

**FITOPATOGEN ZAMBURUG‘ KULTURALARINI UZOQ MUDDATGA
KOLLEKSIYADA SAQLASHNI OPTIMIZATSIYA QILISH.**

Ruzmetov Dilshod Rustam o‘g‘li- b.f.f.d. (PhD)

O‘zR FA Genetika va o‘simliklar eksperimental biologiyasi instituti

E-mail:ruzmetov.1993@inbox.ru +998909065651

Annotatsiya. Respublikamizda ekilgan fitopatogen mikroorganizmlar bilan zararlangan qishloq xo‘jaligi ekinlaridan zamburug‘ turlarining sof kulturasini ajratildi. Ajratilgan shtammlarning morfologik, sistematik, biologik, patogenlik xususiyatlari o‘rganildi, hamda «Fitopatogen va boshqa mikroorganizmlar» noyob ob’ekti kolleksiyada vazelin yog‘i ostida saqlanyotgan shtammlarni uzoq muddatga kolleksiyada saqlashni optimizatsiya qilish ustida laboratoriya tajribalar olib borildi. Tajribada O‘zbekiston Respublikasida ilk bor mikroorganizmlarni kolleksiyada uzoq muddat saqlashning usullari optimallashtirildi.

Kalit so‘zlar: Fitopatogen, kolleksiya, liofilizatsiya, vazelin yog‘i, optimizatsiya, eppendorf probirkalar, KDA.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ
ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБНЫХ КУЛЬТУР В КОЛЛЕКЦИЯХ.**

Рузметов Дилшод Рустам угли, к.б.н.(PhD)

Институт генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз

E-mail:ruzmetov.1993@inbox.ru +998909065651

Аннотация. Из посевов сельскохозяйственных культур республики Узбекистан, пораженных фитопатогенными микроорганизмами, были выделены чистые культуры различных видов грибов. Изучены морфологические, систематические, биологические и патогенные свойства выделенных штаммов, а также проведены лабораторные эксперименты по оптимизации условий длительного хранения штаммов под вазелиновым маслом в коллекции уникального объекта «Фитопатогенные и другие микроорганизмы». В ходе экспериментов впервые в Республике Узбекистан были оптимизированы методы длительного хранения микроорганизмов в коллекции.

Ключевые слова: Фитопатоген, коллекция, лиофилизация, вазелиновое масло, оптимизация, пробирки типа эппендорф, КДА.

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR LONG-TERM STORAGE OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI CULTURES IN THE COLLECTIONS.

Ruzmetov Dilshod Rustam ugli (PhD)

Institute of genetics and plant experimental biology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

E-mail: ruzmetov.1993@inbox.ru +998909065651

Abstract. Pure cultures of various fungal species were isolated from agricultural crops affected by phytopathogenic microorganisms in the Republic of Uzbekistan. The morphological, systematic, biological and pathogenic characteristics of the of the isolated strains were studied, and laboratory experiments were carried out to optimize the long-term storage of strains under under vaseline oil in the collection of the unique object “Phytopathogenic and other microorganisms”. During the experiment, for the first time in the Republic of Uzbekistan, methods for long-term storage of microorganisms in the collection were optimized.

Keywords: Phytopathogen, collection, lyophilization, vaseline oil, optimization, eppendorf tubes, PDA.

Kirish. Hozirgi kunda mikroorganizmlarni saqlashning xalqaro amaliy ahamiyati juda katta bo'lib, dunyoda <http://microbiosociety.ru> 9 ta mikroorganizmlar kolleksiyalari bazasi mavzud bo'lib ularda saqlanyotgan kulturalar ko'plab sohalarda, ilmiy tajriba laboratoriyalarda qo'llanilib kelinmoqda. Shu bilan birga ilmiy tekshirish institutlarida va universitetlaridagi tirik kulturalar kolleksiyalarini saqlashning bir necha uslublari bor. Umumiy mikroorganizmlar morfologiyasi, fiziologiyasi, biokimyosi, genetikasi, sistematikasi va ularning tabiatdagi ahamiyatini o'rganadi. Yashash muhitiga ko'ra umumiy mikrobiologiya tuproq, sanoat, suv, geologik, kosmik mikrobiologiyaga ajratiladi. Bu jarayonlarning mexanizmi ayrim mikroorganizmlarni o'stirish, saqlash va qayta ekib ko'paytirish borasidagi yutuqlarimizning bir qismi hisoblanadi. Mikroorganizmlarni, jumladan patogen organizmlarni tirik holda saqlash, ularning

eng xarakterli xususiyatlarini saqlay bilish, monospora kulturalarini ajratish, hozirgi kunda o'simliklarning yangi navlarini yaratishda va ularning patogen mikroorganizmlarga chidamlilik darajasini tekshirishgacha bo'lgan davrda mikroorganizmlarning kolleksiyasini yaratish va ulardan foydalanish muhim ahamiyat kasb etadi. [1].

