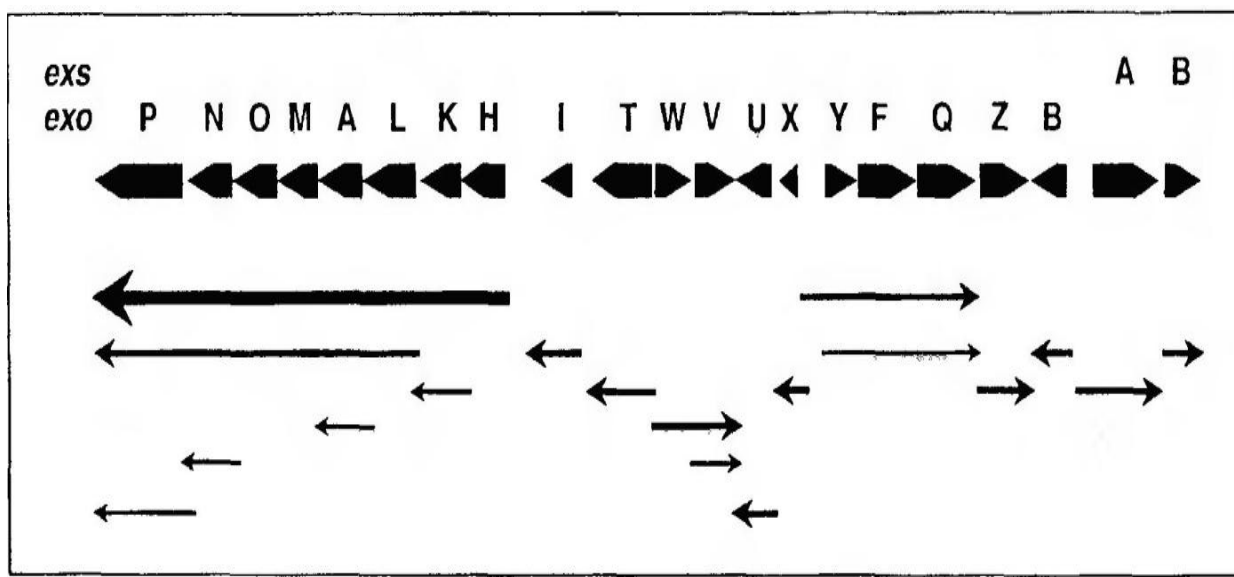
Rhizobiylarning ayrim shtammlari molekulyar massasi bilan farqlanuvchi 2 xil turdagi EPS formalarini kulturaviy suyuqligini hosil qiladi: yuqorimolekulyar polimerlar va pastmolekulyar *S. meliloti* (Amemura va b., 1983), *Rhizobium sp.* NG234, *R. leguminosarum bv. trifolii* (Djordjevic va b., 1987), *Rhizobium sp.* GH2 (Lopez-Lora va b., 1993), *B. japonicum* (Kosch va b., 1995) oligosaxaridlar ajratib olingan.

1.2 Rhizobiy ekzopolisaxaridlari biosintezining genetikasi. Bakteriyal EPS biosintezini o'rganish bo'yicha dastlabki ishlar ularni tozalab olish va strukturasi o'rganish bo'yicha olib borilgan. Ushbu ishlarda genetik yondashuvlarning qo'llanishi ish ko'lamini oshirdi va EPS hosil bo'lishining boshqarilishi va sintezida ishtirok etuvchi genlar analizini o'tkazishga imkon berdi. Ishning asosi bo'lib, EPS sintezi bo'yicha nuqsonli transpozon mutantlarini ajratib olish hisoblanadi.

1.2.1 Genlar klasterlarining shakllanishi. EPS sintezini nazorat qiluvchi genlar ko'p hollarda yirik klasterlarni hosil qiladi. Biroq, ularning genom bo'yicha dispers taqsimlanishi holatlari ham ma'lum. Rhizobiylarda EPS hosil bo'lishida ishtirok etuvchi genlar xromosomalarda, shuningdek yirik plazmidlarda ham joylashadi. Ma'lum bo'lgan klasterlarda EPS tarkibidagi takrorlanuvchi birliklar

genetikasi to'g'risidagi ma'lumotlar *S. meliloti* EPS-1 sintezi haqidagi ma'lumotlar bilan solishtirgan holda tahlil etiladi.

1.2.1.1 *S. meliloti* SU47 shtammidagi EPS-1 biosintezini boshqaruvchi *exo/exs* genlari klaster. *S. meliloti* SU47 shtammining EPS-1 sintezi bo'yicha nuqsonli mutant formalari odatda mutagenез yo'li bilan olinadi (Finan va b., 1986). Transpozon joylashgan lokuslar xromosomada yoki ikkinchi megoplazmida kartirlanadi (Finan va b., 1986). EPS-1 sintezini boshqaruvchi yirik klaster SU47 shtammida va uning hosilalari bo'lgan Rm1021 va Rm2011 R-megoplazmida joylashadi. Nukleotid ketma ketliklarni tahlil qilish, *exo* yoki *exs* deb belgilangan 21 genni ajratib olish imkonini berdi (3-rasm) (Buendia va b., 1991).



3-rasm. *Sinorhizobium meliloti* SU47 shtammi *exo/exs* klasteri gen va operonli strukturasi. Operonlar o'lchami chiziqlar uzunligi bilan promotorlar kuchi esa chiziqlar qo'shilmasi bilan belgilangan (Becker, Puhler, 1997). *exsH* geni *exsB* genidan 7,4 t.p.n masofada lokalizatsiyalangan (York, Walker, 1997). Bundan tashqari EPS-1 biosintezining 5ta lokusi xromosomada aniqlangan. Ular *exoR* (Doherty va b., 1988), *exoS* (Doherty va b., 1988), *mucR* (Zhan va b., 1989), *exoC* (Finan va b., 1986) va *exoD* (Reed, Walker, 1991) kabi boshqarilishda ishtiroketuvchi genlarni tutadi.

Exo va *exs* genlari mahsulotlarining gomologlari ma'lum bo'lgan funksiyali oqsillardir. Ularning tahlili, ushbu genlarda takrorlanuvchi birliklar sintezida,

S.meliloti SU47 shtammining EPS-1 biosintezi regulyatsiyasining umumiy
ko‘rinishi

Oqsil	Oqsilning shuvi	Oasillarning funksiyasi	Gen	Adabiyotlar
ExoC	CY	Fosfoglyukomutaza	CHR	Uttaro va b., 1990
ExoB	CY	UDF-glyuko-4-epimeraza	MP2	Buendia va b., 1991
ExoN	CY	UDF-glyuko-fosforilaza	MP2	Becker va b., 1993
ExoY	CMa	Galaktozil-transferaza	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoA	CMa	Glikozil-transferza	MP2	Becker va b., 1993
ExoL	CY	Glikozil-transferza	MP2	Becker va b., 1993
ExoM	CY	Glikozil-transferza	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoO	CY	Glikozil-transferza	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoU	CMa	Glikozil-transferza	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoW	CY	Glikozil-transferza	MP2	Buendia va b., 1991;
ExoZ	CMi	Atsetil-transferaza	MP2	er, Walker, 1993
ExoH	CMi	Suksinil-transferaza	MP2	Becker va b., 1993
ExoV	CY	Piruvil-transferaza	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoF	PP	Galaktozani tashiluv	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoQ	CMi	Eksport va polimerizatsiya	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExoT	CMi	Eksport va polimerizatsiya	MP2	Becker va b., 1993
ExoP	CMi	Eksport va polimerizatsiya	MP2	Reuber, Walker, 1993
ExsA	CMi	Eksport	MP2	Becker va b., 1993
ExsK	PP	Endo- β -1,3-1,4-glyukanoza	MP2	Becker va b., 1993
ExsH	EC	Endoglyukanaza	MP2	York, Walker, 1997
ExsX	Cma	Teskari regulyator	MP2	Zhan, Leigh, 1990
ExsI	PP	Aniqlanmagan	MP2	Becker va b., 1993
ExsB	CY	Teskari regulyator	MP2	Becker va b., 1993
ExsR	CY	Teskari regulyator	CMR	Doherty va b., 1988
ExsS	CMa	Teskari regulyator	CMR	Doherty va b., 1988
ExsR	CY	To‘g‘ri regulyator	CMR	Zhan va b., 1989
ExsD	CY	Aniqlanmagan	CMR	Reed, Walker, 1991

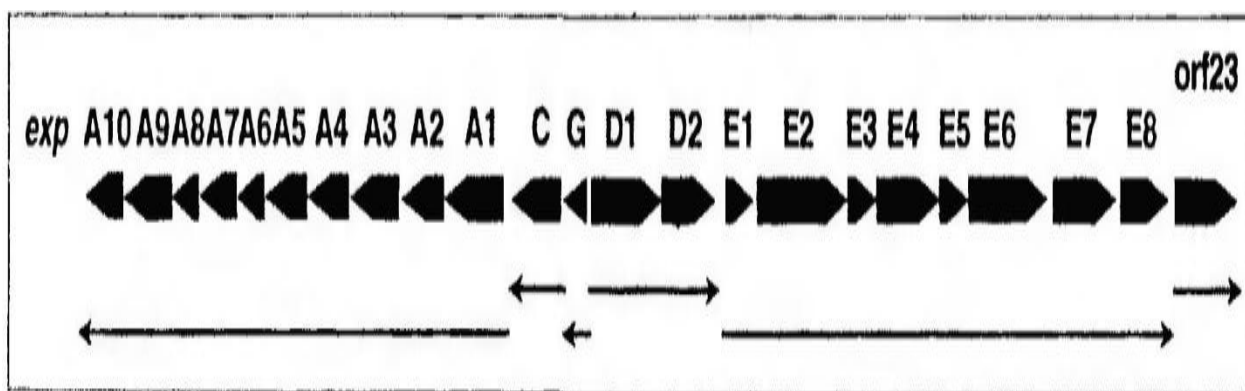
Oqsillar subhujayrali lokalizatsiyasi aminokislotali ketma-ketlik gidrofobligini o‘rganilishi natijalari asosida keltirilgan: CY-sitoplazma, CM-sitoplazmatik membrana (i-integral membranali oqsil, a-membranaga yopishgan oqsil), EC-hujayradan tashqari, EC-periplazma, CHR-xromosoma, MR2-megaplazma (Becker, Puhler, 1997).

ularning almashinuvida, polimerizatsiyasida EPS- eksporti va degatsatsiyasida, Shuningdek, biosintezini boshqarishda ishtirok etadi (Buendia va b., 1993; Reed

va b., 1990) (1-jadval).

Exo va *exs* genlari klasterlari bir necha operonlardan iborat (Buendia b., 1991; Becker va b., 1997) (3-rasm). Yovvoyi tipdagi Rm2011 shtamida integatsion plasmid mutagenezi yo‘li bilan 18 ta promotor aniqlangan. Bu shtamm mutant hisoblanib, *exo-lacZ* yoki *exs-lacZ* qo‘shilishlariga ega. Turli promotorlar yo‘naltiruvchi transkripsiya *exoHKLAMON*, *exoWV* va *exoYFQ* operonlariga xos bo‘lgan bir-birini qoplovchi RNKlar hosil bo‘lishiga olib keladi.

