

ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА МАХСУС
ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ

С.С.Муродова Р.М.Артикова

ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИК БИОТЕХНОЛОГИЯСИ



ТОШКЕНТ 2009

Created with

 **nitro** PDF[®] professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Мазкур дарслик Қишлоқ хўжалик олий ўқув юр்தларининиг қуйидаги йўналишлари ва мутахассисликлари талабалари учун мўлжалланган:

- 5620100 – Агрокимё ва агротупроқшунослик
- 5620200 – Агрономия (дехқончилик маҳсулотлари бўйича)
- 5620300 – Ўсимликлар ҳимояси ва карантини
- 5620400 - +ишлоқ хўжалиги экинлари уруғчилиги ва селекцияси
- 5620500 - +ишлоқ хўжалик маҳсулотларини етиштириш, сақлаш ва уларни дастлабки қайта ишлаш технологияси
- 5620800 – Ўрмончилик
- 5140900 – Касб таълими (5620200 – Агрономия (дехқончилик маҳсулотлари).
- 5A522904 – Мева сабзавотчиликда биотехнология
- 5A620224 – Ўрмон доривор ўсимликлари.
- 5A620803 – Аҳоли яшаш жойларини кўкаламзорлаштириш ва ландшафтини қуриш
- 5A620804 – Ўрмон мелиорацияси
- 5A620301 – Ўсимликларни касалликлар ва зараркунандалардан асраш
- 5A620201–Пахтачилик
- 5A620202–Ўсимликшунослик
- 5A620206–Дончилик
- 5A620304–Энтомология
- 5A620505–Қишлоқ хўжалик маҳсулотларини стандартлаш метеорология ва сертификатлаш
- 5A620203– Умумий дехқончилик
- 5A620401– Пахта уруғчилиги ва селекцияси
- 5A620402 –Дала экинлари уруғчилиги ва селекцияси
- 5A620204 – Агрономия (далачилик)
- 5A620216 –Сабзавотчилик
- 5A620217 –Мевачилик
- 5A620218 –Химояланган ерда сабзавотчилик
- 5A620219 –Узумчилик
- 5A620501 –Дех=ончилик маҳсулотларини етиштириш, са=лаш ва дастлабки =айта ишлаш технологияси
- 5A620502 –Мева-сабзавот маҳсулотларини етиштириш, са=лаш ва уларни дастлабки =айта ишлаш
- 5A620503-Пахта хом-ошёсини етиштириш, са=лаш ва уларни дастлабки =айта ишлаш технологияси
- 5A620902- Ипак қурти уруғчилиги
- 5A620903– Ипак қурти биологияси ва агротехникаси

(Аннотация)

Қишлоқ хўжалик биотехнологияси

Ушбу дарслик қишлоқ хўжалик олий ўқув юртларининг ўсимликлар ҳимояси ва карантини, қишлоқ хўжалиги экинлари уруғчилиги ва селекцияси, агрокимё ва агротупроқшунослик, агрономия (деҳқончилик маҳсулотлари бўйича), қишлоқ хўжалик маҳсулотларини етиштириш, сақлаш ва уларни дастлабки қайта ишлаш технологияси, касб таълими, ўрмончилик ва мева-сабзавотчилик бакалавр йўналишлари ва магистратура мутахассисликлари талабалари учун мўлжалланган.

Дарслик Ўзбекистон республикаси Олий ва ўрта махсус таълим вазирлигининг қишлоқ хўжалик олий ўқув юртлари учун Давлат таълим стандартлари ва ўқув дастурларига мос ёзилган. Мазкур дарслик Давлат тилида биринчи бор яратилган бўлиб, талабаларга ушбу фандан назарий билимларини ва маъруза дарсларини мустақил ўзлаштиришига тўлиқ имконият яратиб беради.

Дарсликда ген муҳандислиги асослари, ўсимликларнинг генетик муҳандислиги, ўсимликшунослик ва селекцияда хужайра ҳамда тўқималар биотехнологияси, биотехнология ва ўсимликшуносликда фитогормонлар ҳамда ўсимликларни ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи сунъий регуляторла, тупроқ унумдорлигини оширишда биотехнология ўсимликларни ҳимоя қилишда биотехнология, аграр ишлаб чиқаришда биотехнология ва биомуҳандислик ютуқларидан фойдаланиш каби масалалар ёритилган. Бундан ташқари олинган билимларни мустаҳкамлаш учун назорат саволлари ва баъзи таянч иборалар изоҳи келтирилади.

Сельскохозяйственная биотехнология

Первое издание учебника «Сельскохозяйственная биотехнология» отражает современное состояние и динамику развития биотехнологии и ее фундаментального ядра – биоинженерии как важнейшего приоритета науки и высоких технологий XXI века.

Данная книга рекомендована в качестве учебника для студентов бакалавриата и магистратуры, она может быть использована преподавателями.

Учебник написан в соответствии стандартом и программой, принятых для учебных заведений Республики сельскохозяйственного направления.

В нем приведены обобщенные результаты фундаментальных и прикладных исследований в области генетической инженерии, трансгеноза растений, клеточных, тканевых и органогенных технологий, генетических основ повышения почвенного плодородия, основных направлений в защите растений.

Показаны возможности и реальные масштабы применения биотехнологии и биоинженерии в селекции и растениеводстве, животноводстве, ветеринарной медицине, биоконверсии и органических отходов, биоэнергетике, перерабатывающей промышленности и других областях сельского хозяйства.

Agricultural biotechnology

This textbook was written for students of bachelor direction and masters degree in Higher educational Institutions specializing in plants protection and quarantine, agricultural plants seed breeding and selection, agro-chemistry and agro-ecological soil science, agronomy (agricultural production), technology of growing of agricultural production, protection, protection and recycling, professional preparing, forest breeding and fruit vegetable production.

This textbook was composed in accordance to standards of Ministry of Higher and Secondary education for Agricultural Institutions. Being written in the state language it gives opportunities for students to not only gain theoretical knowledge in this subject but also to confirm them practically.

The basic knowledge in genetic engineering, plants genetic engineering, plants breeding and using cells and tissues biotechnology in selection, biotechnology and using phyto hormones and artificial regulators of plants growth and development, using biotechnology in increasing soil fertility, biotechnology in plants protection, biotechnology in agricultural production and using achievements of biotechnology is given in this text book. Some testing questions and examples are given in order to push students' knowledge of this subject.

Тақризчилар: А.Ш.Шералиев - Тошкент Давлат аграр университети
Қишлоқ хўжалик биотехнологияси ва фитопатологияси
кафедраси профессори, биология фанлари доктори.
А.С. Имомходжаева - ЎзРФА Ботаника ИИЧМ
“Ўсимликлар молекуляр биологияси” лабораторияси
катта илмий ходими, биология фанлари номзоди.
М.Рахимов – ЎзМУ профессори, биология фанлари
доктори
Ў.Ахмедов – Тошкент Фармацевтика институти
профессори, биология фанлари доктори.

Муаллифлар ҳақида маълумот

Артикова Раъно Мамурхановна 1961 йилда туғилган. 1994 йилда ЎзРФА Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институтида 03.00.26 – молекуляр биология ихтисослиги бўйича биология фанлари номзоди илмий даражасини олиш учун “Ўза митохондрияси плазмидасимон ДНКсини ажратиш ва унинг бирламчи структурасини ўрганиш” мавзусида номзодлик диссертациясини ҳимоя қилган.

2000-йилдан буён Қишлоқ хўжалик биотехнологияси ва фитопатологияси кафедрасида катта ўқитувчи ва доцент лавозимларида ишлаб келмоқда, доцент.

Қишлоқ хўжалик биотехнологиясига оид бир неча ўқув дастурлари муаллифи. 3та услубий қўлланма ва 25дан ортиқ илмий мақолалар чоп этган.

Муродова Сайёра Собировна 1974 йилда туғилган. 2000 йилда ЎзРФА Микробиология институтида 03.00.23 - “биотехнология” ихтисослиги бўйича биология фанлари номзоди илмий даражасини олиш учун «Мош ўсимлиги тугунак бактерияларига *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* энтомопатоген бактерияси тох-генларини киритиш» мавзусидаги номзодлик диссертациясини ҳимоя қилган.

2002-йилдан буён Қишлоқ хўжалик биотехнологияси ва фитопатологияси кафедрасида катта ўқитувчи ва доцент лавозимларида ишлаб келмоқда, доцент

Қишлоқ хўжалик биотехнологиясига оид бир неча ўқув дастурлари муаллифи. Қишлоқ хўжалик биотехнологияси ва фитопатологияси кафедраси доценти. 2 та ўқув - услубий 30 дан ортиқ илмий мақолалари чоп этилган.

КИРИШ

Қадим даврданоқ биотехнология, ундаги жараёнлар кишиларнинг кундалик эҳтиёжларини қондириш мақсадида фойдаланиб келинган бўлсада, амалий фан сифатида XX асрда шаклланди. У ҳозирги вақтда инсониятнинг энг асосий долзарб муаммоларидан бири ҳисобланмиш – озиқ-овқат, энергетик ресурс, атроф-муҳит ифлосланишининг олдини олиш билан боғлиқ муаммолари ечимини топиш зарурияти туфайли юзага келди.

Биотехнологик жараёнлар микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон ҳужайралари, сунъий озиқа муҳитларида ўстирилаётган ҳужайра, тўқима ва органларни биосинтетик потенциалидан амалий фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёнинг кўплаб мамлакатларида биотехнологиянинг тараққиётига асосий эътибор қаратилмоқда, чунки бошқа технологияларга қараганда, биотехнологик жараёнлар энергия сарфининг камлиги, деярли чиқиндисизлиги, экологик софлиги жиҳатидан бир қатор афзалликларга эга. Бундан ташқари бу технологиялар муайян асбоб-ускуна, техник қурилма ва препаратлардан фойдаланишни талаб қилади, шунингдек, иқлим шароитларига қарамасдан кичик ҳажмни эгаллайдиган майдонларда ҳам тадқиқотлар ўтказиш мумкинлиги билан ажралиб туради.

Бундай афзалликлар ҳужайралар култураси, ўсимлик тўқима ва органларига ҳам тегишлидир.

Замонавий биотехнология фан сифатида ўтган асрнинг қирқинчи йиллари бошида шаклланиб, 1953 йилда Джеймс Уотсон ва Френсис Криклар томонидан ДНК қўш спиралининг фазовий тузилиши тўғрисидаги кашфиётдан сўнг жадал ривож топди. Бу соҳада янги стратегик йўналиш - ген муҳандислиги 1972 йилда, яъни, Пол Бэрг лабораториясида биринчи марта ДНК нинг рекомбинат молекуласи синтезлангач пайдо бўлди. Бу эса биотехнологияни унинг асосий бўғини биомуҳандислик (ядро биологияси) билан боғлаб замонавий фанда асосий ўрин эгаллади.

Юксак кашфиётлар оралиғидаги тадқиқотлар машҳур олимлар Г.Бойер, С.Коэн, Д.Морр, А.Баев, А.Белозерский, О.Эйвери, Г.Гамов, К.Коран, Ф.Жакоб, Ж.Моно, Ж.Бэквист, Ю.Овчинников, А.Спирин, Р.Петров ва бошқалар томонидан генлар ва ферментларнинг идентификацияси, ўсимлик, микроб, ҳайвон ҳужайраларидан ДНК молекуласини ажратиш, генетик коднинг ўқилиши, прокариот ва эукариотларда генлар экспрессия механизмлари, оксил биосинтезини кашф этилиши билан боғлиқ ишлар билан тўлдирилди.

Ўтган асрнинг 50- йилларига келиб биотехнологияда яна бир муҳим янги йўналиш – ҳужайра муҳандислиги вужудга келди. Унинг асосчилари П.Ф.Уайт (АҚШ) ва Д.Готре (Франция)лардир. Бу йўналишнинг давомчилари сифатида А.Курсанов, Р.Г.Бутенколар томонидан яратилган

мактабга жуда кўплаб ёш мутахассисларни жалб этиш орқали амалга оширилган соҳага оид тадқиқотларни кўрсатиш мумкин.

Ген ва ҳужайра муҳандислиги замонавий биотехнологиянинг асосий йўналишларини белгилаб бердики, ундаги усуллар ўтган асрнинг 80-йилларида кенг ривожланиб фан ва ишлаб чиқаришнинг кўплаб соҳаларида кенг қўлланила бошланди.

Биотехнология фан сифатида замон ва моҳиятига кўра, замонавий ва анъанавий (классик) биотехнологияга бўлинади. Замонавий биотехнология (биомуҳандислик) ген ва ҳужайра муҳандислиги усуллари орқали генетик трансформация (модификация) қилинган ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлардан ишлаб чиқаришни интенсивлаштириш, турли хил мақсадларга мўлжалланган маҳсулотларнинг янги турларини олиш технологияларини яратиш ва улардан фойдаланиш тўғрисидаги фандир.

Анъанавий биотехнологияни, оддий, нотрансген ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлардан (табiiй ва селекцион йўли билан олинган) фойдаланиб табiiй ва сунъий шароитларда қишлоқ хўжалик ва бошқа хил маҳсулотларни ишлаб чиқариш, сақлаш ва қайта ишлаш, уларни ташиш усуллари ва технологиялари ҳақидаги фан деб ҳам қараш мумкин.

Янги, замонавий биотехнологиянинг йирик ютуғи генетик трансформация, ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмларнинг реципиент ҳужайраларига бегона (табiiй ва сунъий яратилган) донор генларни киритиб, янги ёки кучайтирилган белги ва хусусиятларга эга трансген организмлар олишдир. Мазкур йўналиш ўз мақсад ва имкониятларига кўра, келажакдаги стратегик йўналишлардан бири бўлиб ҳисобланади. Бу ташқи муҳитнинг ноқулай стресс омилларига чидамлилиги юқори маҳсулдор ва сифатли ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмларни яратиш, табиат ва ишлаб чиқаришнинг барча соҳаларидаги экологик вазиятни соғломлаштириш борасидаги мутлақо янги муаммоларни ҳал этиш имконини беради.

Бундай мақсадларга эришиш учун генетик трансформация самарадорлигини оширишда баъзи қийинчиликлар ва энг аввало, генларни идентификация қилиш ва клонлаш, уларнинг банкини яратиш, биологик объектларнинг белги ва хусусиятларини полиген детерминацияси механизмларини мукаммал ўрганиш, ишончли вектор тизимларини яратиш ва генлар экспрессиясининг юқори даражада чидамлилигини таъминлаш кабиларни бартараф этиш лозим. Бугунги кунда дунёнинг кўплаб мамлакатлари лабораторияларида тижорат мақсадларида қўлланиладиган мутлақо янги хилдаги трансген ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар яратилган.

Ҳужайра биотехнологияси ҳужайраларнинг нодир хусусияти уларнинг тотипотентлиги, яхлит ўсимлик организмга қадар регенерация бўла олиш хусусияти, шунингдек, улар томонидан иккиламчи синтез

бирикмаларининг ишлаб чиқарилиши, селекцияда: чидамлилик, ҳосилдорлик ва сифат; қимматли генотипларнинг кўпайиши; ўсимликларни вирус ва вироидларидан соғломлаштириш; тиббиёт ва озиқа мақсадларида қўлланиладиган биологик фаол препаратларни олишда фойдаланиладиган қишлоқ хўжалик ўсимликларининг янги шакл ва линияларини олиш имконини берди. Бу соҳада кўплаб қийинчиликлар юзага келди, уларнинг асосийлари хужайралар регенерацияси частотасининг камлиги ва организмнинг нормал онтогенезининг бузилиши, самокломал вариацияларнинг тор спектри организмларнинг муҳим қимматли хўжалик аҳамиятига молик белгилари ва моддаларнинг иккиламчи метаболизмини назорат қилувчи генлар экспрессиясининг сустлиги кабилар ҳисобланади.

Дунё фанида биотехнология борасидаги кучли кўзғалиш ўтган асрнинг 80 – йилларида рўй берди, яъни, янги услубий ёндошишлар уларда фан ва амалиётда самарали фойдаланишга ўтиш имконини берди ва бундан катта иқтисодий самара олиш имконияти туғилди. Илмий асосланган тахминларга кўра, ХХІ асрнинг бошлардаёқ дунё бозорига келиб тушадиган маҳсулотлар умумий ҳажмининг қарийб 20 % ини биотехнологик маҳсулотлар ташкил этади.

Мамлакатимизда биотехнологияни ўрганиш ва унинг ютуқларидан илмий – тадқиқот ишларида фойдаланиш, соҳада олиб борилаётган изланишларни шакллантириш 70-80-йиллардан бошлаб юборилган.

Бугунги кунга келиб қишлоқ хўжалик биотехнологияси соҳасидаги кўплаб ишлар, тадқиқотлар бир қатор олимлар, мутахассисларнинг изланишлари билан изчил давом этмоқда.

Бу борада ЎЗР ФА Микробиология институти Давлат илмий-техникавий ва фундаментал тадқиқотлар дастури доирасида минтақамизда биотехнология, айниқса, микроб биотехнологиясида микроорганизмлар тарқалиши қонуниятларини ўрганиш, улар орасидан халқ хўжалиги учун ўта зарур бўлган турлари ва туркумларини ажратиб олиш орқали микроорганизмлар тўпламини яратиш, энг фаол турлари янги биотехнологиялар яратиш, микроблар синтез қиладиган физиологик фаол моддаларни (антибиотиклар, витаминлар, оксил моддалар, ферментлар, фитогормонлар ва ҳ.к.) соф ҳолда ажратиб олиш, уларнинг физик-кимёвий хусусиятларини ўрганиш бўйича чуқур илмий изланишлар олиб борилмоқда.

Жумладан:

- пахатачилик ва тупроқ биотехнологияси;
- озиқа моддалари биотехнологияси;
- ферментлар ва бошқа физиологик фаол моддалар биотехнологияси;

- ошқозон – ичак фаолиятини яхшилашга ҳамда касалликларни олдини олиш ва даволашга мўлжалланган биотехнологиялар;
- ноёб, рангли ва нодир металллар биотехнологияси;
- атроф- муҳитни микроорганизмлар ёрдамида тозалаш ва унинг ифлосланишини олдини олишга мўлжалланган биотехнологиялар эътиборга лойиқдир.

Пахтачилик ва тупроқшунослик биотехнологияси йўналиши бўйича ҳам бир қатор янги, экологик, импорт ўрнини боса оладиган, экспортга мўлжалланган, рақобатбардош биологик ўғитлар “Ер малҳами”, “Биоўғит”, “ФМКГ”, “Микробли ўғит” каби биопрепаратлар ишлаб чиқариш технологиялари яратилди ва улар мамлакатимизда кенг синовдан ўтказилиб, қатор ижобий натижаларга эришилди.

Бундан ташқари ҳар хил ўсимликларни касаллантирувчи (фитопатоген) микробларга қарши, жумладан ўсимликлар иммун тизимини оширувчи ҳамда ғўзани вилт, илдиз чириш ва гоммоз касалликларидан ҳимоя қилувчи бир қатор биопрепаратлар ишлаб чиқариш ҳам йўлга қўйилган. Биопрепаратлар Тошкент, Андижон, Наманган, Қашқадарё ва Сурхондарё вилоятлари хўжаликларида синаб кўрилган ва амалиётга кенгроқ тадбиқ қилиш тавсия этилган.

Ўсимликларни зараркунанда ҳашаротлардан асраш бўйича, колорадо қўнғизи, барг ўровчи ҳашаротлар, америка оқ капалаги, ҳар хил куялар, ўтлоқ парвонаси каби ўндан ортиқ ҳашаротларга қарши биоинсектицидлар ишлаб чиқарилган ва синовдан ўтказилган.

Маълумки, мамлакатимизда чорвачиликни ривожлантириш, чорва маҳсулотлари сифатини ошириш долзарб масалалардан биридир. Шу мақсадда ҳам сезиларли ишлар амалга оширилмоқда. Масалан, ғўзапоя, сомон, хазон ва бошқа ўсимлик қолдиқлари ва ишлаб-чиқариш чиқиндиларини микробиологик қайта ишлаш ва уларнинг озиқа бирлигини ошириш туфайли чорвачилик учун оқсилга бой, сервитамин маҳсулотлар олиш биотехнологиялари яратилган бўлиб, бу асосида Қашқадарё вилояти Яккабоғ туманида ва Тошкент вилояти Қибрай туманида махсус цехлар ташкил қилинган.

Институт тажриба ишлаб-чиқариш лабораториясида яратилган озиқ-овқат, ёғ – мой, фармацевтика саноат чиқиндилари асосида юқори сифатли озиқа моддалари ишлаб чиқариш технологияси Республика, Россия, Украина давлат патентлари билан ҳимоя қилиниб чорвачилик ва паррандачилик учун катта самара бериши тажрибаларда тасдиқланган.

Минтақамиз иқлим шароити, овқатланиш маданиятининг ўзига хослиги ва бир қанча бошқа сабаблар ёз ойларида ошқозон-ичак фаолиятининг ўзгаришига олиб келиши мумкин. Бунга ўз вақтида эътибор берилмаса, жигар ва қон –темир хасталиклари келиб чиқиши маълум. Шунинг учун ҳам олимларимиз олдида қўйилган асосий вазифалар олдини олиш ёки ўз

вактида ва сифатли даволашга шароит яратиш йўллари излаб топишга кўмаклашишдан иборат. Бу мақсадда бир қатор янги биотехнологиялар яратилган бўлиб, улар асосида “Лактобактерин”, “Колибактерин”, “Ором-1”, “Ором-2”, “Ором-3”, “Биофикол”, “Биофикол-М” каби ўндан зиёд биопрепаратлар ва 20 дан ортиқ ачитки препаратлари тайёрланиб, харидорларга етказиб берилмоқда.

Жумладан, даволашда парҳезга мўлжалланган “Ором-1” биопрепарати Олмония ва Буюк Британия патентларига эга. Бу биопрепаратнинг чақалоқлар ва кекса кишилар организмида яхши фаолият кўрсатиши ҳамда минтақамиздаги экологик вазиятга қулай ва чидамлилиги бошқа биопрепаратлардан устундир. Қолаверса, бу препаратларнинг арзонлиги ҳориждан валютага келтириляётган хиллари ўрнини боса олиши уларнинг бир қатор афзал томонларини белгилайди.

Академик М.Э.Мавлоний раҳбарлигида нон ва нон маҳсулотлари сифатини ошириш бўйича бир қатор илмий ишлар амалга оширилмоқда. Унинг илмий таклифлари асосида ачитки замбуруғлари сифатли, хушбуй таъмли нон ва нон маҳсулотлари ишлаб чиқаришда кенг кўламда қўлланилмоқда.

Ҳозирги вақтда экология муаммоларига боғлиқ бўлган бир қатор рақобатбардош биотехнологиялар яратилган. Нефть ва нефть маҳсулотлари билан ифлосланган тупроқ ва оқова сувларини тозалаш, гербицидлар, пестицидлар, дефолиантлар ва бошқа захарли кимёвий препаратлар ва ўсимликлар қолдиқлари (масалан, хазон) ва бошқа чиқиндиларни микробиологик йўл билан парчалаш бўйича олиб бериляётган ишлар шулар жумласидандир.

Ёғ-мой комбинатлари, спирт заводлари, озиқ-овқат саноати ва тиббиёт учун зарур бўлган бир қатор препаратлар (амилаза, глюкиназа, глюкозоизомераза, пектиназа, протеаза, липаза, протеаза, лактаза, пероксидаза ва ҳ.к.) олиш технологияларининг баъзилари чет эл (Литва, Украина) фермент заводларида ишлаб чиқаришга жорий этилган.

Тупроқ шўрланиши сабабларини аниқлаш ва уни бартараф қилиш учун микроорганизмлардан фойдаланиш, ўсимликлар ўсиш ва ривожланишини бошқариш йўллари излаб топиш, ўсимликлар иммун тизимини бошқариш ва бошқа соҳалар бўйича олиб бориляётган, катта салоҳиятга эга бўлган илмий ва амалий изланишлар фикримизнинг далилидир.

Ўзбекистон фанлар академияси Микробиология институтида юқори концентрацияли тузли эритмаларда бемалол яшаб, кўпаядиган микроорганизмлар ажратиб олишга эришилди. Бу микроорганизмлар шўрланган тупроқларда кўпайиши билан бир қаторда, ҳаводаги азотни ўзлаштириш ва ўсимлик ривожланишида муҳим аҳамиятга эга бўлган физиологик фаол моддалар синтез қилиш хусусиятлари борлиги билан

этиборга лойиқдир. Келгусида бундай микроорганизмлар асосида шўрланишга қарши биопрепаратлар тайёрлаш кўзда тутилмоқда.

Мамлакатимизда мавжуд 4,3 млн гектар суғориладиган ер майдонининг 3,3 млн гектарида шудгорлаб деҳқончилик қилинади. Жумладан, 2 млн гектарга яқин майдон шўрланганлигини, бу жараён фаол давом этиб, ҳар йили 50 минг гектардан зиёд ер майдони шўрланиб бораётганини этиборга олсак, қилинаётган ишлар қанчалик долзарб эканлиги ўз-ўзидан намоён бўлади.

Қолаверса, ўсимликларда касаллик чақирувчи микроорганизмлар ва уларга қарши йўллари топиш устида ҳам чуқур илмий изланишлар қилинмоқда. Масалан, катта иқтисодий самара берадиган ва экологик тоза маҳсулот етиштиришга мўлжалланган помидорда фузариум замбуруғи кўзгатадиган вилт касалликларининг олдини олиш ва уни даволаш устида олиб борилаётган изланишларнинг келажаги порлоқдир.

Қишлоқ хўжалик биотехнологияси саонатининг ривожланиши мамлакатимиз иқтисодиётини кўтаришга хизмат қилишига шак-шубҳа йўқ. Бу фикр бир қатор ривожланган мамлакатлар мисолида ўз ифодасини топган. Мамлакатимизда бу соҳани янада ривожланиши учун барча имкониятлар мавжуд.

Биотехнология соҳасидаги илмий изланишларни ривожлантириш мақсадида мамлакатимиз илмий-тадқиқот институтлари ва марказлари дунёнинг АҚШ, Германия, Италия, Япония, Хиндистон, Жанубий Корея, Хитой каби ривожланган давлатларнинг кўплаб илмий тадқиқот муассасалари билан ҳамкорликларни ўрнатганлар.

Ген муҳандислиги, биомуҳандисликнинг тараққий этгани сари бу вақт мобайнида Ғарбий Европа, Америка, Россия матбуотида жамоатчиликнинг соҳага оид қарши фикрлари ҳам чоп этилди, бу борада ҳозирга қадар турли қарама-қарши ғоялар илгари сурилмоқда.

Жамоатчиликнинг ген муҳандислиги ривожига нисбатан бундай қарши ҳаракатлари негизида биотехнологиянинг янги ютуқ ва ғояларининг мазмун моҳиятини чуқур англаб етмасдан, ундаги оқибатлардан ҳадиксираш, яъни муайян табиати аниқланмаган янги касалликлар ўчоғи пайдо бўлишидан қўрқиш ва у орқали келажакда амалга оширилиши лозим ишларнинг фойдали ва самарали томонларини кўра олмаслик ётади. Биотехнология фани ривожига бундай тўсиқларни бартараф этишда кенг жамоатчилик оммасини соҳага оид маълумотлар билан таништириш, олиб борилаётган тадқиқотлар усуллари тақомиллаштириб, ген муҳандислиги фаолиятидаги ҳавфсизликни таъминлашга оид меъёрий – ҳуқуқий акт ва ҳужжатлар, қонунларга қатъий риоя этиб олиб бориш лозим бўлади.

Қишлоқ хўжалигида, ишлаб чиқариш ва халқ хўжалигининг турли соҳаларида фаолият юритаётган мутахассислар биотехнология ва

биомуҳандислик усуллари яхши ўзлаштирган бўлиши, бундай усуллардан

қишлоқ хўжалик маҳсулотлари етиштириш ҳажмини ошириш, сифатини яхшилаш, атроф-муҳит ифлосланишининг олдини олиш ва бутун аграр ишлаб чиқариш самарадорлигини юқори кўтаришда фойдалана билишлари лозим. Бундай мақсадларни амалга ошириш борасида мамлакатимизда, жумладан, Тошкент Давлат аграр университетида биринчи марта 1999 йилда Қишлоқ хўжалик биотехнологияси кафедраси ташкил этилиб, соҳа бўйича таълим берила бошланди.

Қишлоқ хўжалик биотехнологияси бўйича ёзилган мазкур дарслик, биотехнология ва биомуҳандислик фанларининг дунёдаги ҳозирги ҳолати, унинг фан сифатида, ишлаб чиқариш соҳасида энг янги фундаментал, амалий ва инновацион ютуқларни ўз ичига олган ҳолда, шунингдек ҳавфсизликни таъминлаш мақсадида ишлаб чиқилган ген муандислиги соҳасидаги меъёрий ҳукукий, қонун ҳужжатлари асосида тайёрланган. Дарслик муаллифлари китобхонни биотехнология ва биомуҳандисликка оид маълумотларни ҳар томонлама ва чуқур ўзлаштиришлари учун фундаментал ва истиқболли фанларнинг замонавий ва анъанавий манбалари асосида илм олишларига йўналиш берадиларки, китобда бу маълумотлар олий ўқув юрти дастури доирасида ёритиб берилади.

I-БОБ

ГЕН МУҲАНДИСЛИГИ АСОСЛАРИ

Молекуляр генетика ва молекуляр биология ген муҳандислигининг асосий пойдевори

Ген муҳандислигининг келиб чиқиши молекуляр биологиянинг тараққиёти билан боғлиқ. Бу соҳада олиб борилган сўнгги йиллардаги тадқиқотлар хужайранинг тузилиши ва вазифаларини изоҳлашдан ўтиб, уларда кечадиган жараёнларнинг молекуляр механизмларини органеллалар даражасида аниқлаш имконини беради.

Ўтган асрнинг 60-йиллари охирида кўплаб тадқиқотчилар асосий генетик жараёнлар - репликация, транскрипция, трансляция ва уларни бошқариш тизимлари молекуляр механизмлари деярли ўрганиб бўлинди, молекуляр биологиянинг усткурмаси, мантикий иморати қуриб бўлинди, деб тахмин қилишган. Генетик ахборотнинг бир томонлама схемасини ифодаловчи ДНК→РНК→оқсил тартиби молекуляр биологиянинг асосий ақидаси ҳисобланган ва қурилган иморатнинг мустаҳкамлигидан далолат берган. Бу схеманинг асосий ҳолати ичак таёқчаси бактерияси *Escherichia coli* учун кўрсатиб берилган бўлиб, у ҳақиқий ядроси бўлмайдиган прокариот организм ҳисобланади. Бироқ схеманинг мантикийлиги ва соддалиги уни барча тирик мавжудотлар, жумладан, ядрога эга эукариот организмлар: одам ва ҳайвонлар учун ҳам қўллаш мумкин, деган фикрга олиб келган. Бу рўйхатга мезокариотлар (Mezokaryotes), замбуруғлар (фунги), ўсимликлар (planta) ва ҳайвонлар (animalea) киритилган. Прокариот организмлар молекуляр биологиясининг шубҳасиз муваффақиятига қарамасдан, юксак организмлар геномини таҳлил этиш қийин кечди. Хужайранинг умумий биокимёвий хусусиятларини ўрганиш генетик ташкилланишнинг барча деталларини аниқлаш имконини бермади. Эукариот организмларнинг геноми жуда катта бўлиши ва улар устида тажрибалар олиб боришнинг ўта мураккаблиги бунга сабаб бўлди. Бунинг учун энг оддийси ДНК ни бўлакларга бўлиб “қирқиш”, дуч келган жойидан эмас, балки муайян аниқ жойидан, ҳар битта нуклеотидга қадар аниқликда амалга ошириш лозим эди. Бу борада яна бошқа муаммо - ДНК таркибидаги нуклеотидлар кетма-кетлигини аниқлаш имкони мавжуд эмаслиги келиб чиқди. Шунинг учун бирорта ҳам ген аниқланмади. Бундай муаммонинг келиб чиқишига сабаб, ҳатто, энг оддий организмлар ҳам ДНК нинг жуда узун молекуласи (маслан, ичак таёқчаси геноми $4,2 \times 10^6$ нуклеотид жуфт – н.ж.) дан тузилган. Юксак организмлар - эукариотлар, жумладан, ўсимликлар ва сут эмизувчилар геноми 10^9 - 10^{11} н.ж. дан иборат. Умуман, геномда бир неча ўн минглаб генлар жойлашади.

Ҳозир ген муҳандислиги реципиент (генни қабул қилиб олувчи организм) ядро аппаратида ушбу организмга тегишли бўлмаган нафақат алоҳида янги генлар ва регулятор (бошқарувчи) кетма-кетликларни киритиш, балки яхлит хромосомалар, алоҳида органеллаларни кўчириб ўтказиш ёки хужайраларни бир-бирига қўшиши орқали организмларнинг янги шаклларни олиш имконини беради.

Ген муҳандислиги ферментлари

Ген муҳандислиги ферментлари ДНК молекулалари билан турли хил муолажаларни ўтказишга ёрдам бериб, уларни тегишли жойидан қирқиш, турли хил бўлақларини улаш, табиатда мавжуд бўлмаган янги хилдаги кетма-кетликларни синтез қилишда қўлланилади. Қуйида ген муҳандислигида фойдаланиладиган асосий ферментларни кўриб чиқамиз.

ДНК полимеразалар. Ген муҳандислигида кенг қўлланиладиган ферментлардан бири *E. coli* нинг T4 фагидан ажратиб олинган ДНК полимераза I ҳисобланади. ДНК полимераза I комплементар нуклетидларни бириктириш йўли билан ДНК занжирининг 5' -3' йўналишида узайтириш хусусиятига эга. ДНК полимеразанинг бу хусусияти ген муҳандислигида иккинчи комплементар занжирни ҳосил қилиш: бир занжирли матрица –ДНК сига қўшилганда праймер иштирокида икки ҳисса ортишида кузатилади. Бу хусусият кДНК-библиотекаларини тузишда қўлланилади. ДНК полимераза ДНК занжиридаги “бўшлиқ” ларни тўлдиришда ҳам фойдаланилади, масалан, 5' - учли бўлақларни тегишли тартибда уланишида ҳам иштирок этади. ДНК полимеразанинг экзонуклеаза фаоллигидан ДНК бўлагига радиоактив нишон киритишда қўлланилади.

Махсус термостабил ДНК полимеразалар Tth ва Taq - полимеразалар иссиқ гейзерларда яшовчи бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, полимераза занжир реакцияси (ПЗР) усули ёрдамида ДНКнинг исталган бўлаги устида кўплаб ишлар - амплификацияни амалга ошириш имконини берибди. ПЗР усули асосида Taq - полимераза ётади, у ген муҳандислигининг эски усуллари билан нафақат соддалаштириш, балки, алоҳида генларни ва яхлит геномни ҳам молекуляр нишонлашни амалга оширишга шароит яратди.

Баъзи вируслардан РНК га боғлиқ ДНК полимераза, яъни тескари транскриптаза ёки *ревертаза* деб номланувчи махсус ДНК полимераза ажратиб олинган. Ревертазалар ДНК нинг комплементар занжирини матрица РНК сида ҳам синтезлай олади. Ревертазалар ёрдамида кДНК-мРНК нинг ДНК нусхаларини олиш мумкин. кДНК генларининг тузилишини ўрганиш бу генларнинг геномдаги тўлиқ нусхаларини аниқлаш имконини беради.

ДНК лигаза кўшни нуклеотидлар орасидаги фосфодиэфир боғларини тиклаш орқали ДНК бўлакларини боғлаш каби битта асосий вазифани бажаради. Бу жараён лигирлаш деб аталади. Ген муҳандислигида кўпинча лигирлаш учун Т4 фагининг ДНК-лигазасидан фойдаланилади. Т4 лигаза ёрдамида ДНК нинг ҳар қандай бўлаги “ёпишқоқ учли” ёки “тўмтоқ учли” қисмлари бириктирилади. Бу энг кўп қўлланиладиган ферментлардан биридир.

Нуклеазалар-нуклеин кислотлар молекулалари гидролизи реакцияларини катализловчи ферментларнинг йирик гуруҳи. ДНК ёки РНК молекулалари нуклеазалар таъсирида бўлакларга ёки алоҳида нуклеотидларга парчаланиб кетади. Нуклеазаларнинг хужайрадаги дастлабки вазифаси – ҳаётий жараённинг айна вақти учун кераксиз бўлган молекулалари (масалан, мРНК ни трансляциядан сўнг) деградациясини ва нуклеин кислотларни бегона молекулалардан ҳимоя қилиш (бактерия фаг билан зарарланганда фаг ДНК сини бактерия нуклеазалари томонидан парчалаб юборилиши) дан иборат.

Нуклеазаларни уларнинг таъсирига кўра, гуруҳларга ажратиш мумкин. Нуклеазалар нафақат ДНК молекулалари (ДНКазалар) ёки РНК (РНКазалар) молекулаларига, ёки ДНК ва РНК га бир вақтнинг ўзида (олтин ранг ловия нуклеазаси) бир хилда таъсир этиши мумкин. Нуклеазалар бир занжирли (S1 нуклеазаси) ёки кўш занжирли (экзонуклеаза III) ДНК молекулалари, ёки гибрид ДНК-РНК молекуласи (рибонуклеаза H) га таъсир этиши мумкин.

Бундан ташқари нуклеазаларни икки типга: экзонуклеазалар ва эндонуклеазаларга бўлиш мумкин. Экзонуклеазалар, одатда, молекулаларни 5' ёки 3' эркин учларидан бошлаб гидролизласа, эндонуклеазалар ДНК молекуласи бўлаги ёки халқасимон ДНК молекуласининг ички кетма-кетликларидан бошлаб парчалайди.

Рестриктазалар. Ген муҳандислигида фойдалилиги нуқтаи назаридан махсус эндонуклеазалар алоҳида гуруҳни ташкил этади.

Генлар устида бевосита муолажалар ўтказиш усуллариининг такомиллаштирилиши рестрикцион эндонуклеазалар (рестриктазалар)нинг очилиши билан боғлиқдир. 1953 йилдаёқ E.coli нинг алоҳида штамми ДНК си бошқа штамми хужайраси (масалан, В штамми ДНКси С штамми хужайраси) га киритилганда, одатда, генетик фаоллик кўрсата олмайди. Чунки у махсус ферментлар-рестриктазалар билан тезда бўлакларга бўлиб юборилади. Ҳозирги вақтда турли хил микроорганизмлардан мингдан ортиқ ҳар хил рестриктазалар ажратиб олинган. Ген муҳандислигида 200дан ортиқ тури кенг қўлланилмоқда.

Рестриктазалар эндонуклеазаларнинг ДНКни муайян махсус кетма-кетликлари *рестрикция сайтлари* (нукталари)ни ҳосил қилиб гидролиз қиладиган гуруҳи ҳисобланади. Ҳар бир рестриктаза ўзининг рестрикция

сайтини танийди ва ДНКни рестрикция сайти изчилликлари ичидан ёки унинг атрофидан бошлаб қиркади (1.1-жадвал). Шундай қилиб, муайян бир рестриктаза таъсирида битта ва айнан ўша ДНК кетма-кетлиги ҳар доим ҳам бир хилдаги бўлақлар йиғиндисини ҳосил қилади. Рестриктазаларни номлашда фермент ажратиб олинган бактерия турининг лотинча номини бош ҳарфлари ва кўшимча белгиларидан фойдаланилади. Чунки бир турдаги бактериялардан бир неча хил рестриктазалар ажратиб олинган бўлиши мумкин. *Escherichia coli*-EcoR I, EcoR V, *Haemophilus influenzae* – Hinf I, *Streptomyces albus* – Sal I, *Thermus aquaticus* – Taq I.

1.1-жадвал

Баъзи рестриктазалар ва улар таниб кесадиган изчилликлар

Микроорганизм	Қисқа номи	Изчиллик 5'→3' 3'→5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam HI	G [↓] GATCC CCT [↓] AG [↑] G
<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	TGGCCA ACC [↑] GGT G [↓] ATTC
<i>Escherichia coli</i> RY13	Eco RI	CTTAA [↑] G P _u GCGC [↓] P _y
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae II	P _y [↑] CGCGP _u GG [↓] CC
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	CC [↑] GG GCG [↓] C
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	C [↑] GCG GTP _y [↓] P _u AC
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind II	CAP _u [↑] P _y TG A [↓] AGC TT
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind III	TTCGA [↑] A CTT [↓] AAC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	CAA [↑] TTG C [↓] CGG
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa II	GGC [↑] C CTGCA [↓] G
<i>Providencia stuarti</i> 164	Pst I	G [↓] ACG TC G [↓] TCG AC
<i>Streptomyces albus</i> G	Sal I	CAGCTG CGATC [↓] G
<i>Xanthomonas arzyae</i>	Xor II	G [↓] CTAGC

Рестриктазалар нуклеотид кетма-кетликларини қирқишига кўра, бир неча типга бўлинади. I-типтаги рестриктазалар рестрикция сайтларини танийди, лекин таниб олган сайтдан ихтиёрий масофада (бир неча ўндан то бир неча юз минг нуклеотид жуфтларга қадар) қиркади. Бундай рестриктазаларни ген муҳандислиги муаммоларини ҳал этишда қўллаб

бўлмайди. III-типдаги рестриктазалар ҳам I-типдаги рестриктазаларга ўхшайди, улар ДНКни таниб олинган сайтдан 20-35 н.ж. масофада гидролиз қилади, шунинг учун ҳам амалий мақсадларда кам фойдаланилади.

Рекомбинант молекулалар олиш учун асосан II-типдаги рестриктазалар қўлланилади. Бундай рестриктазаларнинг асосий тавсифи шундаки, уларнинг таниш сайти ва қирқиш жойи бир-бирига мос келади.

II-типдаги рестриктазалар муайян нуклеотид кетма-кетликларни ДНК дан таниб олади ва уни рестрикция сайти изчиллиги ичидан бошлаб гидролизлайди. II-типидаги рестриктазаларнинг рестрикция сайтлари 180° айланишдаги симметрик кетма-кетликлар - палиндромлардан иборат.

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5' EcoR I рестриктазаси рестрикция сайти.

5' TAGA 3'

3' ATCT 5' Taq I рестриктазаси рестрикция сайти

II-типдаги рестриктазалар рестрикция сайтлари ўлчами ва олинадиган ДНК бўлаклари узунлигига кўра, бир неча синфга бўлинади:

- 1) майда бўлакка бўлувчилар – рестрикция сайтлари тўртта нуклеотид жуфтликлардан иборат;
- 2) ўрта бўлакка бўлувчилар – 6-8 н.ж. рестрикция сайтлари;
- 3) йирик бўлакка бўлувчилар - 10-14 н.ж. рестрикция сайтлари

II-типдаги рестриктазаларни ДНК кетма-кетликларини бўлакларга бўлишига қараб икки гуруҳга киритиш мумкин, чунки улар. Бири танилган кетма-кетликнинг симметрия ўқи бўйлаб, бошқаси эса силжиб, «поғоналар» ҳосил қилади. Биринчи ҳолатда «тўмтоқ» учлар ҳосил бўлса, иккинчисида «ёпишқоқ» учлар ҳосил бўлади; яъни бўлаклар ўз учларида бир занжирли ўзаро комплементар қисмларга эга бўлади.

Рестриктазалар билан қирқилган «ёпишқоқ» учли бўлакларнинг ҳосил бўлиши:

5' G ↓ AATTC 3' 5' C ↓ CGG 3'

EcoR I 3' CTTAA ↑ G 5' Hpa II 3' GGGC ↑ C 5'

Рестриктазалар билан қирқилганда «тўмтоқ» учли бўлакларнинг ҳосил бўлиши:

Ta ↓ GA 3' 5' GTT ↓ AAC 3'

Taq 3' AT ↑ CT 5' Hinc I 3' CAA ↑ TTG 5'

Бир хил «ёпишқоқ» учларга эга ДНК бўлаклари бир-бири билан ДНК лигазалар ёрдамида бириктирилиши мумкин, бунда рестрикция нукталари қайта тикланади. “Тўмтоқ учли” бўлаклар қандай рестриктаза билан ҳосил бўлган бўлишига қарамасдан бир-бири билан бирика олади. “Ёпишқоқ учли” бўлаклар рекомбинант ДНКлар яратишда жуда қулайдир, чунки ДНК лигаза бўлакларини ҳеч қандай истисносиз бир-бирига бирикишини таъминлайди.

Рестриктазаларнинг фермент фаоллиги фаоллик бирликларида ўлчанади. Бу оптимал шароитда λ фаг ДНК сини 1мкг миқдорини 1 соат ичида тўлиқ гидролизланиши учун сарф бўладиган фермент миқдorigа тенгдир. Рестрикциянинг оптимал шароити ҳар бир рестриктаза учун алоҳида бўлиб, у рН, ион кучи, тегишли ионлар мавжуд бўлиши, реакцияни амалга ошириш ҳароратига боғлиқ бўлади. Рестриктазалар ген муҳандислигида қўлланиладиган асосий ферментлар ҳисобланади.

ДНК бўлақларини қирқиш ва рестрикцион хариталарни тузиш (физикавий хариталаш)

Рестрикция ферментлари тадқиқотлар учун асосий қуролга айланди. Улар жуда йирик ДНК бўлақлари (10^6 - 10^{11} н.ж.) ни бир неча юздан бир неча минг нуклеотид жуфтларга қадар ўлчамдаги бўлақларга бўлади. Агарозали гелда *ДНК электрофорези усули* билан бир-биридан ўлчами бўйича фарқ қиладиган ДНК бўлақларини осон ажратиб олиш ва ҳар бир бўлақни алоҳида тадқиқ этиш мумкин. Электрофорез усули электр майдонида турли хил тезликда ҳаракат қиладиган ДНК молекулалари (бўлақларини) ажратилишига асосланган. ДНК эритмада анион шаклида учраб, унинг эритмаси электр майдонида мусбат зарядланган кутб (катод)га томон ҳаракат қилади.

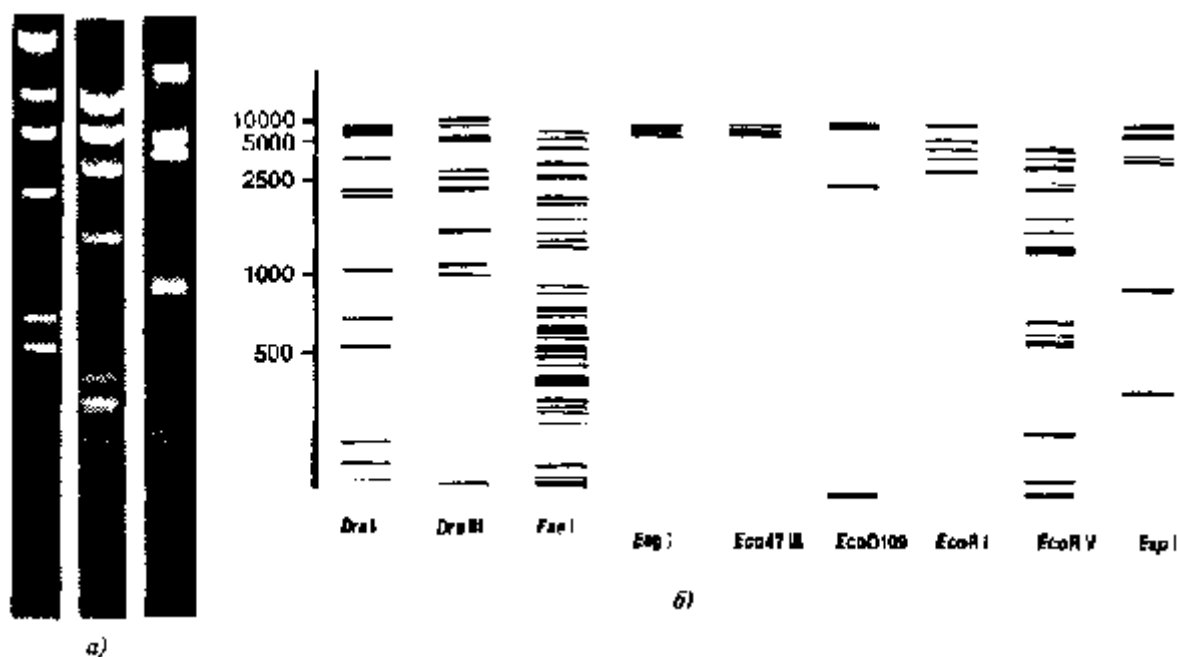
ДНК бўлақларининг ажралиши агароза полимери эритмаси ҳисобланган ташувчида амалга ошади. Усулнинг номи ҳам шундан келиб чиққан. Агарозали гел уч ўлчамли полимер ячейкали тузилмани ҳосил қилади. У электронейтрал ва ДНК га нисбатан кимёвий инерт, шунинг учун ҳар доим ДНК нинг зарур бўлагини гелдан биологик фаоллигини сақлаб қолган ҳолда ажратиб олиш (эллаюция қилиш) мумкин.

Гелдан электрофорез муҳит сифатида фойдаланиб, ДНКни бўлақларга бўлиш ва ундан муайян бўлақни ажратиб олиш мумкин. (1.1-расм)

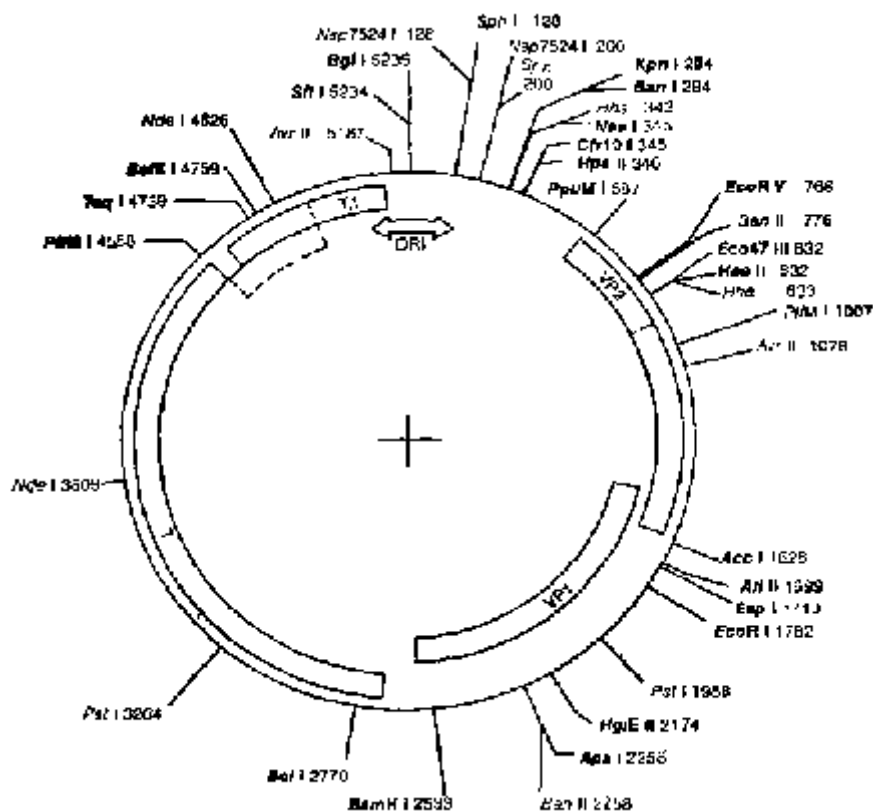
Агарозали гелда майда бўлақлар йирикларига нисбатан тез ҳаракат қилади, бунда ДНК бўлақларининг ҳаракати ушбу бўлақнинг оғирлиги (заряди) логарифмига нисбатан тесқари пропорционал бўлади. Гелни бўёқлар (масалан, этидий бромид) билан бўялганда улар бўёқ билан бирикиб чизикчалар тўпламини ҳосил қилади, уларнинг ҳар бири рестрикция бўлагига мос келади. Ферментнинг молекуляр оғирлиги илгари аниқланган ДНК бўлақларига нисбатан қолибровка қилиш асосида аниқланади.

Электрофорездан рестрикцион фрагментларни бўлиш мақсадида фойдаланиш *рестрикцион хариталар* – турли рестриктазалар учун қирқиш нуқталари киритилган ДНК кетма-кетликлари йиғиндисини олиш имконини беради (1.2- расм). Бундай харита биринчи марта 5423 жуфт асосга эга SV40 вируси учун олинган Бунда вируснинг халқасимон ДНКсини 11 та бўлакка бўлувчи Hind III рестриктазаси қўлланилган.

