

TRICHODERMA ТУРКУМИГА МАНСУБ БЎЛГАН МАҲАЛЛИЙ ИЗОЛЯТЛАРНИНГ МОРФОЛОГИК ВА МОЛЕКУЛЯР ИДЕНТИФИКАЦИЯСИ

Хакимов Альберт Ахмедович,
Тошкент давлат аграр университети доценти,
Утаганов Самад Бобомурод ўғли,
Ўсимликлар карантини ва химояси ИТИ илмий ходими,
Омонлиқов Алишер Уразалиевич,
Тошкент давлат аграр университети катта ўқитувчиси.

Аннотация. Экологик тоза органик қишлоқ хўжалигига ўтиш ўсимлик касалликларига қарши бионазорат агентларини қўллашга бўлган эътиборни янада оширади. *Trichoderma* туркуми турлари энг асосий бионазорат агентларидан бири ҳисобланади. Ушбу тадқиқот потенциал деб ҳисобланган *Trichoderma* туркуми турларининг морфологик ва молекуляр идентификациясига бағишланган. Таҷрибаларда морфологик идентификацияни тасдиқлаш мақсадида, *Trichoderma* изолятларининг молекуляр идентификация қилиш учун икки хил ген ҳудудларидан (ITS-Internal transcribed spacer ва EF-Translation elongation factor 1) фойдаланилган. Тадқиқотлар натижасида жами 4 та турга мансуб *Trichoderma* туркумининг маҳаллий изолятлари морфологик ва молекуляр идентификация қилинган.

Калит сўзлар: *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, бионазорат агенти, BLAST, ITS, TEF.

Аннотация. Неблагоприятные последствия использования синтетических фунгицидов и переход к экологически чистому органическому сельскому хозяйству еще больше усиливают внимание к средствам биоконтроля против болезней растений. Виды *Trichoderma* являются одними из наиболее важных агентов биоконтроля. Настоящее исследование посвящено морфологической и молекулярной идентификации местных потенциальных видов *Trichoderma*. В экспериментах, для подтверждения морфологическую идентификацию, проводили молекулярной идентификации изолятов *Trichoderma* и использовали две разные области гена (ITS-внутренний транскрибируемый спейсер и EF-фактор элонгации трансляции). В результате исследований проведена морфологическая и молекулярная идентификация местных изолятов рода *Trichoderma*, относящихся всего к 4 видам.

Ключевые слова: *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, агент биоконтроля, BLAST, ITS, TEF.

Abstract. The negative effects of the use of synthetic fungicides and the shift to organic agriculture are further increasing the focus on biocontrol agents against plant diseases. *Trichoderma* species are among the most important biocontrol agents. The present study focuses on the morphological and molecular identification of local potential *Trichoderma* species. In the experiments, to confirm the morphological identification, molecular identification of *Trichoderma* isolates was carried out and two different gene regions were used (ITS-internal transcribed spacer and EF-translation elongation factor). As a result of the research, morphological and molecular identification of local isolates of the genus *Trichoderma* was carried out, belonging to only 4 species.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, biocontrol agent, BLAST, ITS, TEF.

Кириш. *Trichoderma* туркуми турлари ўсимликларда касаллик қўзғатувчи кенг доирадаги патогенларга қарши антагонистик хусусиятга эгалиги ва ўсимликлар ўсишини рағбатлантириши маълум ҳамда [11] улар орасида *T. harzianum* энг кўп ўрганилган ва бионазорат учун фойдаланиладиган турлардан бири бўлиб, кейинги ўринларда эса *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* ва *T. pseudokoningii* лар туради [21].

Trichoderma spp. *Fusarium*, *Pythium* ва *Rhizoctonia* spp. каби тупроқ орқали юқадиган патогенларга қарши биологик назорат воситаси сифатида ишлатилади [20, 22]. Улар антибиотик ишлаб чиқариши, патогеннинг хужайра деворини бузувчи ферментлар ажратиши, шунингдек микопаразитизм механизмлари ҳамда озиқа ва ҳудуд учун рақобат кабилар ҳисобига бионазоратни таъминлайди [14, 15]. Бироқ, бу моддаларни ишлаб чиқариш қобилияти ва хусусиятлари турларо ва бир турга мансуб изолятлар ўртасида фарқ қилиши мумкин. Бунда баъзи изолятлар биологик назорат учун муҳим

бўлган метаболитларни ишлаб чиқарса, бошқалари эса фақат ўсимлик ўсишини рағбатлантиради. Бу ҳолат тўғри таксономик идентификацияни талаб қилади [8, 13].

Trichoderma турларининг морфологик идентификацияси колонияларнинг ранги, характеристикаси, ўсиш тезлиги, спора ҳосил қилиши, склероцияларини ҳосил қилиши, мицелий ва спораларининг ранги ҳамда ўлчамлари каби бир қатор кўрсаткичларга асосланади [19]. Турли *Trichoderma* турларида оқишдан то яшил ранггача бўлган ранглар кузатилади. Фойдаланилган озиқа муҳити, инокуляция техникаси ва инкубация шароитлари морфологик хусусиятларга таъсир қилиши мумкин [7, 18, 27]. Морфологик идентификация учун микроскопик кузатувларда конидиофораларнинг шохланиши ва конидиоспораларнинг шакли кабилар кўп қўлланилади. Бироқ турларнинг ўхшаш морфологияси ва ўхшаш культурал хусусиятларга эга бўлиши Триходерма турларини тўғри ва аниқ идентификацияси учун етар бўлмайди [29].

Trichoderma туркуми турларини идентификацияси, фақат

морфологик белгиларга асосланиб амалга оширилса, бугунги кунда бу ҳолат паст аниқликдаги идентификация сифатида баҳоланиши мумкин. Чунки уларнинг бир бирига ўта ўхшашлиги аниқ идентификация қилишни чеклайди. Шунинг учун бу турларни аниқлашда морфологик белгилар билан бирга молекуляр усуллар бирлаштирилиши керак. Молекуляр усул ДНК нинг мақсадли кетма-кетликларини филогенетик таққослаш ҳисобига амалга оширилади. Шу билан бу туркумдаги изолятлар ўртасидаги фарқни аниқлаш мумкин [5, 17].