1.2.1.2 *S. meliloti* SU47 shtammidagi EPS-2 biosintezini nazorat qiluvchi *exp*-genlari klasteri. *S. meliloti* SU47 shtammining galaktoglukon (EPS-2) hosil qilish xususiyati ilk bor *expR* (Glazebrook, Walker, 1989) va *mucR* (Zhan va b., 1989) ning xromosomasi genlaridan mutatsiya olish natijasida aniqlangan. EPS-2 sintezini yo‘naltiruvchi *exp*-genlari klasterlari megaplazmid-2 (Glazebrook, Walker, 1989) da ham aniqlangan. U *exo/exs* genlari klasteridan 200 t.p.n (Charles, Finan, 1991) masofada ajratilgan. *Exp* genlari klasterining transpozon mutagenez yo‘li bilan tahlil qilinganda, o‘lchami 23 t.p.n va kamida 6ta komplementtarlangan guruh tutishi ma’lum bo‘ldi (Glazebrook, Walker, 1989). *Exo*-klaster tutuvchi 32 t.p.n fragmenti nukleotid ketma-ketligi tahlilida 22 ta gen aniqlandi (Becker va b., 1997) (4-rasm). Ushbu genlar mahsulotlarining gomologlari tahlilida esa, *exp*-genlari qand-difosfatlari sintezi, polimerlanishi mazkur genlar boshqarilishi va EPS-2 hujayra eksportida ishtirok etishi ma’lum bo‘ldi (2-jadval).



4-rasm. *Sinorhizobium meliloti* SU47 shtammi *exp* klasteri gen va operonli strukturasi. Operonlar o‘lchami chiziqlar uzunligi bilan belgilangan (Becker, Puhler, 1997).

S. meliloti SU47 shtammining *exp*-geni biosintezi regulatsiyasining
umumiy ko‘rinishi

Oqsil	Oqsil to‘plami	Oqsillar funksiyasi
ExpG	CY	Transkripsiyani boshqaruvi
Exp A7	CY	Glyuko-1-fosfat-timidil-transferaza
Exp A8	CY	dTDO-4-degidroramnoza-3,5-epimeraza
Exp A9	CY	dTDP-glyuko-4,6-degidrztaza
Exp A10	CY	dTDP-4-degidroramnoza-reduktaza
ExpA2	CY	Glikozil-transferaza
ExpE2	CY	Glikozil-transferaza
ExpA3	CY	Glikozil-transferaza
ExpC	CMa	Glikozil-transferaza
ExpE4	CY	Glikozil-transferaza
ExpE7	CY	Glikozil-transferaza
ExpD1	CMi	ABC-proteinaza fermentining transport oqsili kompleksining tarkibiy qismi
ExpD2	CM yoki OM	MFP-proteinazani eksport qiluvchi kompleks tarkibiga kiradi
ExpE1	OM yoki EC	Hujayra tashqarisiga sekretlanib, Kalsiy ioni bilan bog‘lanadigan oqsil
ExpE3	CY	Metittransferaza
ORF23	PP	Aniqlanmagan
ExpA1	CY	Aniqlanmagan
ExpA4	CY	Aniqlanmagan
ExpA5	CY	Aniqlanmagan
ExpA6	PP	Aniqlanmagan
ExpE5	CMa	Aniqlanmagan
ExpE6	CMi	Aniqlanmagan
ExpE8	CY	Aniqlanmagan

Oqsillar subhujayrali lokalizatsiyasi aminokislotali ketma-ketlik gidrofobligini o‘rganilish natijalari asosida keltirilgan: CY-sitoplazma, CM-sitoplazmatik membrana (i-integral mambranali oqsil, a-membranaga yopishgan oqsil), PP-periplazma, OM-tashqi membraba, ES-hujayradan tashqarida (Becker, Puhler, 1997).

1.2.1.3 *S.meliloti* SU47 shtammi *exo*-genining boshqa bakteriyalarda uchrovchi gomologlari. Rhizobiyning har xil turlari EPS sintezida *exo*-genlarga gomolog bo‘lgan genlar qatnashadi. *Rhizobium sp.*ning NG234 shtammi

xromosomasida *exo*-klaster aniqlangan bo‘lib, SU47 shtammidagi genlar klasteridagi kabi 4ta komplementarlangan guruhlaridan iborat. Boshqa bir NG234 shtammida aniqlangan qo‘shimcha *exoG* komplementatsiya guruhi asosiy *exo*-klaster tarkibiga kirmaydi. Ushbu klasterdagi genlar SU47 shtammini *exoA*, *exoB*, *exoY*, *exoM*, *exoN*, *exoP* genlari bo‘yicha mutatsiyani komplementarlashi mumkin (Zhan va b., 1990). Shu bilan bir vaqtda, *exoC*, *exoD*, *exoK*, *exoH* genlari bo‘yicha mutatsiyalar komplementatsiyasi aniqlanmadi. SU47 shtammidagi *exoC* va *exoD* genlar asosiy *exo*-klaster tarkibiga kirmaganligi sababli, NG234 shtammida ham mazkur genlar asosiy klasterga birikmaganligini taxmin qilish mumkin (Zhan va b., 1990). EPS-1 suksinilirlanishida ishtirok etuvchi *exoH* geni mahsuloti SU47 shtammi uchun spetsifikdir, chunki, NG234 shtammi EPS suksinil guruh tutmaydi (Djordjevic va b., 1986).

NG234 shtammining *exoB* guruhiga kiruvchi genlar *S. meliloti* *exo*-mutatsiyalarini komplementlamaydi. Ya’ni, bunday komplementarlash guruhi NG234 uchun spetsifik hisoblanadi. Gibridlash bo‘yicha o‘tkazilgan tajribalar NG234 ning *exoD* komplementatsion guruhi SU47 shtammining *exoL*, *exoA*, va *exoM* genlariga mos keladi (Zhan va b., 1990). Bundan tashqari NG234 ning *exoY* va *exoC* komplementatsion guruhlar SU47 ning *exoY* va *exoB* guruhlariga mos keladi. DNK ning *exoX*-*exoY* qismlari sekvenirlanganda bu qism har ikkala shtammida bir xilligi aniqlandi. Bu ma’lumot esa ushbu bakteriyalar kislotali EPS larining strukturaviy yaqinligini bildiradi. Shuningdek, *exo-X* bilan o‘xshash bo‘lgani uchun *Rhizobium* sp.ning pNG234a simbiotik plazmidida ham aniqlangan.

SU47 shtammining *exoY* geniga gomolog genlar *R. leguminosorum*, *viceae* va *phaseoli* (Borthakur va b., 1986) biotiplarida aniqlangan. Oqsilni kodlovchi *psiA* geni SU47 ning *exoX* bilan o‘xshash bo‘lib, *R. leguminosorum* bv. *phaseoli* (Borthakur va b., 1985, 1988) da aniqlangan. *R. leguminosorum* bv. *viceaeda* EPS biosintezini nazorat qiluvchi 5.5 t.p.n o‘lchamdagi xromosoma fragmenti aniqlangan bo‘lib, bu fragment *pseC*, *pssD*, *pssE*, *pssE*, *pssF*, *pssG*, *pssH* genlariga ega. Lekin, *pssA*, *psiA* (Ivashina va b., 1995, 1996) genlariga bog‘lanmagan. *pssC*, *pssD*, *pssE*, *pssF* genlari mahsulotlari SU47 shtammining *exoM*, *exoO*, *exoW*

oqsillari bilan o'xshashdir. Taxminlarga ko'ra, ushbu genlar mahsulotlari beta-glikozid bog' hosil qiluvchi glitserol-transferaza kabi funktsiya bajaradi. *pssH* geni mahsuloti *Streptomyces* C5 va *Erwiniaherbicola* (Ivashina va b., 1996) dagi gletseterol-transferazaga o'xshashliklarni namoyon etdi.

Bundan tashqari, *R. leguminosorum* *bv.trifoli*ga EPS sintezida ishtirok etuvchi 4ta gen (*pssA*, *pssC*, *pssD*, *pssE*) aniqlandi (van Workum va b., 1997). *pssA* geni mahsuloti *R. leguminosorum* *bv. Viceae* dagi *pss4* oqsili va *S. meliloti* *exoY* oqsiliga gomologdir. *pssD* va *pssE* genlari *pssC* bilan birikgan operon hosil qiladi. Bu 3 ta gen *pssA* bilan birikmagan va turli xildagi glikozil-transferazalarga o'xshash bo'lgan oqsillarni kodlaydi (van Workum va b., 1997).

R. liguminosorum *bv. viceae* va *R. leguminosorum* *bv.trifoli*larga shuningdek, *S. meliloti* *exoB* geni bilan funktsionar jihatdan gomolog bo'lgan genetik fokus aniqlangan. Bunga qo'shimcha ravishda *R. leguminosorum* *bv. viceae*ga galaktozil-transfazani kodlovchi lokus ham aniqlangan.

R. leguminosorum *bv. trifoli*ining <<nosimbiotik>> plazmidi (300 t.p.n) ga Tn-5 mutantlaridan foydalanib *exo*-genlar klasteri aniqlandi. Ikki ta gen signal peptidlaridan mustaqil ravishda oqsil sekretsiasida qatnashuvchi ABC-transport tizimi komponentlariga gomolog bo'lgan oqsilni kodlaydi. Qizig'i shundaki, *S. meliloti* SU47 shtammidagi EPS-2 biosintezida qatnashuvchi o'xshash oqsillar *expD1* va *expD2* (Becker va b., 1997) genlari tomonidan kodlanadi. *B. japonicum*da SU47 shtammining *exoB* va *exoP* lariga o'xshash oqsillarni kodlovchi genlar aniqlandi (Parniske va b., 1993).

1.2.2 Ekzopolisaxaridlar sintezining boshqariluv. EPS sintezining tashqi muhit sharoitiga moslashuvi turli xildagi komponentlarning o'zaro bog'liqligini ta'minlovchi murakkab boshqariluv tizimi mavjudligini talab etadi. EPS sintezi boshqariluv genlar ekspressiasining turli bosqichlarida amalga oshadi. EPS sintezi genlarining transkripsiyasini va translatsiyasini, shuningdek unda ishtirok etuvchi oqsillar faolligini belgilovchi mexanizmlarni o'rganish katta qiziqish uyg'otadi.

1.2.2.1 *S. meliloti*. *S. meliloti* SU47 shtammida EPS-1 sintezi turli xildagi nouglevod komponentlari hususan azot, uglerod, oltingugurtlar bo'yicha ochlik holatida faollanadi (Doherty va b., 1988), fosfatli och qolish esa EPS-2 (Zhan va b., 1991) sintezini stimullaydi. SU47 shtamm o'rganilganda EPS sintezi osmotik bosimga bog'liq ravishda o'zgarishi mumkinligi ma'lum bo'ldi (Breedveld va b., 1990). Past bosim faqat past malekulyar moddalar hosil bo'lishiga olib keladi. Yuqori molekulyar komponentlar hosil bo'lishi esa yuqori bosimda tezlashadi. *S. meliloti*ning YE shtammi NaCl konsentratsiyasi yuqori bo'lganda yuqori molekulyar EPS-2 va pastmolekulyar EPS-1 hosil qiladi. NaCl konsentratsiyasini oshirish EPS-2 va pastmolekulyar EPS-1 komponentlari hisobiga yuqorimolekulyar EPS-1 sintezini oshiradi.