Уларнинг жойлашиш тартиби ҳосил бўлган бўлақлар йиғиндисини текшириш орқали ўрнатилган. Биринчи қирқиш молекулани халқасимон шаклдан чизиқли шаклга ўтказиб, кейин яна майда бўлақларга бўлган. Дастлаб бир-бирини қопловчи бўлақлар йиғиндисини ўрганилган бўлса, кейин тўлиқ парчаланиш маҳсулотлари ўрганилган. Шундай қилиб, вируснинг халқасимон ДНКси рестрикция харитаси олинган бўлиб, унга Hind III рестриктазаси билан қирқиш нуқталари киритилган. Бундай тажрибаларни бошқа рестриктазалар иштирокида амалга ошириш бир неча хил рестриктазалар учун белгиланган рестрикция сайтларидан иборат тўлиқ харитани олиш имконини беради. Хариталаш учун қанча кўп рестриктаза қўлланилса, харита шунча тўлиқ бўлади



1.1- расм. Электорофорез ёрдамида рестриктазалар иштирокида ҳосил бўлган ДНК бўлақларининг ажралиши. а-λ/HindIII фаги бўлақлари, φX 174/HaeIII фаги ДНКси, pBR322/BstnI плазмидаси (/ -белгидан сўнг рестриктаза ферменти номи келтирилган). б- λ фаги ДНКсининг турли хил рестриктазалар таъсирида бўлақларга бўлинишининг схемаси. Шкала бўйича бўлинган бўлақларнинг ўлчами келтирилган.



1.2- расм. SV 40 вирусининг генетик ва рестрикция харитаси. (ORI – репликациянинг бошланғич нуқтаси; рақамлар билан рестрикция нуқталарининг ҳолати ифода этилган)

Нуклеотидлар кетма-кетликларини аниқлаш – секвенирлаш. ДНКнинг генетик муҳим қисмларини аниқлаш имконини берувчи усуллар муҳим аҳамият касб этади. Шунингдек улар ДНКни секвенирлашнинг мутлақо янги самарали усуллари ишлаб чиқиш ва рекомбинант ДНК молекулаларини яратиш учун хизмат қилди.

Секвенирлаш ДНК ни рестрикция эндонуклеазалар билан қирқиш орқали ҳосил бўлган 350-1000 жуфт нуклеотид ва ундан ортиқ кетма-кетликдан иборат бўлақларнинг нуклеотид асослари изчиллигини аниқлаш имконини беради. Секвенирлашнинг иккита асосий тамойили: кимёвий ва ферментатив секвенс мавжуд.

Кимёвий секвенс нуклеотидларнинг танлаб кимёвий деградация қилинишига асосланган. У 1977 йилда А.М. Максам ва В. Гильберт томонидан таклиф этилган ва уларнинг номи билан аталади. Бу усулда секвенирлашда ДНК нинг бир занжирли молекуласини олиш зарур, унинг бир учини ^{32}P изотопи билан нишонланади, нишонланган ДНК препарати тўрт бўлаққа бўлинади ва ҳар бирига тўрт асосни бир ёки иккига бўлувчи махсус реагент билан ишлов берилади. Масалан, 60%-ли чумоли кислотасини қўшиш пурин асослари (А+Г) ни, диметилсулфатни фақат гуанин асосларини; тоза гидразин эса пиримидин асослари (Т+Ц) ни

парчалайди, 1,5 М NaCl эритмасида эса фақат цитозинли асослар парчаланadi. Ҳар бир ДНК молекуласига бир неча жойидан шикастлантириш тўғри келиши учун реакцияни амалга ошириш шароитини танлаб олиш муҳимдир. Шикастланган молекулаларга пиперидин билан ишлов берилганда ДНК да узилиш ҳосил бўлади, у айнан азотли асос шикастланган жойда ҳосил бўлади.

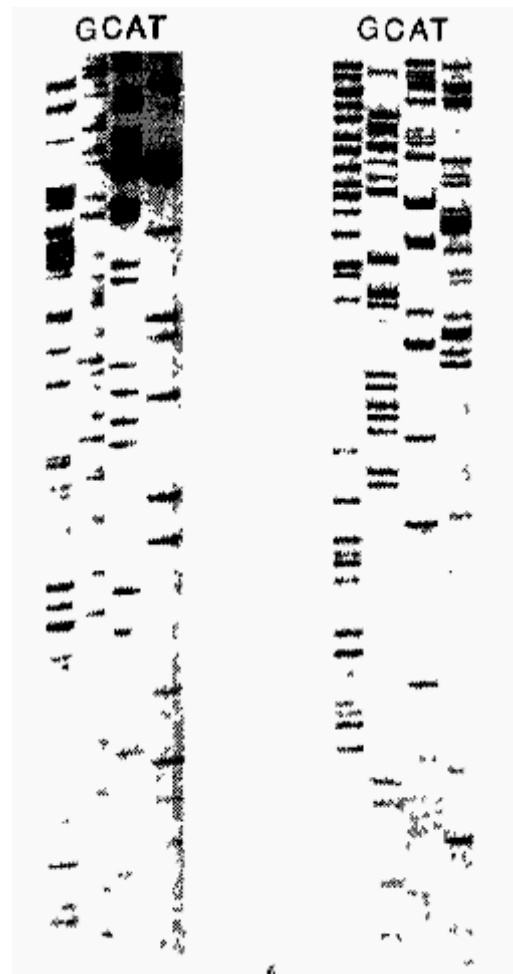
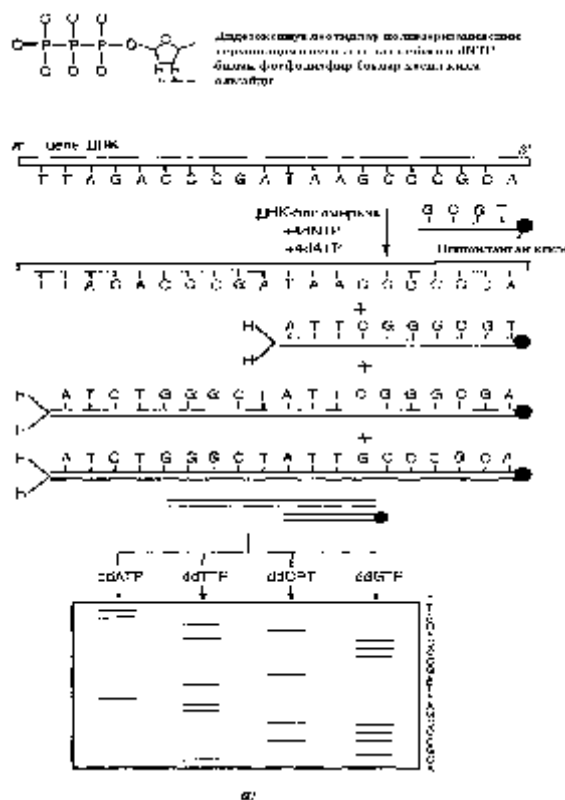
Натижада нишонланган бўлақлар тўплами олиниб, уларнинг узунлиги шикастланган асосдан то молекуланинг охиригача бўлган масофада аниқланади. Тўрттала реакция натижасида ҳосил бўлган бўлақларни денатурацияловчи шароитда акриламид гелида тўртта қўшни йўлакчаларга қуйиб чиқилади. Шундан сўнг радиоавтография амалга оширилади, натижада радиоактив нишонга эга бўлақлар рентген пленкасида из қолдиради. Уларнинг жойлашувига кўра, нишонланган қисмдан шикастланган асос қандай масофада жойлашганини, буни ўрганиш орқали уларнинг ҳолатини аниқлаш мумкин. Рентген пленкасидаги чизиқлар йиғиндисига кўра, таҳлил қилинадиган ДНК бўлагининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланади.

Ушбу усул ёрдамида қисқа муддат ичида SV40 вируси нуклеотид кетма-кетлиги, pBR322 плазмидаси ва бошқа кўплаб ДНК кетма-кетликларини тўлиқ аниқлашга муваффақ бўлинган. Бироқ Максам-Гилберт усули муолажаларининг сезиларли даражада қийинлиги ва узок давом этиши билан боғлиқ бир қатор камчиликларга эга. Ҳозирги вақтда кимёвий деградация ёрдамида секвенирлаш асосида нуклеотид кетма-кетликларни тез ва мукамал аниқлаш усуллари ишлаб чиқилган, қаттиқ фазали секвенирлаш ва айланма фазали хромотографиядан фойдаланиш орқали секвенирлаш шулар жумласидандир.

Ҳозирда *ферментатив секвенирлаш* ёки Сэнгер томонидан 1977 йилда таклиф этилган (1.3.а расм) занжир терминацияси (синтезни тўхтатиб қўйиш) йўли балан секвенирлаш усули кенг қўлланилади. Сэнгер усули негизида (комплементар) ДНК занжирининг репликацияси тамойили ётади. У ДНК кетма-кетлиги синтези узилган, яъни занжир ўсиши терминацияга учраган турли қисмларида амалга ошади. Ферментатив секвенирлашнинг асосий хоссаси тузилаётган занжир синтезининг терминациясига асосланади.

Репликацияни тўхтатишга сабаб бўладиган терминация агентлари 2', 3' –дидезокситрифосфатлар (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ) ҳисобланади. Мазкур модификация қилинган азотли асослар кейинги дезоксирибонуклеотид билан фофодиэфир боғларни ҳосил қила олмайди.

Сэнгер бўйича секвенирлаш негизида ДНК нинг репликацияси ётади, бунда асосий фермент ДНК полимераза (асосан, ДНК–полимераза I) ҳисобланади. Бир занжирли ДНК-матрица калта нуклеотид праймер ва комплементар нуклеотидлар иштирокида ДНКнинг иккинчи занжири



1.3. - расм. ДНК ни Сэнгер буйича секвенирлаш схемаси (а) ва тажриба натижасида олинган радиоавтограмма (б).

Пробиркаларга тўртта бир хил таркиб: нуклеотид кетма-кетлиги олдиндан аниқлаб олинган ДНК матрицанинг денатурланган бўлаги, тўртта дезоксинуклеотид, ДНК-матрицага комплементар бўлган ва ундан ДНК полимераза I синтезини давом эттирадиган, ҳамда ДНК полимераза I ферментининг ўзи, радиоактив нишонланаган қисқа праймер (16-24 н.ж) дан иборат реакцион аралашма солинади. Шундан сўнг ҳар бир пробиркага дидезоксинуклеотидлардан бири қўшилади. Ҳар бир пробиркада синтезланадиган занжир ДНК полимераза I дидезоксинуклеотидни бириктириб оладиган жойда терминацияланади. Дидезоксинуклеотид реакция аралашмасига қўшилган бўлиб, битта пробиркадаги синтез комплементар занжирнинг ддАТФ билан боғланиши ҳисобига, иккинчисида ддГТФ ҳисобига узилади ва ҳ.к. Занжир узилиши тасодифий

нукталарда амалга ошиши ҳисобга олинадиган бўлса, праймердан бошлаб секвенирланадиган бўлак охирига қадар узунликдаги фрагментлар йиғиндиси ҳосил бўлади.

Олинган ДНК фрагментлари полиакриламидли гелда (битта нуклеотидга қадар аниқликда) ажратилади, радиоавтография қилинади ва тўртта пробиркадаги бўлақларнинг ажралишини кўринишига асосан ДНКнинг нуклеотид изчиллиги аниқланади.

Бундай ахборотга эга бўлгач, ДНК га биологик муҳим қисмларни жойлаштириш мумкин. Масалан, SV40 вируси репликацияси битта махсус Hind III нуктадан бошланади ва иккала йўналишда давом этади. Рестрикцион хариталар ва рестрикцион бўлақлар вирус оқсиллари учун мРНК синтезланадиган ДНК бўлақларини хариталашда фойдаланилган.

Ҳозирги вақтда исталган ДНК бўлагининг нуклеотид кетма-кетлигини тўлиқ аниқлаш ечими топилган масала ҳисобланади. Бугунги кунда про- ва эукариотларнинг бир неча минглаб генлари кетма-кетлиги ўрганилган. Кўплаб прокариот организмлар геномининг кетма-кетлиги аниқланган. Эукариотлардан ачитқилар (*Sacharomyces cerevisiae*), нематодалар (*C.elegans*), арабидопсис, дрозифилла пашшаси ва одам геномини тўлиқ секвенирлашга муваффақ бўлинган. Шоли ва сичқон геномининг нуклеотид кетма-кетликлари аниқланмоқда. Бундай ҳажмдаги тадқиқотларнинг олиб борилиши секвенирлаш усулларини автоматлаштириш ва замонавийлаштиришни талаб қилади. Юқорида номлари келтирилган иккала усулни ҳам автоматлаштириш тўлиқ йўлга қўйилган, бу эса секвенирлашни соддалаштиради, сарф-ҳаражатларни камайтиради. Айниқа, нуклеотид кетма-кетликларини аниқлашнинг автоматлаштирилган ферментатив усулидан кенг фойдаланилмоқда. Терминацияловчи нуклеотидлар билан боғланган флуоресцент бўёқлардан фойдаланиш барча реакцияларни битта пробиркада олиб бориш имконини беради. Бундан ташқари секвенирлашнинг мутлақо янги усуллари, масалан, фиксация қилинган олигонуклеотид чиплари билан гибридизация орқали, экзонуклеазалардан фойдаланиш ва бошқа усуллар ёрдамида секвенирлаш ишлаб чиқилган. Мазкур усулларнинг барчаси ДНК нинг йирик қисмлари, шунингдек, исталган геномнинг секвенирлаш муаммосини тезда ҳал этииш имконини беради. Олинган натижалар маълумотлар базаси - генлар банкига киритилади. Энг йирик генлар банки Genbank (АҚШ), EMBL(OE), DDBJ (Япония) ҳисобланиб, ягона INSD тармоғига уланган. Ушбу маълумотлар банкига киритилган нуклеотид кетма-кетликлари тўғрисида ИНТЕРНЕТдаги қуйидаги манзиллар: www.ddbj.nig.ac.jp, www.ebi.nac.uk, www.ncbi.nlm.gov. да танишиш мумкин.

Геннинг нуклеотид кетма-кетлиги ва генетик кодини билган ҳолда, у кодирлайдиган оқсил аминокислоталари кетма-кетлигини аниқлаш

мумкин. Илгари оксил таркибини аниқлаш учун ажратиб олинган ва тозаланган оксилни ўта мураккаб ва кўп меҳнат сарфланадиган таҳлилини ўтказиш талаб этилар эди. Кўпинча нуклеотид кетма-кетликларини аниқлаш орқали оксилнинг структурасини аниқлаш, оксилнинг ўзини тўғридан-тўғри секвенирлашга нисбатан осон кечади.

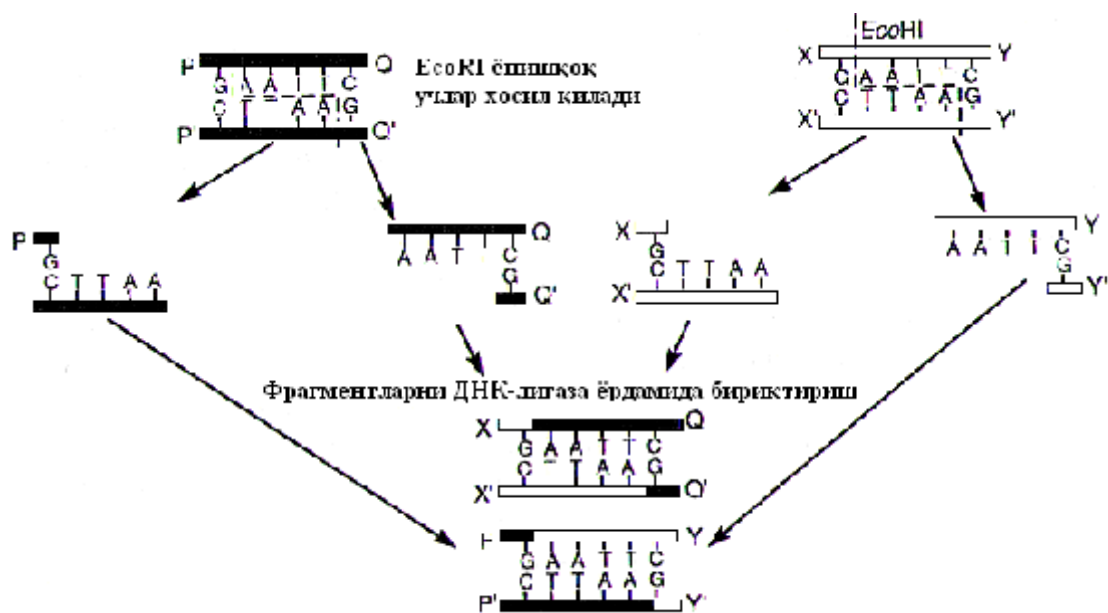
Ҳозирги кунда секвенирлаш йўли билан олинган нуклеотид кетма-кетликларнинг компьютер таҳлилини амалга ошириш илгари аниқланган кетма-кетликлар билан таққослаш, гомология (ўхшашлик) даражасини аниқлаш, махсус (масалан, регулятор-бошқарувчи) изчилликларни ажратиб кўрсатиш, РНКнинг иккиламчи тузилмасини моделлаштириш имконини берадиган компьютер дастурларининг кўплаб турлари мавжуд.

Секвенирлашнинг тезкор усуллари ишлаб чиқилгач, олдиндан белгиланган муайян кетма-кетликларга эга, нисбатан узун олигонуклеотидларни синтез қилишнинг оддий, тезкор усуллари йўлга қўйилди. Ҳозирда 100 нуклеотидга қадар кетма-кетликларни осон синтез қилиш мумкин. Бу жараёни автоматлаштириш эса синтезни янада тезлаштиради.

Рекомбинант ДНК конструкциясини яратиш

Турли биологик манбалардан ажратилган икки ёки ундан кўп ДНК фрагментларининг бирикишидан ҳосил бўлган ДНК молекуласи рекомбинант ДНК дейилади. ДНКнинг муайян фрагментлари, шунингдек зарур гени тугувчи фрагментлар рестриктазалар ёрдамида олинади. Рестриктазалар «тўмтоқ» учли ва «ёпишқоқ» учли фрагментлар ҳосил қилади. ДНК фрагментларини битта молекулага бирлаштириш бу фрагментларнинг қандай учга эга эканлигига боғлиқ ҳолда, турли усуллар ёрдамида амалга оширилади.

Бир хил изчилликка эга «ёпишқоқ» учли фрагментларни бирлаштириш усули. Баъзи рестриктазалар, масалан EcoRI, ДНК занжирида таниб кесадиган сайт марказидан бир хил масофада зина ҳосил қилиб, симметрик узиш пайдо қилади. Бу бир-бирига комплементар участкалар асосини жуфтлашиши ҳисобига ёки «ёпишқоқ» учлари орқали бирлашиш тенденциясига эга бўлади. (1.4 расм).



1.4-расм. Бир хил изчилликга эга ДНК фрагментларини «ёпишқок» учлари орқали бирлаштириш.

Асосларнинг жуфтлашиши фақатгина комплементар изчилликлар ўртасида содир бўлади, шунинг учун EcoRI таъсирида пайдо бўлган ААТТ-учлар масалан Hind III томонидан ҳосил қилинган АГЦТ-учлар билан қовушмайди. Лекин бир рестриктаза таъсирида ҳосил қилинган ҳар қандай ДНК бўлаклари (келиб чиқишидан қатъий назар) комплементар нуклеотидларнинг бир занжирли участкалари орасида водород боғлари ҳосил қилиш ҳисобига бирикиши мумкин.

Лекин бундай жуфтлашишдан сўнг ҳам ДНК қўш занжирининг бутунлиги тўлиғича тикланмайди ва фосфодиэфир боғида иккита узилиш қолади. Уларни тиклаш, яъни тикиш ёки лигирлаш учун ДНК лигазадан фойдаланилади. Рекомбинант молекулалар ҳосил қилиш ишларини лигаза ферменти яқунлайди. Бундай тажрибалар биринчи марта 1972 йилда (П.Берг, АҚШ)да тажрибаси бажарилган ва «ёпишқок» учлар ҳосил қилувчи рестриктазалар билан ДНК лигазадан биргаликда фойдаланиш рекомбинант ДНК молекуласи олишнинг умумий усулларини яратишда асос бўлиб хизмат қилиши кўрсатилган. Шу лабораторияда биринчи марта SV40 вируси ва E.coli нинг галактоза оперонини тутувчи λ бактерияфаги рекомбинант ДНКга бириктирилган.

«Тўмтоқ» учли фрагментларни бирлаштириш усули. Рестрикция сайти ичида тўғри узиш (қайчи сингари шартта иккига бўлиш) ҳосил қилувчи рестриктазалар таъсирида «тўмтоқ» учли ДНК фрагментлари пайдо бўлади, уларни ҳам ДНК-лигаза ферменти ёрдамида бириктириш мумкин. Бундай ҳолларда лигирлаш реакцияси ўзига хос бўлиб, унинг самара даражаси «ёпишқок» учларни

бириктиришга нисбатан бир оз пастроқ. Аммо «тўмтоқ» учли фрагментлар бириктиришининг «ёпишқоқ» учли фрагментларни бириктиришга нисбатан афзаллиги шундаки, «тўмтоқ» учли бу фрагментлар қайси рестриктаза таъсирида пайдо бўлишидан қатъий назар, турли рестриктазалар томонидан ҳосил бўлган фрагментларга осон бирикади.(1.5-расм)



1.5-расм. Бир хил изчилликка эга «тўмтоқ» учли ДНК фрагментларини бирлаштириш.

«Ёпишқоқ» ва «тўмтоқ» учли ДНК фрагментларни бириктириш усули. ДНКнинг «ёпишқоқ» учли фрагментларини ферментатив йўл билан «тўмтоқ» учли ДНК молекуласига бириктириш мумкин. Бунинг учун «ёпишқоқ» учлар «тўмтоқ» учларга айлантирилади яъни ДНКнинг фақат бир занжирли участкаларини гидролизловчи S1 нуклеаза ферменти ёрдамида «ёпишқоқ» учлардаги нуклеотидлар кесилади ёки ДНК полимераза I ёрдамида бир занжирли «ёпишқоқ» учларидан иккинчи занжир синтезланади яъни қўшимча нуклеотидлар қўшилади.

Шундай усулда «ёпишқоқ» учли ДНК фрагментларидан «тўмтоқ» учли фрагментлар ҳосил қилинади ва у бошқа «тўмтоқ» учли ДНК фрагментларига ДНК лигаза ферменти ёрдамида бирикади.

ДНК фрагментлари пробиркада бирлаштирилганидан сўнг, уларни тирик ҳужайраларга киритиш керак. Бунинг учун махсус вектор молекулалардан фойдаланилади.

Вектор молекулалар. Трансформация. Таркибида қўшимча ирсий ахборотлар тутувчи рекомбинант ДНК молекулаларини ҳужайраларга киритиш ва унинг барқарорлигини сақлаш ген муҳандислигининг асосий калит операцияси ҳисобланади. Буни

амалга ошириш учун вектор молекулалардан фойдаланилади. Агар, ДНК шундайлигича хужайрага киритилса, масалан бактерия хужайраларида ферментлар уларни нуклеотидларга парчалаб ташлайди. Баъзи ҳолларда ДНК хужайрага кириб ўрнашиши мумкин, лекин хужайранинг бўлиниш жараёнида у наслдан–наслга берилмай йўқолиб кетади. Рекомбинант ДНК хужайранинг генетик аппаратининг ташкил қилувчи қисмига айланиши учун, у геномга бирикиши (хромосомага интеграция) ва шунинг ҳисобига репликацияланиши ёки автоном репликацияланиш хусусиятига эга бўлиши керак.

Бегона ДНКнинг репликацияси, экспрессияси ва трансформацияси (бошқа организмга кўчишини)ни таъминловчи ДНК молекуласи *вектор* деб аталади. Вектор хужайрага кўшимча ирсий ахборот киритилишини амалга оширади. Вектор сифатида плазмидалар, бактериофаглар, мобил элементлар ва ҳайвонларнинг вирусларидан фойдаланиш мумкин. Ҳозирги вақтда жуда кўп векторлар яратилган бўлиб, уларни бир нечта типга бўлиш мумкин:

1. Клонлаш учун векторлар. Бундай векторларга бириктирилган ДНК фрагментларни репликациялаш орқали сони (амплификацияси)ни кўпайтириш учун фойдаланилади. Бундай мақсадлар учун бактерия плазмидалари ва фаглар қўлланилади. Геномнинг катта ўлчамдаги фрагментларини клонлаш учун эса бактерия ва ачитқи хромосомалари асосида яратилган (ВАС ва YAC) сунъий векторларидан фойдаланилади.

2. Экспрессион векторлар. Улардан генларнинг муайян кетма-кетлиги аниқлаш ва уларнинг оқсил маҳсулотларини айниқса прокариот организмлар учун таҳлил қилиш, муайян оқсилни ишлаб чиқишда фойдаланилади. Кўп сонли экспрессион тизимлар мавжуд. Шунингдек сут эмизувчилар, ўсимликлар ва ачитқилар хужайраларида генлар экспрессиясини амалга оширувчи векторлар ҳам яратилган. Эукариот организмлар учун яратилган экспрессион векторлар полиаденилланиш сайти ва мазкур организмда ишлаш қобилиятига эга промотордан иборат экспрессион кассетага эга бўлади.

3. Трансформация учун векторлар. Реципиент геномига бегона ДНК фрагментларини киритиш учун фойдаланилади. Бундай векторлар одатда геномга интеграцияланишига ёрдам берувчи махсус изчилликлар тутати. Замонавий вектор тизимлар полифункционал бўлиб, бир нечта функцияни битта векторга жамлайди. Биринчи табиий векторлар бактериялардан ажратилган бўлиб, кўпчилиги (экспрессион векторлар, клонлаш учун векторлар, трансформация

учун векторлар) тажриба мақсадидан келиб чиққан холда ген мухандислиги усуллари ёрдамида қайта яратилган.

Вектор молекулаларнинг таркибида маркер ген бўлиши, бу ген ҳужайрада вектор иштирок этаётгани хақида маълум қилувчи фенотип бериши яъни вектор селектив ирсий белгига эга бўлиши керак. Кўпинча селектив белги сифатида табиатда кенг тарқалган антибиотикка чидамлилиқ генидан фойдаланилади. Бу генларнинг оксил маҳсулоти-ферментлар антибиотикларни модификациялайди ва уларнинг таъсирини инактивациялайди (кучсизлантиради). Масалан, *nptII* гени канамицин антибиотигини инактивацияловчи неомицинфосфотрансфераза генини кодирлайди. Бактерия ҳужайраси *nptII* гени иштирокида канамицинга нисбатан чидамлилиқ ҳосил қилади ва шу антибиотик иштирок этuvi озиқа муҳитларида ўсиб, клон ва ҳужайралар колонияси ҳосил қилади. Одатда таркибида *nptII* гени бўлмаган ҳужайралар бундай озиқа муҳитларда ўса олмайди ва нобуд бўлади. Демак, вектор конструкция таркибида *nptII* генини тутиши вектор иштирок этаётган ҳужайраларни аниқлаш ва уларни танлаб олиш имконини беради.

E.coli ҳужайраларига вектор конструкциялар трансформацияси Таркибида бегона ДНК фрагментлари тутувчи вектор конструкциялар *E.coli*нинг махсус штамлари ҳужайраларига трансформация қилиш учун фойдаланилади. Вектор плазмидаларнинг бактерияларга трансформацияси ҳужайраларнинг ДНК молекулаларини қабул қилиш қобилиятига асосланган (компитентлигига). *E.coli* ҳужайраларига трансформациялаш асосан кальций шоки ёки электропорация усулларида бирини қўллаш орқали амалга оширилади. Иккала ҳолатда ҳам бактерия мембранасининг ДНК молекулалари учун ўтказувчанлиги ошади.

Вектор молекуласи учун қуйидаги асосий талаблар қўйилади:

1) вектор бегона ДНК фрагментларини ўзига бириктириши учун бир нечта рестриктазалар учун ягона рестрикция сайтлари тутиши зарур.

2) вектор репликация бошланиш нуқтаси изчиллигини тутиши ҳисобига муайян ҳужайраларда репликацияланиши шарт.

3) вектор маркер ген изчиллигини тутиши зарур. Бу генлар вектор конструкцияни тутувчи ҳужайралар селекциясини енгиллаштиради.

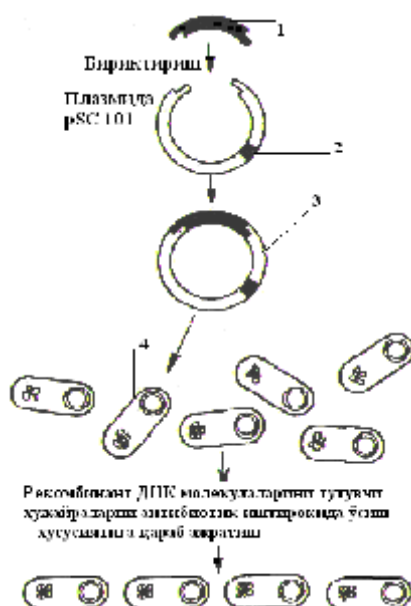
Бактерия плазмидаларидан клонлашда фойдаланиш. Бактерия ҳужайрасида хромосома ДНКсидан ташқари, кўп нусхада халқасимон ДНК молекулалари ҳам мавжуд. (1-25 м.н.ж.). Бундай халқасимон молекулалар *плазмидалар* деб аталади. Баъзи плазмидалар таркибида антибиотикга чидамлилиқ генларини тутати. Ҳужайрада плазмидаларнинг кўп нусхада ҳосил бўлиши натижасида

антибиотикларни биокимёвий нейтралловчи ферментларнинг синтези ошади ва ҳужайранинг антибиотикка чидамлилиги ортади.

Юқорида баён этилганидек, кальций ионлари иштирокида таркибида плазмидаси йўқ бактериялар томонидан плазмидалар осон ютилади. Бактериялар ҳужайрасида фақат бир типдаги плазмидалар иштирок этиши мумкин.

Ҳужайрадаги плазмидалар нусхасининг сони ўзгариб туради. Бу ҳужайранинг ва плазмидаларнинг ирсий хусусиятларига боғлиқ. Баъзи турдаги плазмидалар ҳужайрадаги сони 10-200 нусха бўлгунига қадар кўпайишни давом эттиради. Бошқа турлари эса бактерия хромосомасининг кўпайиш тезлигида репликацияланади. Бундай типдаги плазмидалар ҳужайрада бир дона ёки бир нечта бўлиши мумкин. Клонлаш учун фақат биринчи типдаги плазмидалар асосидаги векторлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқдир.

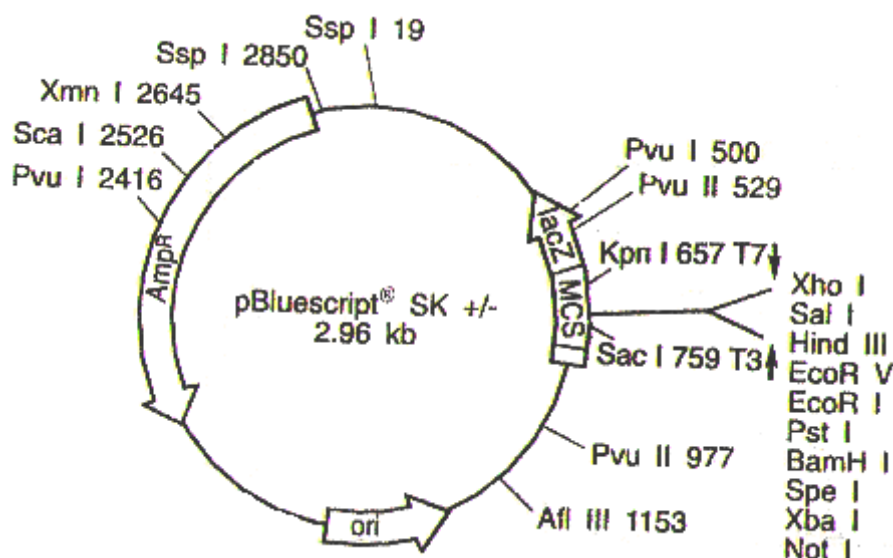
Плазмидалардан вектор сифатида биринчи марта 1973 йилда П.Берг лабораториясида фойдаланилган. Тажрибалар унча катта бўлмаган (~9 м.н.ж.), тетрациклинга чидамлилик гени тутувчи *E.coli* плазмидаси pSC 101 да олиб борилган. Плазмида таркибида фақат бир дона *EcoRI* рестриктаза ферменти таниб кесадиган сайт (махсус нуклеотидлар изчиллиги) бўлганлиги сабабли, фермент плазмиданинг халқасимон кўш занжирини фақат бир жойидан кесиб «ёпишқоқ» учли очиқ халқа ҳолатига ўтказди. Плазмида pSC 101нинг ДНКси ичак таёқчаси учун бегона ДНКнинг *EcoRI*–фрагментлари билан аралаштирилади. ДНК-лигаза ферментлари ёрдамида бегона ДНК фрагментлари ва pSC 101 плазмида ягона рекомбинант молекулага бирлаштирилади. Сўнгра бу рекомбинант плазмидани *E.coli*нинг компитент ҳужайраларига кўшилганда у бактерия ҳужайрасига киради. Рекомбинант плазмидани тутувчи ҳужайралар тетрациклинли селектив муҳитда ажратилади. (1.6-расм)



1.6-расм. ДНК фрагментларини плазмидалар ёрдамида клонлаш бўйича тажриба схемаси.
1-бириктириляётган гетеро-логик ДНК; 2-антибиотикка чидамлик бўйича маркер; 3-ДНКнинг рекомбинант молекуласи; 4-рекомбинант ДНКни бактерия хужайрасига киритиш.

Бу тарихий тажриба ген муҳандислиги ишларини бошланишига асос бўлди. Про- ва эукариот хужайраларига турли ДНК фрагментларни киритиш ва янги хусусиятли хужайралар олиш бўйича тажрибалар ўтказиш имконияти туғилди.

Ҳозирги вақтда табиий векторлар асосида фойдаланиш қулай бўлган вектор конструкциялари яратилган. Улардан pUC типи векторлари ва уларнинг ҳосилалари (pBluescript, pGEM) кенг тарқалган бўлиб, улардан клонлаш учун ҳам, шунингдек экспрессиялаш учун ҳам фойдаланиш мумкин. Унча катта бўлмаган pUC векторлари (~2,7 м.н.ж.) таркибида репликация бошланиш нуқтаси изчиллигини (ori-сайт) тутиб, бу уларга бактерия хужайрасида мустақил репликацияланиш имконини беради. pUC векторида клонлашни осонлаштириш учун кўп фойдаланиладиган рестриктазалар учун такрорланмас рестрикция сайтларини акс эттирувчи сунъий синтезланган *полилинкер* изчиллиги мавжуд. (1.7-расм).



1.7-расм. Клонлаш учун pBluescript SK вектори
(MCS –полилинкер изчиллиги; Amp^R-ампициллинга чидамлик)

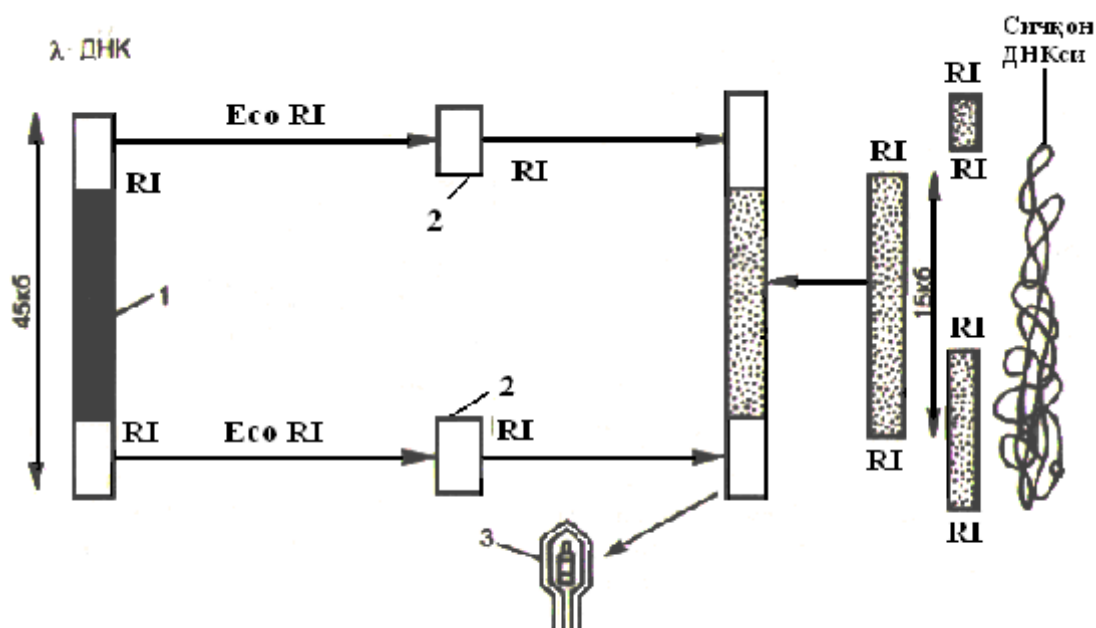
(селектив маркер)

Полилинкер вектордаги бегона ген иштирокининг кулай маркери ҳисобланган λ с Z генига ўрнатилган. λ с Z гени X-gal субстратни парчалаш хусусиятига эга (β -галактозидаза ҳосилалари) β -галактозидаза генини кодирлайди. Бунда бактерия ҳужайралари ранги оқ рангдан мовий ранггача ўзгаради. Полилинкернинг унча катта бўлмаган изчиллиги (100-20 н.ж.) β -галактозидаза оксиди синтезига таъсир этмайди. Бегона ДНК фрагментини клонлаш учун λ с Z гени экспрессиясини барбод қилувчи pUC-вектори полилинкерига бириктирилади. ДНК уланган вектор тутувчи ҳужайралар X-gal субстратни парчалайди ва бундай бактерия ҳужайралари бошқа ген уланмаган бўш плазмида вектори тутувчи мовий ранг ҳужайралардан фарқли оқ рангда қолади. pUC векторлар ва уларнинг ҳосилаларининг оқ-мовий ранг селекцияси клонлаш жараёнини анча осонлаштиради, чунки вектор плазмидаги бегона генларни улаш жуда кам ҳолларда муваффақиятли чиқади. Аксарият ҳолларда 10-30та лигирланган молекулалардан фақат биттаси рекомбинант бўлади, яъни ўзининг таркибида бегона фрагмент тутуди ва фақат мовий ранг селекцияси ёрдамидагина рекомбинант ДНК тутувчи бактерия клонларини аниқлаш мумкин.

pUC векторлар таркибида клонланган генларнинг транскрипциясини таъминловчи регулятор изчилликдан иборат махсус экспрессион кассеталар тутуди.

Фаглар асосидаги векторлар. Космидлар. Вас- ва Yас-векторлар. Бактерия плазмидалари асосидаги векторлар клонлаш учун кенг қўлланилади, лекин уларнинг битта муҳим камчилиги бор, бу сифимининг кичиклигидир. Бундай векторларда ўртача 7-8 м.ж.н. узунликдаги фрагментларни клонлаш мумкин, эукариот генлари изчиллиги эса (~10-25 м.ж.н.) узунроқ бўлади. Бундан ташқари генларнинг кодирловчи қисми атрофида жойлашган регулятор изчилликларни ўрганиш учун геномни кенгроқ клонлаш зарур. Бундай катта фрагментларни клонлаш учун эса плазмида векторлари тўғри келмайди. Чунки катта ўлчамдаги хромосома ДНКси (~9 м.н.ж.дан ортиқ) уланган плазмидалар барқарор бўлмайди ва репликация жараёнида аста секин ўлчами камайиб боради. λ бактериофаги асосида таркибига 22 м.ж.н. узунликдаги бегона ДНК фрагментларини тутувчи вектор конструкция яратилган. λ бактериофаг асосида клонлаш учун бундай векторларни яратишда фаг ДНК молекуласининг марказий қисми фагнинг E.coli да кўпайиши учун зарур эмаслиги эътиборга олинган ҳолда рестриктазалар ёрдамида фаг геномидан кесиб олинганда репликация учун зарур

бўлган фагнинг ўнг ва чап елкаси ўзгармасдан қолиши керак. Фаг елкалари бошқа фрагментлардан алоҳида ажратилиб, клонлаш учун вектор сифатида қўлланилади. Кесилган фаг ДНКси ўрнига ўлчами 9-21 м.ж.н. бўлган бегона ДНК уланади. Бактерияларда фақат фагнинг иккала елкаси ва бегона ДНК тутувчи фаглар кўпаяди (1.8 расм). Бунда олинган фаг рекомбинант ДНКси 30 м.ж.н. дан кам бўлмаслиги керак.



1.8-расм. Бактериофаг λ асосидаги векторда ДНКни клонлаш.

1- Фагнинг репликацияси учун зарур бўлмаган ДНК фрагменти; 2- фагнинг бактерия хужайраларида репликацияланиши ва фагнинг кейинги тахланиши учун жавобгар генларни тутувчи ДНК фрагментлари; 3-бегона ДНК фрагментларини тутувчи бактериофаг.

Янада узунроқ генларни ёки ёнма-ён генлар гуруҳини ажратиш ва ўрганиш учун катта ўлчамдаги (~30-45 м.н.ж.) ДНК фрагментларини клонлаш зарур. Бундай фрагментларни клонлаш учун катта сифимга эга махсус вектор конструкциялар яратилган бўлиб, улар *космидлар* деб аталади. Космидлар дурагай молекулалар бўлиб, фаг геномининг махсус *cos*-участкасини тутуди, шунинг ҳисобига улар λ фагининг бош қисмига жойлаша олади. Уларнинг плазмидалар каби репликацияланиши учун имкони яратади. Космидларнинг ўлчами фаг векторлариникига нисбатан кичкина, ҳаммаси бўлиб 5 м.ж.н., космидларга 30-45 м.ж.н. узунликдаги генларни улаш мумкин. Бундай рекомбинант ДНК тутувчи фагнинг бошчалари фаглар каби кўпая олмайди. Улар билан *E. coli* хужайралари трансформацияланади. Эукариот ДНКсини тутувчи *cos*-сайт ўрнатилган дурагай молекула

*E.coli*да плазмидалар сингари кўпаяди ва ҳар бир фаг заррачалари индивидуал бактериялар трансформант колониясини ҳосил қилади.

100 м.ж.н.дан ортиқ узунликдаги ДНК фрагментларини клонлаш махсус яратилган ВАС ва YAC векторларида амалга оширилади. *ВАС-векторлар* бактериянинг F-плазмидаси асосида олинган бўлиб, бу плазмидаларнинг бактерия ҳужайраларидаги репликацияси ва нусхасининг кўпайишига жавобгар генларни ва клонлашни осонлаштирувчи катор қўшимча нукулеотид кетма-келикларни тутати. ВАС –векторлар сиғими ўзининг унча катта бўлмаган ўлчамида (~7 м.ж.н) жуда катта -100-300 м.ж.н. Унинг сиғими геном библиотекасини яратишда клонлар сонини кўп марта камайтириш имконини беради.

YAC-векторлар ҳам катта ўлчамдаги ДНК фрагментларини клонлашда фойдаланилади, ачитқининг сунъий минихромосомасини намоён қилади. YAC-вектор центромер, теломер ва репликация бошланиш нуктасига эга. Бундай векторга бегона ДНКнинг 100 м.ж.н. дан ортиқ узунликдаги фрагментларни ҳам улаш мумкин. Бундай минихромосома ачитқи ҳужайрасига киритилганда репликацияланади ва митоз бўлинишда ўзини бошқа ачитқи хромосомалари каби тутати.

Геном библиотекаси (генлар банки) - мазкур организмнинг ДНК изчилликлари тўлиқ тўпламининг вектор таркибида клонланишидир. Бутун геномни алоҳида қисмларга ажратиш (фрагментациялаш) ген муҳандислиги ишларини енгиллаштиради, алоҳида изчилликларни, турли геномларнинг муайян қисмларини қиёсий таҳлил қилиш ва асосийси индивидуал генларни ажратиш ҳамда улар билан ишлаш имконини беради.

Геном ДНКси фрагментлари юқори молекуляр хромосома ДНКсини рестриктазалар ёрдамида гидролизлаш йўли билан олинади. ДНК гидролизи учун рестриктазалар шундай танланиши керакки, олинган фрагментлар бир-бирини ёпиши ва уларнинг узунлиги вектор ўлчамига мос келиши лозим. Олинган фрагментлар фаг елкалари билан лигирланади ва фаг заррачаларининг олдиндан тайёрланган тайёр бошчаларига жойлаштирилади. Генлар банки шундай усулда олинади. Генлар банки фаг банки кўринишида 70 °C ҳароратда хлороформ остида сақланади. Шундай усулда генлар банкини ўн йиллаб сақлаш мумкин.

Олинган геном клонларини кўпайтириш, шунингдек керакли клонни қидириб топиш ишларини амалга ошириш учун фаг библиотекаси билан бактерия ҳужайралари зарарланади ва зарарланган ҳужайралар Петри ликобчасидаги агарли муҳитга экилади. Сут эмизувчилар ҳужайрасининг тўлиқ гаплоид тўплами

$3 \cdot 10^9$ жуфт асос тутади. 15 минг жуфт нуклеотид сиғимдаги векторда библиотека 1млн. атрофида фаг заррачалари тутади. Миллионлаб фаг бляшкаларини текшириш, бутун геномдан зарур ген иштирокини аниқлаш имконини беради. Айнан шундай тарзда қидирилаётган ген изчиллигини тутувчи фаг заррачаларини аниқлаш, фақат шу изчиллик ДНКсини кўпайтириш ва кейинги изланишларни амалга ошириш мумкин.

Генлар изчиллигини идентификация қилиш ва ажратиш

Генларни ажратиш ген муҳандислигининг асосий босқичларидан биридир. Рекомбинант ДНК олишнинг бу босқичидаги муваффақияти авваломбор бу геннинг қанчалик даражада ўрганилгани ва унинг донор геномидаги жойлашиш ҳолатига, мазкур ген мРНКсини ажратиш усуллари ва шу ген маҳсулотларининг функционал фаоллигини аниқлаш усуллариининг яратилиши; мазкур ген кўп миқдорда мавжуд бўлган (амплификацияланган) ёки фаол бўлган объектларнинг мавжудлиги, кейинчалик тескари транскрипция йўли шу геннинг ДНКсини олишда фойдаланиб, унинг мРНКсини етарли миқдорда ажратишга боғлиқ.

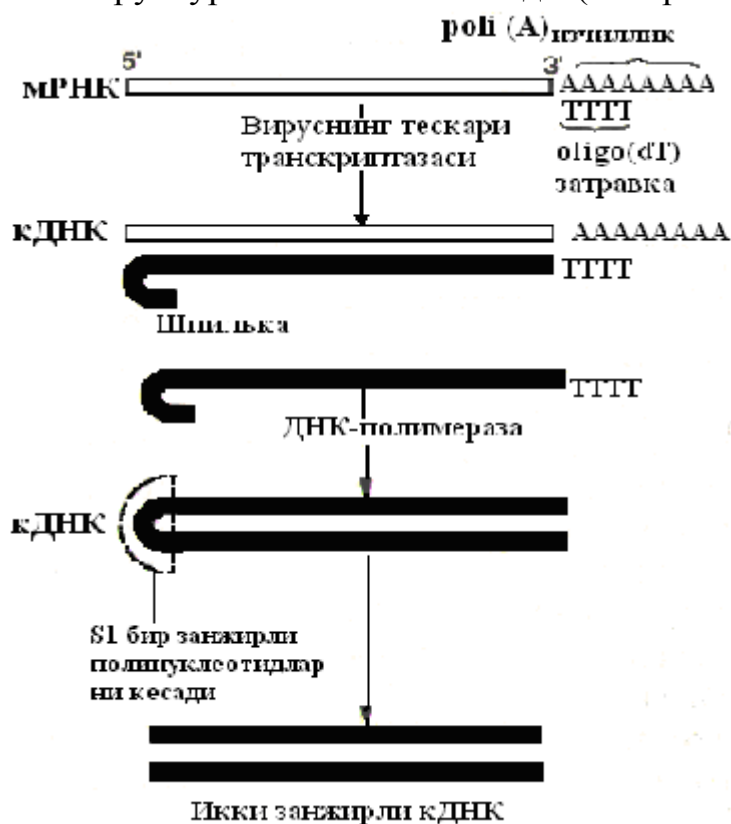
Генларни ажратишнинг иккита асосий усули мавжуд: ген сунъий равишда синтезланади ёки клонотекадан зарур генни тутувчи клон танлаб олинади.

Комплементар ДНК синтези (кДНК). *Тескари транскриптаза ёки ревертаза* ферменти аниқланганидан сўнг, генни сунъий равишда синтезлаш орқали генларни ажратиш имконияти пайдо бўлди. Бу фермент РНК тутувчи онкоген вируслардан ажратиб олинган. Фермент специфик ДНК-полимеразаи акс эттиради ва РНК бошқарувчи ДНК синтезини РНКдан матрица сифатида фойдаланиб амалга оширади. Натижада комплементар ДНК занжири синтезланади. Фермент ген экспрессиясининг биринчи босқичига—транскрипцияга тескари реакцияни катализлайди, унинг номи ҳам шундан олинган.

Муайян геннинг мРНК гомоген препаратини ажратишга муваффақ бўлдик деб тахмин қилсак, баъзи ҳолларда мРНК умумий қисмининг асосини мРНКнинг ташкил этган ҳолларда буни амалга ошириб бўлмайди. Деярли барча эукариот мРНКлари ўзининг 3' учида аденин қолдиқларидан иборат поли (А)- изчиллик тутади. Бу изчиллик процессинг натижасида мРНКга бирлашади.

ДНКнинг синтез реакцияси бошланиши учун ДНК ревертазага бошқа барча ДНК-полимеразалардаги каби унча узун бўлмаган икки занжирли затравка керак бўлади. Агар реакцияга 18-20та тимин қолдиқларидан иборат (поли дТ) бир занжирли қисқа

олигонуклеотидлар қўшилса, улар мРНКнинг поли(А)-изчиллиги билан бирлашади (комплементарлик принципи асосида ДНК- РНК фрагментлар хосил қилади) ва бундай дуплекс ферментатив реакциянинг бошланиши учун затравка бўлиб хизмат қилади (1.9. расм). Натижада дурагай РНК-ДНК молекула хосил бўлади, унинг учиди фермент икки занжирли ДНКнинг қисқа бўлагиди-шпилкани синтез қилади. Шпилка ДНКнинг иккинчи комплементар занжири синтези учун затравка бўлиб хизмат қилади. Буни ДНК полимераза I амалга оширади. мРНК занжири РНК-аза ферменти томонидан гидролизланади. ДНКнинг бир занжирли участкаларини гидролизловчи S₁ эндонуклеаза ёрдамида шпилкани кесиб ташлаш мумкин. Натижада занжирларидан бири мРНК га комплементар бўлган икки занжирли ДНК молекуласи хосил бўлади. Бундай ДНК *кДНК* деб аталади ва у мРНКнинг дастлабки молекуласи транскрибцияланган структура генига мос келади (1.9.-расм).



1.9-расм. мРНКда кДНК синтези схемаси.

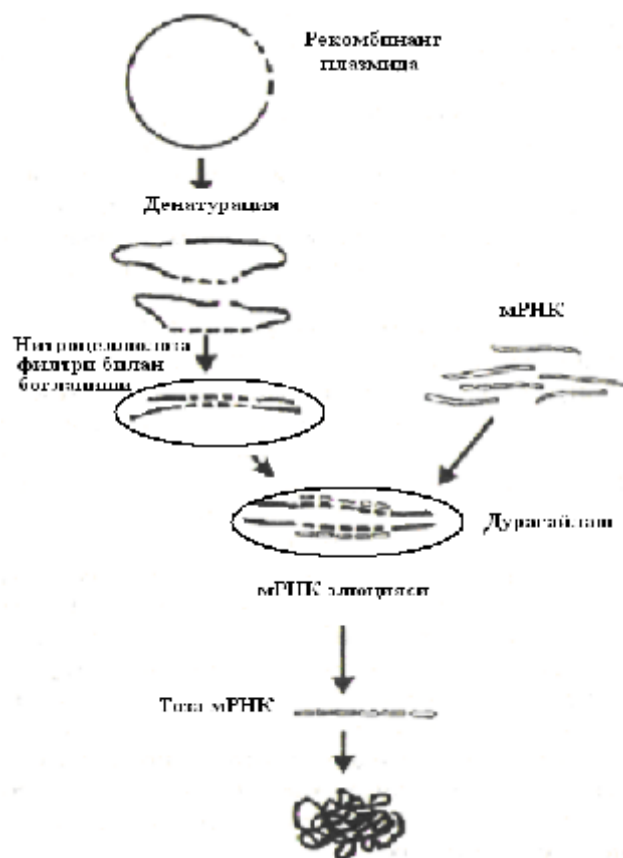
Олинган кДНКга «ёпишқоқ» учлар бирлаштирилади ва плазмидига, масалан, pUC 19 плазмидасига уланади. кДНК фрагментларини кўпайтириш учун рекомбинант ДНК E.coli га киритилади. Шу каби схемалар ишлаб чиқарилиши саноат асосига қўйилган. Инсулин, ўсиш гормони, интерферрон, альбумин,

иммуноглобулинлар, қатор бошқа оқсиллар генларини олишда фойдаланилади.