Бугунги кунда молекуляр техникалар замбуруғларнинг таксономиясида муҳим аҳамиятга эга эканлиги исботланган ва бу усулларни қўллаш туфайли кўпгина турлар қайтадан баҳоланмоқда [10, 26]. Шу сабабли, *Trichoderma* туркуми турларини тўғри, аниқ ва тезкор идентификация қилиш ҳали ҳам қизғин тадқиқот мавзуларидан бири ҳисобланади.

Замбуруғлар молекуляр идентификацияси учун Internal Transcribed Spacer (ITS) асосий ДНК баркодинг [33], Translational elongation factor 1 α (TEF1 α) эса иккиламчи ДНК баркодинг [30] ҳисобланиб, шунингдек RPB1 (РНК полимераза II суббирлиги) [31], IGS (Рибосомал РНК генларининг генлараро спейсерлари) [9] ва COX1 (Цитохром с оксидаза I суббирлиги гени) ҳамда β -Tubulin генларидан [28] фойдаланилади. Рибосомал РНК Ички транскрипцияланган оралиғи (ITS-Internal Transcribed Spacer) *Trichoderma* ни турлар даражасида аниқлаш учун ишлатиладиган энг ишончли ген ҳудудларидан бири ҳисобланади. Ушбу ген ҳудуди ёрдамида яқин турлар орасидаги фарқларни аниқлаш мумкин. Ушбу генга қўшимча равишда Translation Elongation Factor 1 (EF) гени ҳам турларни аниқлашда қўлланилади ва у яқин турлар орасидаги фарқларни намоён қилади [4, 23].

Ушбу тадқиқот маҳаллий антагонистларни скрининг қилиш мақсадида ажратилган *Trichoderma* изолятларини морфологик ва молекуляр идентификациясига бағишланган.

Тадқиқот усуллари ва материаллари. Тупроқ фитопатоген замбуруғлари ва маҳаллий антагонистларнинг соф культурасини ажратиш, уларни қайта киши ва сақлашда оч агар, картошкали декстрозали агар (ҚДА), сусло агар каби озиқа муҳитларидан фойдаланилди. Озиқа муҳитларини таркиби ва уни тайёрлаш кетма-кетлиги, стерилизация қилиш ҳамда сақлаш микология ва фитопатологияда умумқабул қилинган усуллар ёрдамида амалга оширилди [1, 2].

Trichoderma spp. туркуми изолятларини ризосфера тупроқларидан ажратиб олиш учун суюлтириш усулидан (Ваксман методи) фойдаланилди. Ажратилган суспензия модификация қилинган ҚДА (рифампицин 50 мг/мл + хлороталонил 1,25 мг/мл) озиқа муҳитига экилди ва 28°C да инкубацияга қўйилди. Петри ликобчасидаги униб чиққан колониялар сони ҳисоблаб чиқилди ва тупроқдаги замбуруғларнинг умумий сони (кхқб/г) аниқланди. Бошқа замбуруғлардан икки марта субкультурада ёрдамида тозаланди ва кейинги тажрибага совутгичда 4°C ҳароратда сақланди [16].

У.Гамс ва Ж.Биссетт [12] лар тавсифи келтирган аниқлагич асосида *Trichoderma* туркуми турлари морфологик иденти-

фикация қилинди. Микроскопия Optika B-290 ва Микмед-5 биологик микроскопларида олиб борилди.

Морфологик идентификация қилинган *Trichoderma* spp. изолятларидан геном ДНК сини ажратиш Д. Лю, С.Коло, Р.Бэрд, Дж.Педерсон [24] ҳамда Ш.Ш. Эгамбердиев ва бошқалар [3] келтирган усул ёрдамида ажратиб олинди.

Полимераза занжир реакцияси, Полимераза занжир реакцияси (ПЗР) стерил шароитда алоҳида ажратилган хонада, 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) 96 та чуқурчали термоциклерда амалга оширилди. ПЗР Дж.Брукс ва бошқалар [6] ҳамда Ш.Ш.Эгамбердиев ва бошқалар [3] лар тавсифи келтирган усулда амалга оширилди. Ажратилган ДНК амплификацияси учун (рДНК нинг Internal Transcribed Spacer (ITS) - ички транскрипцияланувчи оралиқ) ва Translational elongation factor (TEF1 α) – трансляцион элонгация омили праймерларидан фойдаланилди (1-расм) [25, 32].

Нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш - ДНК сиквенсинг Россия Федерациясининг "Синтол" (Москва шаҳри) илмий-ишлаб чиқариш компаниясида ABI 3500xl (Thermo Fisher) генетик анализаторида (Сэнгер методи бўйича) амалга оширилди.

Олинган ДНК кетма-кетликлари SnapGene Viewer (Dotmatics), UGENE (UniPro, Россия) дастурларида таҳрирлангандан ва текислангандан сўнг, ДНК кетма-кетликлари NCBI (National Center for Biotechnology Information, АҚШ) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) маълумотлар базасининг BLASTn қидирув инструменти ёрдамида солиштирилди, таққосланди ҳамда идентификация қилинган тур бўйича рақам (Genbank Accession Number) олинди.

Филогенетик таҳлил ўтказиш учун текширилаётган намуна тўғриланган (текисланган) ДНК кетма-кетлигидан фойдаланилди. Одатда референс кетма-кетликлар сифатида халқаро илмий жамият томонидан тавсифланган ва тасдиқланган фитопатоген микроорганизм (замбуруғ) ДНК изчиллигидан фойдаланилди. Назорат вариант сифатида текширилаётган тур ёки туркумга мансуб бўлган фитопатоген замбуруғнинг ДНК фрагменти изчиллиги олинди. Кластерли таҳлил, генетик яқинликни аниқлаш ва филогенетик дарахт яратиш MEGA-X дастурида амалга оширилди.

Тадқиқот натижалари ва уларнинг муҳокамаси. Тошкент ва Фарғона вилоятларидан келтирилган ризосфера тупроқлари намуналаридан суюлтириш усули ёрдамида дастлаб жами 18 та *Trichoderma* spp. изолятлари соф культуралари ажратиб олинди. Ажратилган изолятлар орасидан намуналар келтирилган ҳудуд ҳамда изолятларнинг ўсиш тезлигига қараб 6 та *Trichoderma* spp. туркуми турлари ажратиб олинди (2-жадвал, 1-расм). *Trichoderma* spp. турларини ҚДА озиқа муҳитида изоляция қилинди ва моноспора ҳолида ажратиб олиниб, У.Гамс ва Ж.Биссетт [12] лар келтирган турлар тавсифи асосида микроскопия орқали дастлабки морфологик идентификация қилинди.