Adabiyotlar tahlili. Hozirgi vaqtda liofilizatsiya katta kolleksiyalarda turli xil bakteriyalarni, aktinomitsetlarni, mikoplazmalarni, mitselial zamburug'larni, achitqi zamburug'larini, suvo'tlarini, viruslarni, vaksina va qon plazmalarini uzoq saqlash (30 yildan ortiq) maqsadlarda keng qo'llanilib kelinmoqda. Liofil quritish jarayonida mikroorganizmlar turli xil noqulay (stress) sharoitlar ta'siriga uchraydi: muzlatish, quritish, vakuum va boshqalar. Liofilizatsiya jarayonida hujayraning buzilishiga sabab bo'ladigan omillarni aniqlash va hayot faoliyatini, belgilarini turg'unligini ta'minlovchi sharoitni tanlash muhim ahamiyat kasb etadi. Liofil quritish jarayoni dastlab mikroorganizmlarning patogen va shartli patogen, keyinroq esa saprofit formalari bilan olib borilgan; ko'p tadqiqotlar natijasida aniqlanishicha, liofil quritilgan mikroorganizmlarning hayot faoliyati saqlanishi, tur va shtammning maxsus sezgirligiga, kulturaning o'sish bosqichiga, hujayra miqdoriga, himoya muhitining tarkibiga, liofilizatsiya rejimiga, saqlash sharoitiga (harorat, atmosfera muhiti, yorug'likka) bog'liq bo'ladi

Qo'llaniladigan ozuqa muhiti. Shuni qayd etish kerakki ozuqasi kam, ya'ni minimal ozuqa muhitida mikroorganizmlarda metabolism jarayoni sust kechadi, shuning uchun ularni saqlashda qayta ekish oralig'i uzoqroq bo'ladi. Biroq ba'zi bakteriyalar rivojlanishi uchun kompleks ozuqa muhiti talab qilinadi. Saqlash uchun ularning spesifik – fiziologik xususiyatlari va murakkab birikmalar hosil qilishini inobatga olmoq lozim.

Qayta ekish muddati eksperimental usul orqali amalga oshiriladi, ya'ni ularni tez-tez nazorat qilish, variantlarni chalkashtirib yubormaslik uchun bir nusxada emas, balki kamida 3-5 yoki ba'zan 10-15 nusxada ekib saqlash ular yaxshi saqlanishiga va har xil noqulay sharoitlarda hayotchanligini saqlashning ehtimolini oshiradi. Muddati kelganda qayta ekish uchun mikroorganizmlar

shtamlari yog'dan sterillangan filtr qog'oziga olinadi. Keyin bu jarayon bir necha marta takrorlanadi, ya'ni filtr qog'ozida yog' dog'lari qolmaguncha davom ettiriladi. Toza sof kultura ozuqa muhitiga ekiladi va kerakli haroratda o'stiriladi. Ozuqa muhitida o'stirilgan kulturalar avval fenotipik jihatdan o'rganiladi, keyinchalik mikroskopda turning tozaligi aniqlanadi. Agar kultura toza bo'lsa, yana probirkalarga ekib o'stiriladi va ustiga 1,5-2 sm qalinlikda mineral yog' solinadi [2,7]. Mikroorganizmlar kolleksiyasi bo'yicha ko'p tajribaga ega bo'lgan olimlar [3,4] fikricha, hozirgi vaqtda mikroorganizmlar kolleksiyasini yaratish, ularni tinim davrida saqlash, laboratoriya sharoitida saqlashga yetarli hisoblanadi. *Vazelin yog'i ostida saqlash usuli.* Mikroorganizmlar oddiy agarli ozuqa muhitida o'stirilib, ustiga (2 marta 1 atm da 1 soatdan) sterillangan vazelin yog'i solinadi. Tarkibidagi suvni bug'latib chiqarish uchun vazelin yog'i 150°S da qizdiriladi [5]. Vazelin yog'i probirkalardagi sof kulturalarning ustiga 1,5-2 sm qalinlikda quyiladi.