Мазкур оқсилни кодирловчи айнан шу ген олингани хақида ишонч хосил қилишнинг бир нечта усуллари мавжуд. Агар ген томонидан кодирланган оқсилнинг аминокислоталар тартиби маълум бўлса, унда клонланган ДНКнинг нуклеотид изчиллигини аниқлаб, унинг айнан шу оқсилни кодирлашига ишонч хосил қилиш мумкин. (1.3.расмга қаралсин).

Баъзи ҳолларда ДНК-РНК дурагайлаш усули ҳам қўлланилади. буни амалга ошириш учун индивидуал мРНК ажратилган бўлиши керак (1.10-расм). кДНК молекулалари денатурацияланади (ДНК иплари бир-бирларидан ажралади) ва радиоактив нишонланган мРНК билан аралаштирилади. Ренатурация шароитида (қўш спиралнинг қайта тикланиш жараёни, ДНК ва унга комплементар РНК занжири орасида ҳам хосил бўлиши мумкин) ДНК-РНК дурагай молекулалари хосил бўлади. S_1 нуклеазадан фойдаланиб, уларнинг тўлиқ комплементарлигига ишонч хосил қилиш мумкин. Агар кДНК РНКга тўлиқ комплементар бўлмаса, унда дурагай молекулада жуфтлашмаган бир занжирли участкалари бўлади, уларни S_1 нуклеаза ферменти ёрдамида гидролизлаш орқали йўқотиш мумкин.

Агар кДНК вектор молекула таркибида экспрессияланишга кодир бўлса, унда мРНК синтези амалга ошади, сўнгра мРНКдан оқсил синтез бўлади, генни унинг маҳсулоти бўйича оқсилни аниқлаш иммунокимёвий усул ёрдамида идентификация қилиш мумкин. Шундай тарзда бу усулларнинг бирини қўллаб айнан зарур ген олинганини исботлаш мумкин.



1.10-расм. Филтрларда ДНК-РНК дурагайлаш ёрдамида кДНКни тутувчи плазмидалар идентификацияси

кДНК библиотекасини яратиш. Биз юқорида индивидуал мРНК ажратиш имкониятини юқорида кўриб чикдик. Демак бу амалга ошиши учун ген муайян хужайра ва тўқималарда танлаб фаол бўлиши керак. Бундай холларда мРНК нинг аралаш популяцияларида тескари транскрипция реакцияси ўтказилади ва натижада барча типдаги мРНКлар тескари транскриптлари аралашмасини акс эттирувчи кДНК олинади. Сўнгра одатда кДНК банкини яратиш усулига ўтилади. Бунинг учун кДНК молекулалари вектор молекулалар билан бирлаштирилади ва улар бактерия хужайраларига трансформацияланади. Лекин тажрибалар шундай ўтказилиши керакки, хар бир бактерия хужайраси бир дона рекомбинант плазмидга эга бўлиши ва шунга асосан фақат бир хил турдаги кДНК тутиши зарур. Хар бири ўзининг таркибида кДНК тутувчи вектор плазмидалар йиғиндиси *кДНК библиотекаси* деб аталади. Демак, кДНК библиотекаси геном библиотекасидан фарқли, геномнинг бутун изчилликлари ва генларини ўзида тутмайди, фақат бу организмда экспрессияланувчи қисминигина намоён қилади. Бундай холларда

кДНК геннинг промотор ва интрон қисмларисиз фақат структура қисмини акс эттиради.

Фақат баргдан ёки илдиздан мРНК ажратиб, илдиз ёки барг тўқимасининг муайян тўқималарда баргда ёки илдизда экспрессияланувчи генларга хос бўлган специфик кДНКсини олиш мумкин. Шу йўл билан ўсимлик ёки ҳайвонлар кДНК библиотекаси билан бирга алоҳида органлар ва тўқималар кДНК библиотекаси (орган ёки тўқимага хос кДНК библиотекаси) ёки онтогенезнинг турли жараёнларига характерли кДНК библиотекасини яратиш мумкин.

Бундай библиотекаларни олиш ва таҳлил қилиш- тўқимага хос генларни ажратиш ва ҳужайра ҳамда тўқималарнинг дифференцияланиш жараёнларини ўрганиш, тўқима ва органларга хос метаболизмни, бу жараёнларда иштирок этувчи генларни аниқлаш имконини беради.

Клонотекадан зарур генни идентификация қилиш. Бундай ҳолларда тадқиқотчиларнинг олдида минглаб клонлар орасидан уни қизиқтирувчи генни тутувчи ДНК фрагменти мавжуд бўлган клонни излаб топиш вазифаси туради. Ҳозирги вақтда бундай муаммони ҳал қилиш учун молекуляр зондлардан фойдаланилади. Зонд- геннинг изчиллигига гомологик бўлган нуклеин кислотанинг нишонланган молекуласини ўзида акс эттиради. Қидирилаётган генни тутувчи бактерия колониясини аниқлаш учун радиоактив нишонланган индивидуал мРНК яхши зонд бўлиб хизмат қилади. Аммо индивидуал мРНКни ҳар доим ҳам ажратишга муваффақ бўлиш қийин. Баъзида ҳужайрада қидирилаётган ген маҳсулоти (демак мРНКси ҳам) жуда кам миқдорда бўлади, ёки мРНК жуда тез деградацияланади, шунинг учун мРНКни ажратиш мумкин эмас. Барқарор оксил иштирокида унинг баъзи қисмининг унча кўп бўлмаган миқдорини ажратиш ва аминокислоталар тартибини аниқлаш мумкин (бунинг учун узунлиги 5-10 аминокислота қолдиғидан иборат оксил қисмини билиш етарли). Аминокислоталарнинг маълум изчиллиги бўйича мРНКнинг шу участкасидаги аминокислоталар изчиллигини кодирловчи қандай нуклеотидлар изчиллиги бўлиши мумкинлигини аниқлаш мумкин. Сўнг радиоактив нишонланган алоҳида нуклеотидлардан 30 жуфт нуклеотидан кам бўлмаган узунликдаги олигонуклеотидлар кимёвий синтезланади, улардан биттаси қидирилаётган ген участкасига тўлиқ комплементар бўлади. Бундай нуклеотидлар кДНКга, сўнг геном библиотекасидаги клонларга мос келувчи зонд- намуна ҳисобланади.

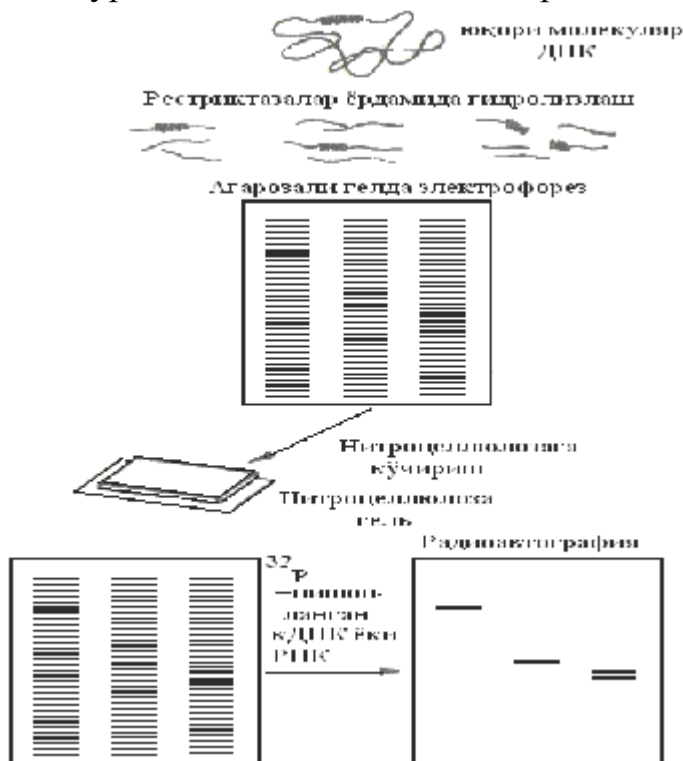
Библиотекалар скрининги. Радиоактив нишонланган зонд олинганидан сўнг, зондга комплементар ва таҳлил қилинаётган оксилга мос изчилликга эга плазмида тутувчи бактерия

колонияларини идентификация қилиш учун геном библиотекаси ёки кДНК библиотекаси кўриб чиқилади.

Бактерия колониялари ўсаётган Петри ликобчаси устига махсус нейлон филтр ёпилади; ҳар бир колония ҳужайраларининг бир қисми филтрга ўтади, қолган қисми ликобчада қолади. Натижада реплика ҳосил бўлади: ликобчада ва филтрда колониялар бир хил тақсимланади. Нейлон филтрга ДНК мустаҳкам ўрнашади. Нейлон филтрдаги бактерияларни лизис қилиш ва клонларнинг ДНКсини денатурациялаш учун ишқор билан ишлов берилади. Сўнг филтр нишонланган зонд (кДНК ёки мРНК ёки сунъий олигонуклеотид) солинган эритмага жойлаштирилади. Дурагайланишда зонд нишонланган зондга комплементар изчилликлар тутувчи колониялар билан боғланади; филтр зонд молекулалари билан боғланмаган ҳужайралардан ювиш орқали тозаланади ва радиоактив нишон тутувчи колонияларни аниқлаш учун радиоавтография қилинади. Бу колониялар Петри ликобчасида идентификацияланганидан сўнг, алоҳида олиб кўпайтирилади. Шундай қилиб, геном библиотекаси ёки кДНКнинг кўп сонли клонлари орасидан таҳлил қилинаётган ген изчиллигини тутувчи клон аниқланади ва кейинги ишлар бутун геном билан эмас, фақат битта ген (ДНК фрагменти) билан олиб борилади.

ДНК таҳлилининг блот-дурагайлаш усули нафақат кДНК ва геном библиотекалари скринингида, шунингдек геном ДНКсини таҳлил қилишда ҳам фойдаланилади. Шу усул ёрдамида геномда муайян ДНК изчиллиги иштирокини аниқлаш мумкин (масалан, трансген ўсимликлар геномида бегона ген иштироки, ген нусхаларининг кўпайиши, геннинг нуклеотид изчиллигидаги ўзгаришларни таҳлил қилиш мумкин). Блот-дурагайлаш усули билан ДНКни таҳлил қилиш муайян ДНК фрагментларини специфик нишонланган зондлар билан дурагайлаш йўли орқали аниқлашга асосланган. У қуйидаги босқичлардан иборат: 1) ДНК рестрикцияси; 2) рестрикцияланган ДНК фрагментларини гелдан нейлон филтрга кўчириш ва уларни иммобилизациялаш; 3) нишонланган зонд билан дурагайлаш. Юқори молекуляр хромосома ДНКси битта ёки бир нечта рестриктазалар билан кесилади. Ҳосил бўлган фрагментлар агарозали гелда электрофорез қилиш орқали ажратилади ва олдиндан денатурацияланган (0,4 М NaOH) гелнинг устига нейлон филтр, унинг устидан филтр қоғозлар қўйилади. Капилляр кучлар таъсирида ДНК фрагментлари перпендикуляр равишда филтрга ўтиб, у билан боғланади (иммобилизацияланади). Бундай кўчириш блоттинг (blot – сўриш) деб аталади. Бунда филтрда гелнинг репликаси ҳосил бўлади. Сўнг филтр радиоактив нишонланган бир занжирли зонд солинган эритмага жойлаштирилганда филтрга бириккан хромосома ДНКси

фрагментлари билан қўшилиб дурагайланади. Зонд фақат ўзига гомологик бўлган ДНК изчиллиги тутувчи фрагментлар билан дурагайланади. Нишон билан боғланган фрагментлар радиоавтография орқали аниқланади. 1.11-расмда Саузерн (Southern blotting) бўйича блот-дурагайлашнинг схемаси берилган.



1.11-расм. Саузерн бўйича блот-дурагайлаш усули принципи.

Радиоавтографияда хосил бўлган чирикчалар орқали геномда таҳлил қилинаётган фрагментлар мавжудлигини, бу изчилликлардаги ўзгаришларни (делеция, инсерция), чирикчаларнинг оч ёки тўқ ранги орқали геннинг геномдаги нусхалари сонини аниқлаш мумкин. Демак, бу усул бутун геном ва алоҳида генларни таҳлил қилиш учун ҳам қўлланилади.

Шундай усулда (Northern blotting усулида) мРНК ни ҳам иммобилизация қилиб, таҳлил қилиш мумкин.

Демак, усулларни биргаликда қўллаш орқали кўпчилик генларни, уларнинг махсулотлари оқсилларни жуда кам миқдорда бўлса ҳам ажратиш мумкин. Бу генлар келажакда ген муҳандислиги ишлари учун объект бўлиб хизмат қилиши муқаррар

2-БОБ

ЎСИМЛИКЛАРНИНГ ГЕНЕТИК МУҲАНДИСЛИГИ

Жинсий гибридизация ва танлашга асосланган анъанавий селекция усуллари ўсимликларнинг янги генотипларини олиш имкониятини беради. Улар йирик ҳажмдаги қишлоқ хўжалик экинларининг гибрид ва навлари, шунингдек, селекциянинг нодир нусхаларини олишни таъминлайди. Россиянинг машҳур селекционерлари (П.П.Лукьяненко, В.С.Пуставойт, В.С.Ремесло, П.В.Гаркавий, Кириченко, Калинин ва бошқалар), ҳамда республикамизнинг йирик селекционер олимлари (Р.Р.Шредер, Я.Л.Навроцкий, Г.С.Зайцев, С.С.Канаш, А.И. Автономов, А.Дадабоев, Н.Н.Назирова, С.Мирахмедов, А.П. Ибрагимов, Ш.Ибрагимов, Ризмат ота Мусахмухаммедов, О.Жалилов ва бошқалар) селекция ривожига муносиб ҳисса қўшганлар. Янги навларни олишда анъанавий (классик), селекция усуллари бундан кейин ҳам асосий усуллардан бўлиб хизмат қилади. Ген муҳандислиги манипуляциялари қишлоқ хўжалик экинларининг

патогенларга чидамли янги нав, шакл, линия ва гибридларини олиш ва янги навларни жорий этиш муддатларини қисқартириш каби қатор муҳим муаммоларни ечиш имкониятини беради.

Рекомбинант ДНК лар технологияси прокариот, шунингдек эукариот келиб чиқишга эга генларни ажратиш, бу ген (ёки бир неча генлар) реципиент ўсимлик хромосомасига кўчириб ўтказиш ва унинг экспрессиясини таъминлашга шароит яратади. Бу технологияни қўллаш изланишни бирмунча аниқ мақсадли қилади ва генетик аппарат билан манипуляция қилиш имкониятларини кенгайтиради.

Ўсимликларнинг битта хужайрасидан яхлит ўсимлик олиш мумкинлиги, яъни тотипотентлик хусусияти ҳайвонлар хужайраларига нисбатан уларнинг энг муҳим афзаллиги ҳисобланади. Ўсимликлар ген муҳандислигидаги натижалар ўсимлик тўқималари култураси усуллари, айниқса, турли хил ўсимликларни регенерация қилиш услубларини ишлаб чиқишга боғлиқ бўлади.

Ген муҳандислиги технологияси трансген ўсимлик олишнинг қуйидаги босқичларини ўз ичига олади: 1) генни танлаш ва уни клонлаш; 2) реципиент - ўсимлик генотипини танлаш; 3) генни киритиш ва унинг реципиент – ўсимлик геномига экспрессияси; 4) трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш.

Генни танлаш ва уни клонлаш. Генни танлаш, ўсимликка ҳўжалик аҳамияти қимматли маълум бир белгини ўтказиш заруриятидан келиб чиқади. Ҳозирги вақтда, асосан, ўсимликлар трансформацияси учун моноген белгилар, яъни, пестицидларга чидамлилик, ёки бошқа хил стресс омилларга чидамлиликни белгиловчи генлар кенг қўлланилади. Бу белгиларга жавобгар генларнинг кўпчилиги бактерия геномларидан ажратиб олинган. Кейинги вақтларда чидамлилик белгиларига жавобгар донор сифатида ёввойи ўсимлик турлари геномлари танланмоқда. Турли хил тур, авлод ва ҳатто оилаларга мансуб ўсимликларнинг биологик жиҳатдан бир-бирига мос келмаслиги сабабли бундай генларни реципиент ўсимликлар геномига жинсий гибридизация усули орқали киритиш мумкин эмас. Ҳал этилиши янада мураккаб муаммо бир гуруҳ сифат белгилари: уруғ сифати, қурғоқчилик, юқори ва паст ҳароратга чидамлилик белгиларини ажратиб олиш ҳисобланади.

Реципиент ўсимлик генотипини танлаш. Реципиент сифатида ишлаб чиқариш амалиёти талабларига ҳосилдорлиги, уруғ - меваси сифати, биотик ва абиотик стрессларга чидамлилиги билан жавоб бера оладиган, лекин фақат биргина салбий белги, масалан, зараркунанда ҳашаротга чидамсиз нав ёки линиялар танлаб олинади. Бундай ўсимликлар геномига ҳашаротларни нобуд қилувчи прототоксин оксили экспрессиясини таъминловчи в *bt2* бактерия генини киритиш танлаб олинган навда ҳосилдорликни сезиларли ошишига сабаб бўлади. Шунингдек, реципиент

ўсимлик генотипини танлашда хужайраларнинг яхлит (фертил) етук ўсимликка қадар регенерация қилиш хусусияти ҳам инобатга олинади, чунки бу белги генотипга ҳам бир қадар боғлиқдир.

Генни киритиш ва унинг реципиент ўсимлик геномидаги экспрессияси. Ўсимликлар геномига бегона генларни кўчириб ўтказиш муаммоси бегона генларни икки паллали ва баъзи бир паллали ўсимликлар геномига кўчириб ўтказиш имконини берувчи тупроқ агробактериялари *Agrobacterium tumefaciens* таркибидаги Ti – плазмидларининг аниқланиши билан бирмунча енгиллашди. Сўнгги вақтларда ўсимлик хужайралари трансформациясида биобаллистик трансформация усули, айниқса, бир паллали ўсимликлар учун кенг қўлланилмоқда. Бегона генни реципиент ўсимлик геномига экспрессиясини амалга ошириш ва авлодларда белгининг наслдан – наслга турғун ўтишини таъминлаш муҳим масала ҳисобланади. Киритилган генни экспрессия бўлиши бир қатор сабаблар: генни ўсимлик геномига интеграция бўлган жойи, промотор қисмининг метилланиш изчиллиги, киритилган геннинг хусусиятлари ва ҳ.к. ларга боғлиқ.

Трансформант хужайралар регенерацияси ва трансген ўсимликларни танлаш. Трансформант хужайралардан етук ўсимликни регенерация бўлиши хужайралар тотипотентлигига боғлиқ, аммо бу ҳар доим ҳам амалга ошавермайди. Тотипотентлик белгиси икки паллали ўсимликлар: тамаки, картошка, лавлаги, соя, рапс, беда, помидор, сабзи, карам ва баъзи мевали дарахтларда яққол ифодаланган. Бир паллалилар, айниқса, бошоқдошларда бу белги кучсиз ифодаланган бўлиб, уларда хужайрадан етук ўсимликни регенерацияси жараёни жуда қийинчиликлар билан кечади. Ҳозирги вақтда ғалла экинларига мансуб баъзи ўсимликлар маккажўхори, шоли, буғдой, сули кабиларни регенерация қилиш усуллари ишлаб чиқилган.

Шуни қайд этиш лозимки, кўплаб ўсимликларни регенерация қилиш бўйича йилдан йилга бир қатор такомиллаштирилган усуллар ишлаб чиқилмоқда ва ривожлантирилмоқда.

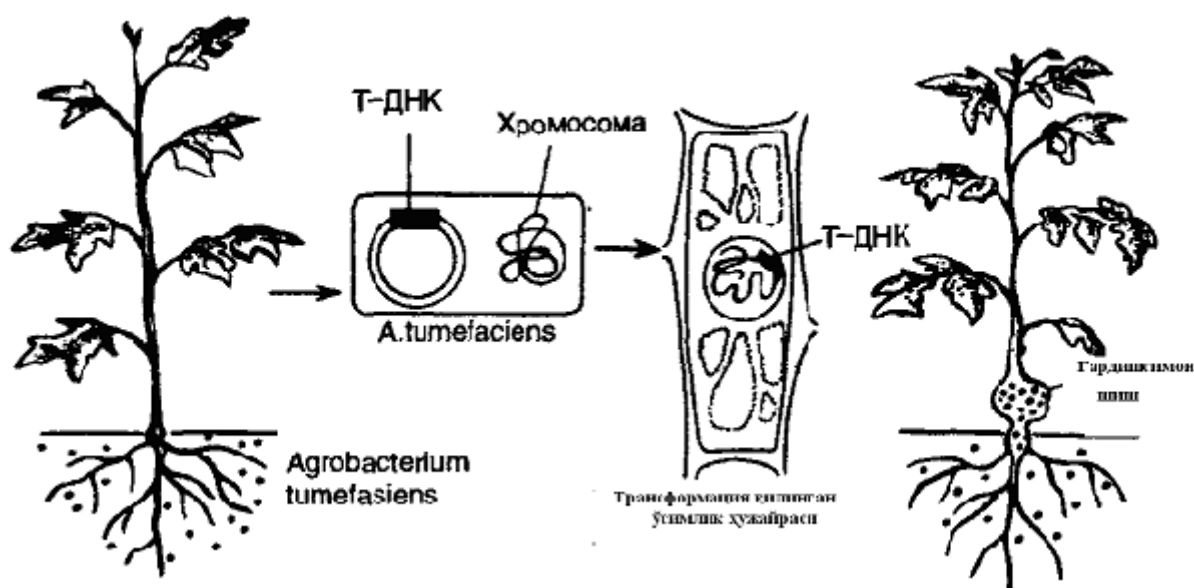
Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси

Трансген ўсимликлар олишдаги асосий муаммолардан бири ўсимликлар хромосомасига бегона генларни киритиш яъни, ўсимлик хужайралари трансформацияси ҳисобланди. Бу борада тупроқ агробактериялари Ti – плазмидаларидан ўсимликлар трансформацияси табиий тизимида фойдаланиш имкониятининг кашф этилиши муҳим туртки бўлди.

Баъзи тупроқ бактериялари турлари (*Agrobacteria*)нинг икки паллали ўсимликларни зарарлаши ва бунда ўзига хос шиш – гардишсимон бўртма ҳосил қилиши олдиндан маълум эди. Бу шишлар зарарланган жойда

мунтазам равишда бўлиниб ўсадиган дедифференциаллашган ҳужайралардан ташкил топган. In vitro шароитида ўстирилганда шиш ҳужайралари нормал ўсимлик ҳужайралари ўсиши учун зарур гормонлар учрамайдиган муҳитда ҳам ўса оладилар. Агар зарарлантирилгандан сўнг барча агробактерияларни антибиотиклар қўшиб инактивация қилинса ҳам шиш ҳужайралари тартибсиз (назорат қилинмайдиган) бўлиниш хусусиятини сақлаб қоладилар. Шундай қилиб, агробактериялар фақат шиш ҳосил бўлишини индуцирлаш учунгина зарурдир. Шиш ҳужайралари ўсимликка хос бўлмаган аминокислоталар – опинлар (аргинин ҳосилалари)ни синтезлай бошлайди, улар агробактериялар томонидан азот ва углевод манбаи сифатида фойдаланилади. Агробактериялар билан зарарланган ўсимликда, трансформант ўсимлик ҳужайралари метаболизми қайта қурилади ва улар фақат бактериялар учун зарур бўлган бирикмалар синтезини бошлайди.

Шиш ҳосил қилувчи кучли индукторлардан бири *Agrobacterium tumefaciens* мисолида шиш чақирувчи восита Ti – плазмида деб номланган (инглиз тилидан Tumor inducing – шиш чақирувчи) махсус плазмида бўлиб, унинг бир қисми ўсимлик ҳужайраси хромосомасига ўрнашиб олиши аниқланган (2.1- расм).

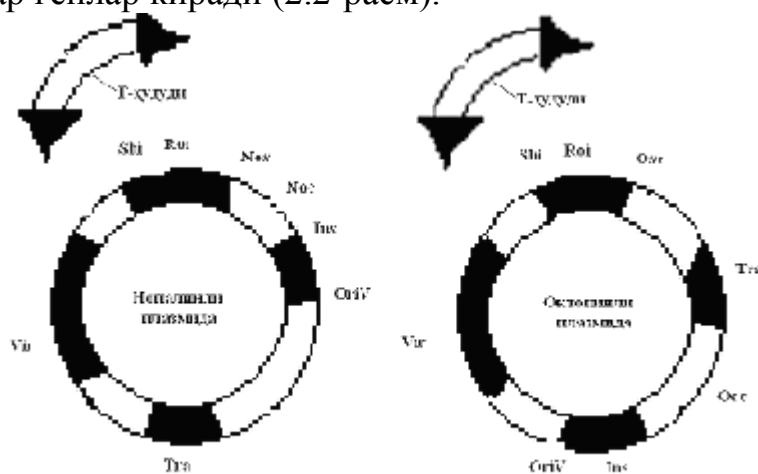


2.1-расм. Т-ДНК нинг ўсимлик хромосомасига интеграцияси ва (гардишсимон) шиш ҳосил бўлиши (по Э.С. Пирузян бўйича).

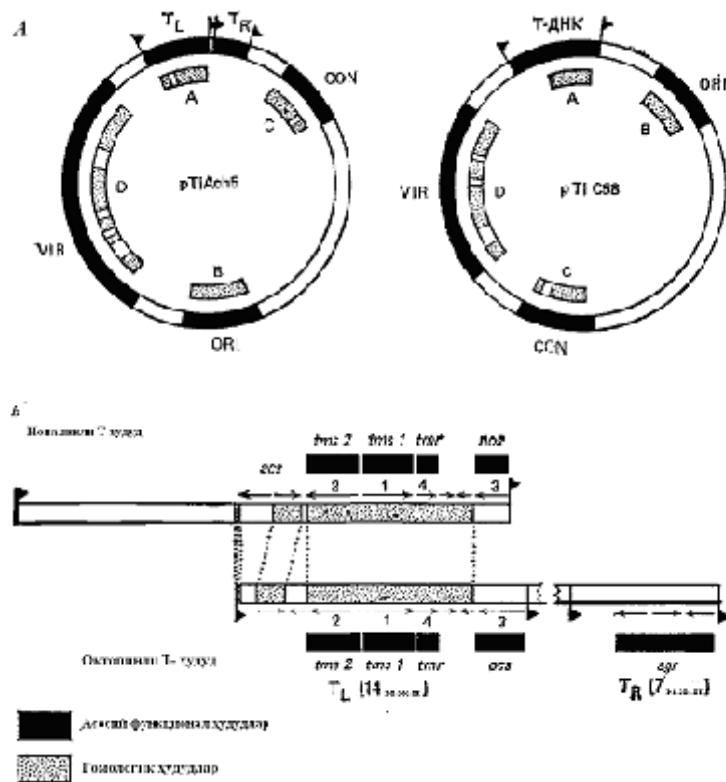
Ti – плазмида узунлиги 200 м.н.ж (минг нуклеотид жуфт) дан иборат ҳалқасимон ДНК дан ташкил топган. У бактерия ҳужайраларида автоном

репликация бўла олиш хусусиятига эга. Ti – плазмидаларни улар синтезлайдиган опинлар типига кўра 4 та гуруҳга бўлиши мумкин. Кўпинча нопалин ёки октопин аминокислоталарини кодирлайдиган Ti – плазмидалар учрайди. Агробактерия хужайраси плазмидаларнинг фақат бири октопин ёки нопалин кодирлайдиган типини сақлаши мумкин.

Генетик тадқиқотларнинг кўрсатишича, барча Ti – плазмидалар ўхшаш тузилишга ва икки хил: 1) агробактериянинг ўзини метаболизми учун зарур (опинлар катаболизми генлари, плазмидалар репликацияси бошланғич нуқтаси ва ҳ.к.); 2) ўсимлик хужайралари трансформацияси учун зарур бўлган гуруҳга мансуб кетма-кетликларга эга гуруҳларга бўлиш мумкин. Бунда шуни алоҳида қайд этиш лозимки, биринчи гуруҳ генлари промоторининг прокариот типига эга ва фақат бактерия хужайрасидагина фаолият юрита олади, иккинчи гуруҳ генлари эса ўсимлик хужайрасида ҳам ишлай олади. Иккинчи гуруҳга шиш ҳосил бўлиши ва опинлар синтези учун жавобгар генлар киради (2.2-расм).



2.2.- расм. Ti-плазмиданинг тузилиши.



2.2. (б)- расм. Октопинли ва нопаинли типдаги Тi плазмиданинг тузилиши ва экспрессияси.

А – Ti-плазмиданинг асосий функционал хуудларнинг жойлашуви ва ўлчамини кўрсатувчи октопин (pTiAch5) ва нопаин (pTic58) типдаги харитаси. Иккала плазмиданинг ўта ўхшаш хуудлари қора рангда берилган. Байроқчалар билан тўғри кетма-кетликлар (25 м.ж.н) белгиланган. CON-конъюгация вазифасини кодирловчи хуудлар, ORI-репликация ва репликациянинг бошланиши (ориджин), VIR-вирулентлик хуудди; т-ДНК, T_L T_R - Т-ДНК тутувчи хуудлар (ингл.тилидан transferred).

Б. Октопин ва нопаин типдаги плазмидаларнинг Т-ДНК хариталари; асосий функционал доменлар, гомология ва транскриптлар хуудлари кўрсатилган. Транскрипция махсулотлари 3 (nos)-нопаинсинтетаза, 3(osc)- октопинсинтетаза, acs-агроцинопинсинтетаза, 1(tms1) триптофанмоноксигеназа, 2 (tms2)-индол-3-ацетамидгидролаза, 4 (tms)-диметилаллил (ДМА)-трансфераза, arg-агропин синтези учун зарур учта транскрипт.

Ўсимликни агробактериялар билан зарарланиши натижасидаги трансформацияси куйидагича кечади. Аниқланишича, агробактерия ҳам, Ti – плазида ҳам ўсимлик хужайраси ичига кирмайди, лекин Ti – плазмиданинг бир қисми ўсимлик хужайраси ядросига ўтиб, ўсимлик геномига жойлашиб олиши мумкин Ti – плазмиданинг бу фрагменти Т-ДНК (инглиз тилидан transforming DNA – трансформацияланувчи ДНК) деб номланади. Т-ДНК нинг узунлиги 25 м.н.ж. Т-ДНК охирларида уни плазида таркибидан қирқиш ва ўсимлик геномига интеграцияси учун зарур тўғри кетма-кетликлар (25 м.н.ж) жойлашган. Т-ДНК еттита ген: опинлардан бирини кодирлайдиган *nos* гени (нопаинсинтетаза) ёки *osc* (октопинтетаза)], шунингдек, шиш ҳосил бўлиш белгиларини кодирлайдиган олтита ген, улардан икkitаси ауксин синтези, биттаси цитокинин синтезини кодирлайдиган генларни тутати. Бу генлар экспрессияси натижасида хужайраларнинг гормонал статуси ўзгаради, бу

эса уларнинг дедифференциаллашуви ва шиш ҳосил бўлишига олиб келади.

T – ДНК нинг мавжуд бўлиши зарурий бўлса-да, трансформация жараёни учун етарли эмас. T-ДНК ни T_i – плазмидадан қирқиш ва уни ўсимлик хужайрасига ўтказишда T_i – плазмиданинг бошқа, яъни, T-ДНК дан ташқаридаги *vir* –худуди (вирулентлик худуди) жавобгардир. Vir худуди еттита локус – *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* дан иборат бўлиб, 40 м.ж.н. дан иборат районни ташкил этади.

Бажарадиган вазифасига кўра *vir* генларни 2 та синфга бўлиш мумкин:

1. *virA* ва *virG* регулятор генлари, оз миқдорда бўлса ҳам агробактерия хужайраларида доимий экспрессия бўлиб туради;

2. *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* генлари T-ДНК ни ўсимликка бевосита кўчириб ўтказилишини таъминлайдиган оксилларни кодирлайди ва улар фақат промоторлари бевосита фаоллашганидан сўнг экспрессия бўлади.

Агробактериялар ёрдамида ўсимликлар трансформацияси амалга оширилиши учун учун учта шарт бажарилиши лозим:

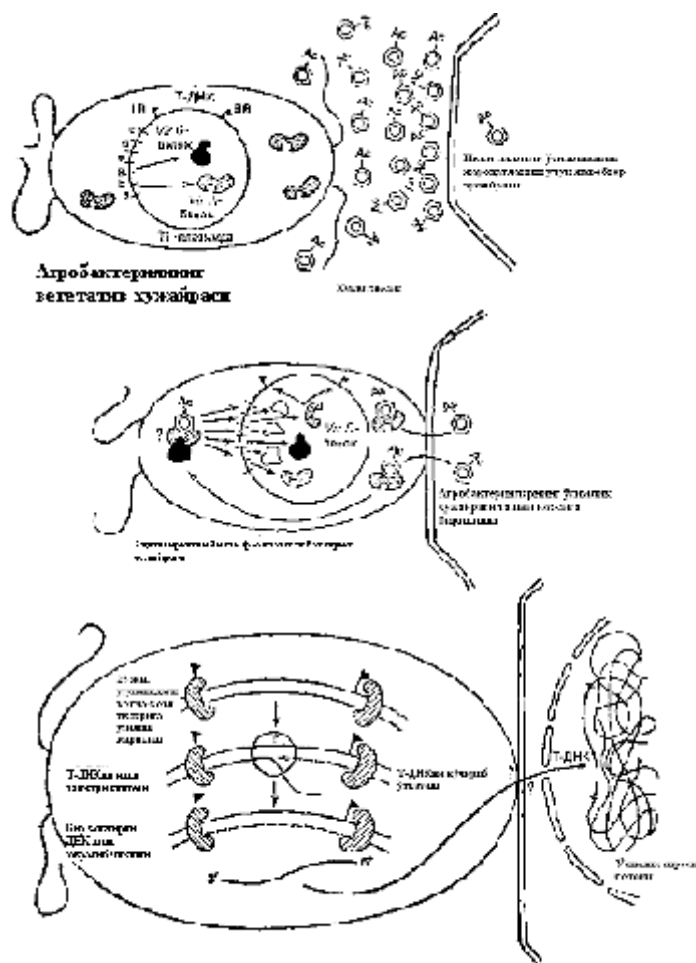
- бактерия хужайраси юзасида бактериянинг ўсимлик хужайраси билан бирикиши учун зарур махсус полисахаридлар синтезини амалга оширувчи тўртта генни агробактериялар хромосомасидаги фаоллашуви;

- T_i – плазмиданинг *vir* –худуди, яъни ДНК нинг ўсимлик хужайраси ядросига кўчириб ўтказилиши инициацияси учун зарур қисмининг фаоллашуви;

- T-ДНК нинг мавжуд бўлиши.

Ўсимликлар трансформацияси жараёни агробактериянинг ўсимлик хужайрасига жароҳатланган қисм орқали кириб бориб бирикишидан бошланади. Жароҳатланганда ўсимлик хужайраси ташқи муҳитга махсус фенолли бирикма – ацетосиренгон ажратиб чиқаради.

Юқорида таъкидлаб ўтилгандек, *virA* гени агробактерия хужайрасига мунтазам равишда экспрессия бўлиб туради ва VirA оксили ацетосиренгоннинг мембрана рецептори ҳисобланади. Ўсимликлардан ажратиб чиқариладиган ацетосиренгон VirA оксили орқали танилади, у эса ўз навбатида, агробактерия хужайрасига доимо экспрессия бўлиб турадиган бошқа оксил VirG нинг фаоллашувига олиб келади. VirG оксили бошқа *vir* генлари - *virC*, *virD*, *virB*, *virE*, *virF* – генлари транскрипциясини фаоллаштиради ва мазкур генларнинг промотор қисмлари билан боғланиб, уларнинг экспрессиясига сабаб бўлади (2.3 – расм).



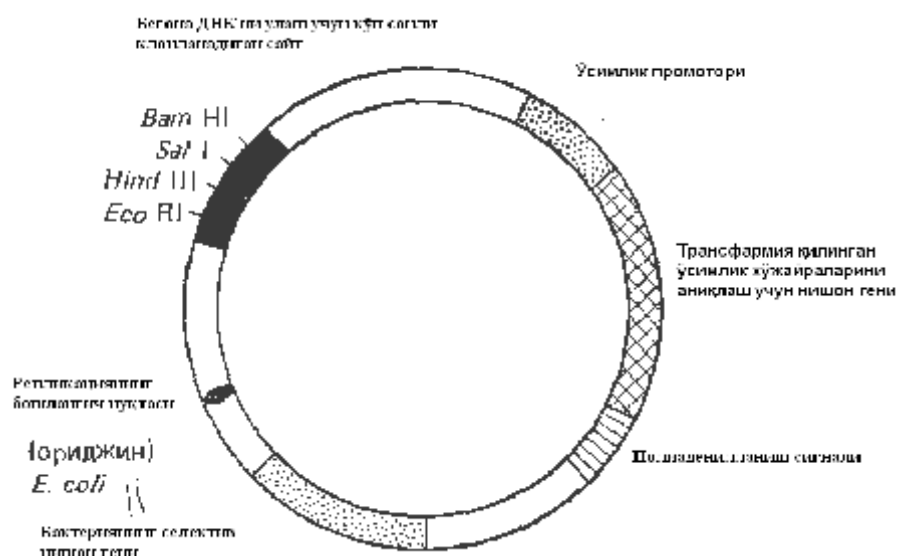
2.3 - расм. Агробактерияларнинг ўсимлик хужайраси билан таъсирланиш ва Т-ДНКни кўчириб ўтказилиши схемаси

vir C, *virD*, *virB*, *virE*, *virF* генларининг оксил маҳсулотлари Т-ДНК билан боғланиб, унинг *Ti* – плазмида таркибидан қирқилиши ва ўсимлик геномига уланишини таъминлайди. *VirD* оксили бир занжирли қирқишни аввал ўнг томондаги Т-ДНКнинг 25 м.ж.н кетма-кетлигида бошлаб, кейин чап томонидаги кетма-кетликда давом эттиради. Олинган Т-ДНК нинг бир занжирли ипи у билан боғланадиган *VirE* оксили билан ҳимояланади. Т-ДНК нинг ўнг чегараси (*overdrive* деб номланувчи қисми) атрофида жойлашган маълум кетма-кетлик билан боғланади. *VirC* оксили билан бирга, *VirE* ва *VirF* оксиллари Т-ДНК нинг кўчиб ўтиши ва ўсимлик хужайраси ядросига интеграциясини таъминлайди. 11 та *VirB* оксили *VirD* билан махсус кўприк ҳосил қилади, Т-ДНК агробактериялардан ўсимлик хужайрасига у орқали ўтади. Т-ДНК ўзининг қўш занжирли структурасини тиклайди ва ўсимлик геномига жойлашади.

Шундай қилиб, ўсимлик хужайраси трансформацияси амалга ошади. Ҳозирги вақтда Т-ДНК нинг кўчириб ўтказилишида иштирок этадиган барча оксиллар ва механизмлар охиригача тўлиқ ўрганилмаган.

Ti – плазмидалар асосида трансформация қилиш учун векторлар.
 Ti – плазмиданинг нодир биологик хусусиятлари уни генларни кўчириб ўтказишдаги идеал табиий векторга айлантиради. Ti – плазмидаси ҳўжайинларнинг кенг спектрига эга, у Т-ДНК ни ўсимлик хромосомасига ўтказди, у ерда Т-ДНК репликацияси амалга ошади ва унинг генлари оксил ҳосил қилиш билан трансляция бўлади. Т-ДНК чегаралари узунлиги 25 нуклеотид жуфтликлардан иборат такрорланувчи тўғри кетма-кетликлардан иборат бўлиб, бу кетма-кетликлар оралиғига уланган ҳар қандай бегона ДНК бўлагига ўсимлик ҳужайрасига ўта олади. Бироқ Ti – плазмидаси билан ишлаш унинг катта ўлчамдалиги сабабли қийинчилик туғдиради, анъанавий усулларни қўллаб, генни плазмидага улаб бўлмайди. Шунинг учун Ti – плазмида ген муҳандислиги усуллари ёрдамида модификация қилиниб, унинг асосида ўсимликлар трансформацияси учун векторлар олинган (2.4 - расм).

Бундан ташқари, шуни қайд этиш лозимки, ўсимликларни табиий Ti – плазмидаси билан трансформацияси натижасида, трансформант ҳужайралар регенерация бўла олмайди, чунки уларда шиш ҳосил бўлиш белгиларини кодирлайдиган Т-ДНК ҳудудининг олтига гени фаоллиги сабабли дифференциалланиш хусусияти тўхтатилган бўлади. Агар дифференциаллашувни блоkirлайдиган генлар кетма-кетлигини Т-ДНК дан қирқиб олиб ташланса, трансформант ҳужайралар регенерация қилиш хусусиятини тиклайди. Шунинг учун Ti – плазмидаларидан фойдаланишда шиш ҳосил қилиш ва опинлар синтези учун жавобгар генлар кетма-кетлиги қирқиб олиб ташланади, Т-ДНК нинг фақат ўсимлик геномига кўчириб ўтказиш учун зарур фрагменти (энг аввало чап ва ўнг чегара такрорий кетма-кетликлари) ни қолдирилади. Кейин Т-ДНК ҳудудига ўсимлик геномига киритилиши лозим бўлган бегона генлар жойлаштирилади.

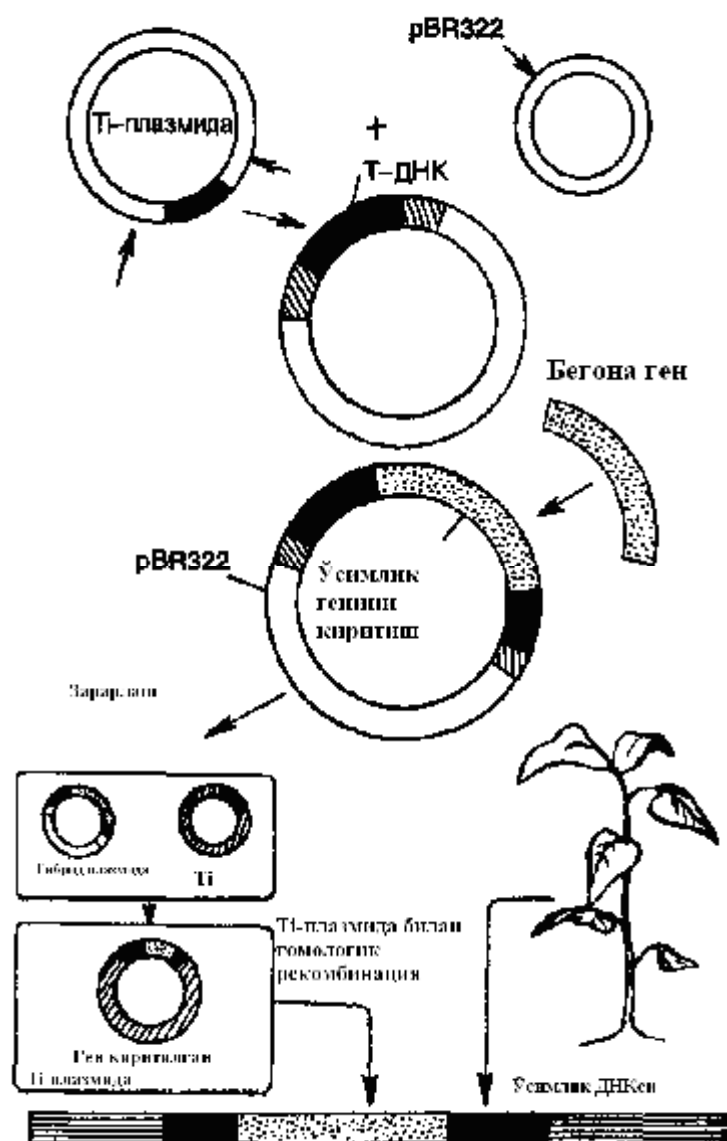


Расм. 2.4. ДНК орқали генларни кўчириб ўтказиш учун фойдаланиладиган вектор тузилишининг умумий схемаси.

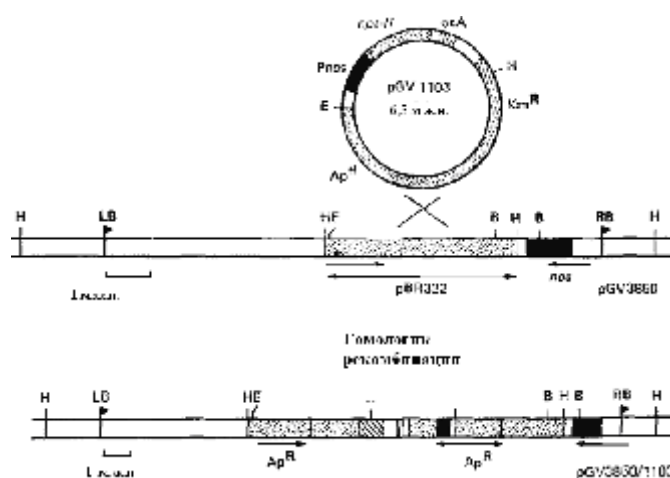
Коинтегратив векторлар. Бегона ДНК ни ўсимлик геномига киритилишни осонлаштирувчи усуллардан бири коинтегратив векторлардан фойдаланиш бўлиб ҳисобланади. Бу йўналишнинг моҳияти қуйидагича (2.5 а- расм). Бегона генни ўсимлик геномига кўчириб ўтказишдаги барча жараёнларни 2 босқичга бўлинади: ўсимлик геномига киритилиши лозим генни клонлаш ва ўсимлик ҳужайраси геноми трансформациясини амалга ошириш. Бу иккала босқич турли хил векторлар ёрдамида амалга оширилади.

Керакли генни клонлаш учун ёрдамчи (оралиқ) вектор сифатида *E. coli* асосидаги плазмидалардан фойдаланилади. Уларга Т-ДНК нинг чегараланган Т-ДНК кетма-кетликлари фрагменти ва селектив (одатда, антибиотиклар канамицин, гигромицин ёки гербицидга) чидамлилик белгисини кодирлайдиган гени жойлаштирилади, бу эса келгусида трансген ўсимликларни танлашни амалга ошириш имконини беради. Бундай вектор кичик ҳажмга эга, ундан Т-ДНК ҳудудига керакли ген кетма – кетлигини улаб, клонлаш мақсадида фойдаланилади.

Конъюгация йўли билан бундай оралиқ векторни ўсимлик геномига Т-ДНК қисмининг интеграцияси учун зарур бўлган генларни сақлайдиган бошқа векторга эга махсус *Agrobacterium tumefaciens* штамми ҳужайраларига кўчириб ўтказилади. Бу вектор муайян ўлчамга эга ва у *Ti* – плазмиданинг *vir*-ҳудуди, Т-ДНК нинг чегараланган кетма-кетликларига эга ва оралиқ векторларга аналогик *pBR322* плазмидаси фрагментларидан ташкил топган. Конъюгациядан сўнг иккала векторнинг гомологик қисмлари ўртасида рекомбинация амалга ошади, бунинг натижасида оралиқ векторнинг керакли ген ва селектив маркер тутувчи қисми *vir*-ҳудуди ва Т-ДНК нинг чегаланган кетма-кетликлари билан бирга иккинчи векторга кўчириб ўтказилади. Шундай қилиб, иккита плазмида ўртасидаги рекомбинация натижасида коинтегратив вектор олинади (2.5. б-расм). Бундай коинтегратив векторга эга агробактерия ҳужайралари селектив озиқа муҳитларида танлаб олинади ва келгусида ўсимликлар трансформацияси учун қўлланилади.

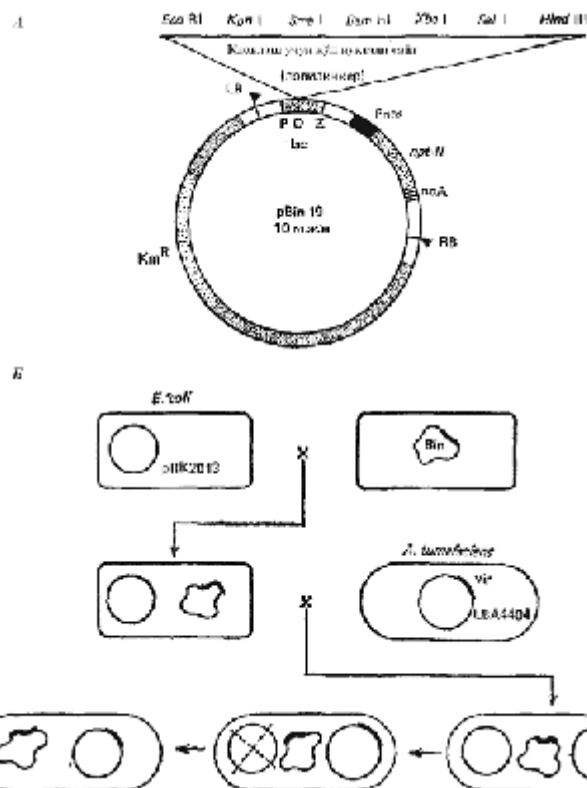


2.5 а-расм. Тi-плазмидадан ўсимлик хужайраларига генларни кўчириб ўтказишда вектор сифатида фойдаланиш.



2.5.6- расм. Коинтегратив векторнинг тузилиши ва қўлланилиши.

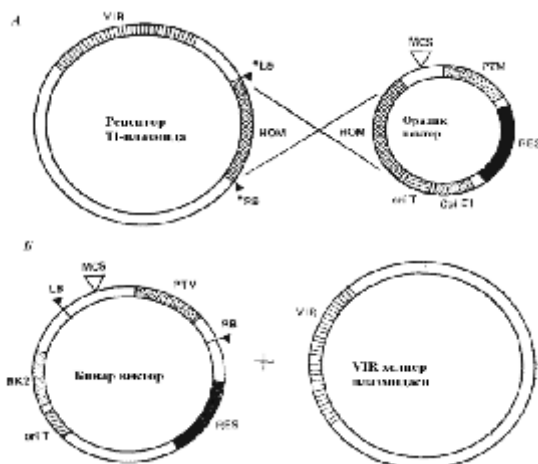
Бинар векторлар. Бегона ДНК ни кўчириб ўтказишнинг бошқа хил бирмунча содда, кенг қўлланиладиган услубларидан бири бинар векторлардан фойдаланиш ҳисобланади. Илгари қайд этилганидек, агробактериялар билан ўсимлик хужайрасини зарарлантириш ва жавобгар *vir* –худуди трансформацияни амалга ошириш учун ДНК ни кўчириб ўтказиш ва Т-ДНК районини чегараловчи тўғри такрорий кетма-кетликлар зарурдир. Бундан ташқари *vir* худуди ва ДНК нинг чегараловчи такрорий кетма-кетликлари битта плазмида таркибида жойлашган бўлиши муҳимдир. Бинар векторлар тизими шунга асосланганки, ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган агробактерия хужайрасида бир вақтнинг ўзида иккита плазмида жойлашган бўлади. Улардан бири Т-ДНК нинг чегараланган қисмлар кетма-кетликларига эга бўлса, иккинчиси *vir* худудига эга бўлади. Иккала плазмида ҳам мустақил репликация бўла олади, лекин алоҳида ҳолда ўсимликлар трансформациясига сабаб бўла олмайди. Бунда Т-ДНК тутувчи плазмида ўз таркибида *E.coli* плазмидаси фрагментлари (жумладан, репликациянинг бошланғич нуқтасини) тутади, бу эса *E. coli* хужайраларида клонлаш бўйича барча манипуляцияларни амалга ошириш ва барча жараёнлар (соддалаштириш) ни осонлаштириш имконини беради. Коинтегратив векторга аналогик ҳолда керакли (мақсадли) ген ва селектив маркер гени Т-ДНК худудига уланади, шундан сўнг бундай рекомбинант плазмида *vir*-худудига эга бошқа плазмида сақловчи агробактериялар хужайрасига киритилади. Коинтегратив векторлардан фарқли ўлароқ, иккала плазмидалар ўртасида гомологик рекомбинация рўй бермайди ва улар ягона вектор молекуласига айланмайди. Битта плазмиданинг *vir*- генлари билан экспрессияланувчи оксилларни қирқиб, бошқа плазмиданинг бегона генлар билан бирга Т-ДНК худудини ўсимлик геномига жойлаштирилади. Ҳозирги вақтда бундай бинар векторлар ўсимлик хужайралари трансформацияси учун энг кўп қўлланилади (2.6 - 2.7 - расмлар).



2.6. расм. pBin19 бинар векторининг тузилиши ва қўлланилиши.