SU47 shtammida EPS-1 sintezini tezlashtiruvchi *exoR* va *exoS* xromosoma genlari (Doherty va b., 1988) bo'yicha 2 ta mutatsiya olingan va *exo*-genlar ekspressiyasiga ta'sir qiladi. Hujayralarning ammoniydan cheklash EPS-1 sintezini tezlashtiradi. *exoR* geni bo'yicha mutantlarda ammoniyga bog'liq bo'lmagan holda EPS-1 sintezi tezlashishi va *exoS* (Doherty va b., 1988) geni bo'yicha mutantlarda ammoniy bo'lmasligi EPS-1 sintezini aktivlashishi aniqlandi. Boshqa ma'lumotlarga ko'ra, *exoR* geni ammoniy bilan EPS-1 sintezini boshqarishda muhim emas. *Exo*-genlarning m-RNK sintezi tahlili qilinganda, *exoR* oqsili ulardan ba'zilarining transkripsiyasiga ta'sir qilishi ma'lum bo'ldi. *exoR* va *exoS* mutatsiyalari fonida *exoA*, *exoF*, *exoQ* genlarining *phoA* bilan qo'shilishi ekspressiyasining tezlashishi bu kuzatuvlarga mos keladi (Reuber va b., 1993). Bu mutatsiyalar *exoT* va *exoB* (Reuber va b., 1993) genlari translyatsion qo'shilishlari ekspressiyasiga ta'sir qilmaydi. Bundan tashqari *exoY-lacZ* geni transkripsion qo'shilish ekspressiyasini *exoR* (Ozga va b., 1994) mutatsiyalar fonida *exoR* geni bo'yicha *exoS* lokusidagi mutatsiyalar tomonidan supressorlanadi. Ushbu suppressor mutatsiyalar *exoR* mutatsiyalar fonida *exoY-lacZ* ekspressiyasini pasaytiradi (Ozga va b., 1994).

ExoR ma'lum bo'lgan regulyatorlar orasida gomologlarga ega bo'lmasada (Reed va b., 1991), ChvG (Osteras va b., 1995) oqsiliga gomolog hisoblanadi va

ikki komponentli regulyator tizimlarning sensor oqsillariga o'xshash. Demak, *exoS* EPS-1 sinteziga ta'sir qiluvchi tashqi muhit ta'sirlarini qabul qilishda qatnashadi. Bu regulyator sistemaning ikkinchi DNK bog'lovchi komponenti ChvI ham EPS-1 sintezida qatnashishi mumkin.

SU47 shtammidagi *exoX* va *exoT* nisbati EPS-1 sinteziga ta'sir qiladi. Har ikkala gen megaplazmid – 2 *exo/exs* klasterida joylashgan. *ExoX* mutantlarida EPS-1 sintezining ortib ketishi kuzatilsa, bu genning ko'plab nusxalari EPS-1 sintezini to'xtatadi. Ko'p nusxali plazmida bir vaqtning o'zida *exoX* va *exoY* mavjudligi *exoX* bo'yicha ko'p nusxalarning ta'sirini oldini olishga yordam beradi. *Exo*-genlarining ekspressiyasi *exoX* va *exoY* dozasiga bog'liq bo'lmasa, *exoX* va *exoY* ning posttranslyatsion ingibitori sifatida faoliyat yuritishi taxmin qilinadi. *exoY* EPS-1 sintezi dastlabki bosqichini katalizlovchi galaktozil–transferazani kodlaydi. Har ikkala oqsil ichki membranada joylashtirilganini hisobga olgan holda oqsil-oqsil ta'sirlashuvlar mavjudligini taxmin qilish mumkin. Bundan tashqari *exsB* ham *exo/exs* genlar klasterida joylashgan bo'lib, *exo*-genlari ekspressiyasining posttranslyatsion darajasiga ta'sir etuvchi salbiy regulyatorni kodlashi mumkin (Becker va b., 1997). *Nod*-genlari regulyatsiyasida qatnashuvchi *syrM* genlarining ortiqcha ekspressiyasi SU47 shtammida EPS sintezini tezlashtiradi, lekin bu jarayonning boshqarilish mexanizmlari aniq emas. *ExoA* va *exoB* genlari EPS sintezini tezlashtirishi uchun zarur bo'lsa, *exoA* spetsifik tarzda EPS-1 hosil qilishda qatnashadi. *syrM* ga yaqin joylashgan *syrA* geni ham EPS sintezini kuchaytirish uchun zarur hisoblanadi.

Aniqlanishicha, *exoA*, *exoP*, *exoF* genlarining *phoA* genlari bilan translyatsion qo'shilishlari asosan sebarga o'simligi tugunaklaridagi infeksiyon zonalarida ekspressiyalanadi. Bu esa simbiozdagi *exo*-genlari ekspressiyasining so'ndirilishi bilan bog'liq (Reuber va b., 1991).

SU47 shtammi odatda faqat EPS-1 sintezlaydi, EPS-2 sintezi esa fosfatli haroratdan tashqarida aktivlanadi (Zhan va b., 1991). U *exp-lacZ* gaenlarning transkripsion qo'yilishlarining beta-galaktozidaza faolligini stimullaydi. SU47 dan ikkita mutant olingan bo'lib, ular EPS-2 ni sintezlaydi. Mutatsiyalardan biri *mucR*

xromosomaga ta'sir qilib, faqatgina EPS-2 sintezlanishiga olib keladi va EPS-1ni bartaraf etadi. *MucR* bo'yicha mutant supernatantda EPS-1 ning faqatgina quyimolekulyar komponentlari aniqlangan. *MucR* oqsili *Agobakterium* dagi *ros* oqsili bilan gomolog bo'lib, *virC* va *virD* operonlarini repressiyalaydi va EPS mahsuldorligini faollaydi. Shuningdek, *mucR* va *ros* genlari negativ avto boshqariladi. Ularga mos oqsillarning aminokislota ketma-ketligida (C₂H₂ tipidagi) "Ruxli barmoqlar" aniqlangan. *Ros* oqsili agobakteriyalar *virC/virD* qismidagi promotorlar bilan bog'lanadi. *Ros*, *virC*, *virD* genlari promotorlarda invertirlangan takrorlanuvchi qism bo'lib, *ros-box* deb ataladi va u *ros* oqsili bilan spetsifik bog'lanadi.

Exp genlari komplementarlanishining 5 xil guruhida lokalizatsiyalangan *exp-lacZ* transkripsion birikishlarning ekspressiyasi *mucR* (Keller va b., 1995; Becker va b., 1997) geni mutatsiyalari fonida indutsirlangan. Bu mutatsiya *exo-lacZ* (Keller va b., 1995) birikishlarining ko'pchilik qismining transkripsiyasini o'zgartirmaydi. Faqatgina *exoY*, *exoF* va *exoK* genlari uchun *mucR* mutatsiyalari fonida transkripsiyaning uncha katta bo'lmagan susayishlari kuzatilgan. Ammo bunda *exoH* va *exoX* genlarining transkripsion birikish ekspressiyasi tezlashgan. *ExoY* genidan yuqorida joylashgan va promotorga bog'liq bo'lgan transkripsiyaning ijobiy boshqarilishi *exoYFQ* operoni ekspressiyasiga ta'sir qiladi. *exoX* va *exoY* nisbati EPS-1 sinteziga ta'sir etgani *exoY* esa bu jarayonning dastlabki bosqichida ishtirok etgani uchun *mucR* ning *exoY* geni tomonidan aktivlanishi EPS-1 biosintezi boshqarilishining bir sababi bo'lishi mumkin.

MucR oqsili *mucR*, *exoY*, *exoH* promotorlari bilan spetsifik ravishda bog'lanadi, *ros-box* bilan gomolog bo'lgan invertirlangan takrorlanuvchilar *Agobakterium* dagi *ros* oqsili tomonidan boshqariladi va *mucR*, *exoY* *S. meliloti* genlari promotorlarida aniqlangan. Demak, *MucR* negativ avtoregulyatsiya qilish va *exoY* ni faollash, *exoH* transkripsiyasini kuchsiz ekspressiya qilish xossasiga ega. Shuningdek, *S. melilotida* ORF2 oqsili aniqlangan bo'lib, u *MucR* ga 50% o'xshashdir. Lekin, uning funksiyasi noma'lum.

SU47 shtammidagi *mucR* mutatsiyasi bilan birga, *expR* geni bo'yicha ham

exoX va *exoY* genlari juda o'xshash (Gay va b., 1990). Har ikkalasida ham *exoX* va *exoY* nusxalarining nisbati EPS hosil bo'lishi darajasini belgilab beradi. NG234 dagi *exoX* ning ko'p sonli nusxalari SU47 va *R. fredii*larning ham gomologik, ham geterologik shtammlaridagi EPS hosil bo'lishini buzib yuboradi.

R. leguminosarum bv. *viceaening* *pss4* geni va *R. leguminosarum* bv. *phaseolining* *pssA* SU47 shtammidagi *exoY* oqsiliga gomologik bo'lgan oqsillarni kodlaydi. *exoY* kabi *pssA* oqsili ham ichki membranada joylashgan. Bundan tashqari, *psiA* geni SU47 dagi *exoX* va NG234 dagiga o'xshash bo'lgan oqsilni kodlaydi. U *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pRP2JI simbiotik plazmida aniqlangan. *exoX* va *psiA* oqsillarning gidrofobik profillari o'xshash: har ikkisi ham gidrofob-N uchi va gidrofil S-terminal uchlariga ega (Gay va b., 1990). Shuningdek, *psiA* oqsilining membrana bilan assotsiatsiyasi ma'lum. *psiA* genining ko'psonli nusxalari *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Borthakur va b., 1985;) EPS sintezini izdan chiqaradi. PRP2JI simbiotik plazmidida joylashgan *psrA* geni amplifikatsiya qilinganda ko'p sonli *psiA* keltirib chiqargan EPS sintezi yuqolishini qayta tiklaydi (Borthakur, Johnston, 1987; Mimmack va b., 1994). *PsrA* oqsili *psiA* transkripsiyasini repressiyalaydi va transkripsion reguladorlar bilan o'xshash bo'lib <<spiral-burilish-spiral>> motivi bilan birikish domeniga ega. *PsiA* genining *gusA* bilan birikmalari tahlil qilinganda, *psiA* *pssA*dan farqli ravishda *Phaseolus* tugunaklarining simbiotik zonasida ekspressiyalanishi ma'lum bo'ladi. Demak, *psiA* tugunaklardagi *pss* genlarining negativ (salbiy) boshqarilishida ishtirok etadi. *S. meliloti* SU47 shtammidagi EPS sintezini boshqaruvchi *mucR* geni blot-gibridlash usuli bilan *Rhizobium* sp. NG234, *R. fredii*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* va *A. tumefaciens*larda topilgan (Keller va b., 1995). *MucR* ga gomologik bo'lgan *ros* genlari *Rhizobium etli* (Bittinger va b., 1997), *A. tumefaciens* va *A. radiobacter* (Cooley va b., 1991) da sekvenirlangan. *A. radiobacter*da *exoY-phoA* birikmalarining faolligi *ros*-mutatsiyalar fonida kamaytirilgan, ya'ni *exoY* ekspressiyasi *ros* geni tomonidan aktivlanadi va EPS sintezining dastlabki bosqichida muhim sanaladi. Bunda, *exoY* genidan oldingi nomukammal invertirlangan takrorlanish *ros-box* ketma-ketligiga o'xshash ketma-