MDU ning mikrobiologiya kafedrasida 1959-1960 yillarda saprotrof mikroorganizmlarni liofilizatsiya qilish usulida saqlashda 1% jelatina, 10% qand, 7% sutdan olingan laktozadan foydalanilgan[9].

Tadqiqot metodologiyasi Hozirgi kunda mikroorganizmlarni saqlashning, har xil mineral yog'lar ostida, kriokonservatsiya, liofil, suv ostida, gerbariyalarda quritish (disk) holatida, muzlatgan holda va boshqa bir qancha turlari mavjud.

Liofil quritish usuli muhim ahamiyatga ega, bu usulning afzalligi hujayrani muzlagan holatidan suyuq fazaga o'tkazmasdan vakuum ostida quritish bilan bog'liq.

Mikroorganizmlarni quritilgan holda saqlash. Quritish mikroorganizmlarni saqlashning eng oddiy usulidir. Ko'plab mikroorganizmlar tabiiy sharoitda (tuproqda, qumda, loyda, havoda), qurigan holda va turli xil oziq-ovqat mahsulotlari tarkibida uzoq vaqt yaxshi saqlanadi.

Subkulturalash (ko'chirib ekish) usuli. Subkulturalash yoki mikroorganizmlarni yangi agarli muhitda vaqti-vaqti bilan ko'chirib ekish,

Qattiq agarli muhitda saqlash. Bu usul juda oson va samarali usullaridan biri, lekin ko'pchilik mikroorganizmlarga to'g'ri kelmaydi. Sababi mikroorganizmlar qurib qolgandan keyin nobud bo'lishi mumkin [8,10,11,12].

Mikroorganizmlar kulturasini vazelin yog'larda saqlash usuli.

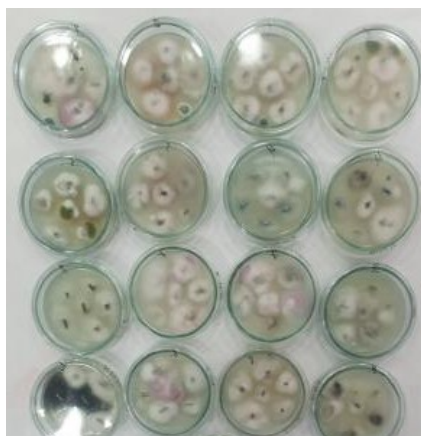
Bu usulda bakteriyalar va mikroskopik zamburug'lar yaxshi saqlanadi. Bu usulda saqlangan mikroorganizmlarning barcha taksonomik va sistematik belgilari, fiziologik xususiyatlari uzoq vaqt davomida saqlanishiga sabab, ozuqa muhiti qurib qolmaydi. Ularning metabolizm jarayoni uzoq vaqt sekinlashadi va qayta ekish muddatlarini uzaytiradi. Buning uchun mikroorganizmlarni agarli ozuqa muhitida o'stirilib, aeroblari 45° qiya qilingan ozuqa muhitida, mikroaerofillar va fakultativ anaeroblar suyuq ozuqa muhitida, anaeroblar agarli ozuqa muhiti yuzasiga ekiladi. Kulturalar bu ozuqa yuzasida yaxshi o'sgandan keyin ukol yo'li bilan ekiladi. Kultura ozuqada yaxshi o'sgandan keyin ustiga mineral yog' solinadi. Yog'ni solish muddati turli organizmlarda turlicha bo'ladi. Masalan, asporogen bakteriyalarda ekilgandan keyin, 2-7 kun o'tganida, batsilla va aktinomitsetlar tinim davriga kirib spora hosil qilganda, achitqi zamburug'lari 4-10 kundan keyin, ko'p boshqa zamburug'lar 7-12 kundan keyin ularning kulturalariga mineral yog' solinadi. Mineral moylar orasida zamburug'lar mitseliysi uchun eng maqbuli tibbiyotda foydalaniladigan yog' hisoblanadi.

Tayyor yog'ni probirkada ekilgan mikroorganizmlarning o'sgan yuzasidan 1,5-2 sm qalinlikda quyiladi. Bunday kulturalarni xona sharoitida yoki sovutgichda 4-6°S haroratda saqlash mumkin.