А. pBin19 бинар векторининг харитаси. LB, RB-чап ва ўнг чегаралар, lac-lac –опероннинг α -комплементар хуудди, P pos-нопалинсинтетаза гени промотори, hptII - Tn5нинг неомицинтрансфераза кетма-кетлигини кодловчи қисми, oriA -нопалинсинтетаза генининг полиаденилланиш нуқтаси, нуқталар билан pRK252 плазмидасининг RK кенг спектрли RK 2 плазмидаси репликацияси бошланғичини сақловчи кетма-кетликлари кўрсатилган.

Б. pBin19 плазмидасининг ёрдамчи плазида pRK2013 билан бирга *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404га кўчириб ўтказилиши ва агробактерияларда хелпер плазмиданинг йўқотилиши.



2.7.-расм.- Коинтегратив (А) ва бинар (Б) вектор тизимларини бириктилишининг схематик диаграммаси.

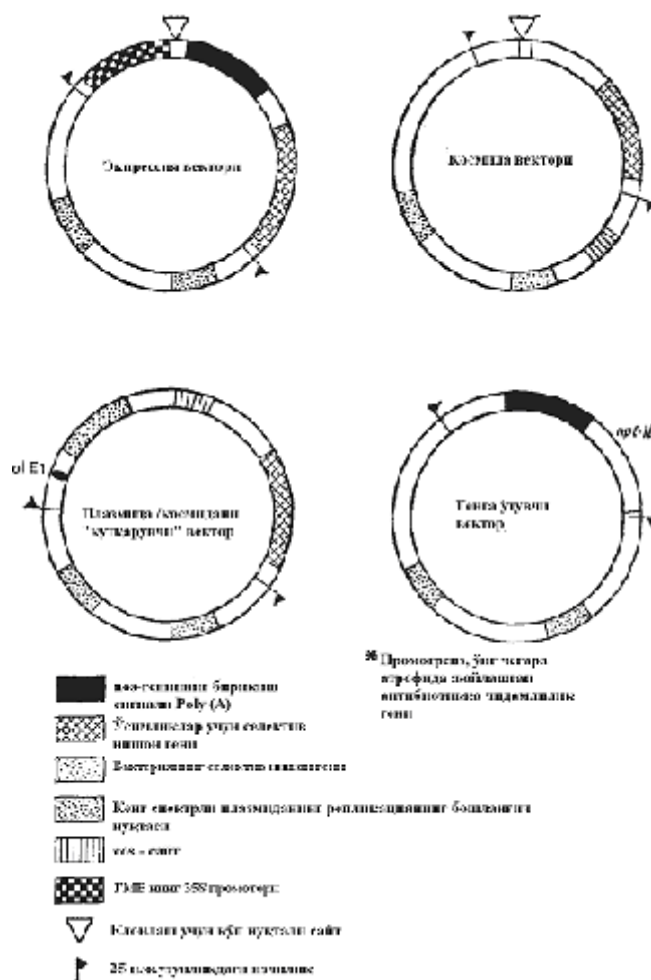
Ri – плазмидаси асосида ўсимликлар трансформацияси. *A. tumefaciens*нинг Ti- плазмидаларидан ташқари *A. rhizogenes* агробактериясидан ажратиб олинган Ri плазмидалари (инглиз тилидан Root inducing – ортиқча илдиз ҳосил бўлишини индуцирловчилар) ҳам ўсимлик ҳужайрасига трансформация бўлиш хусусиятига эга. Ri плазмидалар ҳам илдиз ҳосил бўлишини кучайтириб, Ti – плазмидалар каби опинлар синтезига сабаб бўлади. Бироқ Ri плазмидалар Ti – плазмидалардан фарқли ўлароқ, онкоген эмас, трансформациядан сўнг ўсимлик ҳужайралари соғлом, серҳосил ўсимликларни регенерация қилиш хусусиятига эга бўлади. Ҳозирги вақтда Ri- плазмидалари асосида ҳам ўсимликлар ген муҳандислиги учун кўплаб векторлар олинган.

ДНК сақловчи вируслар асосидаги ўсимлик векторлари. Кўпчилик фитовируслар генетик ахборот ташувчи сифатида РНК тутадилар. Ўсимликларни зарарловчи вирусларнинг фақат 1-2 % игина ДНК сақловчи бўлади. Айнан улар рекомбинант ДНК олиш технологиясида қўллаш учун жуда қулай ва ўсимликларга генларни кўчириб ўтказувчи векторлар учун асосий воситалар ҳисобланади. Бу борада карамгулдошлар оиласига мансуб ўсимликларни зарарлайдиган гулкарамнинг CaMV (cauliflower mosaic virus) мозаика вируси энг истиқболли бўлиб ҳисобланади. Бу вирус қисмлари диаметри 50 нм атрофида бўлиб, 8000 ж.н. узунликдаги ҳалқасимон ДНК тутади. CaMV геномининг катта бўлмаган ҳажми билан худди бактерия плазмидаси сингари вирус ДНК си билан *in vitro* шароитида ишлаш имкони мавжуд ва уни ўсимлик баргига ишқалаш орқали киритиш мумкин. Оз миқдордаги ҳужайраларни зарарлантириш яхлит ўсимликни зарарланишига олиб келади, чунки вирус ҳужайрадан – ҳужайрага ўтиб тез тарқалади. Битта ўсимликни зарарлаш учун 1- 5 мкг ДНК қўлланилганда, агробактериялар билан зарарлантиришга нисбатан бир мунча юқори, деярли 100 % га етадиган самарадорликка эришилади.

Инфекциядан сўнг CaMV ДНК сининг ҳўжайин ўсимлик геномига тўғридан - тўғри интеграция бўлиш йўли ҳали аниқланмаган. Инокуляциядан сўнг вирус ДНК сини тўғридан – тўғри геномга жойлашишини амалга ошириш учун махсус усул агроинфекция ишлаб чиқилган. Бунинг учун Т-ДНКга CaMV геноми жойлаштирилади ва ушбу геном унинг таркибида турли ўсимликларнинг ядро геномига интеграция бўлади, бунда CaMV таркибидаги унинг вирулентлигини таъминлайдиган кетма-кетликлар қирқиб олиб ташланади.

Вируслар асосидаги вектор тизимларнинг афзалликларига қуйидагилар: геномининг кичик ўлчами (бу вирус ДНКси билан осон ишлашни таъминлайди); зарарланган ўсимлик ҳужайраларида вирус ДНК си нусхаларининг кўплиги (бир ҳужайрага 50000 гача); бегона генлар экспрессияси самарадорлигини таъминлайдиган кучли промоторларнинг мавжудлигини киритиш мумкин.

Хулоса қилиб шуни айтиш мумкинки, ўсимликлар трансформациясида вируслар асосидаги векторлар кам қўлланилса-да, вирус промоторлари, айниқса, CAMV 35S РНК промотори бегона генларни бошқа вектор тизимларига экспрессия қилишда кенг фойдаланилади (2.8 - расм). Гулкарам мозаикаси вирусининг 35S РНК промотори кучли промотор ҳисобланади, бундан ташқари у нафақат карамгулдошлар оиласи вакилларида, балки кўплаб оила вакиллари ҳисобланган ўсимлик ҳужайраларида ҳам фаолдир. У тўқима спецификлигига эга эмас ва трансформант ўсимликларнинг барча ҳужайраларига экспрессия бўла олади.



55

Кўчиб юрувчи генетик элементлар (транспозонлар) асосидаги векторлар. 90-йилларда ўсимлик хужайралари трансформацияси учун ўзига хос тузилишига эга ва геном бўйлаб транспозиция бўла оладиган ДНК кетма-кетликлардан иборат кўчиб юрувчи генетик элементлар асосидаги векторлардан фойдаланила бошланди. Бошқа хил вектор конструкцияларга нисбатан қийинлашганда бундай векторларни қўллаш қандай афзалликларга эга? Мазкур усулнинг моҳияти шундаки, кўчиб юрувчи генетик элементлар ўсимлик хромосомасига бирламчи интеграциясидан сўнг қирқиш ва кетма-кет жойланиш йўли билан геном бўйлаб ўрнашиб олади. Ўсимликлар учун Ac/Ds векторлар тизими кенг қўлланилади.

Ac (Activator) – 1940 йилларнинг ўрталарида маккажўхори геноми махсус участкаларида хромосомада узилиш ва геномнинг махсус участкаларида ксиниллик ҳолатини чақириш хусусиятига кўра, биринчи марта генетик усуллар ёрдамида Барбара Мак Клинтон томонидан идентификация қилинган. Ac- элементлари геном бўйлаб фаол транспозиция бўлиш хусусиятига эга кўчиб юрувчи генетик элементлар гуруҳига киритилади.

Транспозонларнинг бу оиласига бирламчи структураси жиҳатидан Ac-элементига қардош бўлган, бироқ ички районларидаги делециялари туфайли геномга мустақил жойлаша олмайдиган Ds – элементлари гетероген гуруҳи ҳам киритилади, бунда транспозициялар эҳтимоли фақат Ac – элементлари махсус оксиди транспозоаза иштирокида амалга ошади.

Аниқланишича, Ac–элементлари маккажўхори ўсимлигидан ташқари бошқа хил ўсимликлар: арабидопсис, сабзи, картошка, помидор, шоли ва ҳ.к. геномларида ҳам фаол бўлиши мумкин экан. Арабидопсис ўсимлиги геномида Ac–элементлари транспозицияси қонуниятларини тадқиқ қилиш бўйича тажриба натижаларининг кўрсатишича, Ac- кўчиб юрувчи элементлари асосидаги конструкциялардан *нишонланган транспозициялар тизимини* олишда фойдаланиш мумкин, шунингдек, *қопқон (enhances trap lines) номли генлар линияларини* яратиш янги генлар, жумладан тўқимага хос экспрессия, яъни, маълум бир тўқималарда транскрипция ва трансляцияга учрайдиган генлар гуруҳини идентификация қилиш имконини беради. Шундай қилиб, муайян тўқималарга хос бўлган, масалан, илдиз, муртак халтаси ва ҳ.к. тўқималарига хос генлар ва оксидларни идентификация қилиш (ва келгусида амалиётда қўллаш) мумкин. Бундай векторларда репортер генларни қўллаш транспозонли конструкциялардаги интеграциянинг янги сайтларни белгилаш ва инсерция жойларини аниқлаш имконини беради. Улар функционал генларнинг кетма-кетлиги атрофи ёки бевосита ўзига ўтиб олиб, унинг кейинги клонланиши ва секвенс қилинишига шароит яратади, шунинг

учун бундай типдаги плазмида- векторларни - ген тутгич (копқон) деб аталади.

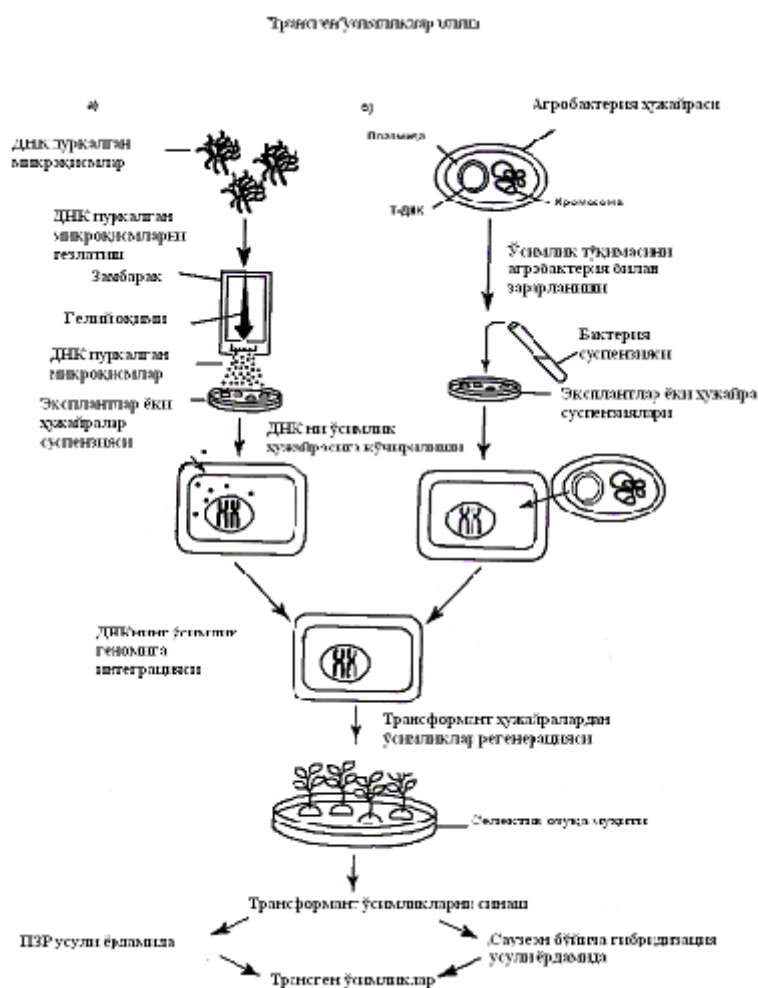
Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари

Икки паллали трансген ўсимликлар олишда энг кенг тарқалган усуллардан бири агробактериялар билан кокультивация қилиш усули ҳисобланади (2.9. - расм). У ўсимлик эксплантларини Т-ДНК худудига бегона ген жойлаштирилган вектор конструкцияга эга агробактериялар билан трансформация қилишга асосланган. Унинг кенг тарқалганлигининг сабаби, трансформацияни амалга оширишнинг бирмунча соддалиги трансген ўсимликларни ажратиб олишда юқори (ўсимлик турига қараб, 10-60 %) самарадорлиги билан изоҳланади.

Дастлабки материал учун вектор (бинар, коинтегратив ёки муайян трансформация тури учун яроқли бошқа бирор) конструкцияга эга бўлган агробактерия штамми бўлиши лозим. Вектор ўсимлик геномига киритилиши лозим бўлган ген кетма-кетлигига эга бўлиши керак. Геннинг келиб чиқиши (прокариот ёки эукариот) трансформация учун аҳамиятсиздир, лекин у ўсимлик хужайрасига экспрессия бўла оладиган промотор назорати остида бўлиши лозим. Функционал гендан ташқари, вектор, албатта, трансформациянинг селектив нишон белгисини сақлаши шарт. Бундай нишон белги сифатида антибиотиклар: канамицин (*npt*-гени), гигромицин (*npt*-гени) ва ёки гербицидлар хлорсульфурон (*ALS*-гени), фосфинотрицин (*bar*- гени) (*BASTA*) га чидамлилик белгисини юзага чиқарадиган генлар ишлатилади. Бундан ташқари, реципиент – ўсимлик навларини танлаб олиш лозим. Трансформация учун эксплант сифатида стерил ўсимлик барг пластинкалари олинади. Бироқ бунинг учун ёш илдизлар (арабидопсисда), гипокотил (помидорда), уруғпалла (помидор, бақлажонда), бўғим оралиғи (картошкада) ҳам ишлатилиши мумкин.

Эксплантларни вектор конструкцияли агробактериялар сақловчи суюқ муҳитида инокуляция қилинади. Инокуляция қилиш муддати ҳар бир тур ўсимлик учун алоҳида танлаб олинади. Бунда эксплантнинг жароҳатланган юзасида хужайраларнинг зарарланиши бошланиб, кокультивациядан сўнг 24 – 48 соат ўтгач, Т-ДНК бўлагини бегона (танлаб олинган) ген билан бирга ўсимлик геномига жойлашиши содир бўлади. Шундан сўнг, эксплантларни антибиотиклар (карбенициллин ёки цефотаксим) сақловчи озиқа муҳитига ўтказилади, бу агробактерия хужайраларнинг танлаб нобуд бўлишига сабаб бўлади. Бундан ташқари, озиқа муҳитига керакли (тўғридан-тўғри регенерация ёки каллус ҳосил бўлиши учун) фитогормонлар ва трансформант хужайраларни селектив танлаб олиш учун антибиотиклар, гербицид қўшилади. Антибиотик ёки

гербицидга чидамлилик генларининг экспрессиясини амалга оширувчи трансген ўсимликлар селектив агент қўшилган муҳитда ўса олса, трансген бўлмаган ўсимликлар бундай муҳитда nobуд бўлади. 2-5 ҳафтадан сўнг трансформант эксплантлардан поялар ўсиб чиқа бошлайди, уларни ажратиб олинади ёки кейинги қўшимча молекуляр таҳлиллар учун тупроққа қўчириб ўтказилади (2.9. а – расм).



2.9. расм – Трансген ўсимликларни олиш схемаси.
а)-биобаллистикалар усули; б)-агробактериялар билан
кокультивация

Протопластлар шу йўсинда трансформация қилинади, лекин бу усулдаги трансформация протопластларнинг ўзида регенерация қилиш қобилияти сустлиги учун кам самара беради.

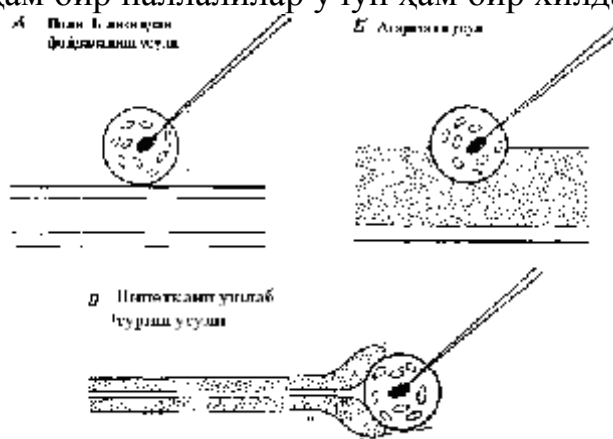
Агробактериялар билан кокультивация қилиш усули орқали ҳозирги кунга қадар деярли барча икки паллали қишлоқ хўжалик экинларидан трансген ўсимликлар олинган. Бу усул баъзи бир паллалилар (буғдой, маккажўхори, шоли)да ҳам ўз ифодасини топган.

Ўсимликларга генларни тўғридан - тўғри кўчириб ўтказиш. Ўсимлик хужайраларига генларни тўғридан-тўғри кўчириб ўтказишда ўсимлик протопластларининг трансформацияси кенг қўлланилади. Ўсимлик хужайра деворига ферментлар (целлюлаза, пектиназа) билан ишлов берилганда хужайра девори емирилиб, фақат протопласт қолади. ДНК иштирокида протопластларни тўғридан - тўғри трансформациялаш усули ишлаб чиқилган. Трансформациянинг бирмунча юқори самарадорлигига (10^{-2}) электропорация ва полиэтиленгликол қўшиш усули орқали эришиш мумкин. Агробактериялар билан трансформация қилишга нисбатан, тўғридан - тўғри кўчириб ўтказиш усулининг частотаси кам бўлса-да, бирмунча афзалликларга эга. Вектор махсус биологик сигналлар ва трансформация функциялари (Т-ДНК худуди билан чегараланган ва *vir*-худуди) га эга бўлмаслиги ҳам мумкин. Трансформация учун деярли ҳар қандай бегона ген тутувчи ДНК вектори қўлланилиши мумкин. Бунда гибрид ген (фақат тегишли регулятор худудлар мавжуд булганида) хужайра рекомбинацияси механизмларидан фойдаланиб, айниқса, протопласт ядросига тўғридан - тўғри инъекция қилишда ўсимлик ядро ДНКсига интеграция бўлади ва экспрессияланади.

Ҳозирги вақтда 140 дан ортиқ ўсимлик турлари вектор ДНКсини протопласт хужайраларига турли усуллар билан кўчириб ўтказиш орқали трансформация қилинган.

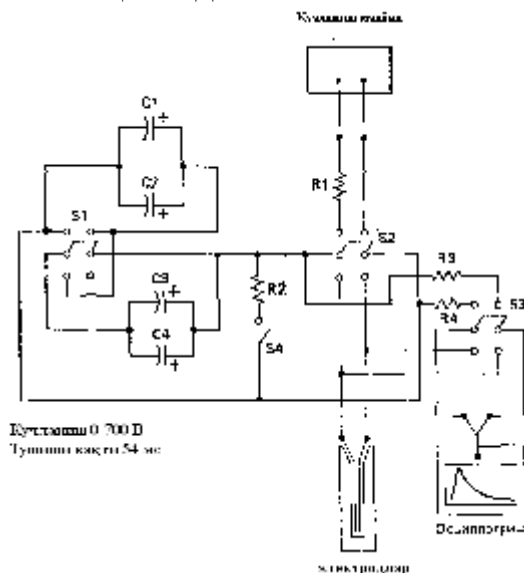
ДНК микроинъекцияси. Бир қатор тажрибаларнинг кўрсатишича, ўсимлик хужайралари трансформацияси учун ҳайвон хужайраларидаги микроинъекциялар сингари ДНК микроинъекциялари усулини қўллаш мумкин. Бунда инъекция учун протопластлар олишда уларни полилизинли шишаларга ёпиштириш усуллари ишлаб чиқилганлиги қатор техник қийинчиликларни бартараф этиш имкониятини бери (2.10-расм).

Вектор типига боғлиқ бўлмаган ҳолда ўсимлик протопластлари трансформацияси самарадорлиги 10-15 % дан ошмайди, у икки паллали ўсимликлар учун ҳам бир паллалилар учун ҳам бир хилда мувофиқ келади.



2.10 – расм. Микроинъекцияни амалга ошириш учун протопластларни иммобилизация қилиш усули

Электропорация. Бу усул юқори импульсли кучланишларнинг биомембраналар ўтказувчанлигини қайтар даражада оширишга асосланган. Ўсимлик протопластлари учун электропорация муолажалари жуда самарали ҳисобланади. Усулнинг моҳияти куйидагича: ДНК- векторини сақловчи юқори концентрацияли эритмадаги ўсимлик протопластларига юқори вольтли импульс (кучланиш 200-350 В, импульс давомийлиги 54 мс) билан таъсир этилади (2.11-расм). Натижада ДНК молекулалари ҳужайра мембранасидаги поралар (тешикчалар) орқали ютилади. Эритма аралаштирилгандан сўнг протопластларни регенерация бўлиши учун етарли муҳитга экилади. Кўчириб ўтказишнинг самараси электр шокидан сўнг 24-28 соат ўтгач аниқланади.



2.11 - расм. Электропорацияни амалга ошириш учун паст кучланишли қурилманинг тузилиши

Липосомаларга жойлаштириш. Ўсимлик протопластларига ўтказиладиган экзоген генетик материални нуклеин кислоталарни парчалайдиган нуклеазалар таъсиридан химоя қилишда қўлланиладиган усуллардан бири липосомаларга жойлаштириш усули.

Липосомалар қобиғи фосфолипидлардан ташкил топган сферик шакллар ҳисобланади. Уларни фосфолипидларни сувли эмулсияларига ультратовушлар билан ишлов бериш ёки қаттиқ чайқатиш натижасида олиш мумкин. Липосомалар ёрдамида ўсимлик протопластларига тамаки мозаикаси вируси РНК си, *A.tumefaciens* бактерияси *Ti* – плазмидаси ДНК си, шунингдек, бутун метафаза даври хромосомалари киритилган. Липосомалар ёрдамида кўчириб ўтказиш тизимларнинг афзалликлари сифатида уларнинг ҳужайраларга нисбатан захарлилигининг камлиги, липосомаларни парчалаш хусусиятига эга ҳужайралари бўлган кўплаб ўсимликларда ишлатиш мумкинлигини кўрсатиш мумкин. Ҳозирги вақтга келиб, мазкур усул техник жиҳатдан қийинлиги ва трансформациялаш

фаоллигининг нисбатан кам (0,5-1 %) лиги учун тобора кам фойдаланилмоқда.

Биобаллистик трансформациялар усули. Биобаллистика усули бугунги кунга келиб, бир паллалилар учун энг самарали усуллардан ҳисобланади, шунингдек уни икки паллали ўсимликларда ҳам муваффиқият билан қўллаш мумкин. Трансформация учун дастлабки материал сифатида културалар суспензияси, каллус тўқимаси ёки бир паллалиларнинг етилмаган муртак ўсимталари олинади.

Мазкур усулнинг моҳияти шундан иборатки, диаметри 0,6-1,2 мкм бўлган вольфрам, олтин ёки платина бўлакчалари трансформация учун зарур ген конструкциялари сақловчи ДНК устидан пуркалади. ДНК тутувчи вольфрам, платина ёки олтин бўлакчалари целлофан қобик билан ўралиб, биобаллистик замбарак ичига жойлаштирилади. Каллус ёки ҳужайра суспензияси агарли озиқа муҳити солинган Петри лycopчасига ўтказилади ва биобаллистик замбарак рўпарасига 10-15 см масофада жойлаштирилади. Замбаракдаги босим вакуум насос билан 1,0 атм гача туширилади. Босим тушириладиган вақтда замбаракдан вольфрам ёки олтин бўлакчалари отилиб чиқиб, ҳужайра деворини ёриб ўтади ва цитоплазмага, ҳужайра ядросига ўтади.

Одатда бевосита марказда жойлашган ҳужайралар вольфрам ва олтин бўлакчаларининг кўплаб келиб урилиши ва жуда кучли босими туфайли нобуд бўлади, улардан 0,6-1 см марказдан узоқда эса трансформант ҳужайралар жойлашади. Шундан сўнг ҳужайраларни давомли экиш ва регенерация қилиш учун озиқа муҳитларига кўчириб ўтказилади.

Биобаллистик замбараклар ёрдамида бир паллали маккажўхори, шоли, буғдой, арпа ўсимликлари трансформация қилиниб, турғун трансген ўсимликлар олинган. Бундан ташқари биобаллистик трансформация ДНК ни эмбриоген чангчига тўғридан-тўғри кўчириб ўтказиш, трансген дигаплоид ўсимликлар олиш учун қўлланилади ва у селекция ишларида муҳим босқич ҳисобланади. Бу усул билан тамаки ўсимлигининг трансформацияси амалга оширилиб, гаплоид ўсимликлар регенерациясидан сўнг турғун трансформантлар олинган.

Ўсимликлар трансформациясининг далиллари. Ўсимликлар трансформацияси векторлари таркибига функционал гендан ташқари селектив нишон генлари киради. Бу ген одатда антибиотиклар канамицин (*nptII* -гени) ёки гигромицин (*nptII*- гени) га чидамлилиқ генларини кодирлайди, шунинг учун трансген ўсимликларни дастлабки танлов ишларини тегишли антибиотиклар сақловчи озиқа муҳитларида олиб борилади. Бундай муҳитда геноми таркибида селектив нишон гени бўлган ўсимликларгина регенерация қила олади. Бироқ селектив муҳитда ўса олиш хусусиятининг ўзи ўсимликнинг трансген табиатини исботловчи ягона далил бўла олмайди.

Т-ДНК кетма-кетликлари борлигини тўлиқ исботлашда полимераза занжир реакцияси (ПЗР) таҳлили ва Т-ДНК бўлагини радиоактив зонд сифатида қўллаш орқали трансген ўсимлик хромосома ДНК сининг блот – гибридизациясига асосланган молекуляр таҳлили ўтказилади. Бундай таҳлилларни ўтказиш жуда қimmat турса-да, олинган натижалар трансформация амалга ошганлиги, Т-ДНК – конструкцияларнинг қанчаси ўсимлик геномига ўрнаша олганлиги тўғрисида ишончли маълумот олиш имконини беради. Бундан ташқари, функционал ген экспрессиясининг қўшимча таҳлилинини тегишли мРНК ёки оқсилни аниқлаш усуллари орқали амалга оширилади.

Ўсимлик геномига бегона генларнинг экспрессияси

Бегона генларнинг ўсимлик геномига экспрессияси натижасида бир қатор муаммолар келиб чиқади. Биринчи марта ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган генлар бактериялардан ажратиб олинган бўлиб, уларни ўсимлик хужайралари трансформацияси учун тўғридан –тўғри ишлатиб бўлмасди.

Бактерия генлари эукариот хужайраларда транскрипция бўлиши учун уларнинг промотор кетма-кетликларини ўсимлик генлари промоторлари ёки бошқа ўсимлик хужайрасида транскрипцияни инициация қила оладиган промоторларига алмаштириш лозим бўлади. Бундан ташқари, бактериал геннинг 3 - қисмига полиаденилланиш сигналинини сақловчи фрагментни улаш лозим. Бундай модификациялар эукариот РНК – полимеразанинг бактериал кетма-кетликни транскрипциялаши ва ундан сўнг мРНК ўсимлик хужайрасида бактериал оқсилни трансляция қилиш учун керак бўлади.

Бактериал генларнинг экспрессияси учун промотор сифатида кўпинча гулкарамнинг мозаика вируси (CaMV)нинг 35S – РНК промоторидан фойдаланилади. Бундай танлов бир вақтнинг ўзида икки хил муаммони ҳал этиш имконини беради: биринчидан, икки паллали ўсимликлар промоторлари бир паллалилар геномида кўп ҳолларда фаолият юритолмайди, аксинча, 35S CaMV промотори ҳар қандай ўсимлик геномида транскрипцияни таъминлайди. Иккинчидан, кўпгина эукариот промоторлари анча кучсиз бўлиб, CaMV нинг 35S промотори унинг назоратидаги геннинг юқори даражаги экспрессиясини таъминлайди. Кўпгина ҳолларда ўсимлик хужайрасига ўсимлик генини трансформация қилишда оқсил маҳсулоти ажралиб чиқишини ошириш учун унинг промоторини жуда кучли бўлган CaMV нинг 35S промотори билан алмаштирилади. CaMV 35S-промотори конститутив бўлиб, трансген ўсимликнинг барча тўқималарида унинг назоратидаги геннинг кучли экспрессиясини таъминлайди. Айнан шунинг учун CaMV 35S-промотори ўсимликлар трансформациясида қўлланиладиган вектор конструкциялар

ичида энг кўп қўлланилади. Кейинги йилларда баъзан CaMV 35S кетма-кетлигини икки карра кўпайтирилган нусхаси, сунъий олинган MAC - промоторидан ҳам фойдаланилмоқда.

Сўнгги пайтларда ўсимлик генларининг тўқимага хос промоторлари катта аҳамият касб этмоқда. Бу промоторларнинг CaMV 35S промоторидан афзаллиги шундаки, бундай промоторлар назоратидаги генлар маълум бир тўқималардагина экспрессия бўлади. Масалан, пататин промотори назоратидаги ҳар қандай ген фақат картошка ўсимлиги туганагига экспрессия бўлади, чунки пататин оксили – картошка туганаклари захира оксили бўлиб, унинг генлари фақат туганаклардагина экспрессияланади. Тўқимага хос промоторлар бегона оксил ўсимликнинг маълум бир аъзолари учун зарур бўлган ҳолларда қўлланилади. Масалан, ўсимликлар илдизини баъзи бир тупроқ патогенларидан ҳимоя қилишда илдизга хос промоторлардан фойдаланиш қулай, чунки улар ўсимликларнинг патогенлар билан муносабатга киришувчи фақат ер ости қисмидагина ҳимоя оксили синтезланишига олиб келади. Ўсимликлар учун бундай промоторлардан фойдаланиш бирмунча қулайдир.

Шунингдек индуцибел промоторлардан ҳам фойдаланилади. Конститутив CaMV 35S промоторидан фарқли равишда бундай промоторлар назоратидаги генлар ҳар доим ҳам экспрессия бўлавермасдан, фақат маълум шароитлардагина экспрессия бўлади. Масалан, жароҳатланишда индуцирланадиган промоторлар, металл ионлари (мис, темир, ва ҳ.к.) иштирокида юзага чиқадиган металл-индуцибелларини келтириш мумкин. Шундай қилиб, бундай промоторлар назоратидаги генларнинг «киритилиши ва ўчирилиши» осон бошқарилади. Индуцибел промоторлар нафақат ўсимликларда, балки, умуман, ген муҳандислигида кенг қўлланилади. Тўқимага хос ва индуцибел промоторларнинг камчилиги уларнинг фаоллигининг пастлигидадир.

Промоторлардан ташқари трансгеннинг экспрессияланишга унинг ўсимлик геномига интеграция бўлиш жойи ҳам таъсир кўрсатади. Т-ДНК кетма-кетлиги геномнинг исталган қисмига ўрнаша олади деб ҳисобланса-да, кўплаб тадқиқотларда бу ҳодиса тасодифан амалга ошмаслиги исботланган. Кўпинча Т-ДНК ген экспрессияси амалга ошмайдиган гетерохроматин участкаларига ўрнашади ва трансген ҳар қандай кучли промотор таъсирида ҳам транскрибировалмайди. Буни такрорий трансформациялар орқали ҳам англаб олиш мумкин.

Трансген ўсимликлар олишнинг илк босқичларида бегона генлар экспрессиясининг нишон белгилари – репортер генлардан фойдаланилади. Одатда, репортер генларнинг махсулотлари оддий усуллар билан осон аниқланади. GUS деб номланувчи репортер генидан кенг фойдаланилади, у β - глюконаза ферментини кодирлайди ва субстратга қўшилганда уни оч ҳаво рангли бирикмага қадар парчалайди.

Бундан ташқари *gfp* рецептор гени экспрессия бўлганда осон аниқланадиган флуоресцент оксилни ҳосил қилади. Одатда, рецептор геннинг экспрессияси трансген ўсимликда функционал геннинг экспрессияланиш даражаси билан ўзаро мос келади.

Биотехнологияда ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ўсимликларнинг сифат кўрсаткичларини яхшилаш ва ҳосилдорлигини ошириш

Ўсимликларни сифат кўрсаткичини яхшилаш вазифаларидан асосийси-ўсимликларда синтезланадиган, уларнинг озиқавийлиги ва техник қийматини белгилайдиган маҳсулотлар, яъни, оксиллар, ёғлар, полисахаридлар ва бошқа моддаларнинг сифатини яхшилашга қаратилгандир.

Бошоқли ўсимликларда эндоспермнинг заҳира оксиллари алоҳида ўрин тутади. Заҳира оксиллар, асосан структураси, нуклеотид таркиби билан бир-бирига ўхшаш, мультигенлар оиласига бирлаштирилган бир неча генлар томонидан кодирланади. Одатда, бу генларнинг экспрессияси қатъий тўқима спецификлигига эга ва уруғ ривожланишининг маълум бир босқичида амалга ошади. Кўпинча ўсимликларнинг заҳира оксиллари таркиби инсон ва ҳайвонлар озиқаси учун мувозанатланмаган аминокислоталар таркибига эга бўлади. Чунки, дуккакдиларнинг заҳира оксили – легуминлар метионин аминокислотаси, бошоқдилар оксили – проламинлар – лизин, триптофан ва треонин аминокислоталарининг миқдори камлиги билан характерланади. Бу аминокислоталарнинг танқислиги уруғнинг озиқавий қийматини пасайтиради.

Оксилларнинг аминокислоталар таркибини анъанавий усуллар билан яхшилаш анча мураккабдир, чунки қишлоқ хўжалиги учун зарур хусусиятларни белгиловчи генлар кўпинча зарарли хусусиятларни чакирувчи генлар билан бириккан ҳолда ирсийланади. Ўсимликлар селекциясида маккажўхори ва арпа дони таркибида лизин миқдори анча юқори бўлган opak-2, хайпроли типигаги мутантларининг қўлланилиши, дон сифатини яхши натижа бермади, чунки мутант формаларда лизин миқдорининг ошиши асосий заҳира оксиллар зеин ва гордеинлар синтезини ўғирлайди, натижада, ўсимликларнинг ҳосилдорлиги пасайиб кетади.

Шунинг учун ген-муҳандислик усуллари қўлланилиши геномига фақат фойдали генлар киритилган янги навларни яратишда муҳим аҳамият касб этади. Масалан, проламин генларига қўшимча лизин кодонларининг киритилиши лизинга бой оксилларнинг синтез бўлишига ва оксилнинг озиқлик қийматининг ошишига олиб келади.

Ўсимликлар сифатини ген-муҳандислик технологиялари ёрдамида яхшилаш ва улардан сифатли маҳсулотлар олиш бир неча босқичларни ўз ичига олади:

- 1) заҳира оқсиллар генларини клонлаш;
- 2) оқсилларнинг тўқимага ҳослиги ва вақтинча экспрессияси механизмини ўрганиш ва бундай махсус экспрессияни бошқарувчи ва белгиловчи ДНК изчиллигини аниқлаш;
- 3) аминокислоталар таркибини яхшилаш мақсадида заҳира оқсиллар генлари нуклеотид кетма-кетлигини мақсадли ўзгартириш;
- 4) ўзгартирилган ген тутувчи векторлар яратиш;
- 5) такомиллашган генларни ўсимликларга киритиш;
- 6) генлар экспрессиясини ва маҳсулот сифатини синовдан ўтказиш;

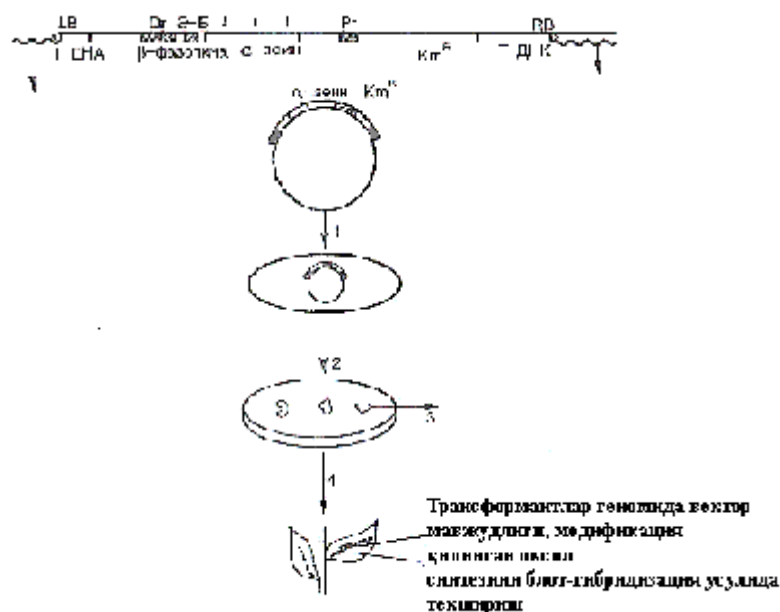
Геннинг нуклеотид кетма-кетлиги унинг оқсил синтези бошқарувида иштирок этувчи элементларини аниқ ўрганишни ўз ичига олувчи тайёргарлик босқичисиз амалга ошмайди.

Дунё олимлари томонидан донли, бошоқли ва бошқа бир қатор ўсимликлар заҳира оқсилларининг ўнлаб генлари ўрганилган. Ҳозирги кунда тадқиқотчилар томонидан арпа гордеини, буғдой α ва β - глиадинлари ва глютенини, маккажўхори зеини, дуккаклилар легуминлари, картошка пататини ва бошқа оқсилларнинг 10 га яқин генлари клонланган. Баъзи генларнинг нуклеотид кетма-кетликлари аниқланган. Заҳира оқсилларни ажратишнинг умумий режаси қуйидагиларни ўз ичига олади: 1) мос м РНК ни олиш ва қисман тозалаш; 2) комплементар кДНК синтезлаш ва клонлаш; 3) генлар банкидан заҳира оқсиллар генини нуклеотид кетма-кетлигини ажратиш.

Заҳира оқсиллар синтези аниқ бошқарувга эга: генлар фақат битта тўқимада (фақат бошоқлилар проламини доннинг эндоспермида) ва уруғ ривожланишининг қисқа даврида экспрессияланади. Заҳира оқсиллар генларини ўрганиш, улар тузилишининг умумийлигини ва ўз ўрнида уларнинг бир хил функцияларни бажаришини кўрсатади.

Кўпчилик заҳира оқсиллар генларида интронлар бўлмайди. Бундан ташқари, уларда транскрипция бошланиш нуктасидан 300 н.ж. оралиғида эндосперм-бокс деб номланган 25 нуклеотид жуфтликдан иборат махсус кетма-кетлик асосида жойлашган. Эндосперм-бокс функциясини аниқлаш, айнан мазкур 25-нуклеотид жуфтликнинг мавжуд бўлиши дон эндоспермига заҳира оқсиллари генларининг тўқимага хос экспрессиясини амалга ошиши боғлиқ бўлишини кўрсатади. Шунингдек, олдида эндосперм-бокс изчиллиги жойлашган ҳар бир геннинг маҳсулоти, фақат донда ёки уруғда синтезланади ва уни такомиллашган проламин оқсиллар генлари кетма-кетлигини тутувчи вектор таркибига киритишдан мақсад уларнинг дон ёки уруғ таркибида сақланиб қолишини таъминлашдан иборат.

Аминокислоталар таркиби яхшиланган оксилли трансген ўсимликлар олишнинг кейинги босқичини такомиллаштирилган α -зеини мисолида кўриш мумкин. Маккажўхорининг α -зеин оксили лизиннинг миқдори камлиги билан характерланади. Бу эса оксилнинг озиқлик қийматини пасайтиради. α -зеин гени кетма-кетлигига йўналтирилган – олигонуклеотид мутагенези усули орқали лизиннинг қўшимча кодонлари киритилади. Олинган α -зеиннинг модификация қилинган гени лизин тутувчи оксил экспрессиясини амалга оширади. Бундай тадқиқот биринчи марта α -зеин кетма-кетлигига янги кодонлар киритилиши бўйича амалга оширилган (2.12 –расм). Ҳозирда бундай янги триплетларни киритилиб, оксилларнинг аминокислоталар таркибини ўзгартириш (яхшилаш) одатий ҳол бўлиб қолмоқда.



2.12 - расм. Лизинли кодонлар билан бойитилган α -зеини гени кўчириб ўтказилган трансген тамаки ўсимлигини олиш схемаси.

1-агробактериялар трансформацияси; 2-ўсимлик хужайралари трансформацияси; 3-канамицин антиотиғи қўшилган озиқа муҳитида танлаш; 4-регенерация.

Такомиллаштирилган α -зеин гени трансформация учун қўлланиладиган векторнинг Т-ДНК қисмига клонланган. Шунингдек, вектор конструкция таркибида эндосперм-бокс ҳам бўлиб, у α -зеиннинг уруғда тўқимага хос экспрессиясини юзага келтиради. Ўтказилган тадқиқотларда такомиллаштирилган α -зеини гени билан трансформацияланиб, лизин билан бойитилган маккажўхори ўсимликлари олинган. Модификация қилинган оксил трансген маккажўхори ўсимлиги уруғларида фаол синтезланади. Натижада донининг сифати яхшиланган маккажўхори тизимларини олишга муваффақ бўлинди. Кейинчалик бу

трансген тизимлар анъанавий селекция усуллари ёрдамида янги нав ва дургайлар олишда қўлланилиши мумкин.

Трансген буғдой ўсимликлари ҳам шу каби усуллар ёрдамида олинган. Ўсимлик геномига глютенин оксили юқори молекуляр суббирлигининг нуклеотид изчиллиги ўзгартирилиб модификация қилинган гени киритилганда, модификацияланган оксиллар синтезини фаоллаштиради ва тегишли захира оксиллар таркиби ва даражасига таъсир этиб, бу буғдойнинг дон сифатини яхшилашга олиб келади.

Оксиллар таркибини яхшилашнинг яна бир усули бу бир паллали ва икки паллалиларнинг захира оксиллари генлари изчиллиги асосида химер генларни конструкциялашдир. Бунда дастлабки материал сифатида арпа гордеини В1 ва дуккаклилар легумини В4 генларидан фойдаланилди. Бундай химер генга эга конструкция (қурилма) билан тамаки ўсимлиги трансформация қилиниб, трансген ўсимликлар тизими олинган.

Шундай қилиб, ген муҳандислиги усуллари ёрдамида донли экинларнинг эндосперм оксиллари таркибини ўзгартиришни амалга ошириш мумкин экан.

Шунингдек захира оксиллари ўзгартирилган ўсимликларни олиш билан бирга трансген ўсимликлардан “озуқабоп” вакциналар ишлаб чиқарувчилар сифатида ҳам фойдаланиш мумкин. Масалан А-Г иммуноглобулини, энтеротоксин, вабонинг В-токсини, В-гепатитнинг юза оксили антигенини синтезловчи тамаки, картошка ўсимликлари олинган. Трансген ўсимликлардан олинган оксиллар, ҳайвон хужайраларидан олинган оксиллар каби антигенлик ва физиологик хусусиятларга эга бўлади. Ҳозирги вақтда трансген ўсимликлар ёрдамида одамда учрайдиган В гепатитига қарши вакциналаш (эмлаш) синовдан ўтказилмоқда. Бундан келиб чиқиб, трансген ўсимликлардан фойдаланиб, келажакда арзон ва биологик фаол вакциналар олиш мумкин, деган хулосага келиш мумкин.

Захира оксиллари модификацияланган дуккакли-дон экинларининг трансген шакллари яратиш билан бирга бир қатор мойли экинлар, биринчи навбатда рапснинг мой кислоталари таркибини яхшилаш борасида ҳам илмий-тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Рапс уруғлари таркибида мой миқдорини юқори бўлиши билан характерланади, аммо унинг таркибидаги специфик узун занжирли эрук кислотаси ва шунингдек, глюкозинолатнинг миқдори кўплиги рапс мойининг таъм хусусияти ва озиқчилига салбий таъсир этади. Ген муҳандислиги ёрдамида ва селекциялаш усуллари орқали рапснинг мой кислоталари молекуласи узунлигини назорат қилиб, эрук кислотаси улушини камайтирувчи ва рапс мойининг сифатини яхшиловчи ген киритилган навлари яратилган. Шу каби тўйинмаган боғларнинг миқдори юқори бўлган модификацияланган мой кислоталар олиш бўйича ишлар олиб борилмоқда, бу янги, қимматли мой кислоталар кислоталар синтезловчи ўсимликлар олиш имконини

беради. Бундан ташқари, ўсимликлар таркибида мой кислоталар таркибининг ўзгариши, уларнинг бир қатор хашаротларга, паст ҳарорат таъсирига чидамлилигини ошириши аниқланган.

2001 йилда мой кислоталари таркиби модификацияланган соя, рапс, маккажўхорининг трансген ўсимликлари навлари дала синовларидан ўтказилди.

Селекциянинг истиқболли йўналишларидан бири - бу янги навларнинг ҳосилдорлигини оширишдир. Қуйидаги йўналишларда фотосинтез фаоллигини ошириш ва алоҳида моддалар синтезини кўтаришда ген муҳандислиги ишлари жадал олиб борилмоқда.

Фотосинтетик фаолликни оширишда ўсимликлар фотосинтезининг C_3 генига C_4 генини киритиш йўналиши бўйича изланиш амалга оширилмоқда. Маккажўхори фотосинтез тизими мезофилл барглари ҳужайрасида атмосфера CO_2 фиксациясида иштирок этувчи фосфоенолпируваткарбоксилазининг C_4 гени клонланди ва агробактерия трансформацияси тизими (PEPS) орқали шоли ўсимлигининг C_3 генига ўтказилди. Олинган трансген ўсимликларнинг таҳлили шуни кўрсатдики, шоли ҳужайрасида ферментлар фаоллиги маккажўхориникига нисбатан 2-3 барабар юқори бўлиши, фотосинтез фаоллигини тезлаштириб, ҳосилдорликни оширишга олиб келган.

Фотосинтез жараёнида иштирок этувчи генларни клонлаш ва улардан фойдаланишидан ташқари, ҳужайрада хлоропласт миқдорини назорат қилувчи генлар ҳам ажратиб олинган. Бундай генлардан фойдаланиш фотосинтез даражасини ўзгартиришга олиб келади. Бошқача ёндошиш орқали эса ҳар бир хлоропластдаги хлорофилларнинг миқдорини оширишга эришилган. Яна *a/b* хлорофилларни специфик тарзда бириктирувчи модификацияланган оксиллар олинган. Трансген ўсимликларда бу оксиллар экспрессиясининг амалга оширилиши биомасса миқдорини сезиларли даражада кўпайишига олиб келади.

Олиб борилаётган ишларнинг бошқа йўналиши трансген ўсимликларда метаболизмнинг ўзгартириш билан боғлиқдир. Маккажўхори углерод метаболизи регуляциясидаги асосий ферменти сахарозофосфатсинтетаза (SPS-ген) генини бошқа ўсимликлар геномига киритилганда, ўсимликларнинг углерод алмашинувига таъсир этади ва ҳосилдорлигини оширади. Ҳозирги вақтда помидор, картошка, рапс, ғўзанинг шундай трансген навлари олинган.

1999 –2000 йилларда трансген ўсимликлардан фойдаланиш рухсат этилган АҚШ, Канада ва яна бир қанча шу каби мамлакатларда ҳосилдорликни оширувчи ва ҳосил бўлган маҳсулотнинг сифатини яхшиловчи турли хил генлар трансформация қилинган маккажўхорининг еттита, буғдойнинг битта трансген навлари дала синовларидан ўтказилиб, қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришда фойдаланилмоқда.

Ўсимликлар ҳосилдорлиги ва сифатини оширувчи генларни трансформация қилиш билан бирга 1998-2001 йилларда тижоратбоп трансген гулларнинг дастлабки тўртта нави олинган бўлиб, уларга АСС-синтетаза гени киритилиши натижасида гуллаш жараёни тезлаштирилган чиннигул нави ва антоциан биосинтези ўзгартирилган генли учта (иккита чиннигул ва битта хризантема) гуллари гулкўрғонидаги тожибарглариининг ноанъанавий рангларини олишга муваффақ бўлишган.

Стресс таъсирларга бардошли трансген ўсимликлар олиш

Атроф-муҳитнинг қурғоқчилик, ортиқча намлик, юқори ёки паст ҳарорат каби таъсирлари, тупроқ шўрланиши, кислоталилик даражасининг ошиши сингарилар қишлоқ хўжалик маҳсулотларининг маълум қисмининг нобуд бўлишига сабаб бўлади. Шунинг учун стресс таъсирларга бардошли ўсимликлар навларидан фойдаланиш катта иқтисодий самарадорликка эга бўлиб ҳисобланади.

Ўсимликларнинг кўпгина стресс ҳолатларга кўникиш реакцияси – бир қанча генларнинг биргаликдаги ўзаро мослашувчан (синхрон) таъсирига боғлиқдир. Шу боисдан ген муҳандислиги изланишлари учун стресс омиллар томонидан кўзғаладиган биокимёвий жараёнлардан фойдаланиш мақсадга мувофиқдир. Маълумки, узоқ вақт сувли стресс таъсирига учраган ўсимликларда бир қатор содда органик молекуляр бирикмалар-пролин, глицинбетаин ва бошқа моддалар тўпланиб, улар осморегулятор ҳамда осмопротекторлар ҳисобланади.

Ўсимликлар ва бактерияларнинг стресс таъсирларга жавоби ўхшашлиги аниқланган: иккала ҳолатда ҳам ҳужайрада осмопротектор молекулалари синтез бўлиб, унинг таъсир механизми цитоплазма ва атроф-муҳит ўртасида осмотик тенгликни юзага келтириш, бундан ташқари, стресс таъсирлар шароитида оксилларни қисман мўтадиллаштиришдан иборатдир. Осмопротектор молекулалари синтезининг биокимёвий йўли ўхшашлиги стрессларга бардошли, трансген ўсимликлар олишда бактерия генларидан фойдаланиш имконини беради.

E. coli геномидан стрессга жавоб реакцияси сифатида юзага чиқадиган пролин биосинтези йўли бўлиб, уларнинг ферментларини кодирловчи, иккита *proBosm* ва *proA* генлари ажратилган. Бу бактерия генларининг экспрессияси ўсимликлар геномида пролин синтезини оширишга олиб келган. Олинган трансген тамаки ўсимликларида назорат ўсимликларга нисбатан пролин синтезининг ошганлиги ва тўпланиб борганлиги қайд қилинган. Трансген ниҳолларнинг илдиз ҳосил қилиш ва 20 г/л (350 мМ) миқдордаги тузли муҳитда ҳам ўса олиш хусусияти сақланиб қолган.

Глицинбетаин синтезини катализловчи бетаинальдегиддегидрогеназа (BADH) гени ажратиб олинган. Бу генни экспрессияловчи трансген тамаки

ўсимликлари тузнинг юқори миқдорига чидамлилиқ хусусиятига эга бўлган.

Юқори ҳароратга бардошлилик *fad7* гени билан боғлиқ бўлиб, у оксил мой кислоталари метаболизмига таъсир этади. Шолининг таранген навларида бу геннинг инактивацияси натижасида ўсимлик юқори ҳароратда ўса олиш ва икки соатгача $+47^{\circ}\text{C}$ га қадар чидамлилиқ белгисини намоён қилиши мумкин.

Ҳозирги кунда газон майсаларининг сув танқислиги ва шўрланишга чидамли трансген навлари дала синовларидан ўтказмоқда, уларни кейинчалик (характерли бундай белгили ноқулай шароит мавжуд абиотик фонга эга) шаҳарларда ўстириш кўзда тутилмоқда.

Зараркунанда ҳашаротларга бардошли трансген ўсимликлар яратиш

Ген муҳандислиги усуллари кўллаб, зараркунанда ҳашаротларга қарши курашда чидамлилиги юқори бўлган ўсимликларни конструкция қилиш мумкин. Маълумки, *Bacillus thuringiensis* бактерияси инсектицид оксил – протоктоксинни экспрессиялайди, бу оксил ҳашаротларнинг ичагига тушгандан сўнг протеаза ферменти таъсирида зараркунандаларни нобуд қилувчи фаол токсинга қадар парчаланади.