Тадқиқот учун фойдаланилган №61, 62, 63, 68, 75, 87 *Trichoderma* spp. изолятларини турини аниқлаш мақсадида морфокультурал, макро ва микроморфологик хусусиятлари

1-жадвал.

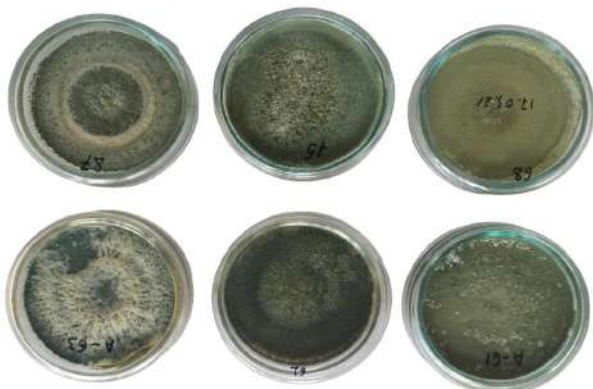
Тef-1 гени ва ITS ҳудудини амплификация қилиш учун фойдаланилган праймерлар.

№	Ген ёки ҳудуд	Праймер номи	Праймер нуклеотидлари изчиллиги
1	TEF-1 α -Translation elongation factor	EF1-F	5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'
		EF2-R	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'
2	ITS (Internal transcribed spacer)	ITS5-F	5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'
		ITS4-R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Келтирилган ризосфера тупроқ намуналаридан ажратилган ва тажрибада фойдаланилган
Trichoderma spp. изолятлари.

№	Изолятлар рақами	Намуна келтирилган ҳудуд	Экилган қишлоқ хўжалиги экини майдони
1.	№61	Фарғона вилояти, Бувайда тумани	Помидор
2.	№62	Тошкент вилояти, Қибрай тумани	Помидор
3.	№63	Тошкент вилояти, Оққўрғон тумани	Ўза
4.	№68	Тошкент вилояти, Оққўрғон тумани	Ўза
5.	№75	Тошкент вилояти, Қибрай тумани	Помидор
6.	№87	Тошкент вилояти, Тошкент тумани	Помидор

ўрганилди. Унга кўра, 61, 62 ва 75 изолятлар морфологик жиҳатдан кескин фарқ қилмади. Стандарт муҳитда колониялар тез ўсди, 3-5-кунларда оммавий споруляция асосида ўхшаш колониялар ҳосил қилди. Дастлаб оқиш мицелийлар, кейинчалик яшил қопламга эга бўлди. Конидиофоралар мутовкали бўлиб, пирамидиал структурани ҳосил қилди. Фиалидлари 3-4 мутовкали, айримлари жуфтлашган, ўлчами 3.0-7.0×2.5-3.5 мкм. Конидиялари шарсимон, ўлчами 2.5-3.5×2.0-3.0 мкм, силлиқ деворли, оч яшил ранг. Макро ва микроморфологик белгиларига асосан бу изолятлар (61, 62 ва 75) *Trichoderma harzianum* Rifai турига мансуб деган хулосага келинди.



1-расм. Ризосфера тупроқларидан ажратилган
Trichoderma spp. туркуми изолятлари.

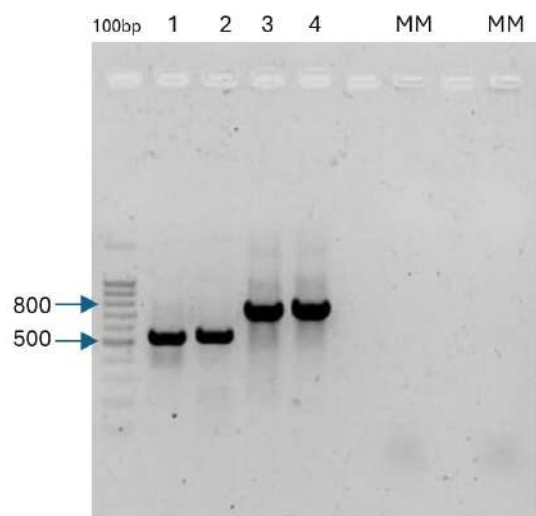
63 ва 87 изолятлар морфологик жиҳатдан бир бирдан фарқ қилмади. Озиқа муҳитда колониялар тез ўсди, изолятлар диаметри 2-4 мкм бўлган рангсиз, силлиқ гифалар ҳосил қилди. Споруляция ўсишнинг 2-4-кунларида ҳавойи мицелийларда бошланди. Конидиофоралари кучсиз шохланган, шохлари кўпинча жуфтлашган, нисбатан эркинроқ, тигиз бўлмаган жойлашувга эга. Фиалидлари кўпинча жуфтли, айрим ҳолларда яқка ёки 3 мутовкали, ўлчами 8-12×2.5-3.0 мкм. Конидиялари шарсимондан эллипссимонгача, оч яшилдан тўқ яшил ранггача, ўлчами 4.0-4.5×3.5-4.0 мкм. Бу иккала изолятларнинг ўзаро кичик бўлган фарқи асосан, 63 изолятнинг конидиялари бироз тухумсимонроқ ва унда майда тукчалар кўпроқлиги билан (87 изолятда асосан шарсимон) намоён бўлди. Культурал, микроморфологик кўрсаткичларига кўра бу изолятлар (63, 87) ўзаро ўхшаш бўлганлиги учун *Trichoderma viride* Pers. турига мансуб деб идентификация қилинди.

68-изолятнинг колониялари юқоридаги изолятларга нисбатан бироз секинроқ ўсди, яъни ўртача тез ўсади. Конидияларни ҳосил бўлиши колоия чегараси яқинида тўпланган

кичик пустикулаларда амалга ошади. Пустикулалар юзаси кўп, эгилувчан, нозик конидиофор учлари туфайли бахмалдай кўринади, ранги яшил. Орқа тарафи рангсиз. Номаълум ҳид. Конидиофорлари устки қисми қисқичли ёки тўлқинсимон, тартибсиз шохланган, юқори қисмигача узунлиги тахминан 100 мкм. Фиалидлари эллипссимон ёки ампуласимон бўлиб, 4.0-5.3×3.0-3.2 мкм, асосан 3-6 та тўдаларда пайдо бўлади. Конидиялари чўзинчоқдан эллипсоидгача, силлиқ юзали, оқиш-яшил рангда, ўлчами 3.0-4.0×2.4-2.7 мкм. Макро ва микроморфологик белгиларига асосан бу изолят *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. турига мансуб.