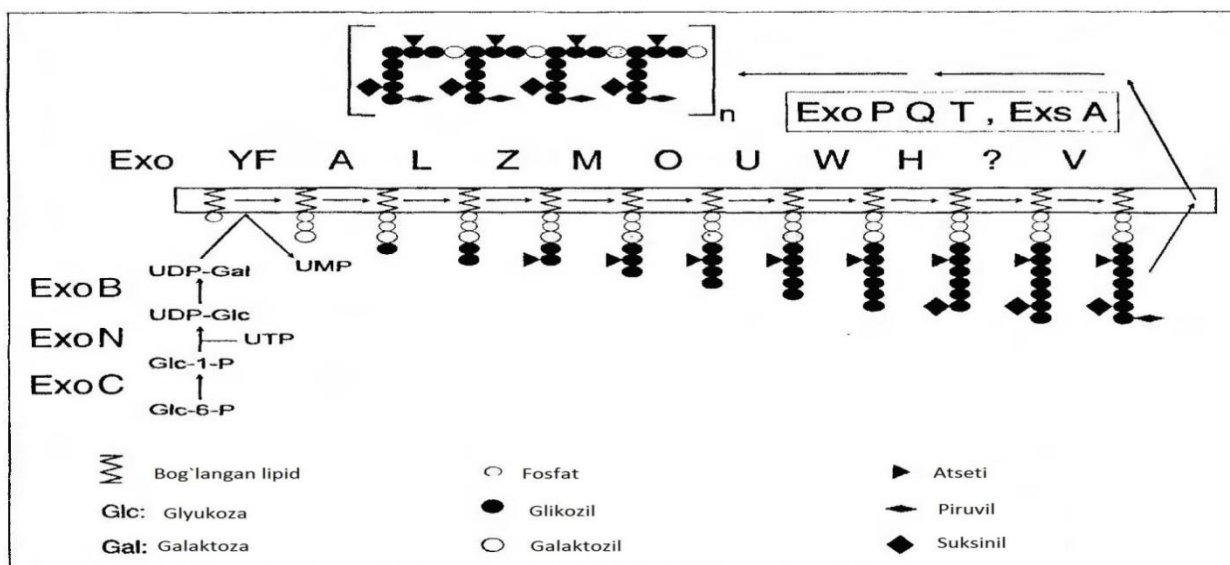
ketliklar *exoY* va *mucR* *S. meliloti*) genlaridan avval ham aniqlangan. Ros oqsilining *A. tumefaciens* *virC* va *virD* qismidagi promotordagi spetsifik bog'lovchi faolligi va *S. meliloti* *mucR*, *exoY*, *exoH* genlari promotorlaridagi *mucR* oqsili *ros-box* ga o'xshash ketma-ketliklarga bog'liqdir. Bu esa *ros* va *mucR* oqsillari oldinroq ta'sirlashishini ko'rsatadi. Shuningdek, *S. meliloti* *exoR* geni gomologi *R. leguminosarum* bv.viciaeda ham aniqlangan.

1.2.3 *S. Meliloti* SU47 shtammida ekzopolisaxaridlar sintezi.

Rhizobiylardagi EPS biosintezining bir qancha yo'llari yaxshi o'rganilgan. Genetik va biokimyoviy yondashuv birgalikda qo'llanishi *S. meliloti* SU47 shtammida EPS-1 sintezining modeli yaratilishiga sabab bo'ldi. U geteropolisaxaridlarni hosil bo'lishiga misol bo'lib xizmat qiladi.

1.2.3.1 EPS-1. EPS-1ning biosintezi huddi shu kabi takrorlanuvchi birliklardan iborat boshqa geteropolisaxaridlar sintezini eslatadi (6-rasm). Bu birliklar poliprenil-difosfat oktamer mahsulotlar hosil bo'lishiga olib keluvchi lipid-tashuvchilarda yig'iladi. UDF-galaktoza va UDF-glukoza takrorlanuvchi birliklarning lipidlar bilan birkkan shakli hosil bo'lishida ishtirok etuvchi sitoplazmatik komponent sifatida, *exoC*, *exoB*, *exoN* oqsillari esa mana shu o'tmishdoshlar biosintezida qatnashadi *exoC* geni kodlovchi fosfoglukomutaza glukoza-6-fosfatni glukoza-1-fosfatga aylantirib beradi (Uttar ova b., 1990). Bunday fermentativ faollik EPS-1, EPS-2 biosintezi, lipopolisaxaridlar (LPS) va β (1-2) glyukanlar sintezida muhimdir (Zhan va b., 1989; Uttar ova b., 1990). *exoV* oqsili UDF-glyukozo-4-epimerazaviy faollikni namoyon etadi. Bu oqsil kodlovchi UDF-glyukozaning UDF-galaktozaga aylanishi EPS va LPS hosil bo'lishida muhimdir. *E.coli*ning *galE*-mutantlaridan farqli ravishda *S. meliloti* SU47 shtammining *exoB* mutantlari galaktozadan uglerodning yagona manbai sifatida foydalanadi (Arias va b.,1986). Chunki bu bakteriyalar galaktoza almashinuvining Deley-Dudorov yo'lidan foydalanadi. UDF-galaktoza faqatgina UDF-glyukozaning epimerizatsiya reaksiyasi yo'li bilan hosil bo'ladi. Sababi, *S. melilotida* galaktokinaza faolligiga ega emas. Shuning uchun, *exoB*-mutantlar EPS-1, EPS-2, LPS hosil qilishga qodir emas. *ExoN* oqsil glyukozo-1-fosfat va UTF

dan UDP-glyukoza sintezini katalizlovchi pirofosforilaza faolligini nomoyon qiladi. *ExoN* genidagi mutatsiyalar EPS-1 hosil bo'lishini pasaytiradi. Bu pasayish bu fermentni kodlovchi biron-bir qo'shimcha genlar bilan bog'liq, garchi *exoN* gomologlari Sauzern bo'yicha gibridlash yo'li bilan aniqlanmagan bo'lsada, dTDR-glyukoza pirofosforilazasi *exoN* o'rniga kelishi mumkin. Chunki, bu ferment ham UDP-glyukozopirofosforilaza faolligiga ega.



6-rasm. *Sinorhizobium meliloti* SU47 shtammida suksinoglyukan biosintezi ko'rinishi. (Uttaro va b., 1991).

Ko'pgina *exo*-genlarning funksiyalari *exo*-mutantlarda to'planuvchi lipid-bog'langan oraliq mahsulotlarni tahlil qilish orqali o'rganilgan (Reuber, Walker, 1993). Almashinuvni amalga oshiruvchi 8-glikozil-transferaza va 3 ta fermentning faolligi takrorlanib keluvchi lipid bog'langan oktasaxarid shakllanishiga olib keladi. *ExoY* va *exoF* oqsillari lipid tashuvchiga galaktozil qoldig'i tashilishining galaktozil qoldig'i tashilishning dastlabgi bosqichida qatnashadi. *ExoA*, *ExoL*, *ExoM*, *ExoO*, *ExoU*, *ExoW* oqsillari keying qand qoldiqlari birikishini ta'minlaydi. Takrorlanuvchi birlikka terminal qandli biriktiruvchi glikozil-transferaza hali aniqlanmagan. *ExoH* va *exoZ* genlari bo'yicha mutantlar hosil qiluvchi EPS-1 tahlili 1-gen mahsuloti suksinilirlanishda qatnashishini ko'rsatdi, 2-gen mahsuloti esa atsetilirlanishida qatnashadi. *ExoP*, *exoQ*, *exoT* genlari bo'yicha mutantlar EPS-1 eksporti va polimerlanishida qatnashadi va turli darajada atsetilirlangan,

suksinirlangan, piruvinirlangan lipid-bogʻlangan oktasaxarid subbirliklarini toʻplaydi. Demak, polimerlanishgacha qoʻshimcha qoldiqlar qoʻshilib borishi mumkin ekan. Atsetilirlanmagan va suksinirlanmagan EPS-1 polimerlanishi va eksport qilinishi mumkin. *ExoV* geni boʻyicha mutantlar piruvilirlay olmaydi va ularda EPS-1 polimeri sekretsialanmaydi. Demak, piruvilirlanish, polimerlanish va eksport uchun zarurdir.

ExoQ oqsili yuqori molekulyar EPS-1 biosintezida, *exoT* esa oktasaxaridlar trimerlari va tetramerlari sintezida qatnashadi. Chunki, *exoP* mutantlarkulturasida supernatantida oksaxaridlarning faqat monomerlari aniqlandi. Shu bilan birga EPS-1 polimerlanishining pastmolekulyar mahsulotlari ham topildi. *ExoP* oqilining membranaviy topologiyasi *exoP* genining *lacZ* va *phoA* reporterlari bilan birikishlari translyatsiyasi yordamida oʻrganilgan. Aniqlanishicha, *exoP*, N-terminal domendan iborat boʻlib, asosan periplazmada joylashgan va sitoplazmatik C-terminal domendan iborat (Becker va b., 1997). *ExoP* ning N-terminal domeni CLD oqsilini eslatadi va baʼzi enterobakteriyalar O-antigen zanjiri uzunligini aniqlashda qatnashadi. *ExoP* va CLD oqsillari uchun umumiy boʻlgan qisqa konsensus motivi *exoP* ning N-terminal domenida topilgan (Becker va b., 1995; Stingle va b., 1996). Ammo bu motivning funksional ahamiyati hali aniqlanmadi. *ExoP* oqsilining C-terminal domeni ATF aza bilan gomolog boʻlib, nukleotid bogʻlovchi saytga ega. Bu domen CLD oqsillarida aniqlanmagan, lekin unga gomolog boʻlgan, EPS polimerizatsiyasi va eksportida qatnashuvchi oqsillar, masalan, *Pseudomonas solanacearum epsB* oqsilida, *Escherichia coli* K12ning *Wzs* oqsilida va *Erwinia amylovoraning AmsA* oqsillarida topilgan. *S. meliloti* SU47 shtammi *exoP*ga gomolog boʻlgan oqsillarning N va C terminal domenlari bitta gen, baʼzan esa *Streptococcus thermophilus CpsC* va *CpsD* oqsillaridagi kabi 2 ta yonma-yon joylashgan genlar tomonidan kodlanishi mumkin (Stingle va b., 1996). SU47 shtammi mutantlari *exoP* geni deletsiyasiga ega va oqsillarining faqat N-terminal domenini kodlaydi. Ularga EPS-1 sintezi ancha past. Bu pasayish *exoP* negative regulyatori mutatsiyasi tomonidan supressirlanadi. *ExoP** mutantlarida EPS-1 yuqori va pastmolekulyar komponentlarining nisbati ancha past boʻlsa,

*exoP**/ *exoR* ikki karrali mutantlarda faqat pastmolekulyar EPS-1 aniqlangan. *ExoP* C-terminal domen nuqsonli *B. japonicum* mutantlarida ham shunga o'xshash fenotip kuzatiladi (Kosch va b., 1995). *ExoP* yuqori va pastmolekulyar EPS komponentlari nisbatini belgilab beradi, deb taxmin qilish mumkin.

ExoK va *exsH* oqsillari EPS-1 ni spetsifik parchalashi mumkin (York, Walker, 1997) va EPS-1 quyimolekulyar komponenti hosil bo'lishida ishtirok etadi.

1.2.3.2 EPS-2. EPS-2 ning biosintezi hali to'liq o'rganilmagan bo'lsada, *exp* genlari mahsulotlari gomologlari asosida ularning funksiyalari haqida taxmin qilish mumkin (Becker va b., 1997). 4 oqsil (*expA*, *expA8*, *expA9*, *expA10*) dTDP-ramnoza hosil bo'lishda ishtirok etishi mumkin. dTD- ramnoza biosinezining 1-oraliq mahsuloti dTDP-glyukoza bo'lib, u EPS-2 biosintezida glyukozaning o'tmishdoshi bo'lish mumkin (Reuber, Walker, 19930. UDF-galaktoza EPS-1, EPS-2 sintezida qatnashadi. EPS ning 2 xil shaklli biosintezida glyukozaning turli birikmalaridan foydalanish SU47 shtammida differensial regulyasiya uchun muhimdir (Zhan va b., 1989; Buendia va b., 1991). Garchi *exp*-oqsillar dTDP-ramnoza sintezining kechroq bosqichlarida ishtirok etsa-da, ular EPS-2 biosintezi uchun muhimdir. Shu bilan bir vaqtda, bu o'tmishdoshni kulturaning supernantida aniqlanmadi. Shuning uchun EPS-2 ramnozaning faqat izlariga ega, yoki bu qand EPS-2 sintezida qatnashadi, lekin yakuniy polimer tarkibida bo'lmaydi. Ramnoza EPS-2 ning yangi zanjiri sintezidagi praymer sintez qilish uchun zarur, yoki EPS-2 o'sishini to'xtatish uchun polimer oxiriga qo'shiluvchi qand donori bo'lib xizmat qiladi. *Exp*-genlar 6 xil glikozil-transferazalarni kodlaydi. Ulardan 2 tasi (*ExpA2*, *ExpE2*) β -glikozit bog'larni hosil qiladi. Qolgan 4 tasi (*ExpA3*, *ExpC*, *ExpE4*, *ExpE7*) α -glikozid bog'larni hosil qiladi (Becker va b., 1997). EPS-2 tarkibida β -1 $\rightarrow$ 3 va α -1 $\rightarrow$ 3 bog'larni tutadi, EPS sintezida kamida kamida bitta α -glikozid bog' hosil qiluvchi glitserol-transferaza va bitta β -bog' hosil qiluvchi ishtirok etishi kerak.