Ушбу токсин асосида олинган препаратлар далаларда ўсимликларга ишлов беришда фойдаланилади. Олинган препаратлар турғун бўлмасдан, ҳашаротларда мазкур инсектицидга чидамлилиқ пайдо бўлишига тўсқинлик қилади. Унинг камчилиги тез парчаланиб кетади, шу билан бир вақтда оксил маҳсулотлари ўсимлик ҳужайраларида ҳашаротларга нисбатан мўътадил чидамлилиқни ҳосил қилиши мумкин.

Юқорида кўрсатилган камчиликларни бартараф этиш учун *B. thuringiensis* геномидан *bt2* токсини гени ажратиб олиниб, гул қарам мозаикаси вируси *CAMV 35 S* промотори назорати остига қўйилган *bt*-гени агробактериал трансформация усули ёрдамида тамаки ўсимлигига кўчириб ўтказилган. *bt2* генининг ўсимлик ҳужайрасидаги экспрессияси ўзига хос мРНК нинг иштироки ҳисобига транскрипция даражасида ҳам, трансляция даражасида ҳам токсин-оксил синтезига кўра ҳам аниқланган. Олинган трансген тамаки ўсимликлари зараркунанда ҳашаротларга чидамли бўлиб чиққан. Бу усул билан қишлоқ хўжалик экинларини зараркунандалардан ҳимоя қилишнинг самарадорлигини эндотоксин генлари билан трансформацияланган помидор мисолида ҳам кўриш мумкин, ўсимлик ҳужайрасида синтезланган бактерия оксили ўсимликни инсектицид препаратлар қўлланилгандаги каби самарали ҳимоя билан таъминлайди.

Шунингдек, тамаки ва помидордан ташқари кўпгина қишлоқ хўжалик экинлари картошка, маккажўхори, ғўза, шоли, соя, брокколи ўсимликлари геномига ҳам *bt2* гени киритилган. Геномида *bt2* генини экспрессияловчи

бир қанча ўсимликларнинг трансген навлари олинган. 1944 –1945 йиллар мобайнида помидор, картошка ва ғўзанинг (“Monsanto” фирмаси), маккажўхори (“Novartis” фирмаси), 1998 йилда эса картошканинг *bt2* генидан ташқари, баргларни буралиши вируслари ва глифосат гербицидига бардошлилик генлари киритилган янги навлари олинган ва дала синовларидан ўтказилган.

2000 йилда трансген ўсимликлар навларининг генетик модификацияланган маҳсулотларидан фойдаланиш рухсат этилган мамлакатларда зараркунанда ҳашаротларга бардошли экинлар 380 минг га. майдонга экилган бўлиб, бундан 230 минг гектарига трансген ғўза, 144 минг гектарига маккажўхори ва 5 минг гектарига трансген картошка экилган.

Трансген ўсимликлардан фойдаланиш натижасида инсектицидларни қўлланишини камайишига ва ўсимликларда ҳосилдорликни ошишига эришилди.

Замбуруғ, бактерия ва вирусли инфекцияларга чидамли трансген ўсимликлар олиш

Фитопатоген таъсирларга қарши ўсимликларда бир қанча ҳимоя реакциялари механизмлари кучга киради. Бунда ўсимликнинг фаол жавоб реакцияси икки асосий йўналишда бориши мумкин: биринчидан инфекцияга жавобан патогенларнинг ҳаёт фаолиятини чекловчи, улар учун захарли бўлган бирикмаларнинг синтези бошланади ва натижада уларнинг ҳалок бўлишига олиб келади. Иккинчидан, ҳимоя жавоби сифатида структуравий тўсиқлар яратилиб, бу тўсиқлар ўсимликларнинг зарарланиши, патогенларнинг тарқалишини олдини олади. Бу эса хужайра деворларининг лигнификацияланиши ёки гидроксипролинга бой гликопротеидлар ва бошқа бирикмалар ҳисобига мустаҳкамланиши орқали амалга ошади, улар экстенсинлар деб аталиб, тўқималарни фитопатогенлар томонидан шикастлашидан ҳимоя қилади.

Вирус, бактерия, замбуруғли инфекцияларга жавобан специфик PR (pathogen related proteins), шунингдек улар орасида ҳар томонлама мукамал ўрганилган хитиназа ва β 1,3 глюконаза оксиллари индуцирланади.

Бу ферментлар замбуруғ ва баъзи бактерияларнинг ўсишини тўхтатади, уларнинг хужайра деворини қисман гидролизлайди.

Хитиназа ва глюконаза оксилларининг фунгицидларга таъсири, ҳамда ушбу оксилларнинг алоҳида генлар томонидан кодирланишига оид маълумотлар кўплаб тажрибаларда аниқланган. Шунинг учун хитиназа ва глюконаза генлари фитопатогенларга чидамли трансген ўсимликлар олиш бўйича ген муҳандислиги тадқиқотларида фойдаланилмоқда. Ҳозирги кунда кўпчилик ўсимликларнинг хитиназа гени тутувчи трансген

Ўсимликлари - тамаки, ғўза, маккажўхори, помидор, картошка, беда, шоли, турнепс, рапс ва бошқа ўсимликларнинг CaMV 35S промотори назоратида хитиназа генини экспрессияловчи трансген навлари олинган. Бу ўсимликларда замбуруғли инфекцияларга чидамлилики нафақат лаборатория шароитида, балки дала шароитида ҳам кузатилган. Бундан ташқари, хитиназанинг глюконаза билан биргаликдаги таъсири самарадорлиги юқори бўлади, шунинг учун иккала генни тутувчи трансген ўсимликлар жуда катта агрономик аҳамиятга эгадир. Ҳозирги вақтда тамаки, рапс, помидор, картошканинг *Rhizoctonia* га, тамакининг *Cercospora nicotiana*га юқори даражада чидамли трансген ўсимликлари олинган.

Фунгицид таъсирга эга бўлган бошқа гуруҳ бирикмалари-гуруҳига паст молекуляр (40-50 к Да) оксиллардан иборат ўсимликларнинг цистеин оксиллари, галактуроноза ингибиторлари, ўсимлик дефенезлари, MF – оксил гуруҳлари. Бу оксилларнинг барчаси одатда ўсимликларнинг турли хил замбуруғли ва бактерия инфекцияларига чидамлилигини специфик бўлмаган ҳолатда оширади.

Мазкур оксилни экспрессияловчи трансген ўсимликлар замбуруғли инфекцияларга қандай даражада чидамли бўлса, вирусли инфекцияларга нисбатан ҳам худди шундай хусусиятга эга бўлади.

Вирус – ўсимлик муносабати жараёнини ўрганиш мобайнида жуда кўп усуллар қўлланилган. Фақатгина бир қанча усулларни биргаликда қўллаш орқалигина вирусли инфекцияларга чидамли ўсимликлар олишга эришилган. Сўнгги йилларда бу йўналишда сезиларли силжиш пайдо бўлди, бу геномнинг тузилишини ва ташкилланишини, вирус генларининг функцияланишининг тўлиқ ўрганиш билан боғлиқдир. Ҳозирги вақтда ген муҳандислиги технологияси асосида вирусли инфекцияларга чидамли трансген ўсимликлар олишнинг турли усуллари мавжуд, бу эса вирус қобиғи юза оксили гени билан трансформация қилинган трансген ўсимликлар олиш имконини беради, натижада инфекция ўтишининг камайишига ва вирус кўпайишини тўхтатишига олиб келади. Мазкур усул билан тамаки ва картошка ўсимликларига тамаки мозаика вируси оксил қобиғи генини трансформация қилиш, трансген ўсимликларда турғун антивируслик хусусияти пайдо бўлишига олиб келган.

Ҳозирги вақтда тамакининг нафақат ТМВ (тамаки мозаика вируси)га, балки қовоқ мозаика вирусига ҳам чидамли тизимлари ҳам олинган. Шунингдек, картошка ва маккажўхорининг баргларининг буралиши вирусларига, арпанинг паканалик вирусига чидамли навлари ҳам олинган. Қовоқнинг учала вирусга ҳам чидамли нави олинган ва экилмоқда.

Патогенларга чидамли ўсимликлар олишнинг яна бир усули - замбуруғ ва микробларга қарши таъсирга эга бўлган фитоалексинлар биосинтези (йўли) ферментларини кодирловчи генларининг ўсимлик хужайраларига

трансформациясидир. Бу генларни картошка ва помидор ўсимликларига киритилганда, фитофтороз ва фузариозга, тамакида эса кулранг чириш касалликларига қарши чидамлик сезиларли даражада ортган.

Ҳозирги кунда картошканинг Y вируси (PVY)га ва барг буралиши (PLRV)га вирусларига чидамли 4 та тижоратбоп трансген навлари, қовоқнинг учта вирусга ҳам бир вақтнинг ўзида чидамли нави, папаянинг айланасимон вируси (PVY) га чидамли навлари яратилган.

Гербицидларга чидамли трансген ўсимликлар олиш

Ўсимликлар биотехнологиясининг асосий йўналишларидан бири гербицидлар таъсирига чидамли маданий ўсимликлар олишдир. Гербицидлар кенг таъсир спектрига эга бўлиб, бегона ўтларни йўқотади, шу билан биргаликда экинларга ҳам салбий таъсир кўрсатади.

Гербицидларга чидамли ўсимликлар олиш икки йўналишда олиб борилади: биринчидан, гербицидларга чидамли ўсимлик шакллариининг тўғридан-тўғри селекцияси (асосан, гербицидга чидамли ўсимликларни ёввойи турлари билан чатиштириш орқали), иккинчидан, экспрессияси гербицидга бардошлиликка олиб келувчи генларини кўчириб ўтказиш йўли билан трансген ўсимликлар олиш. Гербицидларга чидамли трансген ўсимликлар олишда гербицидларга чидамлиликни юзага келтиришнинг молекуляр механизмлари, шунингдек бу хусусиятни белгиловчи бактерия ва ўсимлик генларини ажратиш олиш тўғрисидаги маълумотлар назарий асос бўлиб хизмат қилади.

Гербицидларнинг таъсири ўсимлик ҳужайралари метаболизмини тўхтатиб қўйиш орқали намоён бўлади: биокимёвий жараёнларнинг ингибирланиши (тўхтатилиши) энг аввало, фотосинтезнинг (атразин, симазин, диурон) ва аминокислоталар (глифосат, сульфонилмочевина, биалофос) синтезининг ингибирланишида ўз ифодасини топади. Гербицидга чидамлилик унинг фермент-нишон билан ўхшашлиги ёки гербицид молекуласини бевосита ингибирланиши натижасида келиб чиқади.

Ҳужайралар селекцияси усули орқали петунянинг мутант тизимлари яратилган, улар глифосат гербицидига 20 карра чидамлироқдир. Шунингдек, беданинг 600 мкМ L фосфинотрицин гербициди иштирокида ўсишга мослашган ҳужайра суспензияси билан селекция қилиниб, чидамли тизимлари яратилган.

Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида гербицидлар таъсирига чидамли ўсимликлар яратишда толерантлик (юқори даражада чидамлилик) механизмларини ўрганишга асосланади ва қуйидаги босқичларни ўз ичига олади; ўсимликлар ҳужайрасида гербицидлар таъсир этадиган нишон аниқланади, баъзи гербицидлар таъсирига чидамли, резистентлик генлари манбаи бўлган ўсимликлар, бактериялар танланади, бу генлар

идентификация қилиб олиниб, ажратилади, клонланади, трансген конструкциялар яратиш учун уларнинг экспрессияси ўрганилади.

Атразин гербицидининг таъсири *pbcA* гени томонидан кодирланадиган хлоропласт мембранаси оксиди (Q_h) билан бирикишига асосланади. *pbcA* гени баъзи бегона ўтлар геномидан ажратилган. Аниқланишича, гербицидга чидамлилиқ *pbcA* генида нуқтали мутация юзага келиши билан боғлиқ бўлиб, бу оксид таркибидаги серин аминокислота қолдиғини глицин билан алмашилишига олиб келади. Бундай алмашилиш Q_h оксидида гербицидни фермент – нишон билан боғланишининг кескин камайишига олиб келади. Натижада гербицидга чидамлилиқ пайдо бўлади. Ўсимликлар трансформацияси учун мутант *pbcA* гени вектор конструкцияга киритилиши натижасида атразинга чидамли трансген ўсимликлар олинган.

Айнан шу нарса, яъни, *E.coli*нинг *aroA* гени кодирлайдиган EPSP – синтетаза оксидида аланиннинг аргининга алмашилиши туфайли глифосат гербициди таъсирига чидамлилиқ белгисини юзага келтириши аниқланган. Бу эса мутант *aroA* гени билан тамаки, помидор, қанд лавлаги, картошка ўсимликлари хужайраларига трансформация қилиш ва гербицидга чидамли трансген ўсимликлар олиш учун фойдаланилган.

Ўсимлик геномига бактериянинг *bar* генини киритилганда BASTA гербицидига чидамлилиқ келиб чиқади ва бу ген кодирлайдиган – фосфинотрицинацетилтрансфераза оксиди гербициднинг фаол компоненти фосфинотрицинни ацетиллаши ва натижада унинг инактивациясини юзага келтириши аниқланган. Шу тарзда шоли (1995), маккажўхори (1995), буғдой (1994) ва бошқа ўсимликларнинг трансген навлари олинган. Сўнгги вақтларда *bar*- гени ген муҳандислик векторларида селектив маркер сифатида қўлланилмоқда.

Шоли геномига *B. subtilis* бактериясидан ажратилган протопорфириногенсинтетаза (Protox) ферментини кодирловчи ген киритилганида у трансген ўсимликнинг дифенилэфир қатори гербицидларига чидамлилигини оширган. Бунда антигербицид таъсири механизми кўрсатилган: Protox оксиди экспрессиясининг ошиши гербицид таъсирини нейтраллайди, бу эса унда гербицидга чидамлилиқни ортишига сабаб бўлади. Киритилган ген нусхалари сони ва бардошлилик даражаси ўртасида ўзаро тўғридан-тўғри боғлиқлик борлиги ҳам аниқланган.

Ҳозирги вақтда Шимолий Америка ва Европада гербицидларга чидамли, маккажўхори, ғўза, шоли, соя, буғдой, картошка ва помидор, зиғир каби қишлоқ хўжалиги учун асосий бўлган экинларнинг 20 га яқин трансген навларидан фойдаланишга рухсат этилган. Кулупнай, қанд лавлаги ва баъзи гулли экинларнинг трансген навлари дала синовларидан ўтказилмоқда. Дунё бўйича гербицидларга бардошли трансген

Ўсимликларнинг нав ва дурагайлари 34 млн. гектар ерга экилади. Бу умумий экинлар экиладиган майдонларнинг 80 %и ни ташкил этади.

Умуман олганда, трансген ўсимликларни олиш биотехнологиянинг жадал ривожланаётган йўналишларидан биридир. Генетик модификацияланган ўсимликлардан фойдаланиш рухсат этилган мамлакатларда 2001 йилнинг феврал ойига келиб, 18 хилдаги экинларнинг 78 та трансген навлари дала синовларидан ўтказилди ва агроижора мақсадларида фойдаланишга рухсат этилди.

Ўсимликлар ген муҳандислигининг ҳал этилмаган муаммолари

Ўсимликлар ген муҳандислиги тобора тараққий этиши билан бир қаторда бир қанча муаммолар ҳал этилмай қолмоқда. Бундай муаммолардан бири - ўсимликлар геномига ўлчамли катта бўлган генларни (10 м.н.ж.дан кўп) ёки бир нечта функционал генларни бир пайтнинг ўзida киритишнинг қийинлиги билан боғлиқдир. Бу трансформация учун қўлланиладиган векторларнинг ҳажми билан боғлиқдир. Сўнгги вақтларда ўсимликлар трансформацияси учун фойдаланиладиган кўпчилик генларнинг, айниқса, эукариот генлари катта ўлчамга эга (5 –15 м.н.ж) билан ажралиб туради. Бундан ташқари вектор конструкциялар ўзининг таркибida танланган генлардан ташқари селектив генлар ҳам тутиши зарур. Баъзи ҳолатларда ўлчамларини қисқартириш мақсадида геннинг кДНК изчиллигидан фойдаланиш мумкин. Аммо, кДНК – нусхалари in vivo даги ўзига хос сплайсинг ёки одатда биринчи интронда специфик регулятор изчилликларининг иштироки сабабли ҳар доим ҳам қўлланермайди. Ўсимликлар трансформациясини чекловчи асосий омилларлардан бири - зарур белги бир неча генлар томонидан кодирланади ва бундай хусусиятга эга бўлган трансген ўсимликларни олиш ҳозирча бир оз техник муаммоларга эга.

Бегона генларнинг экспрессияси масаласи алоҳида муаммо бўлиб кўпинча икки – бешта авлоддан сўнг актив транскрипцияланувчи ген экспрессияланишдан тўхтади. Мантиқан бу тушунарли ҳолдир, ўсимлик ҳужайраси ўзининг метаболизми учун бегона бўлган, одатда бактериал келиб чиқишга эга оксилни фаол (масалан, кучли конститутив 35 СаMV промотори туфайли) экспрессиялайди. Кўпинча, трансгеннинг инактивацияланиши регулятор изчилликларнинг метилланиши ёки қайсидир оксилнинг промотори билан ўзаро таъсири натижасида репрессияланиши туфайли юзага келади. Бундай инактивация қилинган трансгенни фаоллаштиришнинг иложи йўқ. Вақт ўтиши билан трансгеннинг бундай “индамаслиги”нинг ўтиб кетишини тахмин қилиш қийин, чунки бу бир қанча омиллар, жумладан, оксилнинг изчиллиги ва ўсимлик геномига бирикадиган аниқ жойи билан боғлиқ. Бу муаммони эҳтимол, бир неча марта трансформациялаш йўли билан ўсимлик геномида

турли хил интеграция жойларига эга бир хил вектор конструкциялари тутувчи турли тизимлар олиш билан хал этиш мумкин.

Трансгенез бўйича олиб борилаётган ишларнинг секин ривожланишидаги асосий сабаб самарали генларни ажратиш, идентификация қилиш, генлар банкини яратиш бўйича олиб борилаётган изланишлар ривожланиш даражасининг пастлиги ва ген муҳандислиги илмий базасининг чекланганлиги билан боғлиқ бўлиб қолмоқда.

I ва II бобга оид назорат саволлари

1. Ген муҳандислигига асосланган селекциянинг пировард мақсади бўлган янги ўсимлик навлари олишнинг анъанавий селекция усулларида афзаллиги нимада?
2. Нима учун I ва III типдаги рестриктазалардан ген муҳандислигида амалда фойдаланилмайди?
3. Қандай усуллар билан турли номдаги кетма-кетликлар учларининг фрагментларини бириктириш мумкин?
4. Вектор нима ва унинг қандай асосий типлари мавжуд?
5. Клонлаш учун қўлланиладиган векторни танлаб олишда қайси хусусият хал қилувчи аҳамиятга эга?
6. Фаглар орқали клонлашда қандай афзалликлар ва камчиликлар мавжуд?
7. Бинар векторларининг коинтегротив векторларга нисбатан афзаллиги нимада?
8. Клонлаш учун қўлланиладиган векторнинг трансформацияга ишлатиладиган вектордан асосий фарқлари нималардан иборат?
9. Ўсимлик хужайраларига генларни тўғридан-тўғри кўчириб ўтказишнинг афзалликлари нималардан иборат?
10. Трансген ўсимликларни ҳақиқийлигини текширишнинг қандай усуллари мавжуд?
11. Трансген ўсимликлар олишининг қайси босқичларида қийинчиликлар келиб чиқиши мумкин ва нима учун?
12. Селекция ва озик-овқат маҳсулотлари ишлаб чиқариш мақсадида трансген ўсимликлардан фойдаланиш технологиялари.

I ва II бобга оид адабиётлар рўйхати

1. Рыбчин В.Н. Основы генной инженерии – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 1999.
2. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. / М.: Наука, 1986
3. Сельскохозяйственная биотехнология. Сб. работ/Под ред. В.С.Щевелухи. Т.1. М: Воскресенье, 1998
4. Сельскохозяйственная биотехнология. Сб. работ/Под ред. В.С.Щевелухи. Т.2- М: Воскресенье. 2003
5. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. //Т. 1-2. М.: Мир 1998
6. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. // Ч.1. Новосибирск: изд-во Новосибирского университета. 1994
7. Чемирис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК // М.: Наука 1999
8. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство /Под ред. Дж. Драйпера и др. – М.: Мир, 1991
9. Уотсон Д., Туз Дж, Курц Д. Рекомбинантные ДНК: Краткий курс М.: Мир, 1986

3-БОБ

ЎСИМЛИКШУНОСЛИК ВА СЕЛЕКЦИЯДА ХУЖАЙРА ҲАМДА ТЎҚИМАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

Хужайра ва тўқималар култураси

Хужайралар биотехнологияси хужайраларнинг *in vitro* шароитида яшаш, кўпайиш ва регенерацияланиш хусусиятларига, ҳамда уларнинг тотипотентлигига асосланади. Ажратилган тўқималарни стерил шароитида, сунъий озика муҳитларда *in vitro* културалаш усули биотехнологияда қимматли генотипларни сақлаш, кўпайтириш, уларнинг эмбриогенезини амалга ошириш ва экиш материалларини соғломлаштириш мақсадларида кенг фойдаланилади. Биотехнологияда ажратилган хужайра ва тўқималар култураси ролини учта йўналишда кўриш мумкин.

Биринчи йўналиш – ажратилган ўсимлик хужайраларининг тиббиёт, парфюмерия (атторлик), косметика ва саноатнинг бошқа тармоқлари учун иккиламчи синтез моддалар: алкалоидлар, стероидлар, гликозидлар, гормонлар эфир мойлари ва бошқа моддаларни синтез қилиш хусусияти билан боғлиқ. Иккиламчи синтез моддалар қаттиқ (агарли) ёки суюқ (суспензияли култура) озика муҳитларида ўстирилган каллус тўқималаридан олинади. Хужайралар технологияси асосида фойдали ўсимликлар хужайраларидан кувватни оширувчи ва тетиклаштирувчи моддалар олиниб, улар тиббиёт ва атторликда кенг қўлланилади. Хужайралар селекцияси натижасида олинган хужайралар културасининг маҳсулдорлиги яхлит ўсимликлар маҳсулдорлигидан юқори бўлиши мумкин. Бундай усулда иккиламчи синтез моддалар олишнинг афзаллиги шундаки, бизнинг табиий шароитимизда ўсмайдиган ўсимликлардан бутун йил мобайнида маҳсулот олиш мумкин.

Иккинчи йўналиш—ажратилган тўқималар културасидан экиш материалларини вирусдан холи қилиш ва кўпайтиришда фойдаланиш. Бу усул ўсимликларни клонли микрокўпайтириш усули деб аталади ва бир йилда битта меристемадан юз минглаб ўсимликлар олиш имконини беради.

Учинчи йўналиш—ажратилган хужайралардан ўсимликлар селекциясида фойдаланиб, тез ривожланувчи, турли ташқи омиллар таъсирига қурғоқчилик, шўрланиш, паст ва юқори ҳарорат, фитопатогенлар, оғир металллар ва бошқаларга чидамли тез ривожланувчи ўсимликлардан фойдаланиш.

Шунингдек, бу йўналиш орқали ажратилган протопластларни қўшиш ва жинссиз (соматик) дурагайлар олиш йўли билан янги ўсимликлар яратиш ишларини ҳам амалга ошириш мумкин. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида ажратилган протопластларга ёт генларни киритиш келажакда янги хусусиятли ўсимликлар олиш имконини беради. Ажратилган чангдон ва уруғ куртакларни сунъий озиқа муҳитида културалаш орқали гаплоидлар олиш, пуч, унмайдиган (эндоспери яхши ривожланмаган) дурагай уруғлардан ўсимликлар олишга эришиш мумкин. Пробиркада чатиштириш орқали эса баъзи ўсимликларнинг ўзаро чатишмаслигини енгиш мумкин. Хужайра ва тўқималар културасидан фойдаланишда муваффақиятга эришиш учун, авваломбор хужайраларнинг нормал бўлиниши, дифференцияланиши ва регенерацияланиб, улардан етук ўсимлик ҳосил бўлиши каби физиологик жараёнларни оптималлаштириш зарур.

Алоҳида хужайралардан ўсимлик регенерациялаш анча мураккаб жараёндир. Айниқса донли экинларда бу ишни амалга ошириш анча қийин. Шунинг учун *in vitro* морфогенез, регенерация ва улар асосида ётувчи жараёнлар механизмини аниқлаш муҳим аҳамиятга эга.

Ўсимликдан алоҳида ажратилган тўқималарни културалашга анча йиллардан буён ҳаракат қилиб келинган ва бу усулнинг ривожланиш тарихи бир неча босқичларни ўз ичига олади.

I- босқич (1882 –1902 йиллар) Г.Хаберландт, Фёхтинг, Рехингер каби немис тадқиқотчилари номлари билан боғлиқ. Улар томонидан сахароза эритмасида турли ўсимликларни културалашга ҳаракат қилинган. Қоқиўт ва терак пояси сегментларида биринчи каллус тўқималари олинган ва каллус ҳосил қилишга қобилятли сегментларнинг минимал ўлчами аниқланган. Хаберландт ҳар қандай ўсимлик хужайрасининг тотипотентлигини яъни хужайра ўзининг ривожланиш потенциалини сарфлаб, маълум културалаш шароитида етук ўсимлик ҳосил қилиш қобиляти ҳақидаги илмий назарияларни илгари сурган.

II-босқич (1902 –1922 йиллар) ҳайвон тўқималарини културалаш учун озиқа муҳити яратилди. Бу озиқа муҳитлар табиий келиб чиқишга эга бўлиб, таркиби қон плазмаси ва эмбрион (пушт) суюқлигидан иборат бўлган. Бу даврда ажратилган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстракти тутувчи сунъий озиқа муҳитларларда ўстиришга бўлган уринишлар муваффақиятсиз чиқди, чунки тажрибалар учун юксак ўсимликларнинг ўсиш фаоллигини кам намоён қиладиган хужайра ва тўқималари танланган эди.

III-босқич (1922 – 1932 йиллар) Бу даврда америка олими В.Робинс ва немис олими Котте бир-бирига боғлиқ бўлмаган ҳолда

помидор ва маккажўхори илдиз меристемаларини қаттиқ озиқа муҳитларида культурлаш имкониятининг мавжуд эканлигини аниқлашди. Аммо маълум вақт ўтгандан сўнг, ўсимлик тўқималари қўнғир рангга кириб нобуд бўлган. Ўсимлик тўқималарни культурлаш усулининг ҳақиқий ривожланиши даври 1932 йилдан бошланди.

IV-босқич (1932-1940 йиллар) француз олими Р.Готре номи билан боғлиқ. У ўсимлик тўқималарини *in vitro* шароитида узоқ вақт культурлашга тўқималарни вақти – вақти билан янги озиқа муҳитга қўчириб ўтказиш орқали эришиш мумкинлигини исботлади. Бу кашфиёт тўқималар култураси бўйича янги ишларнинг бошланишига туртки бўлди.

V-босқич (1940-1960 йиллар) 1955 йилда цитокинин фитогормонларининг янги синфи, аниқроғи кинетиннинг кашф этилиши муносабати билан, тамакини ўтказувчи тўқималари ва камбийдан ҳоли қилинган ўзак паренхима тўқимаси хужайраларининг бўлинишини стимуллаш имконияти пайдо бўлади. Ўсимлик стимуляторини миқдори ва нисбатига боғлиқ ҳолда эксплантдаги хужайралар бўлинишини тезлаштириш, каллус тўқимаси ўсишни давом эттириш ва морфогенезини индуцирлаш мумкинлиги аниқланди.

Бу даврда кокос ёнғоғи, каштан, маккажўхори ва бошқа ўсимликларнинг эндосперм типидagi табиий экстрактларидан хужайраларнинг тартибсиз ўсишини амалга оширишда, каллус тўқималари културасида ва хужайралар суспензиясидаги морфогенез жараёнларини стимуллашдаги роли ижобий баҳоланди.

VI-босқич (1960 – 1975 йиллар) Бу даврдаги муҳим воқеалардан бири, Ноттингем университети профессори Э.К.Коккинг томонидан ферментатив йўл билан протопластларнинг ажратилиши бўлди. У хужайралар деворини гидролизловчи ферментлар ёрдамида помидор меваси ва илдизидан протопластлар ажратиб олди ва ва назоратдаги шароитда културалади. Кейинроқ 1970 йилда шу лабораторияда Пауэр ва унинг шогирдлари томонидан протопластларни қўшиш орқали, соматик дурагайлар олишнинг янги усули яратилди. Бу даврда яратилган яна бир усул, бу *in vitro* шароитида меристема културасидан фойдаланган ҳолда ўсимликларнинг микроқўпайтиришдир. Бу усул француз олими Ж.Морел томонидан дастлаб орхидея ўсимлигининг соғломлаштирилган кўчатларини кўпайтириш мақсадида ишлаб чиқилган.

VII-босқич (1975 йилдан ҳозирги кунга қадар) *in vitro* техникаси жадал ривожланиши давом этмоқда, култураланаётган объектлар биологияси ўрганилмоқда, ажратилган протопластларни электр токи ёрдамида қўшиш усуллари, хужайралар селекцияси ва мутагенези

усуллари, гаплоид ўсимликлар яратиш усуллари яратилмоқда. Протопластлар ва *Agrobacterium tumefaciens* ва *A. rhizogenes*нинг Ti ва Ri плазмидалари асосидаги векторларидан фойдаланиб, ҳужайраларни чуқур културалаш усуллари мукаммаллаштирилмоқда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликлар ҳужайрасига генларни кўчириб ўтказишнинг самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай қилиб, кейинги 10 йилларда ажратилган ўсимлик ҳужайра ва тўқималари билан ишлашнинг техник усуллари ривожлантириш ишлари жадал давом этмоқда. Аммо, бу ишларда тадқиқот объекти сифатида асосан бир паллали ва икки паллали ўтчил ўсимликлардан баъзи ҳоллардагина дарахтсимон ўсимликлардан фойдаланилди.

Ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини *in vitro* культурлаш техникаси

Ажратилган тўқималар култураси билан ишлашнинг асосий шarti стерилликка қатъий риоя қилишдир. Озиқа муҳитининг бой таркиби микроорганизмлар ўсиши учун ҳам яхши субстрат ҳисобланади. Озиқа муҳитда култураланаётган ўсимлик қисмларини (эксплантлар) микроорганизмлар осон зарарлайди. Шунинг учун эксплант ҳам, озиқа муҳити ҳам стерилланган бўлиши шарт. Ажратилган тўқималар билан олиб бориладиган барча ишлар (културага ўтказиш, янги озиқа муҳитига кўчириш) стерил хоналарда, (ламинар боксларда) стерил асбоблар ёрдамида амалга оширилади, ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақлаш лозим, чунки ҳарорат пасайганда, ёки намлик юзага келганда идишнинг нам тикини орқали пробирка ичига микроорганизмлар кириши мумкин.

Эксплант ва уруғлар 5-20 мин стерилловчи эритмада стерилланиб, сўнг бир неча марта стерил сувда ювилади. Стериллаш вақти эксплантни табиатига ва стерилловчи эритманинг фаоллигига боғлиқ. Уруғлар 10 –20 мин, вегетатив қисмлар эса 5-10 мин стерилланади (3.1-жадвал).

Културалаш учун олинган ўсимлик эксплантлари олдин совунли сувда ишқалаб ювилади ва дистилланган сувда чайилади, сўнг бир неча секундга 70 % ли этанолга солинади, уруғлар эса 1-2 мин.га спиртга солиб қўйилади. Спирт тўқималарни стериллаш билан бирга асосий стерилловчи эритманинг стериллаш самарасини ҳам оширади. Спиртдан сўнг тўқималар стерил сувда ҳам чайилади.

3.1-жадвал.

Ўсимлик материалларини стериллаш (Р.Г.Бутенко 1990)

Объект	Стериллаш вақти			
	0,1 % ли диацид	0,1 % ли сулема	5-7 % ли (Na,Ca) гипохлоридлар	10-12 % ли водород пероксиди
Уруғлар куруғи	15-2	10-15	15-20	12-1
Ивигилгани	6 -10	6 – 8	10 – 15	6 –8
Илдиз, тугунаклари- нинг тўқималари	20-3	15-25	15-20	-
Ёғочланган поялар	20-4	20-25	20-25	-
Барглар	1-3	1-3	3-6	3-5
Апекслар	1-10	1-7	3-15	2-7

Ташқи стериллаш фақат ташқаридаги инфекциялардан ҳоли қилади. Агар эксплантда ички инфекция мавжуд бўлса, у ҳолда антибиотиклар билан ишлов бериш зарур. Асосан тропик ва субтропик ўсимлик тўқималари ички инфекцияларга бой бўлади. Замбуруғ ёки бактериялар билан зарарланган културани экилганидан 1-14 кундан сўнг аниқлаш мумкин. Микроорганизмлар билан зарарланган култураларни хонага тарқалиб ҳавони ифлослантормасдан уларнинг олдини олиш зарур.

Озиқа муҳитлари автоклавда 120⁰С ҳароратда 0,75 –1 атм босимда 20 минут давомида стерилланади. Агар озиқа муҳит таркибига юқори ҳароратда парчаланиб кетувчи моддалар киритилган бўлса, у ҳолда бу моддалар махсус бактериал филтрлардан ўтказиб тозаланади, сўнг автоклавланган ва 40⁰С га ча совитилган асосий озиқа муҳитга қўйилади.

Идишларни олдиндан зар қоғозга ёки оддий қоғозга ўраб, қуритиш шкафларида 160⁰С ҳароратда 2 соат давомида стериллаш лозим.

Озиқа муҳитлар. Ажратилган ҳужайра ва тўқималарни културалаш учун озиқа муҳитлари таркибида ўсимлик учун зарур бўлган барча макроэлементлар (азот, фосфор, калий, кальций, магний, олтингугурт, темир) микроэлементлар (бор, марганец, рух, мис, молибден ва бошқалар) шунингдек витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларнинг аналогларини тутиши зарур. Баъзи озиқа муҳитларга казеин гидролизати, аминокислоталар ҳам қўйилади. Бундан ташқари, ҳужайранинг темирга бўлган талабини қондириш учун озиқа муҳитлар таркибига ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) ёки унинг натрийли тузи киритилади.

Каллус тўқимаси олиш учун баъзи ҳолларда озиқа муҳит таркибига кокос ёнғоғининг суюқ эндосперми (какос сути), каштан қўйилади. Углеводлар ажратилган ҳужайра ва тўқималар

култураланаётган озиқа муҳитнинг зарурий таркиби ҳисобланади. Чунки улар автотроф озиқланиш хусусиятига эга эмас. Углевод манбаи сифатида 2-3% ли концентрацияда сахароза ёки глюкозадан фойдаланилади.

Фитогормонлар ҳужайраларнинг дедифференцияланиши ва ҳужайралар бўлинишини тезлаштириш учун зарур. Шунинг учун каллус тўқималар олишда озиқа муҳит таркибида албатта ауксинлар (ҳужайралар дедифференциясини чақиради) ва цитокининлар (ҳужайралар бўлинишини чақиради) бўлиши шарт. Поя морфогенезини юзага келтиришда озиқа муҳитдаги ауксиннинг миқдори камайтирилади ёки умуман қўшилмайди.

Гормонсиз муҳитда шиш тўқималари ёки кўниккан тўқималар ўсади. Улар ўзлари гормон синтез қилиш хусусиятига эга бўлади.

Озиқа муҳитларда ауксин манбаи сифатида 2,4-дихлорфеносирка кислота (2,4-Д), индолил 3-сирка кислота (ИСК), нафтилсирка кислотаси (НКС) дан фойдаланилади. Ғовак, (пўк) яхши ўсувчи каллус тўқимаси олиш учун асосан 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки унинг фаоллиги ИСКга нисбатан 30 марта юқори.

Сунъий озиқа муҳитларда цитокинин манбаи сифатида кинетин, 6-бензиламинопури (БАП), зеатиндан фойдаланилади. Ажратилган тўқималарни ўстиришда, органларни ҳосил қилишда кинетинга нисбатан 6-БАП ва зеатиндан фойдаланиш кўпроқ самара беради. Баъзи озиқа муҳитлар таркибига аденин қўшилади.

Ҳозирги вақтда таркиби жиҳатидан бир-бирларидан фарқ қилувчи бир нечта озиқа муҳитлари маълум. Лекин ажратилган ҳужайра ва тўқималарни *in vitro* ўстириш учун асосан 1962 йилда Т. Мурасига ва Ф. Скуга томонидан яратилган таркибдаги озиқа муҳитларидан фойдаланилади. Бу муҳитда озиқа моддалар таркиби балансланган бўлиб, аммонийли ва нитратли азотнинг нисбати билан бошқаларидан фарқ қилади.

Қаттиқ озиқа муҳити тайёрлаш учун денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахарид агар-агар моддасидан фойдаланилади. (3.2.жадвал)

Макро-микро элементлар тузлари эритмаларини, шунингдек витаминлар ва фитогормонларнинг концентранган (миқдори оширилган) эритмаларини тайёрлаб, улардан оз миқдорда олиб, суялтириб ишлатиш мумкин. Концентранган бошланғич эритмалар совуткичда сақланади.

Ўсимликнинг ажратилган тўқималарини културалаш учун озиқа муҳитлар таркиби.

Озиқа муҳит компонентлари	Концентрацияси мг/л			
	Мурасига- суга	Гамборга	Шенка- хильдебрандт	Грессхофф- доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	--
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	--	--	300	--
KNO_3	1900	--	--	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	--	130	--	200
KH_2PO_4	170	--	--	--
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	--	150	--	90
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,1	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoU}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	--	--	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин –HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин-HCl	1	10,0	5,0	0,1
2,4-Д	--	0,1-1,0	--	--
Кинетин	--	0,1	0,1	--
Глутамин	--	--	--	2,0
Сазароза	30 000	30 000	30 000	20 000

Културалаш шароити. Ажратилган хужайра ва тўқималарни културалашни амалга ошириш учун ўстиришнинг зарурий шартларига амал қилиш лозим.

Аксарият каллус тўқималари ёруғликка муҳтож эмас, чунки уларнинг хужайраларида хлоропластлари бўлмади ва гетеротроф озиқланади. Баъзи яшил каллус тўқималари масалан, мандрагоралар бундан мустасно. Айрим ҳолларда каллус тўқималари авторотроф озиқланишга қодир бўлмасалар ҳам узлуксиз ёруғлик шароитида ўстирилади, бу муваффиқиятли морфогенез ҳосил бўлишининг зарурий шарти ҳисобланади. Асосан каллус тўқималарини олиш учун қоронғулик ёки сочма ёруғлик шароити яратилади.

Шакллана бошлаган тўқималар ёруғликда 1000-4000 лк ёритиш остида култураланади.

Изоляцияланган меристемаларни културалаш ва уларни микрокўпайтириш ёруғликда амалга оширилади. Хоналарни ёритиш даражаси културага боғлиқ ҳолда 3000-10000 лкни ташкил қилиши керак.

Мазкур култураланаётган объект учун зарур бўлган фотодаврни ҳисобга олиш зарур. Културалар ўсаётган хонада намлик 60-70% ни ташкил этиши керак. Агар пробирка ёки колбалар оғзи пахта тикин билан ёпилган бўлса, қуруқ ҳаво озик муҳитлар қуришига ва концентрациясининг бузилишига сабаб бўлиши мумкин. Хонадаги намликнинг миқдорини ошириш учун идишларда сув қўйиб қўйиш мумкин. Кўпчилик култураланаётган тўқималар учун оптимал ҳарорат 25-26⁰С, тропик ўсимликлар тўқималари учун эса 29-30С ни ташкил қилади. Морфогенез индукциясини амалга оширишда ҳарорат 18-20С гача пасайтирилади. Ёруғлик, ҳарорат ва оптимал намлик режимини климатик камералар ёрдамида яратиш мумкин.

Каллус тўқималари култураси

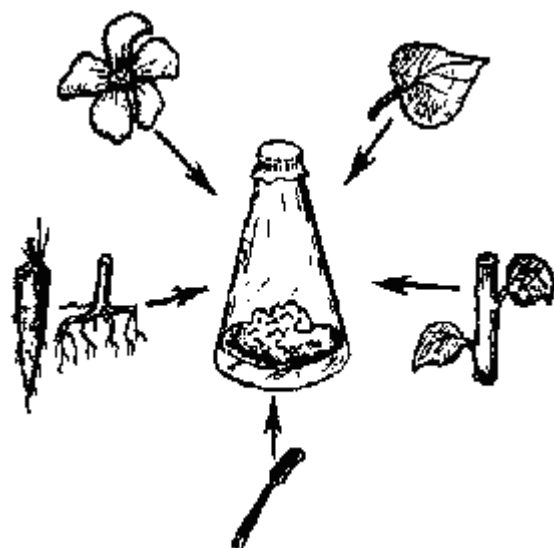
Каллус култураси-бу дедифференцияланган хужайраларнинг тарқоқ бўлинаётган тўқималаридир. *Каллус* - кадоқ маъносини билдириб, ўсимликларнинг шикастланган жойида ва *in vitro* култураланаётган ўсимлик тўқималарида (эксплантларда) хужайраларнинг бетартиб бўлиниши ва ўсишидан ҳосил бўлган қабарикдир.

in vitro каллус тўқимаси асосан оқ ёки сарғиш рангда, камдан – кам ҳолларда оч яшил ранг (мандагора ўсимлиги)да бўлади. Каллус тўқимаси қарий бошлаши билан унинг хужайрасида фенолли бирикмалар тўпланиши сабабли, тўқ қўнғир рангга кира бошлайди. Бунинг олдини олиш учун озика муҳитлари таркибига антиоксидантлар қўшилади.

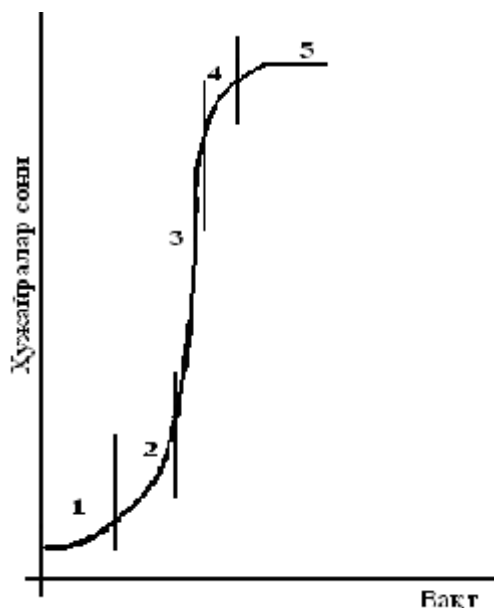
Каллусли тўқималар аморф бўлиб, аниқ анатомик тузилишга эга эмас, аммо келиб чиқиши ва ўстириш шароитига боғлиқ ҳолда улар турли хил консистенцияга эга бўлиши мумкин; 1) пўк, сувга тўйинган хужайралардан иборат, майда, алоҳида агрегатларга уваланиб кетувчи; 2) ўртача зичликда, меристематик маркази яхши кўринган; 3) камбий ва ўтказувчи система элементлари дифференцияланаётган зич тузилишга эга бўлади.

Ўсимлик хужайрасини дедифференцияланиши ва унинг каллусга айланиши учун озика муҳит таркибида фитогормонларнинг икки гуруҳи: ауксинлар ва цитокининларнинг иштирок этиши зарур. Ауксинлар хужайраларнинг дедифференцияланиш жараёнини юзага

келтириб ҳужайраларни бўлинишга тайёрлайди, цитокининлар эса дедифференцияланган ҳужайраларнинг бўлинишини амалга оширади. (3.1 ва 3.2.-расм)



3.1-расм. Ўсимликдан олинган турли эксплантлар: поя қисмлари, илдиз, барг, чангдоналаридан каллус тўқимаси културасини олиш



3.2-расм Каллус тўқимасини даврий ўстиришда ўсиш циклининг эгри чизиқли модели.

Ўсиш фазалари: 1-латент; 2-логорифмик; 3- бир маромда ўсиши; 4-ўсишнинг секинлашиши; 5-стационар.

Агар гормонсиз озиқа муҳитга дифференцияланган ҳужайралардан иборат поя, барг, илдиз (учки меристемаси олинган) қисмлари ёки ўсимликнинг бошқа эксплантлари жойлаштирилса, ҳужайралар бўлинмайди ва каллусли тўқималар ҳосил бўлмайди, чунки дифференцияланган ҳужайралар бўлиниш хусусиятига эга эмас. Ҳар бир ҳужайра ўсишнинг учта давридан ўтади: 1) бўлиниш; 2) чўзилиши; 3) дифференцияланиш. Дифференцияланиш даврида ҳужайранинг иккиламчи қобиғи қалинлашади ва ҳужайра бўлиниш хусусиятини йўқотади. Дифференцияланган ҳужайралар бўлиниш хусусиятига қайта эга бўлишлари учун уларнинг дедифференциацияси юзага келиши яъни ҳужайралар меристематик ҳолатга қайтиши керак.

Дедифференцияланган ҳужайраларнинг кўпайиши тартибсиз, уюлмаган ўсишга, натижада каллусли тўқималар ҳосил бўлишига олиб келади. Демак, каллус тўқималари ҳосил қилиш учун ҳужайралар бўлинишини индукциялаш лозим.

Озиқа муҳитда цитокининнинг йўқлиги тамакини ўзак паренхимаси (ТЎП) митоз олди даврда ҳужайра циклини тўсиб қўяди.

Шунинг учун, агар озиқа муҳотида фақат ауксин иштирок этса, ҳужайраларда бўлиниш кетмайди ва тўрт кунлик латент даврдан сўнг чўзилиш орқали ўсишга ўтади. Озиқа муҳит таркибида ауксинсиз фақат цитокинин бўлса, у ҳолда гормонсиз муҳитдаги каби ТЎП тўқималар қарий бошлайди.

ТЎП тўқималарида олинган натижалар барча ҳоллар учун ҳам тўғри келавермайди, бунга зид мисоллар ҳам бор. Масалан, буғдойнинг етилмаган муртакларида 2,4-Д тутувчи цитокининсиз озиқа муҳотида, кунгабоқар уруғпалласида ауксинсиз фақат цитокинин тутувчи озиқа муҳотида каллус ҳосил қилишни келтириш мумкин. Аниқланишича, натижа кўпинча у ёки бу эксплантнинг ҳужайрасидаги эндоген гормонларнинг миқдорида боғлиқ, яъни уларнинг гормон статуси хусусиятлари билан боғлиқ эканлиги исботланган.

Шунингдек янги маълумотларга қараганда, ҳужайраларнинг бўлинишини юзага келтириб, каллус ҳосил қилишида ауксин ҳам, цитокинин ҳам роль ўйнамайди, балки полисахаридлар ва бошқа индукторлар бу жараёни бошқарар экан.

Апексни базал қисмида каллус тўқималари ҳосил бўлиш жараёни ҳужайра бўлиниши тўхташи билан бошланади. Лаг фаза 24-48 соат давом этади. Бу вақт мобайнида ҳужайралар ўлчами катталашади ва шишади (пўклашади). Лаг фазадан сўнг ҳужайралар каллус ҳосил қилиб жадал бўлина бошлайди. Агар ихтисослашган ҳужайраларнинг дифференцияланиши фитогормонлар таъсирида бўлиниш индукцияси билан боғлиқ бўлса, у ҳолда бўлинаётган меристема ҳужайраларининг дедифференцияланиши бўлинишнинг тўхташи, ҳужайраларнинг қайта ихтисослашиши ва шундан сўнггина ҳужайралар бўлиниши индукцияланиб каллус ҳосил бўлиши билан боғлиқ.

Бир фитогормоннинг таъсир самараси нишон–тўқиманинг физиологик хусусиятига боғлиқ ҳолда турлича бўлиши мумкин.

Кўриб чиқилган мисолларда унинг компетентлиги (омилкорлиги) ҳужайраларнинг дифференцияланиш даражаси билан аниқланади.

Ҳужайраларнинг *in vitro* дифференцияланган ҳолатидан дедифференцияланган ҳолатига ўтишига ва ҳужайраларнинг фаол бўлинишга генлар фаоллигининг (эпигеном ўзгарувчанлиги) ўзгариши сабаб бўлади. Баъзи генларни фаоллашиши ва бошқаларининг репрессияланиши ҳужайра оксил таркибининг ўзгаришига олиб келади. Каллус ҳужайраларида специфик оксиллар ҳосил бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргни фотосинтезловчи ҳужайраларига хос бўлган оксиллар миқдори камаёди ёки умуман йўқолиб кетади.

Икки паллали ўсимликларда дедифференцировка асосида ётувчи генларни репрессия ва дерепрессия жараёни бир паллали ўсимликларга нисбатан энгилроқ ўтади.

Дедифференциацияланган ҳужайраларнинг уюшмаган, тартибсиз кўпайишга ўтиши натижасида, каллус тўқимаси ҳосил бўлади ва ҳужайрада биокимёвий ҳамда цитологик ўзгаришлар юзага келади. Дедифференцировка-ҳужайрадаги захира моддалардан фойдаланиш ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланишидан бошланади. Ҳужайранинг дедифференцияланиши индукцияланганидан 6-12 соат ўтганидан сўнг, ҳужайра девори пўклашади ва шишади, эркин рибосомалар, Гольжи аппарати элементлари, ядрочалар сони ва ўлчами ортади. Барча ўзгаришлар 48-72 соатдан сўнг бошланадиган ҳужайралар бўлиниши учун асос яратади. Културалашнинг бошланғич даврида эксплант ҳужайралари метаболизмида, дедифференцияланиш натижасида пайдо бўлган ўзгаришларни кузатиш мумкин. Бу жараёнларнинг олдини олиш учун эксплантларни олдиндан гормонсиз озиқа муҳитларда 3-6 кун инкубация қилиш мақсадга мувофиқдир. Каллус тўқимаси ўзининг ривожланиш циклига эга бўлиб, бошқа ҳужайраларга хос бўлган: бўлиниш, чўзилиш ва дедифференцияланиш каби ривожланиш даврини такрорлайди, сўнг ҳужайралар қариши ва нобуд бўлиши бошланади. Каллус ҳужайралари дедифференцияланишини иккиламчи деб аташ мумкин, лекин уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайранинг иккиламчи дедифференцияланиши билан адаштирмаслик лозим.

Эксплантларда пайдо бўлган бирламчи каллус тўқималари 4-6 ҳафта ўтгандан сўнг, ҳужайраларининг бўлиниш хусусиятлари йўқолиб, қариши бошланмасдан олдин, янги озиқа муҳитларга кўчириб ўтказилиши керак. Бу муолажани пассирлаш яъни қайта экиш дейилади. Мунтазам пассирлаш орқали ҳужайраларнинг бўлиниш қобилятини ўн йиллаб сақлаб туриш мумкин.

Каллус ҳужайраларининг ўсиши S-симон шаклдаги эгри чизиққа эга (3.2-расм). Ўсишнинг бундай характерини каллус ҳужайраларининг суспензияли културасида кузатиш мумкин. Ўсиш эгри чизиғи бешта фазани ўз ичига олади. Биринчиси, латент ёки лаг-фазада ҳужайралар сони ёки массаси ўзгариши кузатилмайди. Бу фазада ҳужайралар бўлинишга тайёрланади. Навбатдаги иккинчи логорифмик ёки экпониенциал ўсиш фазаси-митотик фаоллиги ва каллус тўқималари массасининг ортиши билан характерланади, бундан ташқари ўсиши тезлашади. Учинчи доимий фазасида ҳужайралар ўсиши доимий бўлади. Шундан сўнг Тўртинчи ўсишнинг секинлашиш фазаси-ҳужайранинг митотик фаоллиги кескин камайганда юзага келади. Бешинчи стационар фазада ўсиш эгри чизиғи платого чиқади.

Бу даврда ҳужайралар деградацияси бошланади, аммо ҳужайралар бўлиниши ҳисобига ҳужайралар сонинг ортиши сабабли яна тенглашади: умуман олганда ҳужайра массасининг ошиш тезлиги нолга тенг бўлади.

Каллус ҳужайраларининг хусусиятлари. Каллус ҳужайралари in vitro шароитида ўсимлик организмнинг нормал ҳужайраларига хос бўлган барча физиологик ва биокимёвий хусусиятларига эга бўлади. Улар иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилиятини ҳам сақлаб қолади. Совуқ ҳароратга чидамли ўсимликлардан олинган каллус тўқималари совуққа чидамлилики намоён қилади. Тропик ва субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималари эса бундай хусусиятга эга эмас. Демак, ҳужайранинг паст ҳароратга чидамлилики хусусияти каллус тўқимаси ҳосил бўлганда ҳам сақланиб қолар экан. Каллус тўқималарига фотопериодик реакциялар ҳам хос бўлиб, бу ундаги фитохром фаоллигининг сақланиши билан боғлиқдир.