Ўтказилган морфологик идентификация тадқиқотларига асосан, ўрганилаётган изолятлар *Trichoderma* туркумининг *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma viride* Pers. ва *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. турларига мансуб экан.

Ўтказилган тажрибаларда юқори антагонистик фаолликни намоён қилган *Trichoderma* spp. изолятларини морфологик идентификациясини тасдиқлаш мақсадида уларни молекуляр-генетик идентификацияси амалга оширилди. Муаллифларнинг юқори антагонистик ва антифунгал фаолликка эга маҳаллий антагонистларни скрининги бўйича ўтказган тадқиқотлари "Агрохимё химоя ва ўсимликлар карантини" журналининг ушбу сонидида чоп этилган "Trichoderma туркумига мансуб бўлган маҳаллий антагонистлар скрининги" номли мақоласида келтирилган.



2-расм. Электрофорезда ITS қисми ва TEF гени асосидаги ПЗР амплификацияси маҳсулотлари. (Бу ерда, 100bp - ДНК маркер; 1 ва 2 - ITS (*Trichoderma asperellum*) 3 ва 4-TEF-1a (*Trichoderma harzianum*).

Ажратилган маҳаллий антагонистлар орасидан тупроқ фитопатоген замбуруғларига (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, *Fusarium solani*) нисбатан энг юқори антагонистик ва антифунгал фаоллиги *Trichoderma* spp. нинг 62 ва 63-маҳаллий изолятларида қайд этилган. Шунинг билан бирга олган ҳолда, молекуляр-генетик идентификация айнан шу изолятларда амалга оширилди.

ПЗР амплификациясини амалга оширишда Translation elongation factor (TEF-1a): EF1-F (5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') ва EF2-R (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') ҳамда Internal transcribed spacer (ITS): ITS5-F (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') ва ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') праймерларидан фойдаланилди. ПЗР ўтказилгандан сўнг, ампликонлар этидий бромид билан бўялган агарозали гелда электрофорез ёрдамида детекция қилинди (2-расм).

Агарозали гел электрофорези таҳлилидан кўриш мумкин, 1 ва 2-қаторлардаги ПЗР маҳсулоти тахминан 500 ж.н. ни, 3 ва 4-қаторлардаги ампликон эса 800 ж.н. ни ташкил этди.

Ампликонларда нуклеотидлар изчиллигини аниқлаш мақсадида Россия Федерациясининг "Синтол" (Москва шаҳри) илмий-ишлаб чиқариш компаниясига юборилди. ДНК сиквенсини натижасида ITS қисми бўйича амплификация қилинган ампликон 507 ж.н. дан, TEF-1a бўйича амплификация қилинган ампликон изчиллиги 806 та нуклеотиддан иборат

бўлди. Олинган нуклеотидлар изчиллиги таҳрирлангандан сўнг BLAST инструменти орқали NCBI маълумотлар базасида мавжуд ДНК изчилликларига таққосланди. №62 изолят *Trichoderma harzianum*, №63 изолят эса *Trichoderma asperellum* эканлиги маълум бўлди. Текширилган ДНК фрагменти кетма-кетлиги NCBI Генбанкига киритилди ва кириш рақамлари (PP400390, PP177538) олинди (3-жадвал).

3-жадвалдан кўриниб турибдики, культурал, макро ва микроморфологик кўрсаткичларига кўра идентификация қилиш натижасида *Trichoderma harzianum* тури деб идентификация қилинган *Trichoderma* spp. нинг 62-изоляти TEF-1a гени амплификацияси сиквенсига асосланган молекуляр-генетик идентификацияда ҳам *Trichoderma harzianum* тури сифатида аниқланган. Лекин морфологик идентификация натижасида *Trichoderma viride* тури деб ташхис қўйилган *Trichoderma* spp. нинг 63-изоляти ITS худуди амплификацияси сиквенсига асосланган молекуляр-генетик идентификацияда эса *Trichoderma asperellum* тури сифатида идентификация қилинди. Бу ҳолатни изолятларнинг культурал, макро ва микроморфологик кўрсаткичларидаги ўзаро ўхшашликлар турларни тўғри идентификация қилишга асос бўла олмаслигидан далолат беради. Шунингдек, *Trichoderma asperellum* ва *Trichoderma viride* лар *Trichoderma* туркумининг *Trichoderma* секциясига мансублиги, бир-бирига жуда яқин турлар бўлганлиги сабабли морфологик идентификация қилишда қийинчиликлар туғдиради.

3-жадвал.

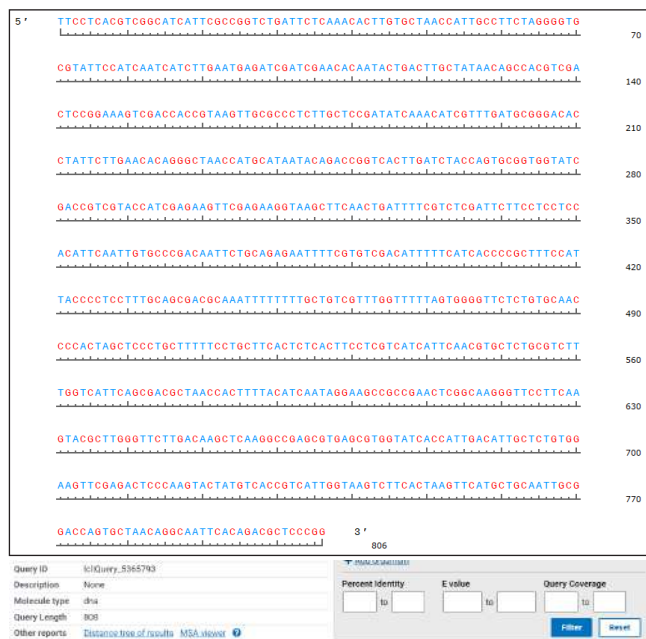
***Trichoderma* spp. изолятлари молекуляр идентификация (сиквенс асосида) ва уларни NCBI базасида рўйхатдан ўтказиш бўйича маълумотлар.**