ExpE1 oqsili *Rhizobium*dagi *NodO* oqsili bilan gomologdir (Becker va b., 1997). Bu oqsillar C-uchli sekretsia signalini tutadi va hujayradan tashqi muhitga chiqariladi. Ular kalsiy bog'lovchi faollikka ega, shuningdek lipid qo'shqavatida

poralar hosil qilishi mumkin. Bu esa ularning *ExpE1*ning EPS-2 eksportida ishtirok etishini bildiradi. Gomologlarni o'rganilishi ko'rsatishicha *ExpD1* va *Exp2* transport kompleksining komponentlari hisoblanadi va pepidlarga bog'liq bo'lmaganoqsilning signal sekretsiyasida ishtirok etadi. *exp1* va *exp2* genlari bo'yicha mutantlar EPS-2 sintezi nuqsonlariga ega (Glazebrook, Walker, 1989; Becker va b., 1997).

1.3 Erkin holdagi Rhizobiylar ekzopolisaxaridlarning funksiyalari va ularning tugunaklar hosil bo'lishdagi ahamiyati. Hujayra tashqi yuzasidagi qatlamda EPS joylashuvi hujayrani tashqi ta'sirlardan himoya qiladi, oziq-moddalarni yutilishi va antigen xususiyatlari namoyon bo'lishida ishtirok etadi. Bundan tashqari strukturaviy xilma-xillik EPSlarga hujayralararo ta'sirlashuvlarda signal molekulalari sifatida faoliyat yuritishga imkon beradi. EPS Rhizobiylar va dukkakli o'simliklar simbiozi yuzaga kelishida, ayniqsa tugunaklar invaziyasi bosqichida muhim rol o'ynaydi.

1.3.1 Osmoroteksiya (Osmohimoyalaniş). Osmotik bosim o'zgarishi *S. meliloti*da sintezini modifisilirlaydi. Muhitning osmotik bosimi *S. meliloti* SU47 shtammida yuqori va pastmolekulyar komponentlari nisbatini o'zgartiradi. *A. tumefaciens* danfarqli ravishda *S. meliloti* kapsula hosil qilmaydi va o'sishning turli xil fazalarida periplazmada doimo $\beta - (1,2)$ glyukanlarning yuqori konsentratsiyasini tutadi. Taxminlarga ko'ra, kapsula materiallari yig'ilmalari va periplazmadagi $\beta - (1,2)$ glyukanlarning yuqori konsentratsiyalari *Rhizobiaceae* ning har xil turlarida hujayra butunligini saqlovchi mexanizm bo'lishi mumkin. Osmotik stresda *R. leguminosarum* hujayralari tashqi muhitga $\beta - (1,2)$ glyukanlarni ajratib chiqaradi. *S. meliloti* SU47 shtammi uchun bunday holat aniqlanmagan. Bu shtamm mutantlari EPS-sintezi nuqsoniga ega va $\beta - (1,2)$ glyukanlarning sezilarli miqdorini ajratib chiqaradi. Bu esa EPS-1 ning osmoprotektorlik va $\beta - (1,2)$ glyukanlarni sekretsia qilish funksiyasi bilan bog'liq.

1.3.2 Tugunaklar hosil bo'lishi (*S. meliloti* SU47 shtammida). Rhizobiy mutantlarining ko'pchiligida EPS sintezi nuqsonli bo'lib, simbioz shakllantirish

samaradorligi keskin oʻzgargan. Bu esa asosan determinirlangan tugunaklar hosil boʻlishining buzulishida namoyon boʻladi. Bunga misol, *Astragalus sinicus* bilan simbiozga kirishuvchi Rhizobiylar daraxtsimon burchoqdoshlar bilan tugunaklar hosil qiluvchi *Rhizobium sp* TAL1145 shtammining ayrim EPS-mutantlaridir. *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, *Rhizobium sp.*, NG234, TAL1145 kabi EPS boʻyicha nuqsonli mutantlar oʻz hujayralarini zararlay olmaydi. Xoʻjayinlar spektri keng boʻlgan Rhizobiylarning EPS mutantlari dukkakdoshlar bilan turli xil simbiotik fenotiplar hosil qiladi. NG234 shtammining EPS mutantlari *Leucaena leucocephala* dukkagida kallustoifali strukturalarni hosil qiladi. Ular determinirlanmagan tugunaklarni hosil qiladi. *Macroptilium atropurpureum* esa determinirlangan strukturali normal tugunaklar mavjud. Bulardan tashqari, *M. loti* EPS mutantlari *Lotus pedunculatus* oʻsimligida azotfiksirlovchi determinirlangan tugunaklar hosil qiladi. *L. lucocepholada* esa samarasiz kallustoifali strukturalarni hosil qiladi. Demak, EPS-determinirlangan tugunaklar hosil boʻlishi uchun zarur emas. EPSmutantlari simbiotik fenotiplari bilan determinirlangan va determinirlanmagan infeksiyon iplarni hosil boʻlishidagi farqlar oʻrtasida bogʻliqlik mavjudligi taxmin qilinadi. Garchi *Glycine max* da determinirlangan azotfiksirlovchi tugunaklar shakllanishida EPS muhim hisoblansa-da, rivojlanish davrida *B. japonicum* EPS mutantlari bilan infitsirlanishi bu jarayonni buzadi, tugunaklar hosil boʻlishi sekinlashadi, raqobatbardoshlik pasayadi. Shu tarzda, EPS mutantlarida determinirlanmagan tugunaklarning shakllanishi determinirlangan tugunaklarga nisbatan kuchliroq izdan chiqqan.

S. meliloti SU47 shtammining sebarga oʻsimligi bilan simbiozidagi EPS roli atroflicha oʻrganilgan.

1.3.2.1 EPS boʻyicha defektlil mutantlarning simbiotik xususiyatlari.

Medicago sativa ildizida SU47 shtammi *exo*-mutantlari hosil qilgan tugunaklar bakteriyalardan holi boʻlib, azot fiksirlamaydi. Bunday «*psevdotugunaklar*» hosil boʻlishi uchun ildiz tukchalarining yigʻilishi sekinlashishi va periferik hujayralarda infeksiyon iplarning abortatsiyasi xarakterlidir. Psevdotugunaklar koʻpincha ikkilamchi ildizlarda asosiy ildizga nisbatan koʻproq rivojlanadi va

diskret apikal meristemesi bo'lmaydi. Uning o'rniga metotik faollikka ega bir nechta markaz bo'ladi. Yuza qavatida jigarrang nekrotik zonalar kuzatilib, faol himoya reaksiyasidan dalolar beradi. Kortikal hujayra devori anomal ravishda qalinlashgan va avtofluoresensiyalanuvchi material bilan indutsirlangan. Normal tugunaklardan farqli ravishda psevdotugunaklar hujayra devorlarida fenolbirikmalari miqdori ortgan. Bunday strukturalarda peroksidaza faolligi, fenilalanin-ammoniyliazalar (PAL) transkriptlari darajasi, 3—O-metiltransferaza (COMT) va izoflavon-reduktaza (IFR) aktivligi yuqori bo'ladi. Aynan shu reaksiyalar simbioz buzilishiga sabab bo'ladi. *Vicia sativa ssp. Niga* o'simliklarida etilen miqdori kamayishi *R. leguminosarum* bv. *Viceae* mutantlari infeksiyasini ta'minlaydi. Demak, etilen infeksiya vaqtida hujayralar o'sishini indutsirleydi va shuning uchun tugunaklar rivojlanishini ingibirleydi. EPS defektiga ega *R. leguminosarum* bv. *Viceae* mutantlar va *V. Sativada* (Van Workum va b., 1995) tugunaklar hosil bo'lishida nuqsonli mutantlariga ildiz tukchalari buralishining sekinlashishi va *Trifolium repens* va *T. Subterraneum* da infeksiyon iplar hosil bo'lishi xosdir .

SU47 shtammi mutantlarida psevdotugunaklar qismlari infitsirlanishining sekinlashishi kuzatilgan. Inokulyatsiyadan 6 hafta o'tib, 25% o'simliklar uncha ko'p bo'lmagan infitsirlangan tugunaklarga ega bo'lib, kortikal hujayralarda infeksiyon iplarga o'xshash strukturalar aniqlangan. Normal iplardan farqli ravishda ular ancha qalin va mustahkam qobiq bilan o'raglan. Demak, EPS-1 nuqsonli mutantlar sebarga o'simligining davomli inkubatsiyasidan keyingi himoya tuzilishini bosib o'ta oladi. Sekinlashgan infeksiya shuningdek, SU47 shtammining *exoH* geni bo'yicha mutantlarda aniqlangan bo'lib, bu gen suksinirlanmagan EPS-1 hosil qiladi. Bunda tugunaklar 3-5 haftadan so'ng shakllangan. Bu esa *exoH* mutantlar o'simliklarning himoya reaksiyalarini EPS-1 sintezi bo'yicha nuqsonli mutantlarga nisbatan tezroq bosib o'tadi deganidir. *exoH*-transpozon mutantlarida pastmolekulyar EPS-1 sintezi butunlay bloklanganligi sababli, EPS-1 oligosaxaridlarining to'liq suksinirlanmasligi infeksiya buzilishlari bilan bog'liqligi noaniq bo'lib qolmoqda.

EPS ortiqcha sintezi ham tugunaklar rivojlanishini izdan chiqaradi. Garchi SU47 shtammi *exoX* mutantlari sebarga tugunaklarini infitsirlasada, *R. leguminosarum* bv. *phaseolining* *psiA* geni bo'yicha mutantlari *Phaseoulus* ildizlarida faqatgina azot fiksirlamaydigan tugunaklarnigina indutsirlaydi. Exogenlar ekspressiyasining dastlabki bosqichidagi EPS-1ning salbiy regulatsiyasi SU47 shtammi *exoX*-mutantining effektiv tugunaklar indutsirlash xususiyatiga sabab bo'lishi mumkin (Doherty va b., 1988; Ozga va b., 1994). *ExoS* mutantlardan farqli ravishda, *exoR* mutantlarida EPS-1 sintezi juda faol bo'lib infitsirlanmaydi. *ExoS* lokusidagi suppressor mutatsiyalar *exoR* mutantlariga ko'p miqdorda EPS-1 sintezlash orqali tugunaklarni infitsirlash imkonini beradi (Ozga va b., 1994). EPS-1 produktsiyasi bakteroidlar turg'unligiga salbiy ta'sir qilishi mumkin.