Tahlillar va natijalar Respublikamizda ekilgan fitopatogen mikroorganizmlar bilan zaralangan qishloq xo'jaligi ekinlardan ajratib olingan zamburug' shtammlari hamda kolleksiyada uzoq muddat davomida saqlash maqsadida morfo-kultural hamda molekulyar-genetik belgilari asosida identifikatsiya qilingan zamburug' shtammlari saqlashga tayyorlandi. (1-3 rasmlar) [7].



1-rasm Fitopatogen mikroorganizmlar bilan zararlangan o'simlik namunasi.



2-rasm Zararlangan o'simlik namunalaridan zamburug'lar ajratish.



3-rasm Ajratilgan zamburug'larning sof kulturalari.

Fusarium va *Alternaria* turkumlariga mansub ayrim zamburug' turlarining har bir shtammini Petri idishlarida ozuqa muhitlariga 3 qaytariqda ko'chirib ekildi [2,6,7].

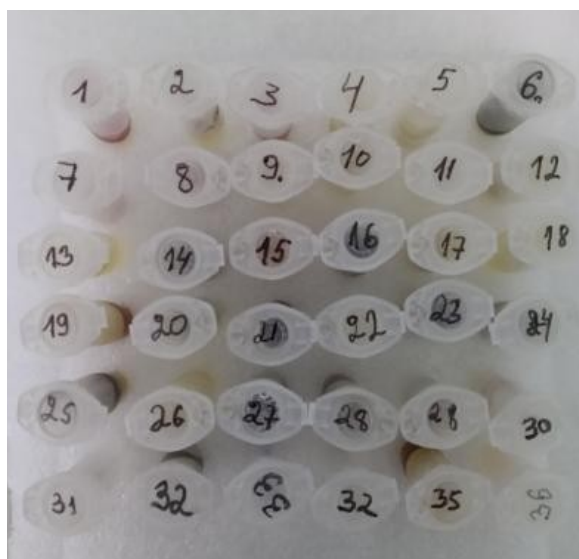
Hozirgi kunda Genetika va o'simliklar eksperimental biologiyasi institutidagi "Fitopatogen va boshqa mikroorganizmlar kolleksiyasi" noyob ob'ektida respublikamizdagi qishloq xo'jaligi ekinlaridan ajratib olingan 1000 dan ortiq shtammlar saqlanib kelinmoqda. Kolleksiyada shtammlar liofil quritilgan, vazelin yog'i ostida hamda biologik probirkalar (qiyshiq agar muhiti) holatida ko'p yillar mobaynida saqlanmoqda. Lekin bu usullar yordamida kolleksiyada shtammlarni uzoq muddat saqlashning iqtisodiy samaradorligi yuqoriligi bilan birga bir qancha kamchiliklari ham bor.

Kolleksiyada shtammlarni uzoq muddat saqlashni optimizatsiya qilishda kolleksiyada vazelin yog'i ostida saqlanyotgan kulturalarni optimizatsiya qilish uchun yangi usul joriy qilindi va sinovdan o'tkazildi(4-rasm).



4-rasm. Kolleksiyada vazelin yog‘ ostida saqlanyotgan shtammlar.

Kolleksiyadagi fitopatogen zamburug‘lar shtammlarini uzoq muddat saqlashning ozuqa muhitlar uchun moliyaviy xarajatlarning qiyosiy tahlili o‘tkazildi: Kulturalarni vazelin yog‘i ostida $+5^{\circ}\text{S}$ da saqlash usuliga ko‘ra kulturalarini mini 1,5 Eppendorf probirkalarida $+5^{\circ}\text{S}$ haroratda saqlash usuliga o‘tkazildi. Bu o‘z navbatida laboratoriya tajribada vazelin yog‘i ostida saqlanayotgan kulturalarni mini 1,5 Eppendorf probirkalarga o‘tkazildi va uzoq muddatga saqlashni uzaytirildi. Kolleksiyada uzoq muddat saqlashda Eppendorf probirkalarida saqlanayotgan shtammlar vazelin yog‘i ostida saqlashga nisbatan ozuqa muhitining sarf-xarajatlari taqqoslandi va ozuqa muhitiga ketadigan agar-agar hisoblab chiqildi: 1 l ozuqa muhiti tayyorlash uchun 20 g agar-agar ketadi. Bu hajmdagi ozuqa muhiti har bir probirkaga 10 ml dan quyiladi va u 100 ta probirkaga etadi. Hajmi 1,5 ml bo‘lgan Eppendorf probirkalarining har biriga 0,65 ml dan ozuqa muhiti solinadi, bunda 1 l ozuqa muhiti 1538 ta probirkaga etadi(1-jadval). Eppendorf probirkasida saqlash usuli vazelin yog‘ida saqlash usuliga nisbat 15,38 marta ustun bo‘lib, kulturalarni kolleksiyada 60 oygacha saqlash mumkinligi aniqlandi(5-6 rasmlar).