№	Антагонист изоляти рақами	Морфологик идентификация	Молекуляр-генетик идентификация	Сиквенс қилинган гени	Сиквенс қилинган нуклеотидлар сони	NCBI базасига жойланганлиги бўйича рақами (Genbank Accession Number)
1	№62	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	TEF-1a	806 bp	PP400390
2	№63	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	ITS	507 bp	PP177538

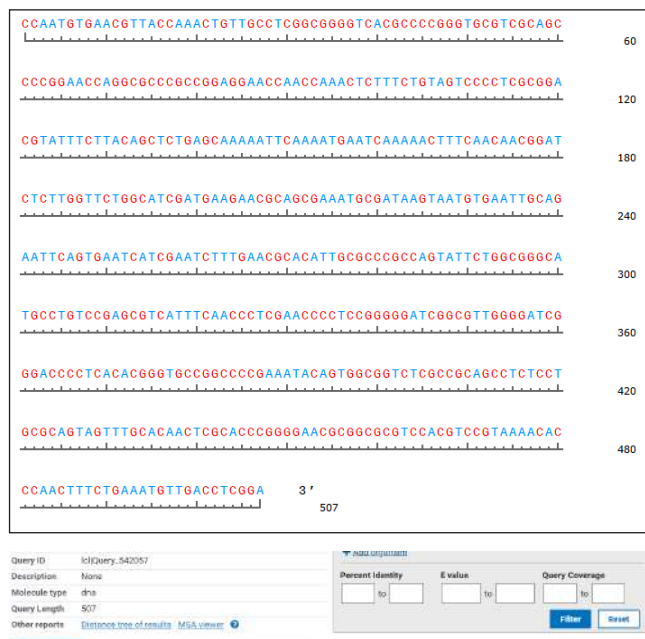
4-жадвал.

NCBI нинг BLAST тизими орқали TEF-1a ва ITS ген ҳудудлари сиквенси бўйича *Trichoderma* spp. изолятларини молекуляр идентификациясида турларнинг ўхшашлик кўрсаткичлари.

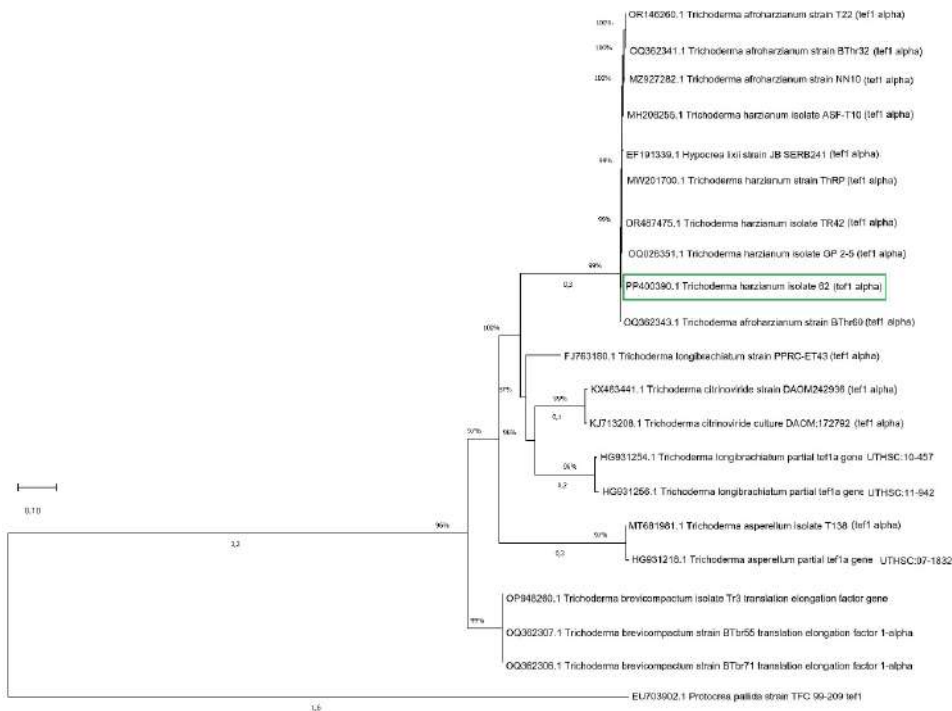
№	Изолят рақами	Замбуруғ турининг номи	NCBI генбанкидаги рақами	Ўхшашлиги, %	Ампликон ўлчами	Тур қайд этилган давлат
1	№62	<i>T. harzianum</i> (Tef-1a)	OQ026351	99	837 bp	Италия
			EF191339	99	883 bp	Австрия
			OQ362343	99	900 bp	Ҳиндистон
			MW201700	100	874 bp	Италия
			MH208255	100	912 bp	Туркия
			OR487475	99	810 bp	Туркия
2	№63	<i>T. asperellum</i> (ITS region)	MK841022	100	609 bp	Ҳиндистон
			OR666414	100	606 bp	Ҳиндистон
			MW015788	100	536 bp	Покистон
			OR091356	100	591 bp	Индонезия
			OR048333	100	568 bp	Вьетнам
			KT582304	100	604 bp	Ҳиндистон
			OQ674375	100	540 bp	Хитой