1.3.2.2 Sebarga tugunaklari invaziyasida EPS-1 va EPS-2 roli. Rhizobiy mutantlarining birgalikdagi invaziyasi ustida o'tkazilgan tajribalar, *nod*-genlari bo'yicha nuqsonli Rhizobiy mutantlari EPS sintezi bo'yicha defektli mutantlarga tugunaklarga kirishga <<ko'maklashishini>>ko'rsatdi. *Sym*-plazmidiga ega bo'lmagan G234 shtammi mutant aralashmasi bilan *L. leucocephala* inokulyatsiya qilinganda har ikkala mutant hujayralarga ega bo'lgan azotfiksatsiyalovchi tugunaklar hosil bo'lgan. Shunga o'xshash natijalar SU47 shtammi *nod*- va *exo*-genlar bo'yicha nuqsonli mutantlar bilan sebarga inokulyatsiya qilinganda ham olingan. Azotfiksirllovchi tugunaklar 2 tipdagi mutantlarga ega ekanligi, ularning har ikkisi ham infeksiya jarayonida ishtirok etishini ko'rsatadi. Ayrim simbiotik tizimlarda tozalangan EPS qo'shilish EPS-mutantlarining tugunaklari infitsirlash qobiliyatini qayta tiklagan. Bu *L. leucocephala*ni infitsirlaganda NG234 shtammi mutantlarida ko'rsatib berilgan. Tozalangan EPS yoki oligosaxaridlar *Trifolium repens* EPS mutantlari bilan *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tugunaklari invaziyasini ta'minlab bergan. Geterologik EPS qo'shilishi infeksiya jarayonni qayta tiklamagan. Bu esa uning spetsifik funksiyasidan dalolat beradi. SU47 shtammida EPS-1 bo'yicha simbiotik nuqsonli mutantlarda bu nuqson pastmolekulyar EPS-1 qo'shish orqali bartaraf etiladi. Pastmolekulyar

fraksiyaning eng faol komponenti tetramer bo'lib, maksimal zaryadga ega. Pastmolekulyar EPS-1 mavjud bo'lgandagi exo-mutantlari tomonidan tugunak hosil bo'lishi, yovvoyi tipdagiga nisbatan sekin amalga oshgan. Taxminlarga ko'ra EPS-1 tugunak ichida faoliyat yuritadi yoki yuqori molekulyar EPS-1 infeksiyon jarayonda ishtirok etishi mumkin.

SU47 shtammidagi EPS-1 sintezi bloklanishi supressor *expR* mutatsiyalar hisobiga yengib o'tilgan qo'sh mutantlar *Medicago sativada* azotfiksirlanuvchi tugunaklarni hosil qilgan bo'lsa, *M. coerulea*, *M. truncatula*, *Melilotus albus* va *Trigonella founum-gaecum* da hosil qilmagan, garchi bu o'simliklar dastlabki shtamm bilan inokulyatsiya qilinganda faol tugunaklarni hosil qilganda, shu tarzda, EPS-1 va EPS-2lardan o'zaro o'rnini bosish xususiyati faqatgina bitta xo'jayin tugunaklari bilan chegaralangan (Glazebrook, Wakler, 1989). Shu bilan bir vaqtda SU47 shtammining *exoY/mucR* qo'sh mutant, *M. sativada* psevdotugunaklarni hosil qilgan edi. *ExpR*-mutatsiya EPS-2ning yuqori va pastmolekulyar fraksiyalari sintezini keltirib chiqaradi. *MucR* mutantlari esa faqat qo'sh molekulyar fraksiyalarni hosil qiladi. SU47 shtammi mutantlarining simbiotik xususiyatlari, pastmolekulyar EPS-2 qo'shilganda EPS-1 va EPS-2 nuqsonlari yengilib o'tilishi mumkin. Tugunaklar invaziyasini 15-20 ta takrorlanuvchi birliklar tutuvchi EPS-2 ning tozalangan fraksiyalari ta'minlangan (Gonzalez va b., 1996).

Taxminlarga ko'ra, pastmolekulyar EPS-1 o'simliklarning himoya reaksiyalarini so'ndirish uchun kerak (Niehaus va b., 1993, 1994). Bu gipotezani tekshirish uchun *M. sativa* xo'jayin-o'simlik, shuningdek dukkakdoshlardan bo'lmagan *Nicotiana tabacum*, *Lucopersicon esculentum* o'simliklarda turli moddalar qo'shilgandagi elisitor va supressorlar sintezi o'rganildi. Turli xil himoya reaksiyalari bilan birga, barcha kulturalar muhit ishqoriyligining kuchli va qisqa muddatli oshirilishi sharoitida kam miqdordagi nospetsifik achitqi elisitorlariga sezgirlikni ko'rsatdi. Sebarga hujayralari kulturasida bu effekt EPS-1 pastmolekulyar fraksiyalarini qo'shish bilan supressorlangan. Shuningdek, geterologik EPS *Xanthomonas campestrisksanta* ham qo'shilgan. Ushbu

moddalarning hech biri dukkakdosh bo'lmagan o'simliklardagi kulturaviy suyuqlikni ishqorlash effektini kamaytirmagan. Bu esa, pastmolekulyar EPS-1 haqiqatdan ham o'simlikning himoya reaksiyalari supressori bo'lishi mumkinligini ko'rsatadi.

Xulosa qilib aytganda, EPS ko'pchilik bakteriyalar tomonidan hosil qilinuvchi universal molekula bo'lib, ayniqsa Rhizobiaceae oilasida ko'p sintezlanadi. Ular bakteriyalar moslashuvi, hujayralar himoyasi, yuza qismiga yopishish va ozuqa moddalarni yutish kabi jarayonlarda juda muhimdir. Biroq hujayradan tashqari oligosaxaridlar xuddi EPS kabi usulda sintezlangani bilan, rizobiylar va xo'jayin o'simlik o'rtasidagi aloqalarda spetsifik funksiyalarni bajaradi.

II BOB. TADQIQOT MATERIALLARI VA METODLARI

2.1 Tadqiqot ob'yektlari. Tadqiqot ob'yektlari sifatida O'zbekiston Milliy Universiteti "Mikrobiologiya va biotexnologiya" kafedrası bakteriyalar kolleksiyasida saqlanayotgan *Rhizobium sp.-6*, *Bacillus megaterium* SKB309, *Bacillus subtilis* SKB310 shtammlari hamda O'zbekiston Respublikasi "O'simlikshunoslik ilmiy tadqiqot insituti" dan olingan ekma no'xat (*Cicer songaricum*) va kuzgi bug'doy (*Triticum vulgare*) urug'lari xizmat qildi.

2.2 Bakteriyalarni o'stirish uchun tayyorlash. Bir yillik dukkakli o'simliklarning ildizidagi tugunaklardan bakteriyalarni o'simlik gullayotgan vaqtida ajratildi. Ko'p yillik o'simliklardan-hayotining ikkinchi yilida ajratildi.

Vodoprovod suvida yaxshilab yuvilgan ildizlardan pinset yoki piska yordamida yirik pushti rangdagi tugunaklar ajratib olindi. Bakteriyalar bir necha daqiqa davomida 96% etil spirtida ushlendi, so'ng steril vodoprovod suvida ko'p marta yuvildi.

Steril pinset yordamida tugunaklar sterillangan Petri likobchaga solib, steril pichoq bilan bo'laklarga kesildi. Bakteriologik ilmoq bilan tugunakni tarkibidagi moddalardan ozgina olinib, Petri likopchasida agarli ozuqa muhiti yuzasiga bir tomchi steril suv tarkibidagi bakteriyalar mikrobiologik shpatel quritildi yordamida surkalib chiqildi. Alohida koloniyalar olish uchun shu shpatel bilan yana 3-4 ta Petri likobchadagi muhitga birin-ketin surkaldi.

Ekilgan likobchalar 25-27°C da TC-80M termostatda saqlandi. Tugunak bakteriyalar 3-4 sutkada ko'zga ko'rinadigan bo'lib, unib chiqadi.

Ozuqa muhiti sifatida Fred muhitidan foydalanildi: Mannit (saxaroza yoki glyukoza) -10 g; K_2HPO_4 -0,5 g; $MgSO_4$ -0,2 g; NaCl-0,1 g; $CaCO_3$ -3 g; achitqi ekstrakti; agar-15 g; distillangan suv(pH-7)-0,9 litr.

Peptonli ozuqa muhiti: 1 litr vodoprovod suvi, pepton-10 g; NaCl-0,5 g; saxaroza-2 g; $MgSO_4$ -0,5 g; K_2HPO_4 -0,5 g; agar-20 g (Mikrobiologiyadan uslubiy qo'llanma, 2012).

79-ozuqa muhiti: mannit-10 g; NaCl-0,1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,5 g; K_2HPO_4 -0,2 g; agar-agar-20 g; distillangan suv (pH-7)-1 litr; achitqi ekstrakti-1g (Аронштам,

Симаров, 1989).

2.3 Bakteriyalarni o'sishi va EPS sintez qilishiga harorat va vaqt davomiyligining ta'siri. *Bacillus megaterum* SKB310 bakteriyasini peptonli ozuqa muhitiga, *Bac. Subtilis* SKB309 shtammi Fred ozuqa muhitiga, *Rhizobium* sp.-6 shtammi 79 ozuqa muhitiga ekildi. Bakteriyalarni o'sishiga va EPS sinteziga haroratning ta'sirini o'rganish uchun, ajratib olingan bakteriya shtammlari 250 ml li kolbalarga 100 ml dan mos ozuqa muhitlariga 1g dan bakteriya koloniyalarini qo'shgan holda 4 xil (25°C, 30°C, 35°C va 40°C) (Мишустин, Шильникова, 1973) haroratda, 3 va 5 sutka davomida o'stirildi. Hosil bo'lgan biomassa va EPS ajratib olinib, quritilgan holda quruq massasi o'lchandi.

2.4 Ekzopolisaxaridlarni ajratib olish. Ajratib olingan kultura 1 atm bosimda 15 min avtoklav (Model XX-280) qilindi. So'ng 3000 ayl/min tezlikda sentrifuga (MPW-340) qilindi. Pastda qolgan cho'kma bakteriya biomassasi hisoblanib, uni termostatda quritildi va massasi o'lchandi. Ustki supernatantga 100% li sovuq izopropanol spirtidan 1:2 nisbatda solindi va ekzopolisaxarid cho'kmaga tushdi. Cho'kmani ajratib olish uchun 3000 ayl/min tezlikda 10 minut davomida sentrifuga qilindi. Olingan EPSlarni tozalash uchun sovuq suv bilan bir necha marta yuvildi (Логинов, 2011). Ozuqa muhiti tarkibida pH-4,0-9,0 oralig'ida bo'lganda EPS to'liq ajraldi (Худайгулов, 2012).

2.5 Ekzopolisaxaridlarning o'simlik hayotidagi ahamiyatini o'rganish. Nazorat va tajriba variantlari uchun olingan urug'lar 100 donadan olinib, sterillandi. Buning uchun urug'lar maxsus idishga solindi va ustidan 5% li natriy gipoxlorid solindi. Oradan 3 daqiqa o'tgandan so'ng, steril suv bilan bir necha marta yuvildi. Tajriba hamda nazorat variantlari sterillangan vodoprovod suvida 8 soat (bug'doy urug'i 2 soat) davomida ivitildi. Tajriba variantlari *Rhizobium* sp.-6 shtammidan ajratib olingan EPSning 10 g/l konsentratsiyali eritmasida no'xat doni qo'shimcha 30 minut davomida, *Bacillus megaterium* SKB310 shtammidan ajratib olingan EPS ning 10 g/l konsentratsiyali eritmasida esa bug'doy doni ushlab turildi. Barcha tajriba variantlari 10 donadan qilib, 10 ta Petri chashkalariga solindi va ustidan 10 ml dan sterillangan vodoprovod suvi quyildi. Urug'lar 28°C li

termostatda 7 sutka (bug‘doy urug‘i 5 sutka) davomida o‘stirildi (Методические рекомендации, 1984).