Нормал ўсимлик ҳужайраларига хос бўлган юқори ҳароратга, осмотик актив моддаларга, шўрланишга чидамлилики белгилари каллус ҳужайралари учун ҳам умумийдир.

Шу билан биргаликда каллус ҳужайралари нормал ҳужайралардан фарқланувчи қуйидаги бир қатор хусусиятларга ҳам эгадир. Уларда баргнинг фотосинтезловчи ҳужайраларига хос бўлган оксилларнинг миқдори ўзгариб туради, ёки умуман йўқолиб кетади. Каллус ҳужайралари генетик гетерогенлиги ва физиологик асинхронлиги билан ҳам фарқ қилади.

Каллус ҳужайралари организм назоратидан чиқиб кетиши туфайли уюлмаган ҳолда асинхрон равишда чексиз кўпайишига ўтади. Р. Горте томонидан олинган сабзи каллус тўқимаси култураси янги озиқа муҳитига мунтазам ўтказилиб турилиши сабабли 60 йилдан буён ҳозирги кунга қадар тўқималар тўпламида ўсиб турибди.

Каллус ҳужайраларининг ҳужайра цикли очик ерда ўсаётган ўсимлик ҳужайралариникига нисбатан давомийдир.

Каллуснинг асосий хусусияти, ҳужайраларининг ёшига нисбатан гетерогенлигидир. Каллус тўқималарида бир вақтнинг ўзида G_1 -фазадаги ёш ҳужайралар, G_2 -фазадаги қари ҳужайралар ва S -фазадаги ҳужайра бўлиниши давридаги ҳужайралар ҳам иштирок этади.

Каллус ҳужайраларининг энергия алмашилишида ҳам катта фарқ мавжуд. Улар нормал ҳужайраларга нисбатан кам кислород талаб қилади. Рамсгорн 1938 йилда меристема тўқималарининг фаол бўлинаётган ҳужайраларининг ҳам худди шундай хусусиятини аниқлаган эди. Каллус ҳужайраларининг нафас олиш коэффиценти (Н.О.К) 1 дан ортиқ, масалан: нўхат каллуси ҳужайраларида Н.О.К >

3,5 (А.В.Романова ва бошқалар 1988)ни ташкил этади. Бу нафас олиш ва бижғиш орасидаги нисбатининг бижғиш томонига сурилиши, Пастер эффектини камайиб, бижғиш кучайишидан далолат беради. Пастер эффекти деганда кислородли нафас олиш орқали бижғиш жараёнини тўхтатилишини тушуниш мумкин. Ўзгармас нафас олиш субстартида нафас олиш коэффицентининг ошиши шундан далолат берадики, каллус ҳужайраларининг нафас олиши хатто кислород иштирокида ҳам бижғишни тўхта олмайди, углеводларнинг кислородсиз парчаланиши яъни бижғиши амалга ошади. Уюшмаган тўқималарни ўсишида углеводларнинг кислородсиз парчаланиши-бижғиш натижасида бўлинаётган ҳужайралар таркибидаги этил спирти тўпланади. Шундай натижалар нўхатни интакт ўсимталарини уюшмаган холда ўсиши индукцияланганида олинган (Г.М.Артамонов, 1975, 1978).

Каллус тўқималарида митохондриялар меристема тўқималариники сингари яхши ривожланмаган, улардаги кристалар сони кам бўлгани учун аэроб нафас олиш фаоллигига таъсир кўрсата олмайди.

Пастер эффектининг бузилишини ҳайвонларнинг шиш ҳужайраларида Варбург томонидан ўрганилаган. У Пастер эффекти бузилиши натижасида, кислород иштирокида углеводларни кислородсиз парчаланиши яъни аэроб гликолиз шиш ҳужайраларининг углеводларга бўлган эҳтиёжини (19 мартагача) кескин оширади.

Каллус ҳужайралари генетикаси. Узоқ вақтлар мобайнида каллус ҳужайралари генетик бир хил деб ҳисобланган эди. Аммо 1960 йилда каллус тўқималарининг генетик гетерогенлиги аниқланди. Каллус ҳужайралари хромосомалар сони билан фарқ қилади. Меристема тўқималари *in vitro* генетик турғун ҳисобланади.

Каллус ва суспензия култураларида бошланғич ўсимликга хос хромосомаларнинг диплоид тўпламига эга ҳужайраларни, шунингдек 3,4,5 ва ундан ортиқ хромосомалар тўпламига эга полиплоид ҳужайраларни ҳам учратиш мумкин. Каллус тўқималари културасида полиплоидия билан бир қаторда анеуплоидлар (бир ёки бир неча жуфт гомологик хромосомалари камайган ёки кўпайган организмлар)ни ҳам кузатиш мумкин. Каллус ҳужайралари *in vitro*да қанча узоқ вақт култураланса, плоидлик бўйича шунчалик фарқ қилади. Тамакини каллус ҳужайралари 4 йил культивланганидан сўнг, диплоид ҳужайралари умуман қолмайди, ҳамма ҳужайралар полиплоид ёки анеуплоид бўлади. Плоидликнинг ўзгариши културалаш ва озиқа муҳит таркибига кирувчи моддалар таркиби таъсирида юзага келади. Ёки буни бошқача изохлаш ҳам мумкин. Полиплоид ҳужайралар диплоид ҳужайраларга нисбатан қисқа лаг-фазага эга бўлади, шунинг учун тезроқ бўлинишга ўтади. Бунинг натижасида улар қайта экилиш

имкониятига эга бўлади. Иккала сабаб ҳам таъсир кўрсатиши эътибордан ҳоли эмас.

Ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини *in vitro* шароитида културалаш уларнинг плоидлигидаги ўзгаришлардан ташқари, ҳужайраларида хромсомалар абберациясини ҳам пайдо қилади. Бунинг натижасида, култураланаётган тўқиманинг хусусияти, ташқи кўриниши, моддалар алмашилиши, ўсиш тезлиги ўзгаради. Култураланаётган ҳужайраларда микроскоп орқали кўриш мумкин бўлган хромосомалар мутацияси билан бирга, микроскопда кўринмайдиган ўзгаришлар ҳам пайдо бўлиши мумкин. Бу ўзгаришлар хромосоманинг баъзи қисмларига, шунингдек генлар структурасига ҳам таъсир кўрсатиши мумкин. Генлар мутациясини ҳужайраларнинг морфологик, физиологик ва биокимёвий хусусиятларини ўзгариши орқали аниқлаш мумкин.

Култураланаётган ҳужайраларни генетик турғун эмаслигининг сабаби нимада? Бундай сабаблар бир қанча. Энг аввало-бошланғич материалларнинг генетик бир хил эмаслигидир (эксплантнинг гетерогенлиги). Қатор ўсимликларнинг дифференцияланган тўқималари турли плоидликка эга ҳужайралар тутиши билан характерланади ва фақатгина онтогенез даврида бўлинаётган учки меристема, камбий ва бошқа тўқималар доимо диплоид бўлиб қолади. Бошқа сабаби, ҳужайра ва тўқималарни узоқ вақт пассирлаш бўлиб, натижада генетик ўзгаришларнинг тўпланиши, плоидликнинг нотекис ўзгаришига олиб келади. Ажратилган ўсимлик тўқималарини сунъий озиқа муҳитларига ўтказилганда ҳужайраларнинг генетик турғунлиги бузилади. Бундай натижалар озиқа муҳит таркибидаги фитогормонларнинг ҳужайралар генетик аппаратига таъсиридан ҳам келиб чиқиши мумкин. Каллус ҳосил қилиш учун озиқа муҳити таркибига ауксин ва цитокининлар киритилиши зарур. Кўпгина олимлар ўтказган тадқиқотларда бу моддаларнинг мутаген таъсири аниқланган. Айниқса, қатор озиқа муҳитлар таркибига кирувчи 2,4-Д-фаол мутаген ҳисобланади. Ҳужайраларнинг полиплоидланишига цитокинин, айрим ҳолларда кинетин ҳам таъсир кўрсатади.

Каллус ҳужайраларининг генетик хилма – хиллиги уларни ҳужайралар селекциясида қўллаб, атроф муҳитнинг ноқулай омилларига, фитопатогенларга чидамли, ҳосилдорлиги юқори ҳужайралар олиш имконини беради.

Гормонга боғлиқ бўлмаган ўсимлик тўқималари

Каллус ҳужайралари сунъий озиқа муҳитларда фақат гормонлар иштирокидагина бўлиниши мумкин. Аммо, баъзи ҳолларда, улар узоқ вақт култураланганда ҳам гормонсиз муҳитларда ўсиш хусусиятини пайдо қилади яъни ауксинлар ва цитокининларга нисбатан автоном

бўлиб қолади. Бундай ҳужайралар «мослашган» ҳужайралар дейилади. «мослашган» ҳужайралардан ҳосил бўлган тўқималар кимёвий шишлар деб юритилади. «мослашган» тўқималар шиш тўқималар каби нормал регенерацияланмайди ва фақат тератомлар ҳосил қилади, камдан кам ҳоллардагина нормал регенерантларни пайдо қилади.

Каллус тўқималари тўртинчи марта қайта экилгандан сўнг регенерацияланиш қобилиятини йўқотади. Қари каллус тўқималари ҳам регенерацияланмайди.

Ҳужайралар мослашув сабабларининг ҳали аниқ жавоби йўқ. Лекин уларнинг нормал дифференцияланиши ва бўлинишида иштирок этувчи гормонларнинг узоқ вақт таъсир этиши билан боғлиқ бўлиши ҳам мумкин деган тахминлар бор.

Кимёвий шиш деб номланувчи «мослашган» тўқималардан ташқари ўсимликларда бактерия, вируслар томонидан чақирилган ва турли ўсимликларни узоқ формалари дурагайларида пайдо бўлган генетик шишлар ҳам маълум. Табиатда кенг тарқалган ва тадқиқотчиларда катта қизиқиш уйғотган шишлар икки паллали ўсимликларда агробактериялар (*Agrobacterium tumefaciens*) томонидан чақириладиган бўртма – галл шишларидир. Шунингдек ўсимликларда бўртма галлга ўхшаш ҳақиқий шишларидан яна 2 тури мавжуд бўлиб, улардан *A. rizogenes* томонидан юзага келадиган касаллик натижасида – серпопук илдиз, ва *A. ruby* томонидан поя галли (бўртмаси) ҳосил бўлади.

Ўсимликларнинг «мослашган» ва шиш тўқималарининг умумий хусусиятлари уларнинг гормонга нисбатан эҳтиёжсизлиги, яъни гормонсиз озиқа муҳитларда ўсиш хусусиятига эга эканлигидир. Бу уларнинг каллус тўқималаридан асосий фарқидир.

«Мослашган» тўқималар ва шиш тўқималарида ўзининг гормонлари синтезланади, шунинг учун улар ўсаётган озиқа муҳитга гормонларни қўшишнинг ҳожати йўқ.

Ташқи кўринишидан бу тўқималар каллус тўқималаридан фарқ қилмайди, уларнинг ягона фарқи гормон синтез қилиши билан намоён бўлади. Бу хусусият «мослашган» ва шиш ҳужайралари учун умумий бўлсада, уларнинг бу вазифани ечиш йўли ҳар хилдир. «Мослашган» тўқималарда гормонга нисбатан эҳтиёжсизлик, гормон синтезида ва гормон молекулалари тузилишида иштирок этувчи, фермент оксиллар синтезига жавобгар генлар фаоллигининг ўзгариши натижасида пайдо бўлади. Шундай қилиб, ушбу ҳолатдаги ўзгариш эпигеномли характерга эга бўлсада, мутация имкониятларини ҳам эътибордан четда қолдирмаслик керак. «Мослашган» ҳужайраларда ўзгариш эпигеномли ёки генетик характерга эгаллигини аниқлаш учун ҳужайра-ўсимлик-ҳужайра қаторида гормонга эҳтиёжсизлик хусусияти сақланиб қолиши ёки қолмаслигини

назорат қилиш керак. Бунинг учун “мослашган” тўқимада регенерация олиб, кейин регенерацияланган ўсимликдан олинган эксплант умуман гормонсиз ёки гормонлардан бири бўлмаган озиқа муҳитда ўстирилиши керак. Агар мана шу муҳитда хужайра бўлинса, яъни гормондан автоном бўлса, гормонга эҳтиёжсизлик хусусияти наслдан-наслга ўтади, демак, у генетик характерга эга деб айтиш мумкин. Агар гормонсиз муҳитда хужайра бўлинмаса, ва каллусли тўқима ҳосил бўлмаса, яъни гормонга эҳтиёжсизлик наслдан-наслга ўтмаса, ўзгаришнинг эпигеномли характерга эгаллиги ҳақида ҳулоса чиқариш мумкин. Аммо, бу йўл билан фақатгина регенерацияланиш хусусиятини йўқотмаган “мослашган” хужайраларни текшириш мумкин ҳолос. Маълумки, кўпчилик “мослашган” хужайралар регенерацияга бўлган имкониятларини йўқотади, бу эса юқоридаги усулдан фойдаланиб, гормонга эҳтиёжсизлик характери табиатини аниқлашни қийинлаштиради.

Шиш тўқималарда гормонларнинг синтези-ўсимлик хужайрасига бу жараёнга жавобгар бўлган бактерия генларини киритилиши билан боғлиқ.

Ўтган асрнинг 40-йилларида Ф. Уайтнинг шогирди, Браун бўртма галли шиш тўқима култураси ҳатто агробактерия иштирок этмаган (улар юқори ҳарорат таъсирида ўлдирилгандан кейин ҳам) ҳолларда ҳам шиш хусусиятини сақлаб қолишини кузатган. Гормон қўшилмаган сунъий озуқа муҳитида бактериясиз бўртма галл тўқимаси фаол пролиферациясини давом эттира олган. Бу тўқималар, оддий тўқимага нисбатан ауксинларнинг юқори микдорини тутди ва бир неча хил цитокининларни синтезлайди. Браун ўзи ўтказган тажрибалари асосида ўсимлик хужайралари *Agrobacterium tumefaciens* таъсиридан сўнг қандайдир йўл билан шиш хужайраларга айланади деган фикрга келган эди. Агробактериялар ўсимлик хужайрасига *Ti*p (Tumor inducing principle) омилни киритиши натижасида 36 соатдан сўнг, оддий хужайрани шиш хужайрага айлантиради деб тахмин қилинган эди. Кейинчалик *Ti*pнинг ДНКдан иборатлиги ва агробактериянинг катта плазмидаси (*Ti*-плазида) таркибида бўлиши аниқланди. Бактерия хужайрасидан *Ti*-плазмидани бутунлай ёки маълум бир қисми ажратиб олиниши унинг онкоген фаоллигининг йўқолишига сабаб бўлади.

1977 йилда Чилтон шогирдлари билан биргаликда бўртма галл шишлари агробактериялар *Ti*-плазмидасининг маълум қисмини ўсимликнинг ядро ДНК сига бирикиши натижасида пайдо бўлишини исботладилар.

Шундай қилиб, *Ti*-плазида сигменти (*T*-ДНК) хромосомага интеграция ланади (уланади) ва ўсимликнинг трансформацияланган (шиш) хужайраси ирсий апаратининг бир қисми бўлиб хизмат қилади. Агробактерияларнинг *Ti*-плазмидалари *T*-ДНКсининг ўсимликлар хромосомасига интеграцияси шиш пайдо бўлишига ва шиш

хужайраларнинг сунъий озуқа муҳитларида гормонга нисбатан эҳтиёжсиз равишда ўсишига олиб келади. Бу ҳар икки ҳодиса бир-бири билан ўзаро узвий боғлиқ, чунки айнан ауксин ва цитокининлар синтезини назорат қилиб турувчи генларнинг экспрессияси натижасида гормонга эҳтиёжсизлик келиб чиқади ва у хужайраларнинг дедифференцировкасига ва пролиферациясига олиб келади.

Ti-плазмида ўсимлик хужайраларига янги генларни киритувчи табиий вектор бўлиб хизмат қилади. Агробактериялар томонидан индуцирланган шиш хужайралар томонидан ауксин ва цитокининларни синтез бўлиш йўли, нормал ва «мослашган» хужайраларникига нисбатан бошқачароқ, оддийроқ ва қисқадир. Гормонлар фаоллиги ўзгаришини назорат қилиб турувчи T-ДНК участкаларини мутагенлар ёрдамида аниқлашни амалга ошириш мумкин бўлди. Шишнинг ўсиши учун битта локус эмас, балки бир қанча генлар жавобгар эканлиги ҳам аниқланади.

T-ДНК галлар орқали ауксин ва цитокининлардан ташқари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар синтезини детерминация қилади. Бу моддалар шиш пайдо бўлишига сабаб бўла олмайди; балки улар ҳосил бўлган шиш тўқималарида синтез бўладилар. Шиш тўқималар бир неча кунлик бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайди, масалан, коланхоэда шиш индукциясининг 7-чи кунидан опинлар синтези бошланади. Опинлар –аминокислоталар, турли кетокислоталар ва шакарларнинг ҳосиласидир. Улар янги типдаги биологик фаол моддалар ҳисобланади ва фақатгина ўсимликларни бўртма галл тўқималарида учрайди, шунинг учун ҳам уларни бўртма галл хужайраларининг биокимёвий маркери сифатида қараш мумкин. Опинлар агробактериялар учун озуқа модда бўлиб хизмат қилади, аммо шиш тўқималари агробактериялар бўлмаган стерил шароитда опинларни синтез қилаверади. Опинларнинг уч типи маълум: нопалин, октопин ва агропин. Бактерияларнинг бир штамми октопин синтез қилувчи шишларни индукция қилса, бошқа штаммлари нопалин синтез қилувчисини индукция қилади.

Шундай қилиб, агробактериялар томонидан индукцияланувчи «мослашган» ва шиш тўқималарнинг биринчи умумий хусусияти, ўзининг гормонини синтез қилиш хусусияти билан боғлиқ бўлган гормонга нисбатан эҳтиёжсизлигидир. Галл шишларидаги бундай қобилят бактерия хужайрасидаги бегона генларни ўсимлик хужайраларига киритилиши натижасида пайдо бўлади. Кимёвий (мослашган) шиш хужайраларида бу хусусият гормонлар синтези учун жавобгар генларни депрессияси билан алоқадор бўлиши мумкин деб тахмин қилинади, аммо у мутация билан боғлиқ бўлиши ҳам мумкин.

Иккинчи умумий хусусият, биринчисидан келиб чиқиб, - агробактериялар томонидан индуцирланган «мослашган» ва шиш

хужайраларнинг фертил ўсимликларни регенерация қилиш қобилиятининг йўқотилишидир. Галл шишларини кўпчилик ҳолатларда соғлом ўсимлик регенерация қила олмайди. Баъзида улар тератомлар (мажруҳ, органсимон тузилмалар) ҳосил қилади ва улар нормал ривожлана олмайди.

Одатда «мослашган» тўқималар ҳам нормал ўсимликни регенерация қила олмайди, уларнинг ҳужайралари иккиламчи дифференцияланиш ва морфогенезга бўлган қобилиятларини йўқотади. Аммо баъзида, озиқа муҳити таркибини ўзгартириш орқали, «мослашган» чегарасини орқага суриш мумкин. Демак, узоқ вақт пассаж қилинган културалар тўқималаридан ҳам регенерант ўсимликлар олиш имкониятлари ҳам йўқ эмас.

Ҳужайралар суспензияси култураси

Ҳужайралар суспензиясини олиш учун, каллус автоматик равишда аралаштириладиган суяқ озиқа муҳитга ўтказилади. Пектиназа ферменти ёрдамида эксплант тўқималаридан (барг, поя, илдиз ва бошқалар) суспензияли културасини олиш мумкин. Бунда дастлаб эксплант юзасида каллус тўқимаси пайдо бўлади, сўнг ундан ҳужайралар ва ҳужайра агрегатлари ажралади ва натижада ҳужайралар суспензияси ҳосил бўлади.

100 мл ҳужайра суспензияси олиш учун 2-3 г янги каллус тўқимаси керак бўлади. Ҳужайралар суспензиясини тайёрлаш учун асосий зарур шароит–бу доимий равишда муҳитни чайқатиб, аралаштирилиб туришидир. Агар ҳужайра суспензияси ҳаракатсиз ҳолатда турса ҳужайра суспензиясини бўлиниши натижасида каллус ҳосил бўлади.

Ҳужайралар суспензиясининг бўлиниши ауксинлар ва цитокининлар, яъни каллус ҳужайралари ўсиши ва индукцияси учун зарур бўлган гормонлар ёрдамида амалга оширилади. Суспензия културалари каллус ҳужайраларига хос бўлган барча хусусиятларни ўзида намоён қилади.

Суспензиялар пўк каллусдан 2,4-Д тутувчи озиқа муҳитларида яхши ҳосил бўлади. Озиқа муҳит таркибида кальций ионларининг иштирок этмаслиги суспензиянинг суспендирланишини енгиллаштиради. Агар озиқа муҳитга пектиназа ферменти қўшилса (бу фермент алоҳида ҳужайраларни бир-бирига елимлаб турувчи пектат кальцийни парчалайди) ва бу жараён янада енгиллашади.

Биотехнологияда ҳужайралар суспензиясидан қимматли дори-препаратлари учун иккиламчи метаболитлар олишда, ҳужайралар биомассасини ўстиришда ва ҳужайралар селекциясида фойдаланилади. Шу билан биргаликда ҳужайралар суспензияси ажратилган протопластлар олиш учун бошланғич материал сифатида ҳам қўлланилади.

Хужайралар суспензияси билан ишлашда уларнинг хусусиятлари: яшовчанлиги, суспензия културасидаги хужайралар зичлиги, агрегирланиш даражаси, ўсиш тезлигини билиш зарур. Хужайраларнинг яшовчанлиги метилен кўки ва Эванс кўк бўёқларида уларнинг бўялишига қараб аниқланади. Тирик хужайралар бўялмайди, ўлик хужайраларга эса бўёқ осон киради ва кўк рангга бўялади.

Хужайра суспензияси ҳолатининг кўрсаткичларидан бири, хужайра популяцияларининг зичлигидир. Суспензиядаги хужайралар сонини хужайралар мацерациялангандан (хужайраларнинг бири-биридан ажратилиши) сўнг, микроскоп ёрдамида Фукс-Розентал ҳисоб камерасида аниқлаш мумкин. Хужайраларни мацерациялашда (10-20%ли) хром кислотадан фойдаланилади. У хужайраларни бириктириб турувчи пластинкаларни гидролизлайди.

Яхши ўсаётган суспензия каллус култураси каби ўсишнинг S-симон эгри чизиғига эга бўлади. Одатда пассажнинг давомийлиги 14-16 кундан иборат бўлади. Бунда суспензия зичлиги $5 \cdot 10^4$ дан $5 \cdot 10^6$ хуж/мл-гача ортади. Субкультурлаш учун суспензия ўсишнинг экспоненциал даври охирида олинади. Хужайралар сонини кўпайиши, уларни қуруқ ва ҳўл массаси суспензион културани асосий ўсиш даражасини ташкил этади.

Суспензиянинг сифати хужайранинг агрегирланиш даражасига боғлиқ. Агрегатларда хужайралар сони 10-12 дан кўп бўлмаслиги керак. Шунинг учун, суспензия дока, нейлон ёки метал филтлардан ўтказиш орқали йирик агрегатлар, эксплант қолдиқлари ёки каллус тўқималари бўлакларидан тозаланади.

Суспензия културалари қимматли иккиламчи метаболитлар манбаи бўлиб хизмат қилади, шунингдек улар таркибида янги ажойиб бирикмалар, масалан, компототецин, харрингтонин ва бошқа антиканцерогенлар, пептидлар, (протеазалар, фитовируслар ингибиторлари) тутати. Иккиламчи метаболитларнинг синтези ўсишни стационар фазасида максимал даражага етади.

Якка хужайралар култураси

Генетик ва физиологик изланишлар учун, шунингдек хужайралар селекциясида амалий фойдаланиш учун якка хужайраларни культурлаш муҳим аҳамият касб этади. Якка хужайраларнинг клонларини олиш, каллус хужайраларининг генетик бир хил эмаслиги сабабларини аниқлашда ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатиш ишлари гетероген эксплантлардан эмас, балки якка хужайралардан олинган тўқималар устида олиб борилади.

Ажратилган протопластлар културасидан ажратилган якка дурагай хужайра, ўзининг бўлиниши натижасида дурагай хужайралардан иборат клон ҳосил қилади. Бу эса тадқиқотчиларнинг ажратилган протопластлар културасидан дурагай (гибрид) хужайраларни аниқлаб, ажратиш ишларини енгиллаштиради. Бундан ташқари якка протопластларда соматик гибридизация жараёнини кузатиш осон кечади.

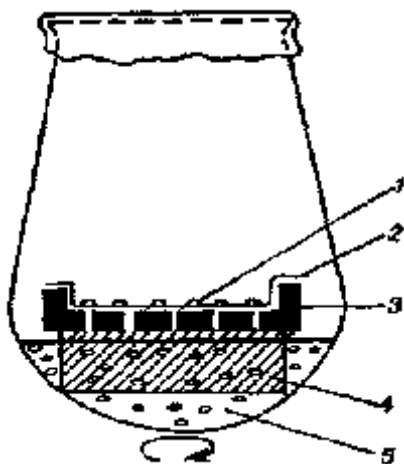
Якка хужайраларни хужайралар суспензиясидан, ўсимлик тўқималаридан, масалан, барг мезофилидан ферментлар ёрдамида мацерация қилинганидан сўнг, алоҳида протопластлардан эса хужайра девори тиклангандан сўнг ажратилади.

Шунингдек, баъзида суспензион културани 15-30 мин. колбада тиндириб қўйиш орқали ҳам бир хужайрали фракцияларини олиш мумкин. Бунда йирик агрегатлар колба тагига чўкади, чўкма устидаги фракция фақат якка хужайралар ва майда агрегатлардан иборат бўлади. Агар бу усул орқали якка хужайралар фракциясини олиш имконияти бўлмаса, у ҳолда мацерацияловчи ферментлар ёрдамида сахароза градиентида центрифугалаш ёки филтрдан (нейлон ёки металл филтр) ўтказиш орқали олинади.

Якка хужайраларни клонлаш бир оз қийин. Чунки каллус тўқималари ўсадиган шароитда якка хужайралар бўлинмайди. Шунинг учун якка хужайраларнинг мажбурий бўлинишини амалга оширувчи махсус усуллар яратилган бўлиб, 1960 йилда Жонсон томонидан таклиф этилган «энага» усули шулар жумласидандир. Бу усулда якка хужайралар бўлинишини стимулловчи «энага» вазифасини алоҳида хужайралардан филтр қоғози ёрдамида ажратиб қўйилган каллус тўқималари бўлаклари бажаради. «энага» иштирокида алоҳида хужайралар бўлинади ва хужайранинг индивидуал колонияси – клонни ҳосил қилади.

Яна бошқа усул – жуда кам миқдордаги таркиби бойитилган озиқа муҳитидан фойдаланиб, якка хужайраларни ҳажми 20 мкл бўлган Купрак ликобчасидаги микротомчида културалашга асосланган. Бу усул академик Ю.Ю.Глеб томонидан тадбиқ қилинган. Микротомчиларда соматик дурагайлаш учун хужайраларнинг ҳосил бўлиши ва бўлинишини кузатиш жуда ҳам қулай.

Якка хужайралар бўлинишини индукциялаш учун «озиклантирувчи қатламлар»дан фойдаланиш мумкин («озиклантирувчи қатламлар» якка хужайра олинган ўсимлик турига мансуб суспензион културанинг фаол бўлинаётган хужайралари) (4.3.расм).



4.3- расм. Ажратилган протопластлар ва якка ҳужайраларни ўстириш учун ҳужайраларнинг суспензияли културасидан “энага” сифатида фойдаланиш.

1-ҳужайралар колонияси; 2-филтр қоғоз; 3-алюмин тўр; 4-пенополиуретан; 5-ҳужайралар суспензияси. (Бу Дик Куанг, З.Б.Шамин 1985)

Интенсив бўлинаётган ҳужайралар културасидан олинган озиқа муҳитидан қўшилса, ҳужайралар бўлиниши стимулланади ва озиқа муҳитни кондицирланади. Кондицирловчи омил ҳужайралар суспензиясини ўсишнинг экспоненциал фазасида бактериал филтрдан ўтказиш орқали олинади. Умуман олганда, юқорида берилган барча усуллар бўлинаётган ҳужайралар ажратган кондицирловчи омилдан фойдаланишга асосланган.

Кондицирловчи омилнинг ҳужайралар бўлинишига таъсир механизми ва кимёвий табиати Ҳозирча аниқланмаган. Аммо, бу омилнинг иссиққа чидамлилиги, сувда эрувчанлиги, паст молекулали моддалар тутиши ва фитогормонлар унинг ўрнини боса олмаслиги ҳақида аниқ маълумотлар бор (А.Н.Павлова,Р.Г.Бутенко 1969). Қўшимча қилиб яна шуни айтиш мумкинки, бу модда рН 4-11 бўлганда барқарор, унинг молекуляр оғирлиги 700 Д ва бу омилнинг brassinosteroidнинг синергисти эканлиги аниқланган (Bellmcampi, Morpurgo 1987). Шундай қилиб, тадқиқотларнинг кўрсатишича, бу модда кимёвий модда эмас, ҳужайралар ажратаётган омиллар йиғиндиси экан.

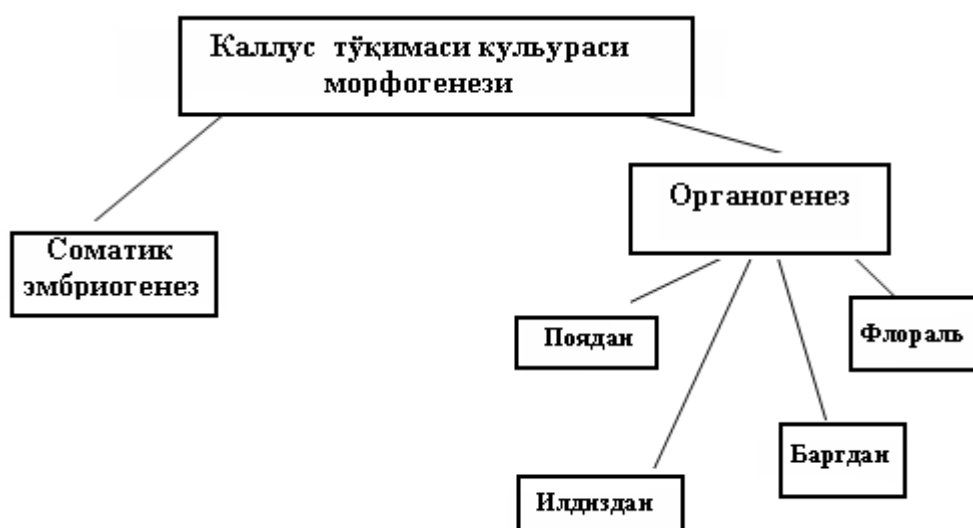
Каллус тўқималарида морфогенез

Ҳужайраларнинг дедифференциялангандан кейинги тараққиёти ривожланишининг бир неча йўли мавжуд. Биринчи йўли - бу етук ўсимликнинг иккиламчи регенерацияси, орган тўқима, ҳужайра даражасидаги дифференцияланиш эхтимолдир. Иккинчи йўли - ҳужайранинг иккиламчи дифференцияланиш ва регенерацияланиш қобилятининг йўқолиши, турғун дедифференцияланиши, гормонсиз муҳитда ўсиш қобилятини пайдо қилиши, яъни шиш тўқимага айланиши. Бундай хусусиятлар кўчириб ўтказилган қари ҳужайраларга хосдир. Учинчи йўли – каллус ҳужайраларини нормал ривожланиш даври, унинг қариши ва nobud бўлиши билан тугайди.

Бундай ҳолатда ҳужайра иккиламчи дифференциялашишга учрайди ва бўлинишдан тўхтади (ўсишни стационар фазаси). Аммо, бундай дифференцияланиш морфогенезга олиб келмайди, балки унга қари каллус ҳужайраларига хос бўлган хусусиятларни сингдиради.

Қишлоқ хўжалиги биотехнологияси учун тўқималар културасида якка ҳужайралардан етук ўсимлик тиклаш имконияти муҳим аҳамият касб этади. Бу баъзида алоҳида органларни ҳосил қилиш орқали ҳам амалга оширилади.

Каллус тўқималари културасидаги уюшмаган ҳужайралар массасидан ташкилланган структураларнинг ҳосил бўлишига *морфогенез* деб аталади. Морфогенезни асосий икки тури мавжуд (3.4-расм).



3.4-расм. Каллус тўқимаси културасидаги морфогенез турлари

Тўқималар културасида у органогенез кўринишида (бир кутбلى структураларнинг, яъни алоҳида органларнинг ҳосил бўлиши): илдиз, поя, гул ва баргда соматик эмбриогенез кўриниши (соматик ҳужайраларда кўш кутбلى муртаксимон структураларнинг ҳосил бўлиши) да намоён бўлиши мумкин. Органогенезда дастлаб алоҳида органлар регенерацияланади, кейин эса, улардан етук ўсимлик пайдо бўлади. Илдиз органогенези бундан мустасно.

Соматик эмбриогенез натижасида оргогогенездан фарқи ўлароқ, илдиз ва поя меристемасига эга бўлган куртаклар ҳосил бўлиб, ундан кейинчалик етук ўсимлик ривожланади.

Ажратилган соматик ҳужайралар ўзининг ривожланиш дастурини тўлиқ амалга ошириши ва яхлит ўсимлик организми пайдо қилиш хусусиятига ўсимлик ҳужайрасининг тотипотентлиги деб аталади. Ҳар қандай ўсимлик ҳужайраси бир хил потенциал имкониятларга эга, чунки улар барча генлар тўпламига ва ҳужайрани зиготага хос

бўлган ривожланиш дастурига эга бўлади. Шунинг учун ҳам гул барги ҳужайрасидан ёки поянинг ўзак паренхимасидан, ёки ўсимликнинг ҳар қандай тўқималари ҳужайрасидан олинган каллус тўқималаридан етук ўсимлик ўстириш мумкин. Аммо унинг тотипотентлик хусусиятлари ҳар доим ҳам намоён бўлавермайди, чунки турли типдаги ҳужайраларнинг потенциал имкониятлари турлича бўлади. Улардан баъзи бирларида генлар кучли репрессия ҳолатида бўлади, шунинг учун тотипотентлигининг намоён бўлиши чеграланади.

Ўсимлик ҳужайралари тотипотентлиги ҳақидаги назария 1902 йилда Г.Хаберландт томонидан илгари сурилган бўлса ҳам ўша вақтларда тажрибалар билан исботланмаган эди. Хаберландт фикрига кўра ҳар қандай ўсимлик ҳужайраси янги организмни пайдо бўлишига асос бўла олади ва фақат ўсимлик организми ҳужайранинг ривожланишига бўлган потенциалсини тўхтатиб қўйган тақдирдагина бу ҳол кузатилмаслиги мумкин. Ҳужайраларни ўсимликдан ажратиш бу потенциалларнинг намоён бўлишига ёрдам беради.

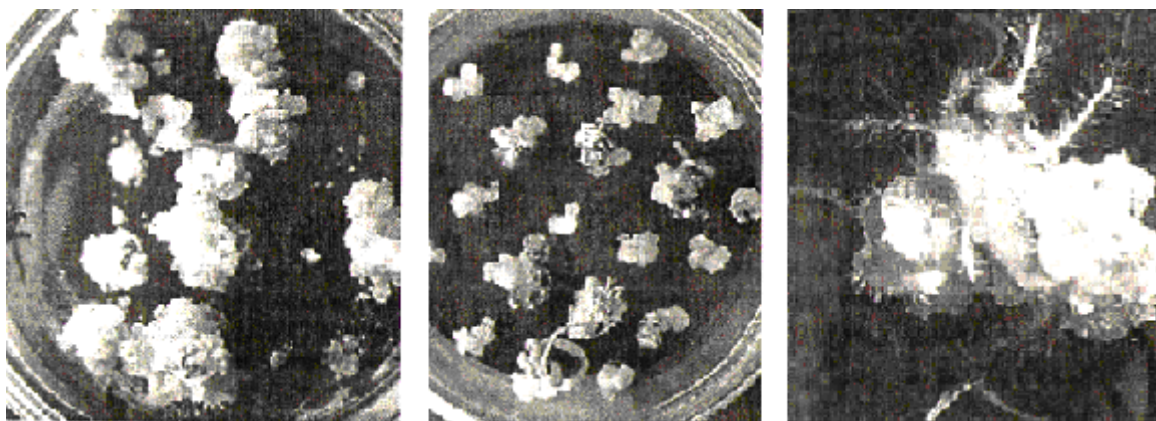
Морфогенезнинг ҳужайра асосини цитодифференцирланиш ташкил этади. Ҳужайраларнинг иккиламчи дифференциланишидан сўнг, ўсимликнинг регенерацияси бошланади. Бунда дедифференцияланган ҳужайралар ихтисослашган ҳужайраларнинг структураси ва функциясини қайта эгаллайди.

Каллус тўқималарини иккиламчи дифференцияланиши ҳар доим ҳам ўсимлик морфогенези ва регенерацияси билан тугалланмайди. Баъзида у фақат тўқималар (гистодифференцировка) ҳосил бўлишига олиб келади. Шу йўл билан каллус ҳужайралари флоэма ёки ксилема элементларига айланиши мумкин. Иккиламчи дифференцияланишга мисол қилиб, дедифференцияланган ва фаол бўлинаётган ҳужайраларнинг бўлинмайдиган, қари каллус ҳужайраларига айланиб қолишини келтириш мумкин (ўсишнинг стационар фазаси).

Барча турдаги иккиламчи дифференцияланишлар орасида морфогенез катта қизиқиш уйғотади, чунки у каллус ҳужайрасидан етук ўсимлик регенерациясини амалга ошириш имконини беради.

Дифференцировка ва морфогенезнинг асосида турли генларни бирин-кетин қўшилиши ётади, яъни ҳужайраларнинг дифференцировкаси генларнинг дифференциал фаоллиги билан аниқланади. Структура генлари фаоллигининг ўзгариши, уларнинг дерепрессияси, репрессияси ёки амплификацияси (кўпайиши) билан боғлиқ бўлиши мумкин. Бу жараёнда фитогормонлар катта роль ўйнайди.

Каллус тўқималари културасидаги морфогенезни бошқариш мумкин. Ажратилган ўсимлик хужайраларини морфогенезга бўлган қобилятига ҳам ички, ҳам ташқи омиллар таъсир кўрсатади. Ички омилларга: бошланғич ўсимликнинг қайси турга мансуб эканлиги, эксплант олинган орган, эксплантнинг ёши киради. Ташқи омилларга эса озика муҳит таркиби, ҳарорат, ёруғлик киради. Озика муҳит таркибига кирувчи цитокинин ва ауксинлар ўзаро нисбатининг ўзгариши морфогенезни кучли индуктори ҳисобланади. Ауксинга нисбатан цитокининлар миқдорини юқори бўлиши поя органогенезини, аксинча бўлганда эса (ауксин миқдори цитокининдан кўпроқ бўлиши) илдиз органогенезини ривожлантиради (4.5- расм).



4.5-расм. Каллус тўқимасининг морфогенетик реакциялари:

а) – пролиферицияланаётган каллус; б) адвентив куртакларнинг ҳосил бўлиши; в) – каллус тўқималарида илдиз ҳосил бўлиши (ризогенез).

Агар каллус тўқимасида илдиз ҳосил бўлса, у ҳолда ҳеч қачон ўсимлик регенерацияланмайди, поя органогенезида эса аввал ниҳол ҳосил бўлади, сўнг ауксин миқдори оширилган озика муҳитга кўчириб ўтказилганда, илдиз отади ва етук ўсимлик ривожланади.

Шундай қилиб, ауксин ва цитокинин типидagi экзоген гормонлар нисбатидаги фарқ, бир томондан културадаги хужайранинг дедифференцияланишига ва уюшмаган пролиферицияга (бўлинишга) ўтишини, бошқа томондан у ёки бу турдаги морфогенезнинг иккиламчи дифференцировкасининг индукцияланиши имкониятларини белгилаб бериши 1957 йилда Ф. Скуга ва Е. Миллер томонидан аниқланган. Демак, ауксин ва цитокининлар нисбатини ўзгариши, хужайраларнинг дедифференцияланиб каллус тўқималарининг ўсиши ёки дефференцияланиб каллус тўқималарида морфогенезини чақиришига, улар нафақат ўсиш ва ривожланишни регулятори, балки дифференцияловчи регулятори бўлиб ҳам хизмат қилади.

Агар органогенезни ауксин ва цитокининлар ёрдамида индукциялаш мумкин бўлса, унда соматик эмбриогенезнинг экзоген фитогормонларга умуман эҳтиёжи бўлмайди. Одатда эмбриоген зоналар каллус ҳосил қилиш учун фойдаланиладиган озиқа муҳитларда ўсаётган каллус тўқималарида ҳам пайдо бўлади. Каллус тўқималарида соматик (жинссиз) муртакларнинг ривожланишини амалга ошириш учун, озиқа муҳит таркибида дедифференцияловчи омиллар (2,4 Д ёки бошқа ауксинлар) иштирок этмаслиги керак. Ривожланаётган муртакнинг экзоген гормонларга эҳтиёжи йўқ, чунки у ўзини ўзи гормон билан таъминлайди.

Соматик эмбриогенезнинг гормонларга нисбатан мустақиллигининг сабаби, хужайраларнинг алоҳида ажратилиш жараёни, унинг тотипотентлигини, яъни морфогенезга ўтишини стимуллайди. Шундай қилиб, озиқа муҳитидаги гормонлар нисбатининг ўзгариши ва хужайрани ўсимлик организмдан ажратилиши морфогенезнинг асосий стимули бўлади. Морфогенезнинг қўшимча стимуллари озиқа муҳити таркибида иштирок этаётган кумуш нитрат, аммоний нитрат, баъзи аминокислоталар (пролин, тирозин, баъзида серин) полиаминлар (путресцин ва спермидин)лар киради. Баъзи ҳолларда морфогенез жараёнини маннит ва сорбит ҳам стимуллайди. NO_3^- ионлари каллус тўқималарида пайдо бўлган уюшган структураларнинг ривожланишига таъсир кўрсатади, уларнинг индукциясини эса NH_4^+ ионлари стимуллайди. Гебберал кислота поя куртакларининг ривожланишини, абсцисов кислота эса соматик муртак органларининг дифференцияланишини стимуллайди.

Юқорида баён этилган моддалардан айримлари, масалан кумуш нитрат кўчириб ўтказилган қари култураларнинг регенерацияланишга бўлган қобилиятини узайтиради.

Морфогенезнинг у ёки бу стимуллари таъсирида каллус хужайраси детерминланиши керак, аммо хужайраларнинг ҳаммаси эмас, фақатгина 400-1000та хужайрадан битта хужайра регенерацияланишига қодир бўлади. Шунинг учун хужайранинг морфогенезга ўтишда фақат индукторнинг (стимулятор) иштироки етарли бўлмай, хужайра ҳам жавобга тайёр бўлиши керак. Хужайраларнинг морфогенез стимуллари қабул қилиш хусусияти хужайраларнинг *компитентлиги* (омилкорлиги) дейилади. Шунинг учун, тадқиқотчилар хужайралар компитентлигини тасодифий ва камдан-кам ҳол деган хулосага келганлар. Компитент бўлмаган каллус хужайраларининг тақдири нима бўлади деган савол пайдо бўлиши мумкин: бу хужайралар културада бўлинишни давом эттиради ва айримлари кўникма ҳосил қилиб, гормонсиз ўсишга ўтади, айримлари

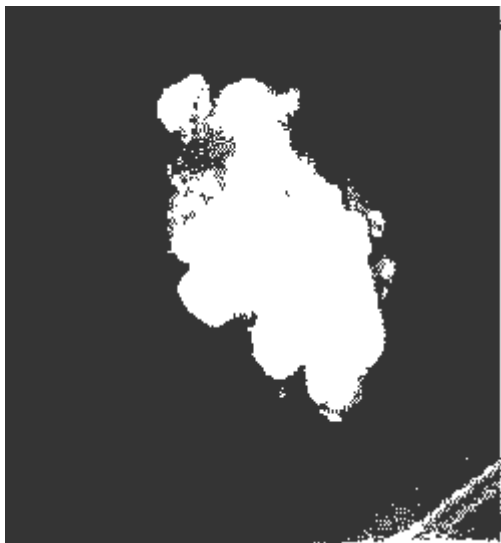
эса экзоген гормонлардан фойдаланишни давом эттиради, лекин улар регенерацияланиш қобилиятини умуман йўқотади. Бундай тўқималар «мослашган» ва янги каллус тўқималари ўртасидаги оралиқ ҳолатни эгаллайди

Каллус тўқималарида морфогенез зарурий шароитлар таъсирида, детерминацияланган хужайра атрофидаги каллус тўқималарига нисбатан ўзгариши, яъни хужайра девори қалинлашишидан бошланади. Бу ҳолат 1972 йилда Данилин томонидан сабзи тўқима културасининг соматик эмбриогенези кузатилганда аниқланган.

Ташаббусчи (инициал) хужайра соматик эмбриогенезда зиготани, органогенезда эса меристема марказини ривожланишини бошланишига асос бўлади. Детерминацияланмаган каллус хужайраларига нисбатан ташаббусчи хужайралар ядросини йириклиги ва вакуоласи ўлчамининг кичиклиги билан фарқ қилади. Одатда ядроси марказда жойлашади. Ташаббусчи хужайралар таркибида кўплаб миқдорда захира моддалар; крахмал, баъзида липидлар бўлади.

Ташаббусчи хужайралар, унинг қайта тузилишига ва навбатдаги бўлинишга ўтишига тайёрланиши учун, бир қанча вақт лаг фазада қолади, сўнг бу хужайралар майда изодиаметрик хужайраларнинг сферик массасини ҳосил қилиб майдалаб бўлинади. Органогенез ҳолатида бу хужайралар массасини *меристематик марказ*, соматик эмбриогенез ҳолатида эса *глобуляр проэмбрио* деб аталади. Кейинчалик меристематик марказда поя, илдиз, барг ёки гулнинг бошланғич куртаклари дифференцияланади, шунга мувофиқ поя, илдиз, барг ёки флорал органогенез содир бўлади.

Глобуляр проэмбриода эса биполяр эмбрионидли структуралар ривожланади. Каллус тўқимасидан соматик эмбрионидларнинг шаклланишини глобуляр, юраксимон, торпедосимон, соматик муртак каби кетма-кет амалга ошадиган бир неча босқичларга ажратиш мумкин. Меристема маркази ёки проэмбрионинг каллус тўқимаси четида, ёки ичида пайдо бўлиши мумкин. Одатда уларнинг қаерда пайдо бўлиши ҳақида аниқ қонуният йўқ (3.6- расм)



3.6-расм. Соматик муртакларнинг шаклланиши.

Лекин, тамаки ўзак паренхимасидан олинган каллус тўқимасининг поя органогенези

хужайранинг маркер (белги) оксигили ҳисобланади. Шу билан бир вақтда каллус тўқималари хужайраларнинг индуцирланган детерминацияси унда поя меристема хужайралари антиген – маркерларини пайдо бўлиши билан бориши ҳам аниқланган.

Эмбриоген културадан ажратилган гликопротеид оксигилини кондицирловчи омил сифатида кўриш мумкин. Каллус тўқималари янги озиқа муҳитларга мунтазам кўчириб ўтказилганда, гликопротеид тўпланиб улгурмайди ва эмбриогенез жараёни юзага келмайди. Агар хужайралардан соматик эмбриогенезга ўтиш жараёнида пайдо бўладиган оксиллар ажратиб олинса ва бу оксиллар узун, (эмбриоген бўлмаган) морфогенез қобилятини йўқотган каллус хужайраларига киритилса, уларнинг морфогенези индуцирланади.

Морфогенезни янги маркерларини излаб топиш ишлари давом этмоқда. Меристема маркази хужайралари ва эмбрионидли структуралар пайдо қилувчи хужайралар каллус хужайраларидан РНК ва ДНК синтезининг жадаллиги билан фарқ қилади. Бу улардаги оксил алмашинувининг ўзига хослиги билан боғлиқ. Оксил алмашинувидаги ўзгариш, дедифференцияланган хужайраларда ўтадиган жараёнларга ўхшаш бўлсада, аммо натижаси турличадир, Р.П.Бутенконинг фикрича, реакцияни ўзига хослиги, макромолекулаларни синтезини тезлашиши билан эмас, балки умумий фонда бўладиган регулятор (бошқарувчи) типдаги оксиллар ҳосил қилувчи ўзига хос синтезлар билан

бундан мустасно, унинг меристема маркази доим каллус массасининг пастки қисмида жойлашади

Каллус хужайраларининг морфогенезга ўтиш даврида хужайра метаболизмида ўзгаришлар юзага келади. Хужайрада антиген – оксилларнинг пайдо бўлиши морфогенез билан боғлиқ.

Россия олимларининг аниқлашича, тамаки каллус тўқималарида морфогенез жараёнида баъзи оксил маркерлар пайдо бўлади ёки йўқолади.

Меристемаларда 2 та антиген – оксил топилган бўлиб, бу оксиллар

белгиланади Каллус тўқималарининг морфогенезга ўтиши, нафас олиш метаболизмини ўзгариши билан ҳамкорликда боради. Умуман олганда нафас олиш (CO_2 бўйича) кучаяди, аммо унинг характери пентозофосфат йўли интенсификацияси йўналишида ўзгаради. Нафас олиш ферментларининг фаоллиги ошади. Биокимёвий ўзгаришлардан сўнг хужайрани қайта структуравий ташкилланиши (реорганизацияси) бошланади. Хужайрани биокимёвий дифференцияланиши ҳар доим структуравий ўзгаришлардан олдин содир бўлади.

Морфогенез йўлига ўтган хужайраларда рибосомалар ва митохондриялар сони ортади, уларнинг ички структураси ўзгаради. Каллус хужайраларида морфогенез жараёни узоқ давом этади. Каллус тўқималарида бир вақтнинг ўзида тўлиқ шаклланган структуралар, шунингдек эндигина шу йўлга ўтган хужайралар мавжуд.

Меристема маркази хужайралари ва глобуляр проэмбриони фаоллиги сунъий равишда оширилганда уларни озика моддаларни ўзига тортувчи марказга айлантиради. Бундай ҳолларда кўпинча уларнинг атрофидаги каллус хужайралари емирилади ва ҳосил бўлган эмбриодлар каллус хужайралари массасидан осон тушиб кетади.

Каллус хужайралари бир – бирлари билан плазмодесмалар орқали боғланмаган. Муртаксимон структуралар ёки меристема марказларини пайдо бўлганда хужайралар орасидаги боғлар плазмодесмалар ёрдамида тиклайди.

Каллус хужайраларида морфогенез жараёни билан бошланиб, ўсимлик пайдо бўлиши билан тугайдиган барча ўзгаришлар махсус генлар томонидан бошқарилади. Ҳозирги вақтда бир гуруҳ олимлар морфогенез хоссаси полигенлар ва бир неча хромосомалар томонидан назорат қилинади деб ҳисобласалар, бошқалари, бу хусусият иккита ядро генлари томонидан бошқарилиб турилади деган фикрларга эга. Баъзи ҳолларда каллус тўқималаридан у ёки бу генотипни регенерация қилиш мумкин эмаслигини каллус хужайраларининг морфогенетик фаоллиги генетик табиатга эга бўлганлиги сабабли, морфогенетик генотипларни чатиштириш хужайраларнинг *in vitro* фаол регенерацияланиш қобилиятини оширишга олиб келиши мумкин.

Иккиламчи синтез моддаларни олишда каллус хужайралари култураси

Ўсимликдан алоҳида ажратилган хужайраларни *in vitro* шароитида субкултуралаш усуллари мавжуд бўлиб, бу усуллар ёрдамида олинган каллус тўқималаридан назарий изланишлар учун, шунингдек амалий қўллаш учун ҳам фойдаланилади. Ажратилган хужайра, тўқима ва органларнинг иккиламчи метаболизм моддаларни синтезлаш

хусусияти муҳим аҳамият касб этади. Улардан тиббиёт, ўсимликлар ҳимояси, ветеринария, озуқа ем ишлаб чиқариш, озиқа-овқат саноати, парфюмерия учун зарур моддалар ишлаб чиқаришда фойдаланиш мумкин. Бу йўналишдаги ишларга тадқиқотчиларнинг қизиқиши тасодиф эмас, чунки физиологик фаол моддалар олиш учун ҳужайралар биотехнологиясининг анаъанавий тарзда ўсимликлар хом-ашёси олишга нисбатан: 1) ҳужайра биомассасини олиш мавсумга, иқлим ва тупроқ шароитларига боғлиқ эмас; 2) зарур миқдорда керакли моддаларни синтезлаб берувчи ҳужайралар суспензиясини культурлашнинг шароитини оптималлаш имкониятининг мавжудлиги; 3) жараёни автоматлаштириш мумкинлиги каби бир қанча устунлик томонлари бор.