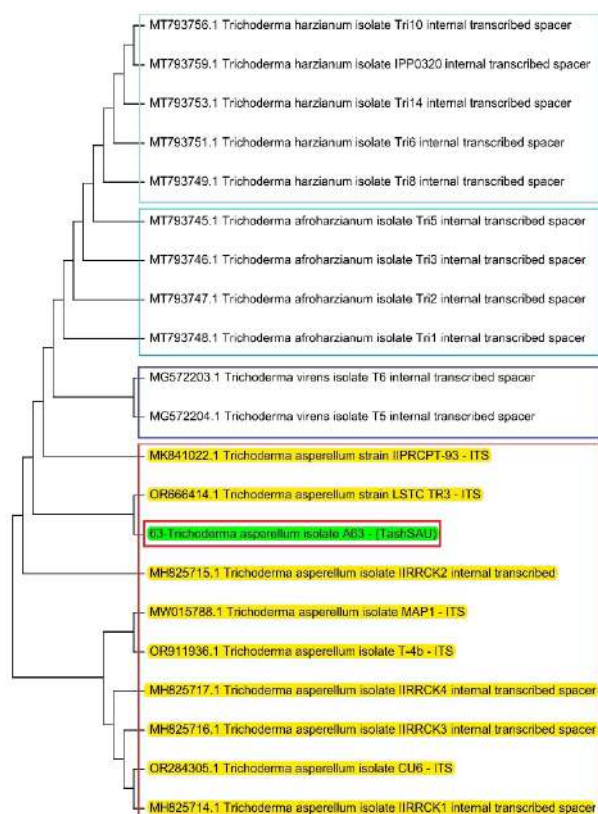
3-расм. Ажратиб олинган *Trichoderma* spp. №62 изолятининг TEF-1 альфа гени бўйича нуклеотидлар изчиллиги ҳамда уни NCBI маълумотлар базасига солиштириш натижалари.



4-расм. Ажратиб олинган *Trichoderma* spp. №63 изолятининг ITS (internal transcribed spacer) бўйича нуклеотидлар изчиллиги ҳамда уни NCBI маълумотлар базасига солиштириш натижалари.



5-расм. Ажратиб олинган *Trichoderma* spp. №62 изолятининг TEF-1 альфа гени бўйича филогенетик дарахтдаги ўрни (яшил рангга бўялган)



6-расм. Ажратиб олинган *Trichoderma* spp. №63 изолятининг ITS (internal transcribed spacer) изчиллиги бўйича филогенетик дарахтдаги ўрни (яшил ранга бўялган).

NCBI нинг BLAST тизими орқали TEF-1a ва ITS ген хуудлари сиквенси бўйича *Trichoderma* spp. изолятларини молекуляр идентификациясида турларнинг ўхшашлик кўрсаткичлари *T. harzianum* (Tef-1a) да NCBI даги OQ026351, EF191339, OQ362343, MW201700, MH208255, OR487475 регистрацион рақамдаги *T. harzianum* сиквенслари билан таққосланганда 99-100% бўлиб, улардаги ампликон ўлчами 810-912 bp ни ташкил қилди. Бу кўрсаткич *T. asperellum* да (ITS region) (MK841022, OR666414, MW015788, OR091356, OR048333, KT582304, OQ674375) 100% бўлиб, ампликон ўлчами 536-609 bp эканлиги аниқланди. Бундан шундай хуло-

сага келиш мумкинки, TEF-1a ген ва ITS хуудди амплификацияси сиквенси *Trichoderma* туркумининг *Trichoderma harzianum* ва *Trichoderma asperellum* турларини аниқ идентификацияси учун етарли ҳисобланади (4-жадвал).

Филогенетик таҳлил *Trichoderma* туркумининг *T. harzianum* (Tef-1a гени бўйича) учун 7 та турнинг (*Trichoderma harzianum*, *T. afroharzianum*, *T. virens*, *T. citrinoviride*, *T. asperellum*) 28 та таксони ва *T. asperellum* да (ITS хуудди бўйича) эса 4 та турнинг (*Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. pyramidale*, *T. citrinoviride*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. viride*) 21 таксони асосида ўтказилди. ДНК изчилликларини таққослаш, *Trichoderma* spp. нинг 62 ва 63 изолятларини *Trichoderma harzianum* ва *Trichoderma asperellum* сифатида аниқлаш имконини берди (3-6-расмлар).

Trichoderma spp. изолятларининг культурал, макро ва микроморфологик кўрсаткичларидаги ўзаро ўхшашликлар турларни тўғри идентификация қилишга асос бўла олмайди. Тупроқ фитопатоген замбуруғларига қарши юқори антагонистик фаолликка эга эга бўлган *Trichoderma* spp. нинг 62-изоляти *Trichoderma harzianum* ва 63-изоляти эса *Trichoderma asperellum* турлари эканлиги маълум бўлди. Шунингдек, TEF-1a ген ва ITS хуудди амплификацияси сиквенси *Trichoderma* туркумининг *Trichoderma harzianum* ва *Trichoderma asperellum* турларини аниқ идентификацияси учун етарли ҳисобланади.

ХУЛОСА:

1. Тошкент ва Фарғона вилоятларидан келтирилган ризосфера тупроқлари намуналаридан жами морфологик идентификация натижасида *Trichoderma* туркумининг 3 та тури: *Trichoderma harzianum* Rifai (№61, №62 ва №75), *Trichoderma viride* Pers. (№63, №87) ва *Trichoderma hamatum* (Bon.) Bain. (№68) лар аниқланди.

2. Тупроқ фитопатогенларига нисбатан энг юқори антагонистик фаолликни намоён қилган, *Trichoderma* spp. нинг №62 изоляти TEF-1a генига асосланган молекуляр-генетик идентификация қилинганда, худди морфологик идентификация каби *Trichoderma harzianum* тури сифатида аниқланди. *Trichoderma* нинг №62 изоляти ITS хуудди сиквенси NCBI маълумотлар базаси n-BLAST инструменти орқали таққосланганда эса морфологик идентификация натижасидагидек *Trichoderma viride* тури деб эмас, балки *Trichoderma asperellum* тури деб аниқланди. Шунинг учун, культурал, макро ва микроморфологик кўрсаткичларидаги ўзаро ўхшашликлар турларни тўғри идентификация қилишга асос бўла олмайди.

АДАБИЁТЛАР:

1. Поликсенова В.Д., Храмов А.К., Пискун С.Г. Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов. Минск: БГУ, – 2004. – 36 с.
2. Чумаков А.Е., Минкевич Н.И., Власов Ю.И., Гаврилова Е.А. Основные методы фитопатологических исследований. – М: Колос. – 1974. – 191 с.
3. Эгамбердиев Ш.Ш., Салахутдинов И.Б., Раджапов Ф.С., Курбонов А.Ё., Абдурахмонов И.Ю. Методические указания по определению патогенов рода *Fusarium*, выявлению наиболее агрессивных форм и методы защиты от них / Ш.Ш.Эгамбердиев. – Центр геномики и биоинформатики АН РУз, МЧЖ «Фан ва таълим полиграф», Ташкент. – 2017. – 38 с.
4. Anees M., Tronsmo A., Edel-Hermann V., Hjeljord L.G., Heraud C., Steinberg C. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani* // Fungal Biology. – 2010. – №114(9). – P. 691-701. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.05.007>
5. Bissett J., Gams W., Jaklitsch W., Samuels G.J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015 // IMA Fungus. – 2015. – №6(2). – P.263-295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>
6. Brooks J.L., Moore A.S., Patchett R.A., Collins M.D., Kroll R.G. Use of the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes for the rapid detection and identification of *Carnobacterium* species from meat // Journal of Applied Bacteriology. – 1992. – №72(4). – P.294-301. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01838.x>
7. Chaverri P., Samuels G.J. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaeae): species with green ascospores. Netherlands, N.L.: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS). – 2003. – P.1-35.

8. Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., Cortes-Penagos C., Lopez-Bucio J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2009. – №149(3). – P. 1579-1592. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>
9. Diaz M.R., Fell J.W. Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia* // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2000. – №77(1). – P.7–12. <https://doi.org/10.1023/A:1002048008295>
10. Dou K., Lu Z., Wu Q. MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2020. – №86(18). e01532-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01532-20>
11. Filizola P.R.B., Luna M.A.C., de Souza A.F. et al. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – №18. 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>
12. Gams W., Bissett J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E., Eds., *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis Ltd., London. –P.3-31. – 2002. <https://doi.org/10.1201/9781482295320>
13. Gwa V.I., Nwankiti A.O. In vitro antagonistic potential of *Trichoderma harzianum* for biological control of *Fusarium moniliforme* isolated from *Dioscorea rotundata* tubers // *Virology & Mycology*. – 2017. – №6(2). – P.2-8.
14. Harman G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 // *Plant Disease*. – 2000. – №84. – P.377-393. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>
15. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. *Trichoderma* species -opportunistic, avirulent plant symbionts // *Nature Reviews Microbiology*. –2004. –№2. – P.43-56. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
16. Howell C.R. Selective isolation from soil and separation in vitro of P and Q strains of *Trichoderma virens* with differential media // *Mycologia*. – 1999. – №91 (6). – P.930-934. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061103>
17. Hoyos-Carvajal L., Orduz S., Bissett J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma* // *Biological Control*. – 2009. – №5. – P. 409-416. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018>
18. Jaklitsch W.M. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species // *Studies in Mycology*. – 2009. – №63. – P. 1-91. <https://doi.org/10.3114/sim.2009.63.01>
19. John N.S., Anjanadevi I.P., Nath V.S., et al. Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus*—A polyphasic approach // *Biological Control*. – 2015. – №90. – P.164-172. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.07.001>
20. Kariuki G.M., Kinyua Z.M., Amata R.L., Otupa M.J., Chege S.W. Efficacy TRIAL of trianum-p as a biopesticide for the management of soil-borne diseases of French beans in Kenya // *Kenya Agricultural Research Institute*. – 2010. – №1105. – P. 129–130.
21. Keswani C., Mishra S., Sarma B.K., Singh S.P., Singh S.P., Singh H.B. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – №98. – P.533–544. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5344-5>
22. Khakimov A.A., Utaganov S.B., Omonlikov A.U. Current status and prospects of the use of biofungicides against plant diseases // *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – №13(03). – P.119-126. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.13.3.0403>
23. Kullnig-Gradinger C.M., Szakacs G., Kubicek C.P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach // *Mycological Research*. –2002. – №106(7). – P.757-767.
24. Liu D., Coloe S., Baird R., Pederson J. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – №38(1). –P.471. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.471-471.2000>
25. O'Donnell K., Kistler H.C., Cigelnik E., Ploetz R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 1998. – №3(95(5)). – P. 2044-2049. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044>
26. Saravanakumar K., Yu C., Dou K., Wang M., Li Y., Chen J. Biodiversity of *Trichoderma* community in the tidal flats and wetland of southeastern China // *PLoS One*. – 2016. – 11(12): e0168020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168020>
27. Savitha M.J., Sriram S. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates with biocontrol potential against *Phytophthora* blight in red pepper // *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. – 2015. – №21(2). – P. 194-202.
28. Seifert K.A., Samson R.A., Dewaard J.R., Houbraken J., Levesque C.A., Moncalvo J.M. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2007. – №104(10). –P. 3901-3906. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611691104>
29. Siddiquee S. Morphology-based characterization of *Trichoderma* species // In: *Practical handbook of the biology and molecular diversity of Trichoderma species from tropical regions*. Fungal biology. Switzerland, C.H.: Springer International Publishing; – 2017. –P. 41-73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64946-7_4
30. Stielow J.B., Levesque C.A., Seifert K.A., Meyer W., Iriny L., Smits D. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes // *Persoonia*. – 2015. –№35. –P.242-263. <https://doi.org/10.3767/003158515X689135>
31. Strathern J., Malagon F., Irvin J., Gotte D., Shafer B., Kireeva M. The fidelity of transcription: RPB1 (RPO21) mutations that increase transcriptional slippage in *S. cerevisiae* // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2013. –№288(4). –P. 2689-2699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.429506>
32. White T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // In: *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. –1990. – P. 315-322.
33. Xu J. Fungal DNA barcoding // *Genome*. – 2016. –№59(11). –P. 913-932. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>

TUNLAMLAR MIQDORINI BOSHQARISHDA TRIXOGRAMMA (*TRICHOGRAMMA CHILONIS* ISHII) PARAZITINING BIOLOGIK SAMARADORLIGI

Qilichova Munisa Nuriddinovna, yetakchi mutaxassis,
Abdumuminova Muqaddam Musurmonovna, bosh mutaxassis,
Sharipov Shavkat Xujamurotovich, bo'lim boshlig'i,
Tangrieva Shaxnoza Allaberdievna, yetakchi mutaxassis,
Utanbaeva Muxabbat Aripovna, laborant,
Biosifat respublika markazi.

Annotatsiya. Ushbu maqolada ildiz kemiruvchi kuzgi va undov tunlamlari tuxumlariga qarshi trixogramma (*Trichogramma chilonis* Ishii) entomofagi qo'llanilgan. Entomofag chiqarilgandan keyin 7,9,11 kunlari kuzatuvlar olib borilgan. Olib borilgan tadqiqot natijalari asosida ishlab chiqarishga tavsiyalar keltirilgan.