Tajriba so‘ngida ekma no‘xat va kuzgi bug‘doyning poya (bug‘doyda barg) va ildiz uzunligi o‘lchandi.

Xulosa qilib aytganda, tuproq tarkibidan bakteriyalarni ajratib olish va bu ajratib olingan bakteriyalarni turli ozuqa muhitlarida o‘stirish usullari, bakteriyalarni o‘stirish orqali EPS hosil bo‘lishida pH muhiti, harorat va vaqtga bog‘liqligi aniqlandi.

Rhizobakteriyalar tomonidan hosil bo‘lgan kultura suyuqligidan EPSlarni cho‘ktirib olish usuli takomillashtirildi. EPSlarni urug‘ unuvchanligi aniqlandi.

III BOB. OLINGAN NATIJALAR VA ULARNING TAHLILI

Ilmiy adabiyotlardan ma'lum bo'lishicha, Rhizobiylar hujayrasining tashqi qismda ko'p miqdorda EPS hosil bo'ladi, chunki EPS o'simliklarning ildiz tizimi bilan bakteriyalarning simbiotik munosabatlarini shakllanishida dastlabki turtki beruvchi omil hisoblanadi. Shuning uchun Rhizobiylar turkumiga mansub Bakteriyalarda EPS miqdori boshqa rizosfera Bakteriyalar, ya'ni o'simliklar bilan assotsiativ simbioz hosil qiluvchi bakteriyalarga nisbatan ko'p bo'ladi. Shuning uchun tadqiqotlarni rejalashtirishda tugunak bakteriyalarga mansub *Rhizobium* turkumi vakillarining EPS hosil qilishini *Bacillus* turkumiga mansub rizosfera Bakteriyalariga nisbatan qiyosiy o'rganishga e'tibor qaratildi.

Kislotali polisaxaridlarni hujayradan ajratib olish va o'rganishda bir qancha usullar yig'indisidan foydalanish, buning uchun bakteriyalarni o'stirish sharoitlari - ozuqa muhitlarining tarkibi, ozuqa muhitining pH ko'rsatkichi, harorat kabi omillarni to'g'ri tanlash muhim rol o'ynaydi. Tahlil etilgan Bakteriyalarda yuqorida qayd etilgani kabi genotipik va fenotipik belgilarning yuzaga chiqishi, ya'ni ko'p miqdorda polisaxarid sintezlanishi uchun tadqiqotlarning dastlabki boshlang'ich bosqichida rizobum turkumiga mansub va o'simliklar rizosferasida uchrovchi bakteriyalarning sof kulturalarini ekish, o'stirish, maksimal miqdorda biomassa olishga qaratildi. Buning uchun Rhizobiylarni o'stirishda №79 ozuqa muhitidan (Аронштам, Симаров, 1989), rizobakteriyalarni o'stirishda boyitilgan peptonli ozuqa muhitidan hamda Fred ozuqa muhitlaridan foydalanildi (Mikrobiologiyadan uslubiy qo'llanma, 2012).

3.1 Bakteriyalarni o'sishida harorat va vaqtning ta'siri. Bakteriyalarni o'sishida haroratning ta'sirini o'rganish uchun, ajratib olingan bakteriya shtammlari 250 ml li kolbalarga 100 ml dan mos ozuqa muhitlariga 1g dan bakteriya koloniyalarini qo'shgan holda 4 xil (25°C, 30°C, 35°C va 40°C) haroratda, 3 va 5 sutka davomida o'stirildi. Bakteriyalarni turli haroratlarda o'stirish natijasida, bakteriyalar o'sishi uchun qulay harorat-bu 30°C ekanligi va shu haroratda o'sgan bakteriyalardan ko'p miqdorda EPS sintez bo'lishi aniqlandi. Chayqatgichda 3 va 5 sutka davomida bakteriyalarni o'stirish natijasida, 5 sutka

davomida o‘stirilgan bakteriyalardan ko‘proq miqdorda EPS sintezlanishi aniqlandi (3-4-5- jadvallar).

3.2 Ekzopolisaxaridlarni ajratib olish. Bakteriyalarni o‘stirish natijasida hosil bo‘lgan kultura suyuqligiga teng miqdorda izopropanol (butanol yoki etanol) spirtidan 1:2 nisbatda silindi va ekzopolisaxarid cho‘kmaga tushdi. EPSni cho‘ktirib olishda butanol spirtidan foydalanilganda yaxshi natija bermadi. EPSni cho‘ktirishda izopropanol spirtidan foydalanilganda yuqori natijaga erishildi. Cho‘kmani ajratib olish uchun 3000 ayl/min tezlikda 10 minut davomida sentrifuga qilindi. Olingan EPSlarni tozalash uchun sovuq suv bilan bir necha marta yuvildi.

Metodikadan farqli ravishda EPSni cho‘ktirib olishda, kultura suyuqligiga 1:2 nisbatda izopropanol spirtidan qo‘shilgan holda, 2 sutka mobaynida 4°C da qoldirish orqali yaxshi natijasiga erishildi.

Tajribalar natijasida ajratib olingan biomassa va EPS miqdorlari 3-4-5- jadvallarda keltirildi.

3-jadval

Bacillus megaterium SKB310 shtammining ajratib biomassa (g/l) va EPS hosil qilishini harorat va vaqtga bog‘liqligi (g/l)

Harorat \ Vaqt	25°C		30°C		35°C		40°C	
	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS
3	0,80	0,30	0,87	0,38	0,73	0,35	0,70	0,30
5	1,50	0,50	1,70	0,52	1,65	0,48	1,51	0,39

3-jadvaldan ko‘rinib turibdiki, pepton ozuqa muhitidan foydalanilganda, *Bacillus megaterium* SKB310 rizobakteriyasi shtamlari uchun 25°C li harorat eng past bo‘lib, 5 sutka davomida 1,5gamm biomassa hosil bo‘ldi. Haroratning 30°C harorat esa optimal bo‘lib, 1,82 gamm biomassa hosil bo‘lishiga olib keldi. Biomassa miqdori kam hosil bo‘lganligi sababli, undan ajratib olingan EPS miqdori ham kam hosil bo‘ldi, ya’ni optimal haroratda 0,52 gamm miqdorda EPS ajratib olindi. Haroratni 40°C ga yetkazilganda ajratib olingan EPS miqdori 0,13 g

ga kamaydi.

4-jadval

Bacillus subtilis SKB309 shtamining biomassa (g/l) va EPS hosil qilishini harorat va vaqtga bogʻliqligi (g/l)

Harorat \ Vaqt	25°C		30°C		35°C		40°C	
	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS
3	0,57	0,18	0,62	0,27	0,58	0,25	0,56	0,17
5	0,82	0,36	0,96	0,42	0,88	0,38	0,70	0,34

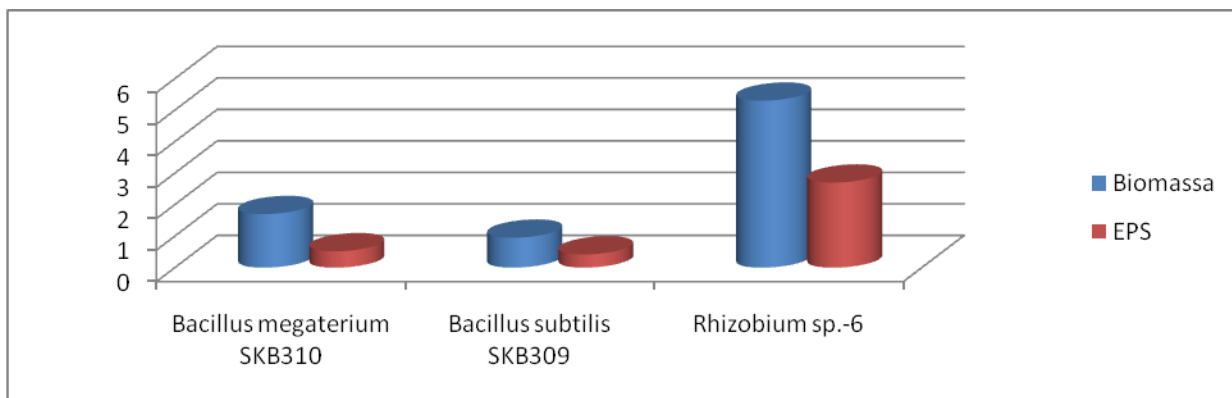
Fred ozuqa muhiti peptonli ozuqa muhitiga nisbatan organik moddalarga kambagʻal boʻlganligi bois, birmuncha past samara berishi aniqlandi. 4-jadvalda koʻrinib turganidek, *Bacillus subtilis* SKB309 shtammi Fred ozuqa muhitida oʻstirilganda, maksimal miqdordagi EPS 30°C li haroratda 0,42 gammni tashkil qildi. Haroratni 40°C ga yetkazilganda EPS miqdori 0,34 g gacha kamaygani koʻrindi.

5-jadval

Rhizobium sp.-6 shtammida hosil boʻlgan biomassa (g/l) va EPS miqdorining (g/l) harorat va vaqtga bogʻliqligi

Harorat \ Vaqt	25°C		30°C		35°C		40°C	
	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS	Biomassa	EPS
3	2,70	1,47	4,40	2,00	3,50	3,5	3,00	1,30
5	4,20	2,00	5,30	2,70	4,80	2,42	4,40	2,20

5-jadvaldan koʻrinib turibdiki, 5 sutka davomida oʻstirilgan bakteriyadan 25°C da 4,2 gamm biomassaga nisbatan 2,0 gam polisaxarid ajralib chiqqan boʻlsa, bu koʻrsatkich 30°C haroratda 5,3 gamm biomassaga nisbatan 0,7 gammga koʻproq, ya'ni 2,7 gammni tashkil etdi. Haroratni 35°C ga yetkazilganda ajratib olingan biomassa va EPS miqdori kamaygani kuzatildi.



7-rasm. Optimal harorat (30 °C) da bakteriyalardan ajratib olingan biomassa va EPS miqdorlari. Ko‘rinib turganidek *Rhizobium sp.-6* shtammida boshqa tadqiqot shtammlariga nisbatan biomassa va EPS nisbatan ko‘p hosil bo‘ldi.

3.3 Ekzopolisaxaridlarning o‘simlik hayotidagi ahamiyatini o‘rganish.

Bakteriyalardan cho‘ktirib olingan ekzopolisaxaridlarni ekma no‘xat (*Cicer songaricum*) va kuzgi bug‘doy (*Triticum vulgare*) o‘simliklari urug‘i unuvchanligiga ta‘sirini o‘rganildi (nazorat suvga nisbatan).

6-jadval

Rhizobium sp.-6 shtammidan ajratib olingan EPS ning ekma no‘xat urug‘lari unuvchanligiga ta‘siri

Variantlar		Poya uzunligi (sm) (o‘rtacha)	Ildiz uzunligi (sm) (o‘rtacha)
Nazorat	1	2,046	4,730
	2	1,957	4,641
	3	2,173	4,857
	4	1,879	4,563
	5	1,970	4,472
O‘rtacha		2,005	4,6526
Tajriba	1	2,356	5,160
	2	2,322	4,978
	3	2,547	5,120
	4	2,478	5,173
	5	2,396	5,134
O‘rtacha		2,4198	5,113

6-jadvalda. *Rhizobium sp.-6* shtammidan ajratib olingan EPS ta‘siri nazorat

va tajriba variantlarida koʻrildi. 100 dona ekma noʻxat (*Cicer songaricum* oʻsimligi 8 soat davomida vodoprovod suvida ivitildi va tajriba variantiga 30 daqiqa davomida EPSli eritma bilan ishlov berildi. Nazorat va tajriba variantlari 28°C li termostatda 7 sutka davomida oʻstirildi. Oʻstirish natijalari 3-5 va 7 kunlarda ildiz va poya uzunliklari millimeter qogʻozida oʻlchandi va ularning oʻrtachasi topildi, natijalar jadvalga tushirildi. Tajriba natijasiga koʻra, EPSli eritma bilan ishlov berilgan urugʻlarning poya va ildiz uzunliklari nazaratdagi donlarning poya va ildiz uzunligiga nisbatan yuqori koʻrsatkichga ega boʻlishi aniqlandi.