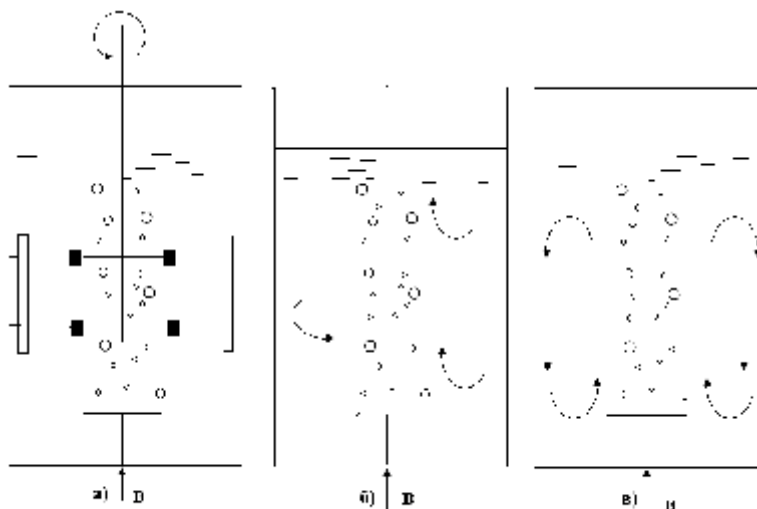
In vitro култураланилаётган каллус ҳужайраларининг интакт ўсимлик ҳужайралари каби иккиламчи метаболитлар синтез қилиши аниқланган. Шунингдек, миқдор ва сифат жиҳатидан улар ўхшаш бўлиши мумкин. Ҳозирги кунда саноатда кенг қўлланилаётган иккиламчи метаболитларни синтезловчи, турли оилаларга мансуб ўсимликлар ҳужайралари културасини катта тўплами йиғилган. Булардан узоқ шарқ женшени – диосгеенин манбаи сифатида, дельтасимон дискорея – стероид гликозидлар, илонсимон равольфия – аймалиннинг антиаритмик алколоиди, стевия – стевонид манбаи бўлиб хизмат қилади. Кейинги вақтларда тадқиқотчиларда резавор тис ҳужайраларини биореакторларда културалашни амалга ошириш катта қизиқиш уйғотмоқда. Аниқланишича, бу ўсимликнинг ҳужайралари таксон-моддаларини синтезлар экан, бу модда саратон касаллигига қарши препарат тайёрлашда ишлатилади.

Ҳужайра биомассасининг in vitro ва in vivo шароитларда турлича тезликда ўсиши тажрибаларда аниқланган. Масалан, 1 йилда женшен илдизини ўсиши тайгада 1 г ни ташкил этса, плантацияларда эса 3 г. Илдиз ҳужайралари агарли (in vitro) озиқа муҳитда ўстирилганда бир кунда 1 л озиқа муҳитда 0,4 г қуруқ массасини олиш мумкин. Женшен ҳужайраси суспензияда ўстирилганда 50 литрли ферментерда бир суткада бир литр озиқа муҳитда 2,0 гр га етади, бу плантацияда етиштирилганига нисбатан 1000 марта кўп демакдир. Женшеннинг қимматбаҳолигини ҳисобга олиб (плантацияда етиштирилган ўсимликнинг илдизининг 1 килограмми 100-150 АҚШ доллари, ёввойи ҳолда ўсувчиларининг баҳоси бир неча минг АҚШ доллари туриши мумкин) унинг ҳужайра култураси биомассасини олишни биотехнологик усули эътиборга моликдир. 4.3. жадвалда юксак ўсимликлар ҳужайра културалари синтезлаган баъзи иқтисодий муҳим маҳсулотлар келтирилган.

Юксак ўсимликлар хужайралар културасидан олинган иқтисодий муҳим маҳсулотлар. (Р.Г.Бутенко. 1999)

Анаъанавий ўсимлик маҳсулотлари	Янги фаол моддалар	Биотрансформация маҳсулотлари
Алколоидлар	Фитовируслар ингибиторлари	Метилдигоксин Дигоксин
Стериодлар Терпенлар ва тереноидлар	Антиконцерогенлар композицин	Метол
Бетанинлар гликозидлар Полифеноллар Полисахаридлар Эфир ёғлари	Протеиназа ингибиторлари Ажойиб оксиллар	Неоментол Гераниол Нерол цитронеллол
Табиий бўёқлар (пигментлар) убихинон маза (там) берувчи қўшимчалар, инсектицидлар латекс		

Иккиламчи синтез моддаларнинг културал суспензиялари биореакторларда ўстириш йўли билан олинади. Биореакторлар ўзининг конструкцияси бўйича барбатажли бўлади, уларни аралаштириш кўтарилаётган ҳаво пуфаклари ҳисобига ҳаво аэрацияси орқали ва механик аралаштиргични қўллаш орқали амалга оширилади (3.7- расм).



3.7-расм. Суспензия култураларини културалаш учун қўлланиладиган биореакторнинг ишлаш схемаси

Тажрибалардан аниқланишига иккиламчи метаболитлар хужайра ичидаги органеллаларда: пластидлар, хлоропластлар, митохондриялар ва микопластларда синтезланади, қўшни хужайраларга, ёки озиқа

муҳитга ташилмайди, ҳужайрани бўш қисми ва вокуласи кўпинча метаболитларни йиғишга хизмат қилади (Князьков И. 1996).

Ҳужайралар *in vitro* шароитида ўстирилганда иккиламчи моддаларнинг миқдор ва сифат ўзгариши озика муҳит таркиби боғлиқ. Масалан, женшен ўсимлиги културасида озика муҳитдаги турли шаклдаги азотларнинг нисбати стероид сапонинларнинг маҳсулдорлигига таъсир кўрсатиши аниқланди. Демак аммонийли ва нитратли азотнинг 1:3 нисбати биомассани ошишига, 2:3 нисбати маҳсулдорлигига таъсир кўрсатмади, аммо диосгенин тўпланишини камайишига олиб келди. Озика муҳитда сахароза миқдорининг оширилиши (5%) ҳужайра массасини ўсишига, сахароза миқдори камайирилганда эса (1,5 %) диосгениннинг маҳсулдорлигини ошишига таъсир кўрсатади (Шаталова 1998).

Биореакторларда ҳужайралар културасини ўстириш технологияси кенг ҳажмли жараён ҳисобланади, яъни катта ҳажмдаги биореакторларда ҳужайраларни ўстириш шароити ишлаб чиқилади. Ҳозирги кунда бир неча кубометр ҳажмли биореакторларда турли ҳужайралар култураларини муваффақиятли масштаблаштириш бўйича етарли миқдорда кўп омиллар йиғилган масалан, DJVERSA (ҳозирги вақтда FYTON) немис фирмаси мутахассислари бир қатор ўсимликлар ҳужайраларини 75000 литрли ҳажмга эга бўлган биореакторларда ўстиришга эришганлар.

Ўсимликларни клонли микрокўпайтириш

Ҳужайра ва тўқималар култураси соҳасида эришилган ютуқлар асосида ўсимликларни вегетатив кўпайтиришнинг янги усули- клонли микрокўпайтириш (*in vitro* шароитида (пробиркада) ўсимликларни жинсسىз кўпайиши, дастлабки нусхаси билан генетик бир хил) усули яратилди.

Усул асосида ўсимлик ҳужайрасининг фақат ўзига хос бўлган тотипотентликни амалга оширишдек ажойиб хусусият ётади, яъни экзоген омиллар таъсирида ўсимлик организми пайдо бўлади. Бу усул, ўсимликларни кўпайтиришнинг анъанавий усулларига нисбатан бир қатор афзалликларга эга:

- генетик бир хил экиш материаллар олиш;
- меристема културасидан фойдаланиши орқали ўсимликларни вирусдан ҳоли қилиш;
- кўпайтиришнинг юқори коэффиценти (10^5 - 10^6 – ўтли, гулли ўсимликлар учун, 10^4 – 10^5 – бутасимон дарахтлар учун, нинабарглилар учун 10^4);
- селекцион жараёни давомийлигини қисқариши;

- ўсимликларни ювенил фазадан репродуктив фазага ўтишни тезлашиши;

- ананавий усуллар билан кўпайиши қийин бўлган ўсимликларни кўпайтириш мумкинлиги;

- бутун йил мобайнида иш олиб бориши мумкинлиги, экиш материаллари ўстириш учун майдонларнинг тежамлилиги.

- ўстириш жараёнини автоматлаштириш имконияти.

Ўсимликларни клонли микрокўпайтириш соҳасида биринчи муваффиқиятга ўтган асрнинг 50 йилларида француз олими Жорж Морел томонидан эришилган. У орхидеянинг-регенерант ўсимлигини олган. Бу вақтда ўсимликларни апикал меристемасини *in vitro* културалаш техникаси яратилган эди. Тадқиқотчилар бирламчи эксплантлар манбаи сифатида ўтчил ўсимликлардан: чиннигул, хризантема, кунгабоқар, нўхат, маккажўхори, қоқиўт, салатдан фойдаланиб, бу ўсимликларни регенерация жараёнига ва шаклланишига озиқа муҳитлари таркибининг таъсирини ўргандилар. Ж.Морел ўз тажрибаларида шунингдек, цимбидиум (орхидеялар оиласига мансуб) ўсимлигини ўсаётган учки конуссимон ва икки – уч барг асосига эга қисмини маълум бир шароитда ўстириб сферик сфералар-протокормнинг ҳосил бўлишини кузатган. Шаклланган протокормларни ажратиб, сўнг янги тайёрланган озиқа муҳитда барг примордийлари ва илдиз ҳосил бўлгунга қадар културалаш мумкин эди. Натижада, бу жараённинг хоҳлаганча давом эттириб кўп миқдорда, юқори сифатли, генетик бир хил, вируссиз экиш материаллари олиш мумкин эканлиги аниқланди.

Шундай қилиб, ўсимликларни клонли микрокўпайтиришда биринчи муваффақият ўтчил ўсимликлар апикал меристемасини ўзига мос озиқа муҳитда културалаб, регенерант ўсимлик олиш билан боғлиқ.

Аммо микрокўпайтиришни қўллаш соҳаси хилма-хил ва кун сайин ривожланиб бормоқда. Бу биринчи навбатда дарахтларни, айниқса, нинабарглиларни *in vitro* кўпайтириш ва *in vitro* техникасидан фойдаланиб доривор ўсимликларнинг нодир ва йўқолиб бораётган турларини сақлаб қолиш билан боғлиқ. Ҳозирги вақтда бу йўналиш бўйича кўзга кўринарли силжишини кўриш мумкин. Дарахтсимон ўсимликлар тўқимаси бўйича ишлар биринчи марта XX асрни 20 йилларида француз олими Готре – томонидан чоп этилган. Бунда у қайрағоч ва қарағайнинг баъзи турлари камбий тўқималарини *in vitro* каллус ҳосил қилишга бўлган қобиляти ҳақида маълумотлар берган. 1940 йиларда чоп этилган мақолаларда қайрағочнинг турли тўқималарини адвентив куртаклар ҳосил қилиш хусусияти ҳақида ёзилган. Аммо муаллифлар ниҳолларнинг кейинги ўсиш ва

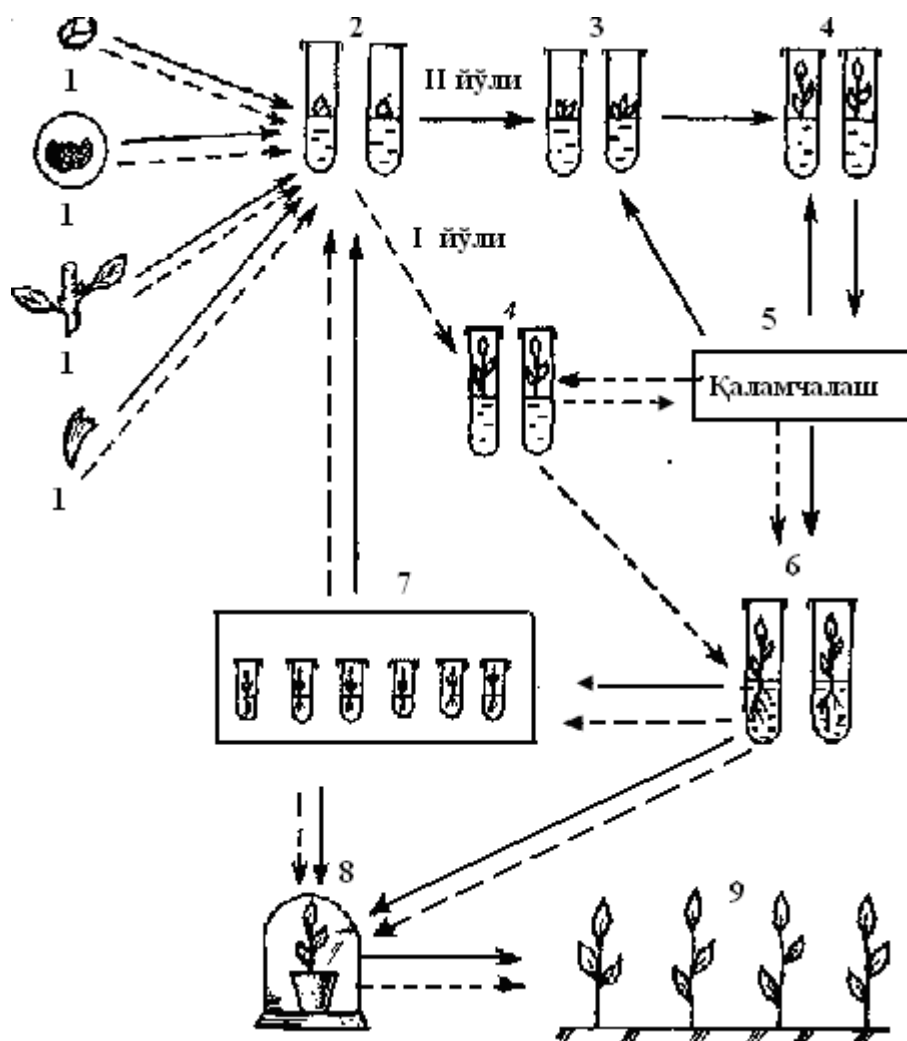
шаклланишини амалга ошира олмадилар. Фақатгина 1960 йиллар ўрталарида Матес томонидан тоғтерак ўсимлигининг биринчи регенерант ўсимлиги олинб, тупроққа экишгача етказилган. Нинабарглилар тўқималарини културалаш кўп вақтгача изланишлар учун объект бўлиб хизмат қилди. Бу ўсимликдан ажратилган ювенил тўқималарни, ундан ҳам қийинроғи катта ёшдаги ўсимликлар тўқималарини културалашнинг ўзига хос қийинчилиги билан боғлиқдир.

Маълумки, дарахтсимон ўсимликлар, айниқса нинабарглар секин ўсади, илдиз отиши қийин. Улар катта миқдорда иккиламчи метаболит бирикмалар (феноллар, терпенлар ва бошқа моддалар) тутади, бу ажратилган тўқималарда турли фенолазалар таъсирида оксидланади. Ўз навбатида фенолдан оксидланган маҳсулотлар одатда ҳужайранинг бўлиниши ва ўсишини тўхтатиши орқали бирламчи эксплантларнинг нобуд бўлишига, ёки дарахтсимон ўсимликларнинг адвенетив куртаклар пайдо қилиш хусусиятини камайиши билан характерланади. Аммо, барча қийинчиликларга қарамай, олимлар илмий тадқиқотлар манбаи сифатида кўпинча дарахтсимон ўсимликларни тўқима ва органларидан фойдаланишади. Ҳозирги вақтда 40 та оилага кирувчи 200 га яқин дарахт турлари (каштан, эман, қайин, заранг, тоғтерак, терак ва тоғтерак дурагайлари, қарағай, қорақарағай) *in vitro* шароитида купайтирилмоқда.

Ўсимликларни клонли микрокўпайтириш босқичлари ва усуллари

Клонли микрокўпайтириш жараёнини 4 та босқичга бўлиш мумкин.

- 1) донор – ўсимлик танлаш, эксплантларни ўсимликдан алоҳида ажратиш ва стерил културада яхши ўсадиганини ажратиб олиш;
- 2) максимал миқдорда мериклонлар олишга эришилгандан сўнг хусусий микрокўпайтириш;
- 3) кўпайтирилган ниҳолларнинг илдиз отиши ва тупроқ шароитига кўникишини амалга ошириш, зарур ҳолатда регенерант ўсимликни паст ҳароратда (-2° , -10°C) сақлаш;
- 4) ўсимликларни иссиқхона шароитида ўстириш ва уларни сотишга ёки далага экишга тайёрлаш (3.8- расм).



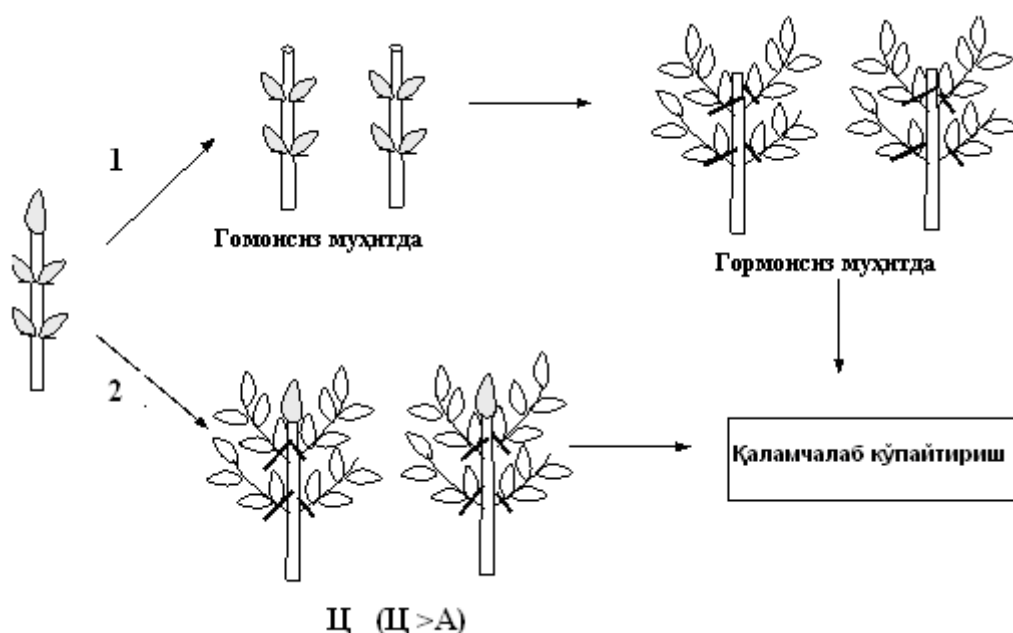
3.8. расм. Мавжуд меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш (I йўли), эксплантда адвентив куртакларнинг пайдо бўлишини индукциялаш (II-йўли) ёрдамида ўсимликларни клонли микрокўпайтириш усуллари схемаси.

1-бошланғич эксплантни танлаш; 2-стерил културалар олиш; 3-бирламчи эксплантда адвентив куртакларнинг ҳосил бўлиши. 4-куртакларнинг ривожланиб микроиҳоллар пайдо қилиши; 5-микроиҳолларни кўпайтириш (қаламчалаш); 6-микроиҳолларнинг илдиз отиши; 7-паст ҳароратда регенерант ўсимликлар яшашишини таъминлаш; 8-ўсимликларни иссиқхона шароитига ўтқизиш; 9-регенерант ўсимликларни далага экиш.

Клонли микрокўпайтиришнинг бир неча усуллари мавжуд. Турли муаллифлар эксплантларни културалаш шароитлари морфогенез жараёнига таъсири бўйича индивидуал изланишлар ўтказиб, ўстириш шароитининг ўзгаришига жавобан турли морфогенетик реакцияларни кузатишлари натижаси клонли микрокўпайтириш усуллари янги классификацияси пайдо бўлишига олиб келди. Ўсимликларни клонли микрокўпайтириш юзасидан адабиётларда берилган маълумотлардан келиб чиқиб, бу жараённи қуйидаги усуллар ёрдамида амалга ошириш мумкин;

- ўсимликда мавжуд бўлган меристемани фаоллаштириш (поя апекси, бўшлиқдаги ва тиним давридаги куртаклар);
- адвентив куртакларни бевосита эксплант тўқималарида пайдо бўлишини индукциялаш;
- соматик эмбриогенез индукцияси;
- бирламчи ва қайта кўчириб ўтказилган каллус тўқималаридаги адвентив куртакларни дифференцияланиши.

Ўсимликларни клонли микроўпайтиришда қўлланиладиган асосий усул, бу ўсимликда мавжуд бўлган меристемаларни ривожланишини апикал доминантликни тўхтатилиши ҳисобига фаоллаштиришдир (3.9- расм).



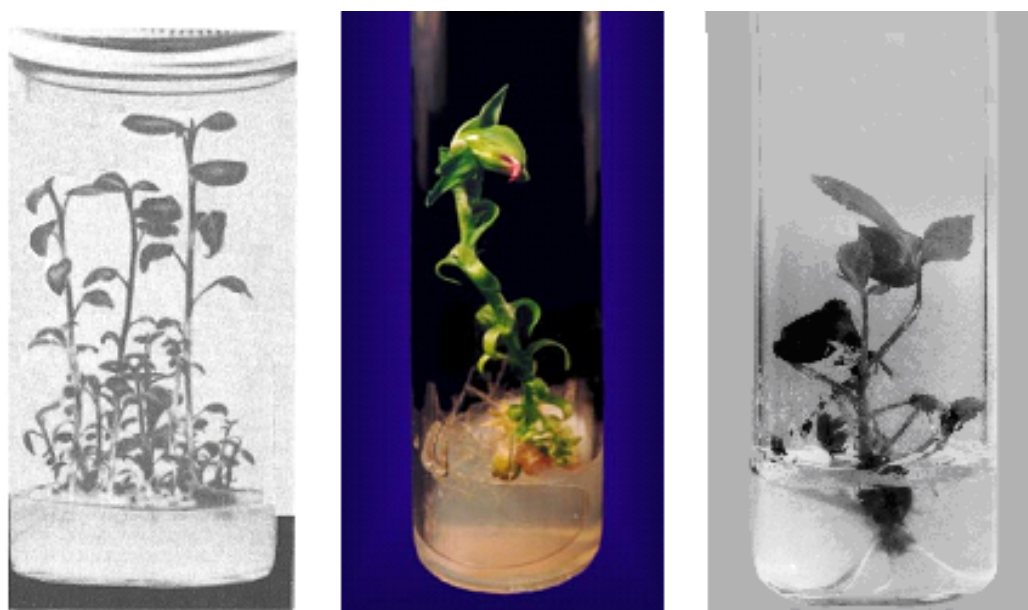
3.9- расм. Мавжуд меристемалар ривожланишини фаоллаштириш усули орқали ўсимликларни кўпайтириш схемаси.

1-ниҳолларнинг учки меристемасини олиб ташлаш. 2-озиқа муҳитларга цитокининларни қўшиш. (Ц-цитокининлар, А-уксинлар)

Бунга икки хил йўл билан эришиш мумкин: а) пояни учки меристемаси олиб ташланади ва новда *in vitro* гормонсиз муҳитда микрокаламчаланаяди; б) озиқа муҳитига цитокинин типи таъсирига эга моддалар қўшиш орқали кўплаб ички бўшлиқдан чиққан новдаларнинг ривожланиши индуцирланади.

Қоида бўйича цитокининлар сифатида 6-бензиламинопурин (БАП) ёки 6-фурфуриламинопурин (кинетик), шунингдек 2-изопентиладенин (2ip) ва зеатиндан фойдаланилади. Шундай усулда олинган ниҳоллар бирламчи эксплантдан ажратилади ва ички меристемалар пролиферациясини стимулловчи ва ниҳолларни пайдо

бўлишини оширувчи янги тайёрланган озиқа муҳитида яна культурланади. Ҳозирги вақтда бу усул қишлоқ хўжалик экинлар ва техник экинлар (қанд лавлаги, тамаки, ер ноки, чирмовик), шунингдек сабзавот экинлари (помидор, картошка, бодринг, қалампир, қовоқ ва бошқалар), мева дарахтлар, буталар (олма, олхўри, олча, нок, узум, қарағат, крижовник ва бошқалар) ва манзарали ўсимликлар (терак, тол, олха, қайин, четан, секвойя, туя, можжевельник ва бошқаларнинг вируссиз экиш материаллари (кўчатлар, тугунаклар) олишда кенг қўлланилмоқда (3.10 -расм. а.б.в).



а)

б)

в)

3.10-расм. Ўсимликларни мавжуд меристемаларни фаоллаштириш усули ёрдамида кўпайтириш.

А-картошка; б-атиргул; в-маймунжон.

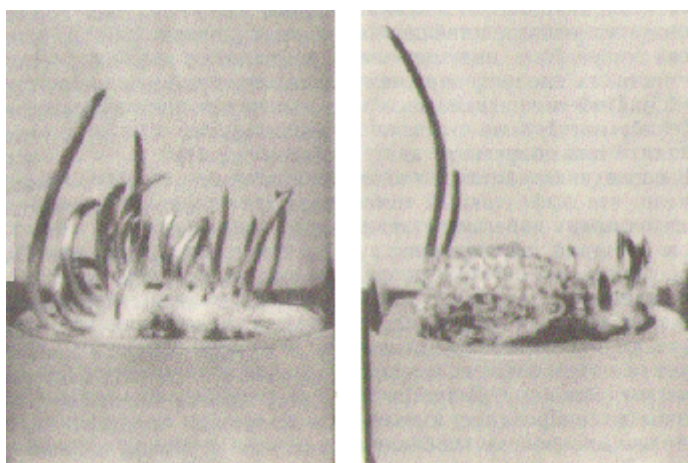
Картошка каби баъзи қишлоқ хўжалик экинлари учун клонли микрокўпайтириш технологияси саноат асосида йўлга қўйилган.

Ўсимликда мавжуд бўлган меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш усулини қўллаш орқали картошкани битта меристемасидан 1 йилда 10^5 ўсимлик олиш мумкин, шунингдек бу технология ёрдамида пробиркаларда қимматли, вируссиз уруғлик материаллар микротугунаклар етиштириш кўзда тутилмоқда

Иккичи усул – эксплант тўқималарида тасодифий (адвентив) куртаклар индукциясини амалга оширишга қаратилган (3.11-расм).

Бу усул алоҳида ажратилган ўсимлик қисмларини қулай озиқа муҳит шароитида културалаб, унда етишмаётган аъзоларини тиклаш орқали етук ўсимлик регенерация қилишга асосланган.

Тасофий куртакларни ўсимликнинг вирусдан ҳоли қилинган ҳар қандай орган ва тўқималарида (алоҳида ажратилган муртак, барг, поя, уруғ куртак, пиёз ости қисмида, қобиғи, илдиз сегментларида ва гул баргларда) ҳосил қилиш мумкин. Бу жараён фақат цитокинин ёки унинг ауксин билан 10:1 ёки 100:1 нисбатдаги аралашмасини тутувчи озиқа муҳитларда ўтади. Бундай ҳолларда ауксин сифатида кўпинча β-индолил-3 сирка кислота (ИСК) ёки α-нафтил сирка кислота (НСК)дан фойдаланилади. Бу усул юксак ўсимликларни клонли микроўпайтириш бўйича кенг тарқалган усул бўлиб, кўпгина пиёздан кўпаядиган ўсимликлар (нарцис, лилия, гиацинт, гладиолус лола) пиёз қобиғи, базал қисми сегментларидан, барг эксплантларидан; Brassica туркуми вакиллари (гул қарам, бош қарам, броюссел қарами, баргли парели, брокколи қарамларини) гипокотил сегментларидан, уруғмуртак, барглардан; пиёз, саримсоқ пиёзни пиёз ости тўқимаси учки меристемасидан; помидорни апикал ва ички меристемалардан, цикор салатини барг пластинкалари сегментларидан; петунья – илдиз сегментларидан, глоксиния, бинафша гуллариини барг пластинкаси сегментларидан алоҳида ажратилган етилган ва етилмаган муртаклардан клонли микроўпайтиришда фойдаланилади (3.11-расм).



3-11-расм. Эксплант тўқималарида тасофидий (адвентив) куртаклар индукциясини амалга ошириш. Narcissus ўсимлиги барги асосидаги эксплантларда ниҳолларнинг ҳосил бўлиши (ўнгда); каллус тўқимасидаги куртак ва ниҳоллар

Клонли микроўпайтириш технологияси кулупнай ўсимлиги учун жуда яхши даражада йўлга қўйилган.

Ёш ўсимликдан вирусдан ҳоли, учки меристема ажратилади ва мослаштирилган, 0,1 –0,5 мг/л БАП тутувчи Мурасига ва Скуга озиқа муҳитида ўстирилади, културалашнинг 3-4 ҳафтасидан сўнг, асосида тасофидий куртаклар шаклланаётган меристема ўсимталари ривожланади. Улар тез ўсиб янги куртаклар пайдо қилади. 6-8 ҳафта давомида куртаклар конгломерати ҳосил бўлади, улар ривожланишнинг турли даврларида бўлиб, бир-бирлари билан бириктирувчи тўқималар орқали бириккан бўлади. Калта новдаларда

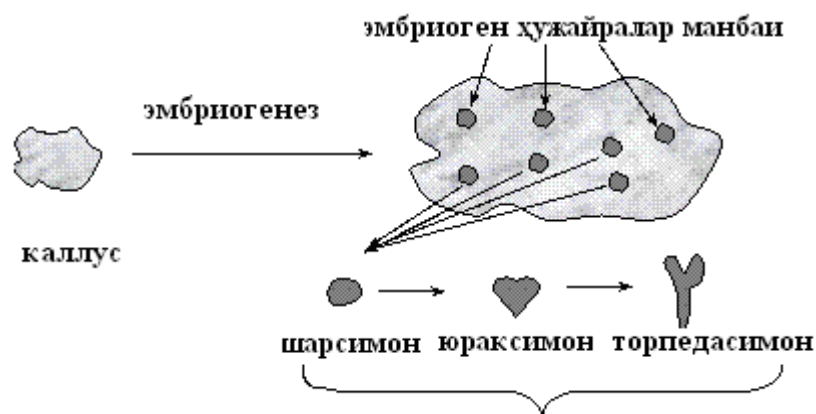
барглар пайдо бўлади, пастки қисмида янги адвентив куртаклар шаклланади. Бу куртаклар ажратилади ва янги озиқа муҳитига кўчириб ўтказилади. Цитокинин тутувчи озиқа муҳитда ён новдаларнинг пайдо бўлиши давом этади, гормонсиз озиқа муҳитда эса 4-6 ҳафта давомида баргли, илдизли нормал ўсимлик пайдо бўлади. Эксплантнинг морфогенетик фаоллиги 3-4 йилгача сақланиб қолади. Шундай қилиб, бир бошланғич ўсимликдан йилига бир неча миллион ўсимлик олиш мумкин.

Албатта, тадқиқотчиларда адвентив куртаклар пайдо бўлишида ҳужайранинг қайси қатлами меристемалар дифференциациясида иштирок этиши ҳақидаги савол пайдо бўлади. Бу савол бўйича ҳозиргача аниқ бир жавоб йўқ. Тамаки тўқималари бўйича олиб борган ишларида, Тран Тан Ван айнан эпидермиснинг фаол тўқима эканлигини ва озиқа муҳитидаги гормон балансига боғлиқ ҳолда куртак, каллус ёки илдиз ҳосил қилишга қодир эканлигини кўрсатди. Цитологик изланишларни кўрсатишича, лола ва нарцис пиёзи базал қисми сегментларида адвентив новдалар пиёз тагига ёпишиб турувчи меристема ҳужайраларининг устки қатламларида шаклланади экан, глоксиния ўсимлигида адвентив куртакларни шаклланиш жараёни, барг пластинкаларининг субэпидермал ҳужайра қаватларида содир бўлади.

Шунингдек, дарахтсимон ўсимликлар устида иш олиб бораётган тадқиқотчилар ҳам бу савол юзасидан бир фикрга келганича йўқ. Аниқланишича, култураланаётган арча нина барглари эксплантининг эпидермис қаватида, псевотсугада эса субэпидермал қаватида куртаклар пайдо бўлади, қарағай уруғ муртаги фақат цитокинин (БАГ) тутувчи озиқа муҳитда културланганда бу жараён бир вақтнинг ўзида ҳам эпидермал, ҳам субэпидермал қатламларда юзага келади.

Учинчи усул, соматик ҳужайраларда муртаксимон структураларни дифференциациясига асосланади ва *соматик эмбриогенез* деб аталади. Муртакларни *in vitro* ва *in vivo* ҳосил бўлишидаги асосий фарқи шундан иборатки, соматик муртаклар муртак халтасидан ташқарида асексуал равишда ривожланади ва ўзининг ташқи кўринишидан бир вақтнинг ўзида ҳам поянинг ҳам илдизнинг апикал меристемаси ривожланаётган қўш қутбли структуралар кўринишини эслатади.

Стевард фикрига асосан, соматик муртаклар ривожланишнинг учта босқичидан ўтади: шарсимон юраксимон, торпедасимон ва жараён сўнггида ўсимталарнинг ривожланиш тенденциясига эга бўлади. (3.12-расм)



3.12-расм. Эмбрионидларнинг ривожланиш босқичлари

Бундай ҳолат сабзи ҳужайра тўқималарида ўтган асрнинг 50 йилларида аниқланган бўлиб, ҳозирги кунда бу усул кўпгина Orchidaceae ва Rutaceae оиласига мансуб ўсимликлар, баъзи бошоқли ўсимликлар (буғдой, арпа), беда, редиска, узум, шунингдек, турли дарахтларни (тоғтерак, эвкалипт, эман, қора қарағай) кўпайтиришда фойдаланилади.

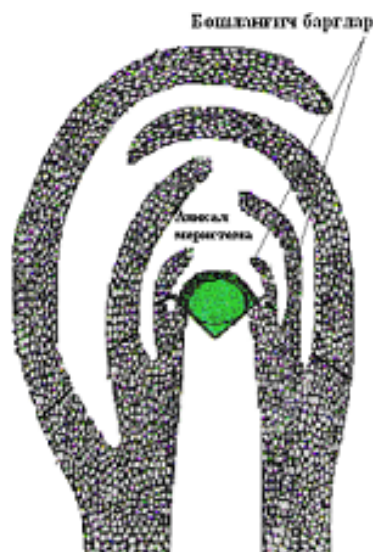
Тўқималар културасида эмбрионидларни шаклланиши иккита босқичда боради. Биринчи босқичда эксплант ҳужайралари озика муҳит таркибига ауксин, 2,4–дихлорфеносирка кислота (2,4-Д) қўшилиши ҳисобига дифференцияланади ва муртакка айланади. Кейинги босқичда шаклланган ҳужайралардан эмбрионидлар ривожланишини амалга ошириш лозим, бунга озика муҳити таркибидаги ауксинлар миқдорини камайтириш ёки умуман йўқотиш орқали эришилади. Соматик эмбриогенез ривожланишини бирламчи эксплант тўқималарида, шунингдек каллус култураларида кузатиш мумкин. Юқорида баён қилинган усул клонли микрокўпайтиришда кам қўлланилади, чунки бу усул билан олинган экиш материаллари донор-ўсимликка нисбатан генетик барқарор эмас. Маълумки, каллус ҳужайраси (суспензияси) суюқ озика муҳитда култураланганда соматик эмбриогенез ҳосил бўлади ва анча қийин операция бўлиб, ҳужайраларга хос бўлган тотипотентликни ҳар доим ҳам (реализация) юзага чиқариб бўлмайди. Аммо, кўпайтиришнинг бу усули ўзининг афзаллик томонларига ҳам эга бўлиб, клонли микрокўпайтиришнинг сўнгги, учинчи босқичини, илдиз чиқаришнинг махсус шароитини танлаш, пробирка ўсимликлари адаптацияси (мослашиши) кабиларни қисқартириш имконини беради, чунки соматик эмбрионлар тўлиқ шаклланган ўсимликни ўзида намоён қилади. Уларни капсулалашда махсус техникадан фойданилса, балки бу эмбрионидлардан ҳам сунъий уруғлар олиш мумкин бўлар эди.

Клонли микроўпайтиришнинг тўртинчи усули – бирламчи ва кўчириб ўтказилган каллус тўқималарида адвентив (тасодифий куртакларни) дифференцияланишидир. Бу усул *in vitro* экиш материаллари олишда кам қўлланилади. Бунга сабаб, каллус тўқималарини янги озиқа муҳитларга мунтазам равишда кўчириб ўтказилганда, микроўпайтириш учун ноўрин ҳолатлар кузатилади булар: култураланаётган ҳужайралар томонидан плоидлигини (карралик) ўзгариши, хромосомаларни структуравий қайта тузилиши ва генлар мутациясини тўпланиши култураланаётган ҳужайраларнинг морфогенетик потенциалларининг йўқотилишидир. Ўсимликларни генетик ўзгаришлари билан бир қаторда: паканалик, баргларининг нотўғри томирланиши ва уларни пояда жойлашиши, бўғин оралиғини калта ва қалинлашиши, касалликлар ва зараркунандаларга чидамлилигини камайиши каби морфологик ўзгаришлар ҳам кузатилади. Шунингдек, каллус ҳужайраларини узоқ вақт давомида културалаш бу ўзгаришларни янада чуқурлаштиради, шунинг учун клонли микроўпайтиришда уюлмаган ўсиш даврини иложи борица қисқартириш лозим.

Аммо, баъзи камчиликларга қарамай, юқоридаги усул ўзининг ижобий томонларига ва афзалликларига ҳам эга. Биринчидан, бу усул самарали ва иқтисодий фойдалидир, чунки кўпайтириш жараёнида ҳар бир каллус ҳужайрасидан културалашнинг қулай шароитида ўсимлик пайдо қилувчи тасофидий куртаклар шаклланиши мумкин. Иккинчидан, баъзи ҳолларда ўсимликларни тўқималар културасидан кўпайишининг ягона усулидир. Учинчидан бу усул орқали олинган ўсимликлар генетик ва морфофизиологик фарқ қилиши туфайли селекционерларда қизиқиши уйғотади. Бу селекционерларга ҳўжалик аҳамияти муҳим бўлган хусусиятли ўсимликларни танлаш ва уларни дала шароитларида ўсишини баҳолаш имкониятини беради. Бу усул каллус тўқималарининг генетик барқарор эканлиги кўрсатилган ўсимликлар учун қўлланилади. Бундай ўсимликларга амариллис, помидор, спаржа ва баъзи кўп йиллик ўсимликлар киради. Каллус тўқимаси орқали, қанд лавлаги, Brassica туркумини баъзи вакиллари, маккажўхори, шоли, буғдой, кунгабоқар, зиғир ўсимликлари кўпайтирилган, бодринг, картошка ва помидорнинг каллус тўқималаридан ўсимликларни регенерациялаш усуллари ишлаб чиқилган.

Соғломлаштирилган, вирусдан ҳоли экиш материаллари олиш. Клонли микроўпайтиришнинг афзаллиги генетик бир хил вируссиз экиш материаллари олиш мумкинлигидир. Бунга апекс тўқималари ва пояга хос куртаклар меристемасидан фойдаланиб эришиш мумкин. Меристема ўсиш конуси ва бир ёки икки барг

асосидан (примордий) иборат бўлиб, вирусдан ҳоли бўлади. (3.13-расм)



**3.13-расм. Узунасига
кесилган поянинг учки ўсиш
нуқтаси – апикал меристемаси**

Вирус билан зарарланган ўсимликларнинг меристема тўқималари вирусдан ҳоли эканлиги биринчи бўлиб Чунг (1938) ва П.Р.Уайт (1943) томонидан аниқланган, XX асрнинг 50 йилларда георгиния ўсимлигини ўсиш нуқтасидан вируссиз ўсимлик олиш бўйича биринчи муваффақиятли тажриба амалга оширилди. Бу усул муаллифлари Ж.Морель ва С.Мартинларнинг тахминича, касалланган ўсимликларда вируслар тарқалиши бўйича тез ўсаётган ёш органлардан орқада қолади, айниқса дифференцияланмаган ёш тўқималарда вируснинг миқдори йўқ даражада бўлади. Бу усул асосига қўйилган назарий концепция сабаби кейинги вақтларда аниқлана бошлади.

Амалиётда қўлланиладиган ҳолатида структуравий асос бўлиб, ўсимлик ўсиш нуқтаси тузилишининг спецификаси хизмат қилади; унинг апикал меристема деб аталувчи дисталь қисми турли ўсимликларда турлича ўлчамга эга бўлиб, ўртача 200 мкм диаметрга ва 20-150 мкм узунликка эга бўлади. (4.13-расм) Дифференцияланаётган меристемани хужайраларни пастроқ қатламида ўтказувчи система боғламларини пайдо қилувчи прокамбий ҳосил қилади. Маълумки, клонли микроўпайтиришдаги муваффақият меристема эксплантини ўлчамига боғлиқ, барг асослари ва поя тўқималари қанча катта бўлса, морфогенез жараёни шунча енгил кечади ва нормал пробирка ўсимлиги ҳосил бўлиши билан тугайди. Шу билан биргаликда, вирус зарраларидан ҳоли зона турли вируслар учун турличадир. Бу ўсимликнинг турлари ва навларига билан боғлиқ. Донли экинлар колеоптилида, масалан, ўтказувчи найлардан ҳоли учки

қисмининг ўлчами 250 мкм га етиши, мумкин. Апикал меристемани бундай ўзига хос тузилиши ўтказувчи тизимлар орқали вирусларни тез ташилишини истисно қилади, лекин плазмодезма орқали бириктирувчи меристема хужайраларига секин тарқалиш имкониятига йўл қўяди. Картошкани 200 мкм ўлчамдаги апикал меристемасини озиқа муҳитда културалаш ва кейинчалик регенерант ўсимлик олишда аниқланинча, олинган ўсимликлардан фақат 10 % гина Х- вирусдан, аммо 70 % У-вирусдан ҳоли экан.

Электрон микроскоп орқали, баъзи вируслар билан ўсимликлар меристемаларининг ҳам зарарланганлиги аниқланган бўлиб, бу зарарланган ўсимликнинг меристемаларига ҳам вируснинг етиб борганлигидан далолат беради.

Шундай қилиб, апикал меристемаларни вирус билан зарарланган ўсимликларни соғломлаштириш усулида қўллаш ҳам кам самара берар экан. CarMV ва CarVMV вируслари билан зарарланган чиннигул, цимбидиум ўсимликлар апикал меристемаларидан *in vitro* шароитида зарарланган (инфекцияга учраган) мериклонлар олингани тажрибаларда кўрсатилган.

Умуман олганда, зарарланган ўсимликдан вируссиз апикал меристемалар олиш мумкин, бунинг учун соғлом тўқимага вируснинг тушиш ҳавфини нолгача пасайтириш лозим. Бунинг учун бошланғич ўсимлик олдиндан термотерапея ёки хемотерапея усуллари ёрдамида вирусдан тозаланиши керак.

Термотерапея усули *in vivo* шароитида, шунингдек *in vitro* шароитида ҳам қўлланилиб, қуруқ, иссиқ хаводан фойдаланишга асосланган. Термотерапея жараёни орқали ўсимликларни вирусдан ҳоли қилиш механизми ҳақида турли назариялар мавжуд. Улардан бири юқори ҳарорат вирус заррачаларига тўғридан–тўғри уларнинг рибонуклеин кислоталари ва оксил қобиғи орқали таъсир этиб, уларнинг физик парчаланишига ва вирус заррачаларининг зарарлаш қобилиятини йўқолишига олиб келади деган фикр берса, иккинчи назария эса, юқори ҳарорат вирусларга ўсимликларни метаболизми орқали таъсир этади, деган тахминни илгари суради. Юқори ҳарорат таъсирида вирус заррачаларини синтези ва деграцияси орасидаги мувозанат бузилади. Агар синтез амалга ошса, унда зарарланган тўқималарда вируслар концентрацияси ошади.

Термотерапея қилинаётган ўсимликлар махсус термокамераларга жойлаштирилади ва биринчи ҳафтада ҳарорат 25⁰ дан 37⁰С гача ҳар куни 2⁰С дан ошириб борилади. Термотерапеяда бутун жараён давомида опимал режимни яратиш ва уни ушлаб туриш ҳам муҳим бўлиб, ҳарорат 37⁰С, кундузги лампа ёруғлиги 5 минг лк, културага

қараб, фотодавр бир суткада 14-16 соат, термокамеранинг ҳаво намлиги 90 % ни ташкил этиши лозим.

Термотерапеяни давомийлиги вирус таркибига ва уларнинг юқори ҳароратга чидамлилиқ даражасига боғлиқ. Масалан, агар чиннигулга 10-12 ҳафталик иссиқлик таъсири етарли бўлса, хризантемани Б-вирусидан ҳоли қилиш учун эса бу муддат 12 ҳафта ва ундан кўпроқни ташкил этади. Аммо, пиёзли ўсимликлар, цимбидиум, атиргуллар ва бошқа шу каби ўсимликларга узоқ вақт *in vivo* термотерапея қилиш салбий таъсир кўрсатади. Бундай ўсимликлар учун термотерапеяни *in vitro* регенерант ўсимликларда ўтказиш мақсадга мувофиқдир.

Термотерапеяни ўсимликларни вирусдан тозалашдаги ижобий таъсири билан бирга юқори ҳароратнинг *in vitro* шароитида баъзи ўсимликларни ўсиш нуқтасига ва морфогенез жараёнига ҳам яхши таъсир кўрсатиши аниқланган. Термотерапеяни қўллаш орқали кўпайтириш коэффицентини 50-60% га ошириш, пробирка регенерант ўсимликларини тупроқ шароитига мослашишини яхшилаш ва шунингдек, бошланғич вируссиз ўсимликлар сонини кўпайтириш имконини беради.

Термотерапеяни меристема култураси билан биргаликда қўллаш орқали нина барглиларни регенерант ўсимликларини 70%ини хлороз вирусидан, кулупнай ўсимлигини 90 %и, қизил ва қора қарағат (смородина) 20%и, маймунжоннинг 50%и, картошка ўсимликларининг 80% соғломлаштирилган, вирусдан холи ўсимликларини олиш мумкин.

Ўсимликларда вируснинг мавжудлигини иммунофермент ташхиси, электрон микроскоп ва ўтчил индикатор – ўсимликлар ёрдамида аниқлаш мумкин.

Вируссиз, ўсимликлар олишнинг бошқа усули – **хемотерапея** усули бўлиб, бу усул апикал меристемалар култраланаётган озиқа муҳитга гуанозинни аналогилар – 1β-Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3 – карбоксимид (вирозол деб ҳам аталади) 20-50 мг/л концентрацияда қўшишдан иборат. Бу вирусга қарши препарат бўлиб кенг таъсир спектрига эга. Вирозолни културал муҳитда қўлланилганда вируссиз меристема ўсимликларини олиш фоизи вирус одатий бўлиб қолган ўсимликлар учун 80-100 % назоратда эса 0-41 % га ошди. Хемотерапея усули олхўри, гилос, маймунжон, турли гуллар ва бошқа ўсимликларга қўлланилганда яхши натижалар олинган. Вируссиз экиш материаллари олишнинг хемо ва термотерапея усуллари иқтисодий кам фойда беради. Шунинг учун Ҳозирги вақтда трансгенез усуллари ёрдамида ўсимликларни вирусга генетик чидамли шакллари яратилмоқда.

Клонли микрокўпайтиришни турли босқичдаги ўсимликлар тўқималарини културалаш техникаси. Тўқималарни културалашдаги тўртта босқичнинг ҳар бирида, муайян таркибдаги озиқа муҳитидан фойдаланиш зарур бўлади.

I-босқич. Бу босқичда яхши ўсадиган стерил култура олишга эришиш лозим. Бунинг учун ўсимлик тўқималари симоб тутувчи эритмаларда (сулема ёки диацид, 0,1-0,2% лиги) ёки хлор тутувчи (10-15 % ли хлорамин, 5-7 % ли натрий ёки кальций гипохлориди) эритмаларида нозик, тез зарарланадиган тўқималар 5-10 мин, қалин, зич пўстли тўқималар 10-12 минут давомида стерилланади. Шундан сўнг ўсимлик тўқималари стерил дистилланган сувда яхшилаб ювилади ва олдиндан тайёрлаб қўйилган озиқа муҳити юзасига жойлаштирилади. Агар эксплантнинг стерил бошланғич културасини олиш қийин бўлса, у ҳолда озиқа муҳити таркибига антибиотиклар (тетрациклин, бензилпенициллин ва бошқалар) 100-200 мг/л миқдорда қўшилади. Бу биринчи навбатда дарахтсимон ўсимликларга тааллуқли бўлиб, уларда ички инфекцияни тўпланиш тенденциясини кузатиш мумкин.

Биринчи босқичда, Мурасига ва Скуга рецепти бўйича минерал тузлар, шунингдек, турли биологик актив моддалар ва ўсиш стимуляторларни (ауксинлар, цитокининлар) объектга қараб турли нисбатда тутувчи озиқа муҳитлардан фойдаланилади. Бирламчи эксплантнинг озиқа муҳитга токсин моддалар (феноллар, терпенлар ва бошқалар) ажратиши ҳисобига, уларнинг ўсиши тўхтаганлиги кузатилган ҳолларда, ўсишни яхшилаш мақсадида антиоксидантлардан фойдаланилади. Буни икки йўл билан: эксплантни антиоксидантнинг кучсиз эритмасида 4-24 соат давомида ювиш: антоксидантни тўғридан-тўғри озиқа муҳитига қўшиш орқали амалга ошириш мумкин. Антоксидантлар сифатида аскорбин кислота (1-60 мг/л), глутатион (4-5 мг/л), дитиотриэтол (1-3 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2-5мг/л), поливинилпирролидон (5000–10000 мг/л) дан фойдланилади. Баъзи ҳолларда озиқа муҳитга 0,5 –1 % миқдорда адсорбент-активланган кўмир қўшиш мақсадга мувофиқдир. Биринчи босқичнинг давомийлиги 1 ойдан 2 ойгача, натижасида меристема тўқималарининг ўсиши ва бирламчи ниҳолларнинг шаклланишини кузатиш мумкин.

II босқич – хусусий микрокўпайтириш. Бу босқичда мериклонларнинг максимал миқдорига эришиш лозим, лекин шуни унутмаслик керакки, субкултуралаш ошиши билан ғайритабиий морфологияга эга регенерант ўсимликлар сони ҳам орта боради, баъзи ҳолларда мутант ўсимликлар ҳам пайдо бўлиши мумкин. Биринчи босқичдаги сингари турли биологик фаол моддалар ва ўсимликларни ўсиш регуляторларини тутувчи Мурасига ва Скуга озиқа муҳитидан

фойдаланилади. Эксплантларни културалашни оптимал шароитини танлашда озиқа муҳит таркибига киритилган цитокинин ва ауксинларни миқдори ва нисбати асосий ролни ўйнайди. Цитокининлардан БАП 1 дан 10 мг/л, ауксинлардан ИСК ва НСК 0,5 мг/л миқдордаги концентрацияларидан фойдаланилади. Ўсимлик тўқималари ауксиннинг миқдори оширилган озиқа муҳитларда узок вақт ўстирилганда, тўқималарда ауксиннинг аста-секин тўпланиб, зарур бўлган физиологик миқдоридан юқори бўлганда, захарли таъсир этиб, морфологияси ўзгарган ўсимлик пайдо бўлишига олиб келади. Шунингдек, клонли микроўпайтириш учун нохуш бўлган самарасини ҳам кузатиш мумкин, буларга учки меристема хужайралари бўлинишини камайиши, хужайралари таркиби сув билан тўйинган ниҳоллар пайдо бўлиши, ўсимликнинг илдиз отиш ва ўсиш хусусиятларининг йўқолиши каби таъсир самарасини бериши мумкин. Цитокининларни ножўя таъсирини бартараф этиш учун Н.В.Ката ва Р.Г.Бутенко берган маълумотлардан фойдаланиб минимал миқдорда цитокинин тутувчи озиқа муҳитлардан фойдаланилганда микроўпайтиришни тургун коэффициентига эришиши мумкин.