Kalit so'zlar: Kuzgi va undov tunlamlar, parazit, entomofag, trixogramma, g'o'za, sabzavot, kartoshka.

Аннотация. В этой статье приведены данные применения энтомофага трихограмма (*Trichogramma chilonis* Ishii) против подгрызающих озимой и восклицательной совки. Наблюдения проводились на 7,9,11 день после применения энтомофага. По результатам проведенных исследований даны рекомендации к производству.

Ключевые слова: Озимая и восклицательная совка, паразит, энтомофаг, трихограмма, хлопчатник, овощи, картофель.

Abstract. This article presents data on the use of the entomophage trichogramma (*Trichogramma chilonis* Ishii) against gnawing *Agrotis segetum* Siff and *Agrotis exclamationsis*. The observations were carried out on 7,9,11 days after the application of the entomophage. Based on the results of the conducted research, recommendations for production are given.

Keywords: *Agrotis segetum* and *Agrotis exclamationsis*, parasite, entomophagus, trichogramma, cotton, vegetables, potatoes.

Kirish. Qishloq xo'jalik ekinlarida fitofaglarlarining entomofag turlari, ularning o'zaro rivojlanishida turli ekologik va antropogen ta'sirlarning ahamiyati, qishloq xo'jaligida fitofaglar miqdorini boshqarishda samarador, ekologik toza usullardan foydalanish asosida ekologik toza oziqa mahsulotlarini yetishtirish bo'yicha tadqiqotlarni olib borish dolzarb hisoblanadi [1].

Tunlamlarning ildiz kemiruvchi turlari ham ayrim yillari katta zarar keltirib, g'o'za va sabzavot ekinlarida yaqqol ko'zga tashlanadi. Ularning qurtlik bosqichi tuproqda o'tganligi uchun unga qarshi kurash choralari mushkul hisoblanadi. Ushbu keng tarqalgan turlardan biri kuzgi tunlam (*Agrotis segetum* Schiff) bo'lib, yosh nihollarning asosiy zararkunandalaridan biri hisoblanib o'suv davrida katta talofat keltiradi. Kuzgi tunlam mamlakatimizda keng tarqalgan 150 dan ortiq ekin turlarida zarar keltiradi.

Undov tunlami (*Agrotis exclamationsis* L.) keng tarqalgan tur bo'lib, tunlam qurtlari 75 tur o'simliklarni, jumladan boshqoqli don ekinlari, tamaki, kanop, makkajo'xori, g'o'za, kungaboqar, qand lavlagi, sabzavot va kartoshka ekinlarini zararlaydi. Oldingi qanotlari asosida undov belgisini eslatuvchi dog' yaxshi bilinib turadi, uning nomi ham xuddi shu belgiga qarab qo'yilgan. Ushbu zararkunanda kuzgi tunlamdan farq qilib, yiliga ikki marta bo'g'in beradi. Morfologik alomatlar va hayot kechirishi kuzgi tunlamnikiga juda o'xshaydi [5].

Kuzgi va undov tunlamlarining tabiatda bir nechta kushandalari bor bo'lib, tuxumlarini trixogramma, oltinko'z va turli qo'ng'izlar, yetuk yoshdagi qurtlarida qora banxus, brakon, taxin pashshasi kabilar parazitlik qiladi. Ushbu parazitlardan zararkunanda sonini kamaytirishda tuxumxo'r trixogrammalarining ahamiyati katta.

Tadqiqot uslublari. Tadqiqotlarimizni davomida kuzgi va undov tunlamlarini chuqur o'rganish bilan birga, ularning tuxumlariga qarshi trixogrammaning *Trichogramma chilonis* Ishii turini qo'llash va biologik samaradorligini aniqlash maqsadida

Toshkent viloyati Yuqori Chirchiq tumani "Faradis xirmoni" fermer xo'jaligining 7,5 gektarlik g'o'za ekilgan dalasida olib bordik. Unga ko'ra, 2023 yil 15 aprelda g'o'zani "Sulton" navi ekilgan. Kuzgi va undov tunlamlarining uchish va tuxum qo'yish muddatlarini aniqlashda feromon tutqichlardan foydalanildi. Zararkunandaning tuxumlariga qarshi trixogramma entomofagining *Trichogramma chilonis* Ishii turini har hil miqdorda qo'llash orqali tajribalar olib borildi. Olingan natijalar esa umum qabul qilingan uslublar asosida tahlil qilingan [3, 4].

Tadqiqot natijalari. Kuzgi va undov tunlamlari kapalaklarini uchishi va tuxum qo'yish vaqtini aniqlash maqsadida, g'o'za nihonlari unib, chiqib boshlagandan, tajriba maydoniga 1,0 gektar maydonga 2 dona hisobida feromon tutqichlar qo'yildi. Tunlam kapalaklarining uchish dinamikasini feromonli tutqichlar orqali kapalaklar miqdori aniqlangandan so'ng tadqiqotlar o'tkazildi.

Unga ko'ra kuzgi va undov tunlamlari kapalaklari ucha boshlagandan laboratoriyada ko'paytirilgan trixogrammaning *Trichogramma chilonis* turi 3-5 kun oralatib 3 marta ya'ni tuproq osti tunlamlarining har bir avlodiga nisbatan bir martadan trixokartlarda 10x10 sxemada tarqatildi. Trixogramma tarqatilgan va kuzatuv davridagi havo harorati va havo nisbiy namligi ham aniqlanib borildi. Tajribalarimiz davomida havo harorati o'rtacha +30±1°C, havoning nisbiy namligi 56±5% bo'lganligi kuzatildi.

Trixogramma turlarini samarali sarf me'yori (tuxum:trixogramma) zararkunandaga 1:10 nisbatda qo'llanildi. Tajriba kuzatishlari natijasida trixogrammaning zararkunanda tuxumlarini o'rtacha zararlanishi aniqlandi. Bunda, kuzgi va undov tunlamlari tuxumlariga qarshi *Trichogramma chilonis* ning samaradorligi ikkinchi avlodiga nisbatan tuxumlarning o'rtacha zararlanishi 7-kun 46,5%, 9-kun 56,7% va 11 – kunga borib 50,6% ni tashkil etdi (1-jadval).

Uchinchi avlodiga qarshi qo'llanilganda tuxumlarning