Tajriba kuzgi bugʻdoy (*Triticum vulgare*) oʻsimligi urugʻi ustida ham olib borildi. Burchoqdoshlar (Fabaceae) oilasiga mansub ushbu oʻsimlikka, *Bacillus megaterium* SKB310 shammidan ajratib olingan EPS taʼsiri koʻrildi.

7-jadval

Bacillus megaterium SKB310 shtammidan ajratib olingan EPSni bugʻdoy urugʻlari unuvchanligiga taʼsiri

Variantlar		Barg uzunligi (sm) (oʻrtacha)	Ildiz uzunligi (sm) (oʻrtacha)
Nazorat	1	4,35	5,93
	2	4,67	6,15
	3	4,82	6,32
	4	4,95	6,37
	5	4,98	6,55
Oʻrtacha		4,754	6,324
Tajriba	1	4,87	6.45
	2	5,12	6.65
	3	5,36	6.82
	4	5,41	6,87
	5	5,45	6,93
Oʻrtacha		5,242	6,744

7-jadvaldan koʻrinib turibdiki, *Bacillus megaterium* SKB310 shtammidan ajratib olingan EPSni bugʻdoy urugʻlari unuvchanligiga taʼsiri 5 sutka davomida oʻrganilganda, nazorat variantlariga nisbatan tajriba variantlari unuvchanligi yuqoriligi koʻrindi. Tajribaning dastlabgi kunlarida avval ildiz, keyin esa bargning

paydo bo'lganligi kuzatildi. Kuzatishlarning 3-4-5 kunlarida hosil bo'lgan ildiz va barg uzunliklari millimeter qog'ozida o'lchanib, jadvalga tushirildi.

Xulosa qilib aytganda, bakteriyalarni o'stirishda tegishli suyuq ozuqa muhitlaridan foydalanildi va eng ko'p ekzopolisaxarid №79 ozuqa muhitida pH-3 bo'lganda o'stirilgan *Rhizobium sp.*-6 shtammidan cho'ktirib olindi. Kulturada 5 sutka davomida o'sayotgan bakteriyalar uchun 30°C harorat optimum ekanligi aniqlandi. Kultura suyuqligida hosil bo'lgan ekzopolisaxaridni cho'ktirib olishda izopropanol spirtidan foydalanilganda yuqori darajada 2,7g miqdorda EPS ajratildi.

Bakteriyalardan cho'ktirib olingan ekzopolisaxaridlarni ekma no'xat (*Cicer songaricum*) va kuzgi bug'doy (*Triticum vulgare*) o'simliklariga nisbatan ta'sirini o'rganildi (nazorat suvga nisbatan). Bunda urug'ning unuvchanligi oshgani ko'rindi. Urug'larda hosil bo'lgan ildiz va poya uzunliklarida ham farq yuzaga keldi.

XULOSALAR

1. Tadqiqot ob'yehti sifatida olingan mikroorganizmlarning o'sishi va EPS sintezlashiga harorat hamda o'stirish davomiyligining ta'sirini o'rganish natijasida, ularni 30°C haroratda, 5 sutka davomida o'stirilgandanda, biomassa va EPS sintezi nisbatan yuqori bo'lishi aniqlangan.
2. Barcha tadqiqot ob'yektlari tomonidan EPS sintezlanishi aniqlanib, nisbatan eng ko'p miqdordagi EPS *Rhizobium sp.*-6 shtammi tomonidan sintezlanishi aniqlangan.
3. *Rhizobium sp.*-6 shtammidan ajratib olingan EPSning ekma no'xat, *Bacillus megaterium* SKB310 shtammidan ajratib olingan EPSning esa kuzgi bug'doy o'simligining rivojlanishiga ta'siri o'rganib chiqilgan. EPS ta'sir ettirilgan tajriba variantlari har ikkala o'simlikda nazorat variantiga nisbatan poya (bug'doyda barg) va ildiz uzunligi yuqori bo'lishi aniqlangan.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR RO'YXATI

1. Mikrobiologik tadqiqotlar uchun uslubiy qo'llanma: Rasulova T.X., Davronov Q.D., Jo'raeva U.M., Magbulova N.A., Toshkent-2012. 42-44 b.
2. Аронштам А.А., Симаров Б.В. Молекулярные механизмы детерминации симбиотических свойств клубеньковых бактерий. Бюллетень ВНИИ с-х микробиологии 1989.
3. Логинов, Я.О. (2011). *Биосинтез и свойства экзополисахарида Azotobactervinelandii*. Щёлкова.
4. Методические рекомендации: Генетические методы селекции клубеньковых бактерий.-под. Рук. Симарова Б.В.-л.,1984,-37с.
5. Мишустин Е.Н., Щильникова В.К. клубеньковые бактерии и инокуляционный процессу-М: Наука, 1973.
6. Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Экзополисахарид альгинатного типа *Panibacillus ehimensis* 739 // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011.-С.214-217.
7. Amemura A., Harada T., Abe M., Higashii S. (1983) Carbohydr. Res. V. 115, p. 165-174.
8. Arias A., Cervenansky C. (1986) J. Bacteriol. V. 167, p. 1092-1094.
9. Becker A., Kleickmann A., Keller M., Arnold W., Puhler A. (1993) Mol. Gen. Genet. V. 241, p. 367-379.
10. Becker A., Niehaus K., Puhler A. (1995) Mol. Microbiol. V. 16, p. 191-203.
11. Becker A., Ruberg S., Kuster H., Roxlau A.A., Keller M., Ivashina T., Cheng H.-P., Walker G.C., Puhler A. (1997) J.
12. Bittinger M.A., Milner J.L., Savilla B.J., Handelsman J. (1997) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 10, p. 180-186.
13. Borthakur D., Barber C.E., Lamb J.W., Daniels M.J., Downie J.A., Johnston A.W.B. (1986) Mol. Gen. Genet. V. 203, p. 320-323.
14. Borthakur D., Barker R.F., Latchford J.W., Rossen L., Johnston

A.W.B. (1988) *Mol. Gen. Genet.* V. 213, p. 155-162. Borthakur D., Downie J.A., Johnston A.W.B., Lamb J.W. (1985) *Mol. Gen. Genet.* V. 200, p. 278-282.

15. Buendia A.M., Enenkel B., Koplin R., Niehaus K., Arnold W., Puhler A. (1991) *Mol. Microbiol.* V. 5, p. 1519-1530. Bugert P., Geider K. (1995) *Mol. Microbiol.* V. 15, p. 917-933.

16. Charles T.C., Finan T.M. (1991) *Genetics.* V. 127, p. 5-20.

17. Cooley M.B., d'Souza M.R., Kado C.I. (1991) *J. Bacteriol.* V. 173, p. 2608-2616.

18. Coplin D.L., Cook D. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact.* V. 3, p. 271-279.

19. Djordjevic S.P., Chen H., Bailey M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1987) *J. Bacteriol.* V. 169, p. 53-60.

20. Djordjevic S.P., Rolfe B.G., Batley M., Redmond J.W. (1986) *Carbohydr. Res.* V. 148, p. 87-99.

21. Doherty D., Leigh J., Glazebrook J., Walker G.C. (1988) *J. Bacteriol.* V. 170, p. 4249-4256. d'Souza-Ault M.R., Cooley M.B., Kado C.I. (1993) *J. Bacteriol.* V. 175, p. 3486-3490.

22. Finan T.M., Kunkel B., de Vos G.F., Signer E.R. (1986) *J. Bacteriol.* V. 167, p. 66-72.

23. Fukasawa T., Nikaido H. (1961) *Biochim. Biophys. Acta.* V, 48, p. 470-483,

24. Glazebrook J., Walker G.C. (1989) *Cell.* V. 56, p. 661-672.

25. Ivashina T.V., Khmelnitsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. (1994) *Gene.* V. 150, p. 111-116. Ivashina T.V., Sadykhov M.R., Chatuev B.M., Dmitriev V.V., Suzina N.E., Duda V.I., Ksenzenko V.N. (1995) In: I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (eds.). *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*, Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, the Netherlands, p. 404.

26. Ivashina T., Sadykov M., Senchenkova S., Shashkov A., Shibaev

V., Ksenzenko V. (1996) In: A. Wojtowicz, J. Slepowska, A. Szlagowska (eds.), 2-nd European Nitrogen Fixation Conference & NATO Advanced Research Workshop, Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Scientific Publishers OWN, Poznan, Poland, p. 127.

Kapp D., Niehaus K., Quandt J., Muller P., Puhler A. (1990) Plant Cell. V. 2, p. 139-151.

27. Keller M., Roxlau A., Weng W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., Puhler A. (1995) Mol.

28. Kosch K., Batinic T., Niehaus K., Werner D., Muller P. (1995) In: I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton (eds.). Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications, Kluwer Acad.Publ. Dordrecht, the Netherlands, p. 329.

29. Lopez-Lara I.M., Orgambide G., Dazzo F.B., Olivares J., Toro N. (1993) J. Bacteriol. V. 175, p. 2826-2832.

30. May T.B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J.D., Roychoudhury S., Zielinski N., Berry A., Rothmel R.K, Misra T.K., Chakrabarty A.M. (1991) Clin. Microbiol. Rev. V. 4, p. 191-206.

31. McGath B.C., Osborn M.J. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 649-654.

32. Mort A.J., Bauer W.D. (1982) J. Biol. Chem. V. 257, p. 1870-1875.

33. Newcomb W. (1981) In: K.L. Giles, A.G. Atherly (eds.) Biology of the Rhizobiaceae. Academic Press, NY, USA.

34. Osters M., Stanley J., Finan T.M. (1995) J. Bacteriol. V. 177, p. 5485-5494.

35. Ozga D.A., Lara J.C., Leigh J.A. (1994) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 7, p. 758-765.

36. Parniske M., Kosch K., Werner D., Muller P. (1993) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 6, p. 99-106.

37. Reed J.W., Walker G.C. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 664-677.

38. Reeve W.G., Dilworth M.J., Tiwari R.P., Glenn A.R. (1997) Microbiology. V. 143, p. 1951-1958.

39. Reuber T.L., Walker G.C. (1993b) J. Bacteriol. V. 175, p. 3653-3655.
40. Rohr T.E., Troy F.A. (1980) J. Biol. Chem. V. 255, p. 2332-2342.
41. Stingle F., Neesler J.-R., Mollet B. (1996) J. Bacteriol. V. 178, p. 1680-1690.
42. Uttaro A.D., Cangelosi G.A., Geremia R.A., Nester E.W., Ugalde R.A. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 1640-1646.
43. Van Workum W.A.T., van Brussel A.A.N., TakT., Wijffelman C.A., Kijne J.W. (1995) Mol. Plant-Microbe Interact. V. 8, p. 278-285.
44. Weisgerber C., Troy F A. (1990) J. Biol. Chem. V. 265, p. 1578-1587.
45. York G.M., Walker G.C. (1997) Mol. Microbiol. V. 25, p. 117-134.
46. Zhan H., Lee C.C., Leigh J.A. (1991) J. Bacteriol. V. 173, p. 7391-7394.
47. Zhan H., Leigh J.A. (1990) J. Bacteriol. V. 172, p. 5254-5259.
48. Zhan H., Levery S.B., Lee C.C., Leigh J.A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 86, p. 3055-3059.