5-rasm. Kulturalarni Eppendorf probirkalarida saqlash usuli



6-rasm. Kulturalarni Eppendorf probirkalarida saqlash usuli

1-jadval

Kolleksiyada vazelin yog‘i ostida saqlanyotgan shtammlar Eppendorf probirkalarda ko‘chirilgan shtammlarga ozuqa muhitdagi nisbatan (agar-agar) mahsulotining sarf me‘yori taqoslandi

Vazelin yog‘ida saqlash	Narxi (so‘m)	1,5 g Eppendorf probirkasida saqlash	Narxi (so‘m)
1 l ozuqa muhiti (20 g agar-agar)	1 kg 6000000 20 g 120000	1 l ozuqa muhiti (20 g agar-agar)	1 kg 6000000 20 g 120000
100 dona probirkaga solinadi	$120000:100=1200$	1538 dona Eppendorf probirkasiga solinadi	$120000:1538=78$
1 ta probirkaga 10 ml	1200	1 ta Eppendorf probirkasiga 0.65 ml	78
Kolleksiyada saqlanish muddati 24 oy		Kolleksiyada saqlanish muddati 60 oy	
Farqi	1		15.38

Kolleksiyada saqlanayotgan hamda yangi aniqlangan turlarni kolleksiyada uzoq muddat saqlashni optimizatsiya qilingan usuli ishlab chiqildi.

Xulosa O‘zbekiston Respublikasida ilk bor mikroorganizmlarni kolleksiyada uzoq muddat saqlashning usullari optimallashtirildi. Ilmiy tadqiqotlar davomida ajratib olingan shtammlar hajmi 1,5 grammli Eppendorf probirkalariga ekilib O‘zR FA Genetika va o‘simliklar eksperimental biologiyasi instituti «Fitopatogen va boshqa mikroorganizmlar kolleksiyasi» genofondiga ro‘yxatga olindi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. Ганнибал Ф.Б., Гасич Е.Л., Орина А.С. Отсенка устойчивости селекционного материала крестосветных и паслёновых культур к альтернариозам // Методическое пособие. Под ред. М.М.Левитина. СПб. ГНУ ВИЗР Росселхозакадемии. 2011. 50 с
2. Гакаева Т.Ю. Фузариоз зерновых культур в северо-Западном. Санкт-Петербург 2011, 94 с
3. Ганибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria* // Санкт-Петербург 2011.
4. Simmons E. G. *Alternaria*. An Identification Manual. CBS Biodiversity series no. 6. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007. 775 pp. 287 figs.
5. Leslie, J.F., and Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. // Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing, 1-388 p.
6. Шеримбетов А.Г *Fusarium* туркуми замбуруғларнинг биоморфологияси ва патогенлик хусусиятлари. Автореф дисс (PhD) 2019 69 б
7. Рузметов.Д.Р Дуккакли экинларнинг микобиотаси, фитопатоген турларининг идентификацияси ва уларнинг культураларини коллекцияда сақлашни оптимизация қилиш. Автореф дисс (PhD) 2023 45б
8. Чурикова В.В Грабович М.Ю. Морфология и культивирование микроорганизмов// Малый практикум по микробиологии. Воронеж 2003.С.18
9. Donev, T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms / T. Donev. Sofia, 100-p
10. Cameron, R. E. Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor valley drill core. R. E. Cameron, P. A. Morelli // Antarctic J. U. S. – 1974. – V. 9. – № 4. P. 113–116. 2001. – 93 r.
11. B. Kirsop, J. Snell Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods / ed. by. – L.: Acad. Press, 1984. – 207 p.

12. Meyer, G. H. Viable microorganisms in a fifty-year-old east preparation in Antarctica// G. H. Meyer, N. V. Morrow, O. Wyss // Nature. – 1962. – V. 196. – № 4854. – P. 598.