III, IV- босқичлар – микрониҳолларни илдиз оттириш, уларни тупроқ шароитига кўниктириш ва далага экишга тайёрлаш каби ниҳоятда кўп меҳнат талаб этади. Қоида бўйича учинчи босқичда озиқа муҳитининг асосий таркиби ўзгартирилади: Мурасига ва Скуга бўйича қўшиладиган минерал тузлар миқдори икки, уч баробар камайтирилади ёки Уайт муҳити билан алмаштирилади, қанд миқдори 0,5 – 1% гача камайтирилади ва гормонлардан фақат ауксиништирок этади, цитокининдан умуман фойдаланилмайди. Илдиз ҳосил бўлиш стимулятори сифатида β-индолил –3–мой кислота (ИМК), ИСК ёки НСК дан фойдаланилади: Микрониҳолларда илдиз ҳосил қилиш икки хил усул ёрдамида амалга оширилади: 1) микрониҳоллар бир неча соат давомида (2-4 соат) стерил, миқдори оширилган (концентрланган) ауксин эритмасига (20-50 мг/л) солиб қўйилади ва гормонсиз агарли муҳитда ёки бевосита мос келувчи тупроқ субстратида (импульсли ишлов) култураланади;

2) микрониҳолларни 3-4 ҳафта давомида кам концентрацияда (1-5 мг/л) ауксин тутувчи озиқа муҳитда тўғридан-тўғри културалаш. Сўнгги вақтларда пробирка ўсимликларини гидропоника шароитида илдиз оттириш усулидан ҳам фойдаланила бошлади. Бу усул илдиз отиш жараёнини бир оз осонлаштириб, бир вақтнинг ўзида табиий шароитга мослашган ўсимлик олиш имконини беради. Картошка учун субстратсиз гидропоникани қўллаб, кичик туғунаклар олиш мумкин. Културал идишларнинг пастки қисми қалин қора мато билан ўралади

ёки озиқа муҳит таркибига активланган кўмир киритилганда микронихолларни илдиз отишига имкон беради.

Регенерант ўсимликларни субстратга кўчириб ўтказиш маъсулиятли босқич бўлиб, микроўпайтириш жараёнини якунлайди. Пробирка ўсимликларини кўчириб ўтказиш учун энг қулай вақт баҳор ва ёзининг бошланғич даври ҳисобланади. Икки ёки уч баргли ва илдиз тизими яхши ривожланган ўсимликлар колба ёки пробиркалардан узун учли пинцет ёки илмоқлар ёрдамида чиқариб олинади. Ўсимлик илдизлари агар қолдиқларидан ювиб тозаланади ва олдиндан 85-90⁰С да 1-2 соат давомида стерилланган тупроқли субстратга экилади. Кўпчилик ўсимликлар учун субстрат сифатида торф, кум (3:1); торф, тупроқ, перлит (1:1:1); торф, кум перлит (1:1:1) дан фойдаланилади. Олдиндан тайёрланган тупроқли субстрат билан қути ёки торфли идишлар тўлдирилади ва унга ўсимликлар экилади. Ўсимликлар экилган идишлар ҳарорати 20-22⁰С, ёруғлиги 5 минг лк дан ортиқ бўлмаган, намлиги 65-90 % бўлган иссиқхоналар (теплица)га жойлаштирилади. Ўсимликларни яхши ўсиши учун сунъий туман яратилади. Бундай шароитларни яратиш имкони бўлмаган ҳолларда ўсимликлар ўсаётган идишлар шиша банкалар ёки полиэтилен пленка халталар билан ёпилади, сўнг ўсимлик батомом кўниккунига қадар аста – секинлик билан очиб борилади.

Яхши илдиз отган ўсимликлар кўчириб ўтказилгандан 20-30 кундан сўнг Кнудсон, Мурасиге ва Скуга, Чесноков, Кноплар томонидан таклиф этилган таркибдаги ўсимлик турига боғлиқ ҳолда минерал тузлар эритмалари билан ёки комплексли минерал ўғитлар билан озиқалантирилади. Ўсимликлар ўса бориши билан уларни янги субстрат солинган каттароқ идишларга кўчириб ўтказиш лозим.

Акклиматизацияланган ўсимликларни бундан кейинги ўсиши ҳар бир индивидуал турдаги ўсимликлар учун қабул қилинган агротехникасига мос равишда бўлади.

Пробирка ўсимликларини тупроқ шароитига мослашиш жараёни анча қимматли ва кўп меҳнат талаб қиладиган операциядир. Кўпинча ўсимликлар тупроққа кўчириб ўтказилганда ўсишдан тўхташи, баргларини тўкиши ва ўсимликнинг нобуд бўлиши кузатилади. Бу биринчи навбатда пробирка ўсимликларини барг оғизчаси (оғизча) аппарати фаолиятининг бузилиши натижасида катта миқдордаги сувнинг йўқолиши билан боғлиқ.

Иккинчидан, баъзи ўсимликларда *in vitro* шароитида илдиз популари ҳосил бўлмайди, бу ўз навбатида тупроқдаги минерал тузлар ва сувнинг ютилишини бузилишига олиб келади. Шунинг учун клонли микроўпайтиришни иккинчи ёки учинчи босқичида ўсимликларни сунъий микоризациялашни (микротрофлар учун)

қўллаш мақсадга мувофиқдир. Улар ўсимликларни минерал ва органик озиқа моддалар, сув, биологик фаол моддалар билан таъминлашда ва шунингдек ўсимликларни патогенлардан химоя қилишда ижобий рол ўйнайди. Ўсимликларни микориза ҳосил қилувчи замбуруғлар билан зарарлашнинг икки хил усули мавжуд; 1) *in vitro* (стерил шароитида); 2) *in vivo* (табiiй шароитда). Биринчи усул қулай усул ҳисобланиб, бу ҳолатда тупроқнинг бошқа микроорганизмлар билан зарарланишининг олди олинади. Бундан ташқари *in vitro* шароитида микоризани нормал шаклланиши учун културалаш шароитини (ёруғлик, ҳарорат, намлик) назорат қилиш ва субстрат танлаш (рН, аэрация) имконияти бор. *In vitro* шароитида кўпайтирилган ўсимликлар агар уларнинг илдиз тизими микориза ҳосил қилувчи замбуруғлар билан алоқада бўлса яхшироқ ривожланади. Бундай ҳолларда уларнинг азот билан таъминланиши яхшиланиб, ўсимликларни тупроққа кўчириб ўтказилганда уларнинг тутиб кетиши 1,5-2 баробарга ортади, шунингдек, ер усти массасининг ўсиши яхшиланади. Бундай тажрибалар қайин, эвкалипт, каштан, қорақарағай, лох ва олхани турли клонларида ўтказилган.

Ҳинд олимлари томонидан *in vitro* ўстирилган ўсимликларни дала шароитига кўчириб ўтказилган ўсимлик баргларининг тез сувсизланиб қолишини олдини олишнинг оддий усули таклиф этилган. Усулнинг моҳияти шундан иборатки, ўсимлик барглари бутун акклиматизация даврида 50% ли глицериннинг сувли эритмаси, ёки парафин аралашмаси, ёки диэтил эфирдаги мой (1:1) билан пуркалиши лозим. Бу усулни қўллаш орқали пробирка ўсимликларини чиниқтиришдек узок ва қийин жараёнлардан кутулиш мумкин ва ўсимликларнинг 100% яшаб кетиши таъминланади.

Россия олимлари томонидан токнинг пробирка ўсимлиги адаптациясини соддалаштириш усули ишлаб чиқилган. Бу усул шундан иборатки, ўсимликларни адаптацияси пробиркаларда ўтади, яъни бунинг учун пробирка ичидаги ўсимликнинг бўйи пробирка тикинига етганда, тикинлар олиб ташланади. Шундай ҳолатда ўсимлик 1,2 ҳафтага қолдирилади. Бу даврнинг охирида пробирка устида ўсимликни иккита барги пайдо бўлади ва бундай ўсимлик тупроққа ўтказишга тайёр ҳисобланади. Ўсимликлар стерил тупроқли субстратга агар билан биргаликда экилади, бунда ўсимлик илдиз тизими механик тарзда зарарланишининг олди олинади. Ниҳоллар тупроқ субстратига экилганда бир-икки баргли поя тупроқ устида кўмилмай қолади. Ток ўсимлигини тупроқда ўсишига мослашишида бу усулининг қўлланилиши, ўсимликлар акклиматизацияси техникасини соддалаштиради ва арзонлаштиради. Бу ҳолларда туман ҳосил қилувчи қурилмадан фойдаланилмайди (Б. А. Бургутин 1988).

Ўсимликларнинг клонли микрокўпайтириш шароитини оптималлаштириш. Алоҳида ажратилган хужайра ва тўқималарни културалашнинг муҳим шарт-шароити – озиқа муҳитдаги минерал тузлар, углеводлар, фитогормонлар ва бошқаларни баланслаштиришдан иборатдир.

Културага янги турдаги ўсимлик киритилганда тадқиқотчилар уни турли озиқа муҳитларида синайдилар. Бу жараён узок бўлиб, кўпинча керакли натижани бермайди. Оптимал таркибдаги озиқа муҳитни аниқлаш учун, тажрибани математик режалаштириш усулидан фойдаланилади. Бу усул кам ҳажмдаги тажрибалар ёрдамида кўпайтиришнинг юқори тезлигини таъминловчи културалаш шароитини аниқлаш, микрокўпайтириш жараёнга таъсир этувчи омиллар йиғиндисига боғлиқлигининг ўрганиш, шунингдек омиллараро ўзаро боғлиқликни борлигини ва самарадорлигини ўрганиш имконини беради. Олдинга қўйилган мақсадга мувофиқ ҳолда тажриба бутун ёки касрий режа асосида ўтказилади.

Оптимизациянинг муваффақияти, оптималлаш критерийсининг қанчалик тўғри танланганига боғлиқ. Микрокўпайтиришни биринчи босқичда кейинчалик етук ўсимлик организмни ҳосил қилишга қодир эксплантнинг ҳар қандай морфогенетик реакциясини миқдорий баҳолаш критерийси бўлиб хизмат қилади. Масалан, ниҳолнинг узунлиги, дифференцияланаётган поя апекслари, ниҳоллар, эмбрионидларнинг сони. Иккинчи босқичда ривожланаётган ниҳолларни, эмбрионидларни, умумий сони ҳисобга олинади. Учинчи босқич оптимизацияси критерийси бўлиб, илдиз отган ўсимликлар фоизи, илдиз тизимини узунлиги, бир микронихол учун илдизлар сони хизмат қилади. Бунда ҳам ўсимликнинг узунлиги, умумий ҳолати ва унинг тупроққа кўчириб ўтказилгандаги тутувчанлигини ҳисобга олиш зарур.

Математик режалаштиришни ўрганилаётган жараёнга (X_1 , X_2 , X_3 ва ян) таъсир этувчи омилларни танлашдан, уларни энг асосий аҳамияти (юқори ва паст даражаси) ва тажриба схемаси (матрица) дан бошлаши зарур. Шундан сўнг тажрибада фойдаланиладиган эксплантлар ажратиб олинади. Бунда бошланғич ўсимлик материални хилма-хиллигини, ва култураланаётган тўқималарни гетерогенлигини ҳисобга олиш лозим. Шунинг учун, ўсимлик материалларини тажрибанинг турли вариантлари орасида тенг тақсимлаш керак. Културалашни оптимал шароити барча эксплантларни ўсишини қониқарли даражада таъминлаши шарт.

Кўп омилли тажрибалар натижаларига статистик тарзда ишлов берилади ва регрессия тенгламасини олиш учун қуйидаги кўрсаткичлар ҳисобланади: 1) эркин аъзо регрессияси коэффиценти; 2)

ўрганилаётган омиллар регрессияси коэффиценти; 3) омиллараро ҳамкорлик регрессияси коэффиценти; 4) қаторли дисперсиялар; 5) Кохрен критерийсини аҳамияти; 6) натижалар адекватлиги.

Масалан, помидорнинг олтига генотиби гипоктилийсини (уруғпалла ости) културалаш шароитини оптималлаштиришда 24/16 тўлиқ омилли тажриба матрицаси бўйича биринчи тартибли тажриба қўйилган. 2- омиллар синалган тенгламалар сони; 4- тажрибада ўрганилаётган омиллар сони; (X_1 -инозит, X_2 –сахароза, X_3 –зеатин, X_4 -ИСК); 16–эксперимент схемаси бўйича тажрибалар сони.

Статистик ҳисоблаш натижасида регрессиянинг қуйидаги тенгламаси олинган. $Y = 3,756 + 1,619X_2 - 0,419 X_1X_2 - 0,244 X_2X_3X_4$ (каллус ўлчами бўйича);

$Y_{1+} = 2,438 + 0,738X_2 - 0,662X_3 - 0,43X_4 + 0,433 X_2X_3 + 0,462 X_1X_2X_3 + 0,437 X_1X_4 + 0,537 X_1X_2 X_4 - 0,312 X_1X_2 X_3X_4$ (битта каллусдаги куртаклар сони бўйича).

Тенгламадан кўриниб турибдики, X_1 дан ташқари барча омиллар ўрганилаётган жараёнларга ижобий ёки салбий таъсир кўрсатади. Демак, иккала тенгламадаги X_2 омилнинг аҳамияти шундан иборатки, бу омил озиқа муҳитга қўшилганда унда ўсаётган каллус тўқималарининг ўсишини ва тасодикий куртакларни пайдо бўлишини стимуллайтиди, зеатин ва ИСК (X_3 ва X_4 омиллар) микдорининг камайиши эса бир каллусдан тасодикий куртакларнинг пайдо бўлишини оширади. Шундай тарзда битта тажриба орқали каллус ва тасодикий куртакларнинг пайдо бўлишига таъсир этувчи омиллар ва помидорнинг бирламчи каллуси орқали клонли микрокўпайтиришнинг бошланғич этапи учун озиқа муҳитнинг оптимал таркиби аниқланди. Кейинги йилларда канд лавлаг, дуккаклилар, раувольфия, женшеннинг каллус тўқималарини културалашнинг шароитини оптималлаштириш учун, герберия, фрезия, каперслар, шувок, оддий қарағай ва бошқа баъзи ўсимликларни клонли микрокўпайтириш жараёни шароитларини оптималлаштириш учун кўп омилли тажрибалардан фойдаланилмоқда. Математик режалаштириш усули ўсимлик тўқималарини *in vitro* културалаш ва ўсимликларни клонли микрокўпайтиришни оптималлаштиришда самарали ва иқтисодий жиҳатдан фойдали усул ҳисобланади.

Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришга генетик физиологик гормонал ва физик омиллар таъсири. Клонли микрокўпайтириш усуллари яратишда албатта, генетик, физиологик, гормонал ва физик омилларнинг таъсирини ҳисобга олиш зарур. Маълум бир турнинг клони учун ишлаб чиқилган усул, ҳар доим ҳам шу турнинг бошқа вакиллари ёки бошқа турдаги ўсимликларни кўпайтиришда қўлланилмаслиги мумкин. Микрокўпайтиришга

генотип, бошланғич ўсимликни ёши, ажратилган мавсуми, шунингдек бирламчи эксплантни ўлчаши таъсир кўрсатади. Гормонал таъсирлардан цитокинин ва ауксинларни нисбати, озиқа муҳитни минерал моддалар, витаминлар, сахароза бўйича таркиби, физик омиллардан эса муҳит консистенсияси (суюқ ёки агарланганлиги), кислоталилиги, ёритиш шароити, шунингдек, ҳарорат режими ва ҳавонинг намлиги таъсир кўрсатади.

Генетик ва физиологик омиллар. Клонли микроўпайтиришни муваффақиятини белгиловчи омиллардан бири, бошланғич ўсимликнинг генотиби катта аҳамиятга эга. Икки паллали ўтчил ўсимликлар бир паллали ўсимликлар, дарахтларга нисбатан катта морфогенетик потенциалга эга, яъни уларнинг адвентив куртаклар пайдо қилишга, ниҳолларни ўсиши, илдиз отиши ва кўпайтиришни юқори коэффицентига эга бўлиши тажрибаларда аниқланган. Масалан, қанд лавлаги, тетраплоид шаклдаги дурагайлардан энг кўп регенерант ўсимликлар олинган, энг ками диплоидлардан, триплоид дурагайлардан олинган ўсимликлар сони оралиқ ҳолатни эгаллайди.

Микроўпайтириш жараёнида морфогенетик потенциални амалга оширида бошланғич эксплантнинг нав ва туркум хусусиятлари ҳам муҳим таъсир кўрсатади. Маълумки, вегетатив кўпайтиришга яхши бериладиган ўсимликлар *in vitro* културада одатда юқори регенерацион қобилиятини намоён қилади. Юқори морфогенетик потенциалга эга бўлган туркумлар орасида Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Compositae оиласи вакиллари мисол бўлади, Gramineae оиласига мансуб ўсимликлар қийин регенерацияланади. Она ўсимлик генотиби ҳам клонли микроўпайтиришга катта таъсир кўрсатади.

Хмел ўсимлиги турли навларидан ажратилган, апекслари озиқа муҳитидаги гормонларнинг иштирок этишига турлича сезгирлик намоён қилиши аниқланган. Смолистий нави учун БАПни оптимал концентрацияси 1 мг/л, Истринский–15 нави учун 0-5-1,5 мг/л, ва ИСКани оптимал концентрацияси 0,05 м/л деб топилган. Смолистий нави апексларига озиқа муҳитга ИСК ва 2,4-Д, қўшилиши таъсир кўрсатмади. Истринский – 15 навида эса 0,05 мг/л ИСК ва 0,05 мг/л 2,4-Д солинган озиқа муҳитда ниҳоллар бўйича ўсиши тезлашиши кузатилади. Шунингдек, крижовник ўсимлиги навларининг ажратилган апекслари ҳам културалаш шароитига морфогенетик реакцияси турлича бўлиши аниқланди.

Морфогенетик потенциалнинг ўсимликлар туркумининг ўзига хослигига боғлиқлиги бошоқли ўтларда аниқланган. Тажрибалар натижасида макро ва микроэлементлар, органик компонентлар (аминокислота, казеин гидролизати, ачитқи экстракти, биотин), ўсиш регуляторларларига нисбатан уларнинг эҳтиёжи турлича эканлиги

аниқланди. Бошланғич оналик шаклларга нисбатан дурагайлар юқори морфогенетик фаолликни намоён қилиши тасдиқланган. Микрониҳолларни илдиз оттиришда ҳам навларнинг хусусияти юзага чиқиши мумкин, масалан, гилосни микрониҳолларига ИМК билан ишлов берилганда Шубина навини 52 %, Владимирская навини 18 %, Любский навини эса 13 % илдиз отганлигини Россия олимлари томонидан аниқланган. Қора смородинани турли навлари микрониҳолларининг илдиз отишидаги фарқи ўрганилган.

Бошланғич эксплантнинг ёши ҳам морфогенезни намоён қилиш қобилияти жиҳатидан аҳамият касб этади. Етилган муртаклар, 20-30 кунлик ўсимталар ёки уларнинг турли қисмлари (ювенил материал) етук ўсимлик тўқималарига нисбатан юқори морфогенетик потенциалга эга ва катта миқдорда адвентив куртакларни ҳосил қилади, келгусида яхши ўсадиган ва илдиз ҳосил қиладиган ниҳоллар пайдо қилувчи ички меристемаларни ривожланишини стимуллайти. Бундай ҳолларда битта муртакдан бир йилда 10-100 минг ўсимлик олинса, етилган ўсимликнинг ички ёки апикал меристемасидан кўпайиш коэффиценти 1-2 баробарга камаяди.

Бирламчи эксплантнинг ёши *in vitro* кўпайтирилган микрониҳолларнинг илдиз отишига ҳам муҳим таъсир кўрсатади. Бошланғич материалнинг ёши катталаша борган сари ниҳоллар ва қаламчаларнинг илдиз отиши қобилияти пасаяди.

Масалан, олманинг 8 та тури билан иш олиб борилганда ниҳолларни илдиз отиши ювенил материалдан олинган микротуганакларнинг илдиз отиши 80-90 %, 2-3 йиллик ўсимликлардан ажратилган апикал куртаклардан 50 %, ундан каттароқ ўсимликлардан 20-30 % ни ташкил қилган.

Амалий жиҳатдан ўсимликларни, айниқса, дарахтларни 20 йилдан сўнг яъни ҳўжалик аҳамияти муҳим белгилари баҳоланганидан сўнг кўпайтириш мақсадга мувофиқдир. Лекин улардан бундай қари ўсимликларни *in vitro* кўпайтириш катта қийинчиликлар туғдиради. Биринчидан, катта ёшдаги ўсимликларни барча тўқима ва органлари замбуруғ, бактериялар билан эндоген зарарланган бўлиб, бу асептик култура олишда қийинчиликлар туғдиради. Иккинчидан, етук дарахтларнинг куртаклари ёки бошқа органлари ўтчил ўсимликларга нисбатан *in vitro* шароитини турлича қабул қилади. Бу културага қайта ўтказилган эксплантларнинг яхши ўсиши ва ривожланишини таъминловчи оптимал шароитни танлаш бўйича махсус тажрибалар ўтказишни тақазо қилади.

Ҳозирги вақтда ўсимликлар ёши билан боғлиқ бўлган тўсиқни бартараф этиш учун, реювенилизация йўли билан яъни *in vivo* ва *in vitro* ишларини биргаликда олиб бориш орқали амалга оширилади.

Реювенилизацияни (қайта ёшартириш) бир неча усуллар билан амалга ошириш мумкин: 1) эксплант олишдан аввал ўсаётган дарахт ёки алоҳида шохларини цитокинин эритмаси билан қайта-қайта ишлов бериш орқали; 2) такрорий қаламчалаш; 3) дарахт танасидан ниҳолларнинг ҳосил бўлишини индукциялаш ва илдиз отишини стимуллаш учун дарахтлар тез-тез бутаб турилади; 4) такрорий пайвандлаш; 5) субкултураларни (*in vitro*) сериялаш усули орқали; 6) қуюқ дарахтзорлар ҳосил қилиш орқали ён шохларнинг ўсишини тўхтатиш ва тиним ҳолатидаги куртакларнинг ривожланишини стимуллашдан иборат.

Або Эл Нил таклиф этган реювенилизация технологиясининг биринчи босқичида тиним ҳолатидаги дарахтларни қайта-қайта цитокинин билан ишлов беришни таклиф этган. Лекин бу ишда кинетин, 2 йр дан фойдаланиш мумкин. Цитокининнинг миқдорини ишлов берилаётган дарахтнинг таъсирланиш даражасига кўра тажрибалар натижаларини ҳисобга олган ҳолда амалга ошириш лозим.

Цитокинга бошқа ўсиш регуляторларидан қўшиб ҳам фойдаланиш мумкин. Масалан БАП билан N-диметиламиноқаҳрабо кислотани кам миқдори биргаликда қўлланилганда баъзи ўсимлик турларининг таъсирланиши ортганлиги аниқланган. *In vivo* ўсувчи барча дарахтлар ва алоҳида шохларига ишлов бериш мумкин. Ўсимликларнинг кесилган шохлари цитокинин эритмасига солиб қўйилади ёки дарахтнинг ўтказувчи тизимлари орқали, масалан, шохнинг кесилган томонидан инъекция қилиш йўли билан ишлов бериш мумкин. Бундай ишлов натижасида куртак ва ниҳолларнинг ҳосил бўлиши тезлашади ва улар ёш асоснинг морфологияси каби морфологияга эга бўлади. Ниҳоллар ёки куртакларга эга калта поя қирқмалари, куртаклари ва ниҳолларини ўсишини индукциялаш учун *in vitro* озиқа муҳитга жойлаштирилади. Сўнг шаклланган ниҳоллар кўпайтириш учун, ёки илдиз чиқариш учун мослаштирилган озиқа муҳитларга ўтказилади. Бунда оралиқ босқич янги ҳосил бўлган куртакларнинг очилиши ва ундан ниҳолларнинг ривожланишига имкон берувчи муҳит ҳисобланади.

Физиологик омилларга эксплантни ажратиш даври ҳам киради. Ўсимликларни вегетация даврида ажратилган тўқима ва органлар, мажбурий ва чуқур тиним даврида ажратилганларига нисбатан, озиқа муҳитнинг таркибига таъсирчанлиги ва адвентив куртаклар пайдо қилиш, ниҳолларининг шаклланиш ва илдиз отиш қобилияти юқори бўлади.

Эксплантлар ўлчами ҳам муваффақиятли микрокўпайтиришни белгиловчи омиллардан биридир. Эксплант қанчалик кичик бўлса,

регенерацияланиш хусусияти шунчалик кам бўлади ёки аксинча, паренхима, ўтказувчи тўқималар ва камбийдан ташкил топган йирик ўлчамдаги эксплантлар озиқа муҳит таркибидаги фитогормонлар нисбатидан қатъий назар, куртаклар ҳосил қилади. Лекин бошқа томони ҳам борки, катта ўлчамдаги эксплант ҳужайраларида вирус ва бошқа патогенлар пайдо бўлиш эҳтимоли юқори бўлиб, бу *in vitro* ўсимликлар тўқимасини соғломлаштирилишига тўсиқ бўлади.

Эксплантларни оптимал ўлчами бирламчи эксплант манбаи бўлиб хизмат қилувчи донор ўсимликнинг турига хос хусусиятларига ва органлари хусусиятларига боғлиқ. Малина учун бирламчи эксплант ўлчами 2 мм деб қабул қилинган, бунда ўсимликнинг апикал учларининг 60%и Морел муҳитида регенирацияланган. Хмел учун бу кўрсаткич 0,1 дан 0,2 мм, пиёз ва сарисоқ пиёз учун меристемаларнинг оптимал ўлчами 0,5-0,8 мм ни ташкил қилади.

Қатор ўсимликларда ажратилган тўқималари ва меристема тўқималарининг морфогенетик қобилияти ниҳолларда куртакларни жойлаштиришига боғлиқ.

Гормонал омиллар. Клонли микроўпайтиришни муваффақиятли амалга оширишда озиқа муҳитининг гормон мувозанати ҳам муҳим омиллардан бири ҳисобланади. Гормонларнинг нисбати (цитокинин ауксин) юқори бўлганда ички меристемалар ёки адвентив куртаклар ривожланади, паст бўлганда илдиз ҳосил бўлиши индуцирланади, ўртача бўлганда эса каллус тўқималари ҳосил бўлиши ва пролиферацияси кузатилади.

Клонли микроўпайтиришда ауксин компонентлари сифатида ИСК, баъзи ҳолларда НСК, цитокинин сифатида эса кинетин ва БАП қўлланилади.

Ўсимликларни микроўпайтиришда фойдаланиладиган цитокининларни унинг фаоллиги бўйича қуйидаги тартибда жойлаштириш мумкин: кинетин < 6 бензил аминопурин (БАП) < 2-изопентиладенин (2 ip) < зеатин.

Цитокинин ва ауксинлардан ташқари озиқа муҳитга баъзида гебберал кислотаси ҳам қўшилади, у шаклланган куртакларни ўсишини ва чўзилишини (элонгацияси) стимуллайти ва ер устки қисми яхши ривожланган ўсимлик олиш имконини беради.

Умуман олганда, тўқималар културасида турли морфогенетик таъсирланишини кам миқдордаги экзоген фитогормонлари ёрдамида индукциялаш ва стимуллаш мумкин ва гормонлар билан тўйинган озиқа муҳитларда ўсимлик тўқималарининг умумий фаоллигини батомом йўқотиши ёки тўқималарни nobуд қилиш мумкин. Ўсимликларни культраланаётган орган ва тўқималарини фитогормонларга нисбатан таъсирланиш хусусиятини ўсимликларни

ўстириш мақсадида ўсиш регуляторларидан фойдаланганда ҳисобга олиш керак.

Клонли микрокўпайтиришга гормонлар билан бир қаторда минерал тузлар, витаминлар ва углеводлар ҳам таъсир кўрсатади.

Ўсимликларни *in vitro* микрокўпайтириш учун Мурасига ва Скуга, Линсмаер ва Скуга, Гресхоф ва Доу, Нич, Хеллер, Шенк ва Хильдебрандт ва бошқа бир-биридан аммонийли ва нитратли азот нисбати билан фарқ қилувчи озиқа муҳитлардан фойдаланилади. Кўпинча тадқиқотчилар юқори миқдорда анорганик моддалар тутувчи Мурасига ва Скуга озиқа муҳитларидан фойдаланишни афзал биладилар. Азот билан бойитилган озиқа муҳитлардан фойдаланилганда, нафақат каллус тўқимаси ҳосил бўлишига, балки органогенез ва айниқса соматик эмбриогенез жараёнларини стимулланишига ҳам эришиш мумкин. Масалан, NH_4NO_3 *Brassica* ни ҳар хил турлари муртакларини морфогенетик потенциалига таъсир этади. Муртакларни яшовчанлик фоизи ва ниҳоллар ҳосил бўлиш частотаси NH_4NO_3 нинг муҳитдаги миқдори камайтирилганда ошади, ниҳолларнинг ва муртаклар шаклланишини максимал даражасига NH_4NO_3 иштирок этмайдиган озиқа муҳитида эришиш мумкин. KNO_3 ва NH_4NO_3 нинг миқдори 6,7 мМ гача камайтирилганда крижовникнинг баъзи навларини морфогенезини яхшиланади. Помидор учун минерал азотнинг миқдори оширилган озиқа муҳитда каллус ҳосил бўлиш жараёни тўхташи ва эксплантларни нобуд бўлиши тажрибаларда аниқланган. Глоксиния учун вегетатив ва репродуктив тузилмаларнинг ҳосил бўлиши озиқа муҳит таркибидаги компонентларга боғлиқ эканлиги аниқланган. KNO_3 (20 мМ) ва сахарозанинг (100 мМ) юқори миқдорида кўпинча вегетатив куртакларни ривожланиши, гул куртакларнинг ривожланиши эса фақат 28 % эксплантларда кузатилган. Озиқа муҳитда KNO_3 (2 мМ) ва сахарозанинг (15 мМ) кам миқдорида барча эксплантларда фақат гул куртаклар ҳосил бўлади.

Микрокўпайтириш жараёнларига гормон табиатига эга бўлмаган биологик фаол моддалар, шунингдек углеводли озиқлантириш ҳам сезиларли таъсир кўрсатади. Маълумки, каллус тўқималари ҳосил бўлиши, ундан ниҳолларнинг регенерацияланиши ва эмбриодларнинг пайдо бўлиши учун, озиқа муҳити таркибида витаминлар, аминокислоталар, ўсимлик экстрактлари, казеин гидролизати иштирок этиши зарур. Агар ниҳолларнинг ривожланиши мавжуд ички меристемалар ҳисобига ёки шаклланган куртак ва эмбриодлар ҳисобига бўлса, у ҳолда биологик фаол моддаларни зарурияти йўқ, чунки бундай ниҳоллар ўзининг хаёт фаолияти учун зарур бўлган моддаларни ўзи синтезлаш қобилиятига эга. Биологик фаол

моддаларнинг юқори концентрацияси гипervитаминоз келтириб чиқаради, натижада ўсиш чекланади, баргларини қорайиши ва қуриши, ўсимлик морфологиясининг ўзгаришига олиб келади

Клонли микроўпайтиришнинг барча босқичларида углевод манбаи сифатида 3 % ли сахарозадан фойдаланилади. Лекин, бу микдорни барча ўсимликларни *in vitro* ўстириш учун оптимал деб бўлмайди. Қора қарағайнинг ажратилган муртакларини ўсишида сахарозанинг юқори микдори (23 %) адвентив куртакларни пайдо бўлишига салбий таъсир кўрсатиши аниқланган. Иккинчи пассажда бу жараён амалга ошмаганлиги ва тўртинчи пассажда барча эксплантлар нобуд бўлганлиги кузатилган. Озиқа муҳитдаги сахароза концентрациясининг камлиги нафақат адвентив куртакларни пайдо бўлишини, балки унинг ривожланиб ниҳол ҳосил қилишини ҳам стимуллади. Ниҳоллар сахарозанинг 0,5 – 1 % ли микдорида 2-3 ой култураланганида 1-1,5 см узунликка эга бўлади, улардан кўпайтириш ёки илдиз оттириш учун фойдаланилган.

Углерод манбаи сифатида сахароза билан бир қаторда глюкоза, фруктоза, галактоза ва бошқалардан ҳам фойдаланиш мумкин. Маълумки, *in vitro* ўсимликлар тўқимасини културалашда углеводли озиқа сифатида фойдаланиладиган манбалардан глюкоза сахарозадан кейинги ўринни эгаллайди. Ўрганилган 38 та ўсимлик култураларидан (ўтчил ва ёғоч пояли ўсимликлар) 85 %ли глюкозали муҳитда ҳам жуда яхши ўсган. Глюкозадан кейинги ўринни фруктоза эгаллайди. Минохнинг фикрича, култураланаётган ўсимликларнинг $\frac{2}{3}$ қисми ўсишида фруктозадан муваффақиятли фойдаланилган. Ажратилган ўсимлик тўқималарига таъсири бўйича, галактоза глюкоза ва фруктозага нисбатан фарқ қилади. Ўрганилган ўсимлик културалардан деярли ярми галактозали муҳитда ёмон ўсган ёки умуман ўсмаган. Лекин ўсимликлар орган ва тўқималарининг ўсишида галактозанинг ижобий роли ҳақида ҳам маълумотлар бор. Шундай қилиб, гормонлар, биологик фаол моддалар ва минерал тузлардан фойдаланиш муоммосини тайёр рецептлар асосида, озиқа муҳит таркибига бу бирикмаларни киритиш орқали эмас, балки, микроўпайтиришда фойдаланилаётган у ёки бу ўсимлик турларининг аниқ морфогенетик реакциясини ҳисобга олган ҳолда ҳал этилиши лозим.

Физик омиллар. Озиқа муҳитнинг каттиқ, суюқ ҳолатда бўлиши ҳам эксплантларни ўсиши ва адвентив куртакларни пайдо қилиш жараёнларига таъсир этувчи муҳим омиллардан бири ҳисобланади. Маълумки, ниҳолларни учки қисмидан олинган эксплантлар суюқ озиқа муҳитларда роллер типдаги аппаратларда култураланганда уларнинг ўсиши сезиларли даражада стимулланади, ниҳолларни апикал доминантлиги аниқ намоён бўлмайди, ўсиш даври ва қайта

экишлар сони қисқаради, бу ўсимликларга озиқа моддалар билан яхши таъминланиш имконини беради. Бошқа томонидан қараганда, бу шароитда аномал, эгри –бугри ниҳолларнинг пайдо бўлиш эҳтимоли ортади. Агарли озиқа муҳитлардан фойдаланиш орқали бу муаммоларни йўқотиш мумкин, лекин шу билан бирга бу усул эксплантларни озиқланиши шароитини ёмонлаштиради ва метаболизм маҳсулотлари чиқиб кетишига тўсқинлик қилади.

Шунингдек ўсимликларни клонли микрокўпайиши ва ўсишида озиқа муҳитининг рН ҳам таъсир этади. Маълумки, кучли кислотали ёки ишқорий муҳитда баъзи элементлар масалан, фосфор, темир эримади, бундан ўсимликларни ўсиши чекланади. Лекин, юқори кислотали муҳитда бу элементларни эрувчанлиги ошиши, кўп миқдорининг эритма ҳолатига ўтиши эксплант учун заҳарли таъсир кўрсатади.

Ўсимликларни орган ва тўқималари рН 5,6-5,8 бўлган озиқа муҳитларда култураланади. Аммо бу шароит ҳар доим ҳам оптимал бўлавермайди. Масалан, оддий қарағай муртаклари учун озиқа муҳитининг кислоталик даражаси 4,7 дан 5,2 гача ўзгартирилганда муртакларнинг 2,3 – 3 маротаба кўп адвентив куртаклар ҳосил қилиши аниқланган, оддий қорақарағай учун эса, муҳитнинг энг оптимал рН 5,2 –5,6 оралиғида деб топилган. Бу натижалар юқорида номлари келтирилган ўсимлик турлари ўсадиган тупроқнинг кислоталик даражаси билан деярли мос келади. Шунинг учун тўқималар култураси бўйича тажрибалар ўтказишда, ўрганилаётган ўсимлик ўсадиган табиий шароитдаги тупроқнинг кислоталик даражасини ҳам ҳисобга олиш зарур.

Одатда ажратилган ўсимлик тўқималари бошланғич ўсимликнинг интенсивлик ва фотожараёнга бўлган талабларини ҳисобга олган ҳолда, люминесцентли лампалар ёруғлиги остида ўстирилади. Мурасига ўсимликларни клонли микрокўпайтиришнинг биринчи ва иккинчи босқичларида тўқималарни 1-5 минг лкда 14-16 соатли фотожараёнда ўстиришни тавсия қилади, ёритишнинг бу шароити кўпчилик ўсимликларнинг ниҳол ва илдизларининг пайдо бўлишига ёрдам беради.

Кўпчилик тадқиқотчиларнинг фикрича, ёритиш интенсивлиги органогенез индукциясида муҳим рол ўйнар экан. Бегоня ўсимлиги културасида ёритишни 3 дан 6 минг лк гача оширилиши ниҳол ҳосил бўлиш интенсивлигини орттиришига олиб келган. Аспарагус тўқималарда эса 1 минг лк ёруғликда (16 соатлик фотожараён) максимал даражада ниҳоллар ва илдизлар ҳосил бўлганлиги аниқланган, ёритиш интенсивлигини оширилиши ёки камайтирилиши тўқималарнинг органогенез қобилятини пасайишига ёки нобуд бўлишига олиб келган.

Ажратилган тўқималар ўсишининг интенсивлиги ва характери ёруғликнинг спектрал таркибига ҳам боғлиқ. Демак, *Heloniopsis orienatalis* тўқималарида куртакларни пайдо бўлишини оқ, қизил, кўк нурлар яшил ранг нурга нисбатан тезроқ индуцирлайди. қизил нур тамаки тўқималарида гул куртакларни, коронгулик эса илдиз ҳосил бўлишини стимуллайди. Тамаки каллусида адвентив куртаклар пайдо бўлишини ультрабинафша, кўк, бинафша нурларлар тезлаштиради. Салат ўсимлиги эксплантларида қизил нурлар ниҳоллар ҳосил бўлишини тезлаштиради. Пробиркада ўстирилган картошка ўсимликларида кўрсатилишича, озиқа муҳит таркибида НСК ва ИСКни иштирок этиши кўк нурга нисбатан қизил нурда тугунак ҳосил бўлишини стимуллайди, БАП ёки кинетин тугунак ҳосил бўлишини қизил нурга нисбатан кўк нурда кўпроқ стимуллайди (Т.Н.Константинова ва бошқалар,1988). Қайин ниҳолларининг илдиз отишига, мавжуд меристемаларни фаоллаштиришга қизил нур яхши таъсир кўрсатади, бунда деярли 100 % микрокаламчалар илдиз ҳосил қилади. Оқ нур таъсирида бу жараён секинроқ кечади, кўк нурда фақат қаламчаларнинг ярми, короғида эса ундан ҳам камроғи илдиз ҳосил қилади. Қизил нур остида озиқа муҳит таркибида ИСК иштирокида илдиз ҳосил бўлиш жараёни тезлашади ва ниҳолларнинг ўсиш тезлиги ортади, кўк нур ўсимлик тўқималарида цитокинин микдорининг ортишига таъсир қилиб, ниҳолларнинг ҳосил бўлишини стимуллайди.

Ҳарорат метаболизм жараёнларини фаоллаштириш орқали ўсимликнинг ажратилган тўқималарини ўсиши ва регенерацияланишига, муҳим таъсир кўрсатади. Кўпчилик ўсимлик тўқималари учун оптимал ҳарорат $23 - 25^{\circ}\text{C}$ ни ташкил этади.

Лекин ўсимликларнинг ҳароратга бўлган эҳтиёжи турлича бўлиши мумкин. *Lilium auratum* ўсимлиги пиёзлари ҳосил бўлишига 20°C ҳарорат яхши таъсир кўрсатади. Гладиолуснинг эксплант тўқималари музлатилганда, унинг регенерацияланиш қобиляти ошади. Бегоня ўсимлиги қаламчалари културасида ниҳолларнинг ҳосил бўлишини паст ҳароратда ($15-18^{\circ}\text{C}$) икки ҳафта давомида индукциялаш лозим.

Ҳарорат режими биринчи навбатда, ўсимлик турига боғлиқ. Масалан, тропик ўсимликлар учун ўстиришнинг оптимал ҳарорати 27°C атрофида, бошқа кўпчилик ўсимликлар учун эса -25°C дир. Клонли микрокўпайтиришда пробирка ўсимликлари климатик камераларда 16 соатли фотодпериодда ва ҳавонинг намлиги 70 % бўлган шароитда ўстирилади.

Шундай қилиб, ўсимликларни кўпайтириш коэффицентини оширишда, ҳар бир тур учун, унинг табиий ўсиш шароитини ҳисобга олган ҳолда културалашнинг индивидуал шароитини яратиш зарур. Демак, клонли микрокўпайтириш усули ўсимликларни вегетатив

кўпайтиришнинг янги истиқболли усули бўлиб, генетик бир хил соғломлаштирилган экиш материаллари олиш, кўпайтиришнинг юқори коэффицентига эришиш, селекцион жараёнларни қисқартириш, бутун йил давомида иш олиб бориш, ўсимликларни ўстириш учун зарур бўлган майдонларни қисқартириш имконини беради. Дунёнинг кўпгина мамлакатларида клонли микрокўпайтириш биоиндустрияси оқими саноат асосига қўйилган ва ўнлаб корхоналар фаолият юритмоқда. Масалан, Францияда гулли ўсимликлар маҳсулотларининг 94% ини ажратилган тўқималар култураси усули ёрдамида, АҚШда 100 га яқин тижорат корхоналари манзарали, мевали ва ўрмон ўсимликлари, сабзавотларнинг экиш материалларини клонли микрокўпайтириш усули ёрдамида олинади. Дунё бозорида соғломлаштирилган экиш материаллари етиштириш бўйича Голландия, олма, олхўри ва шафтоли кўчатларини (хар йили 250-500 мингтагагача) етиштириш бўйича Италия етакчилик қилади.

Ўсимликлар селекциясида алоҳида ажратилган хужайра ва тўқималар култураси.

Хужайралар технологияси йўналишларидан бири – бу улардан селекцияда фойдаланиш орқали, ўсимликларни янги шакллари ва навларини яратишдаги анъанавий селекцион жараёнларни тезлаштириш. Ажратилган хужайра ва тўқималарни *in vitro* културалаш усуллари шартли равишда икки гуруҳга бўлиш мумкин.

Биринчи гуруҳ – бу ёрдамчи технологиялар бўлиб, селекциянинг ўрнини боса олмайди, лекин унга хизмат қилади. Бунга: *in vitro* уруғлантириш (прогам чатишмасликни енгиш), уруғ куртакларни ва етилмаган дурагай куртакларни културалаш (постгам чатишмасликни енгиш), чангдон ва микроспораларни ўстириб гаплоидлар олиш, алоҳида ажратилган хужайра, тўқима ва органларни криосақлаш, узок турлар дурагайлари клонли микрокўпайтириш усуллари киритиш мумкин.

Иккинчи гуруҳ усуллари мустақил равишда, селекциянинг анъанавий усулларига боғлиқ бўлмаган ҳолда, каллус тўқималарини қўллаш орқали хужайралар селекциясини амалга ошириш, соматик дурагайлаш (алоҳида ажратилган протопластларни бир-бирига қўшиш ва жинсиз дурагайлар олиш), ген муҳандисли усулларида фойдаланиб, ўсимликларни янги шакллари ва навларини олишга қаратилгандир.

Ўсимликлар селекциясида *in vitro* усулларининг ёрдамчи усул сифатида қўлланилиши. Узок формаларни чатиштиришда ажратилган тўқималар културасини: *in vitro* уруғлантириш, эмбриокултура (алоҳида ажратилган муртакларни сунъий озиқа

муҳитларда ўстириш), қимматли дурагайларни *in vitro* гаплоидларини олиш, клонли микрокўпайтириш ва криосақлаш каби усулларидадан фойдаланилади.

Агар табиий шароитда танланган жуфтликлар орасида уруғланиш имконияти бўлмаса *in vitro* уруғлантириш амалга оширилади. Бу бир неча сабабларга боғлиқ бўлиши мумкин: 1) физиологик (чанг етилиш вақтининг мос келмаслиги ва бошқалар); 2) морфологик (чангдон найчасининг қисқалиги ёки ривожланишнинг турли даврларида унинг ўсишини тўхтатиши ва бошқалар). Буни икки хил йўл билан амалга ошириш мумкин: а) тугунча устига етилган чанг доначалари қўйилиб, сунъий агарли озиқа муҳитларда ўстирилади; б) тугунча ёрилади ва уруғ куртак билан планцента бўлаги озиқа муҳитига ўтказилади, унинг атрофида ёки бевосита муртак тўқимасида етилган чанг ўстирилади. Уруғ куртаклар ўлчамига қараб уруғланиш амалга ошганлигини аниқлаш мумкин. Уруғланган уруғмуртаклар ўлчами катталаша бошлайди.

Шаклланган муртак тиним давридан ўтмасдан, тезлик билан ўсади ва дурагай авлодни пайдо бўлишига олиб келади. *in vitro* муртакларни уруғлантириш орқали тамакининг ўзаро чатишмайдиган *N. tabacum* тури навлари билан *N. rosulata* ва *N. debneyi* ёввой турларидан турлараро дурагайлари олинган (М.Ф.Термовский ва бошқалар 1976), Шимарева (1986).

Постгам чатишмасликни енгиш. Генетик узоқ формалар чатиштирилганда постгам чатишмаслик юзага келади, натижада пуч, унмайдиган уруғлар ҳосил бўлади. Бунинг сабаби муртак ва эндоспермнинг ривожланиш вақтидаги тафовут бўлиши мумкин. Эндоспермнинг ривожланиши суст бўлганда муртак нормал ўсишга қодир эмас. Бундай ҳолларда етилган пуч уруғлардан муртаклар алоҳида ажратиб олинади ва сунъий озиқа муҳитларда ўстирилади.

Муртакларни сунъий озиқа муҳитларда ўстиришга *эмбриокултура* деб аталади. Етилган муртаклар физиологик фаол моддалар иштирокисиз фақат минерал тузлар ва сахароза тутувчи оддий таркибдаги озиқа муҳитларида ўсади (масалан, Уайт озиқа муҳитида). Узоқ турлар ўзаро чатиштирилганда муртаклар ривожланиши бузилишини дастлабки даврдаёқ кузатиш мумкин, бунда хужайралар дифференцияланмайди, ўсиши секинлашади. Бундай ҳолларда муртак култураси ўсиши икки босқичдан: муртакнинг эмбрионал ўсиши, бу вақтда унинг дифференцияланиши давом этади ва етилаётган муртакни ўсишидан иборат бўлади. Биринчи босқич учун сахароза миқдори оширилган, турли аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар қўшилган мураккаб таркибли озиқа муҳити керак бўлади.

Ҳозирги вақтда эмбриокултураларни селекцияда қўллаб, донли, бошокли ва бошқа қишлоқ хўжалик ўсимликларининг узок формаларидан дурагайлар олиш муҳим аҳамият касб этмоқда, етилмаган муртакларни етилтириш йўли билан буғдой-жавдар дурагайини чиқишини ошириш, шунингдек эмбриокултуралардан буғдойни айғир қиёқ ўсимлиги билан дурагайлашда постгам чатишмасликни енгиш учун фойдаланиш мумкинлиги аниқланган.

Эмбриокултура усули сабзавот экинларини ўзаро чатиштиришда тобора кенг қўлланилмоқда. Эмбриогенезни турли босқичларидаги пийезнинг дурагай уруғларидан олинган муртакларни *in vitro* ўстириш усуллари, қисман фертил турлараро дурагайлардан муртакларни ўстириш усуллари йўлга қўйилган. Ажратилган муртаклар култураси помидор ва бошқа сабзавот экинлари селекциясида фойдаланилади.

Помидор муртакларининг *in vitro* ўсиши ва ривожланиши, гормон регуляцияси ўрганилган. Кунгабоқарнинг турлараро дурагайларни олишда эмбриокултура усулини қўллаш имкониятлари яратилмоқда, чангланганидан сўнг турли муддатларда ажратилган муртакларни *in vitro* ўсиши ва ривожланишини назорат қилувчи омиллар ўрганилмоқда.

Алоҳида ажратилган муртаклар култураси узок дурагайлар олишда ёрдамчи усул сифатида нафақат постгам чатишмасликни енгишда, шунингдек хўжалик аҳамияти қимматли дурагайларни кўпайтиришда ҳам қўлланилади. Бу ҳолда микрокўпайтириш каллусогенез, морфогенез индукцияси ва каллус тўқимасидан регенерант ўсимлик олиш йўли билан боради. Етилмаган муртакларни клонлаш техникаси қимматли генотипга эга бўлган ўсимликларни ҳаёт жараёнининг бошланғич даврларида кўпайтириш имконини беради. Муртак културасини қўллашнинг яна бир имконияти улардан хужайралар селекциясида фойдаланишдир.

Узок дурагайларни клонли микрокўпайтириш. Эмбриокултура тўлиқ ривожланмаган муртаклардан дурагай ўсимлик олиш имконини беради. Аммо дурагайлардан ўсимлик олиш камдан-кам ҳол бўлиб, кўпинча дурагайлар стерил бўлади, масалан баъзан гречиха селекциясида, бу ўсимликнинг чорраҳали чангланиши сабабли, нодир генотипли авлодларни яратиш қийин. Шунинг учун тадқиқотчи олимлар олдида, олинган ўсимликларни сақлаш ва кўпайтириш вазифаси туради. Бунда клонли микрокўпайтириш усули ёрдам беради. Дурагайлар яширин куртакларининг ривожланишини фаоллаштириш орқали (стерил ниҳолларни қаламчалаш), адвентив куртаклардан ёки каллус тўқималаридан ўсимликларни регенерациялаш орқали кўпайтирилади.

in vitro гаплоидлар олиш ва уларни селекцияда қўллаш. Гаплиод ўсимликларнинг селекциядаги ўрни бекиёсдир. Уларни қўллаш орқали керакли комбинацияни тезроқ топиш нав яратиш муддатини қисқартиради. Гаплоидлардан барқарор гомозигот тизимлар олишда фойдаланилади. Мутагенез учун ҳам гаплоидлардан фойдаланиш қулай, чунки гаплоидлар даражасида рецессив мутацияларни танлаш осон кечади.

Диплоид ўсимликларда гомологик хромосомалар аллел генларининг иккаласи ҳам камдан-кам ҳолларда мутацияга учрайди. Асос одатда гетерозигот бўлиб (иккала гени билан фарқ қилади), бунда фақат доминант геннинг таъсири юзага чиқади. Чунки мутация кўпинча рецессив бўлганлиги сабабли, уларни аниқлаш қийин. Гомологик хромосомаларнинг фақат биттасини тутувчи гаплоид ўсимликларда эса мутация тез аниқланади. Гаплоид даражасидаги селекция нафақат доминант, балки рецессив белгиларни ҳам тўғридан – тўғри танлаш имконини беради.

Гаплоид асослар стерилдир, лекин уларнинг хромосомалар тўпламини колхицин ёрдамида икки ҳисса кўпайтириш ва диплоид гомозигот ўсимликлар олиш мумкин. Сунъий йўл билан *in vitro* усулларида фойдаланиб, кўп микдорда гаплоид ўсимликлар олишни амалга ошириш мумкин. Ажратилган тўқималар култураси усулини қўллаш орқали гаплоидлар олишнинг учта усули мавжуд:

- *андрогенез* – алоҳида ажратилган чангдон ва микроспорани сунъий озика муҳитларда ўстириб гаплоид ўсимликлар олиш.

- *гиногенез* – уруғ куртакларни сунъий озика муҳитларда ўстириб, гаплоид ўсимликлар олиш.

- *партеногенез* – узок формадаги дурагайлар чатиштирилганда оталик хромосомалари йўқолиб кетган дурагай муртақдан гаплоид ўсимликлар олиш.

Чангдонларни културалаш технологияси асосида, буғдой, маккажўхори, арпа, картошкани гаплоид ўсимликлари олинган. Чангдонлар културасида гаплоид ўсимликлар пайдо қилишнинг икки йўли мавжуд: Биринчи – йўли чанг дончаларидан эмбриогенез йўли билан ўсимлик ҳосил қилиш. Бунда чангдонлар ичида алоҳида чанг дончаларидан эмбрионлар пайдо бўлади. Улар ўсиб гаплоид ўсимликлар ҳосил қилади. Иккинчи йўли – чангдон хужайраларидан каллус тўқимаси олиш ва кейинчалик каллус хужайраларида морфогенез натижасида ўсимлик регенерациялаш. Лекин пайдо бўлган ўсимлик хар доим ҳам гаплоид бўлавермайди ва улар кўпинча плоидлиги билан фарқ қилади. Ҳозиргача уларнинг полиплоидланган гаплоид хужайралардан ёки хужайралар қўшилишидан ҳосил бўлиши охиригача аниқланмаган.

in vitro олинган гаплоидлардан нафақат амалий селекцияда, шунингдек ген муҳандислиги ишларида ва ҳужайралар селекциясида ҳам фойдаланиш мумкин.

Генетик трансформациялаш бўйича тажрибалар учун, баъзи ҳолларда протопластларга нисбатан чанг доналаридан фойдаланиш қулайдир.

Ўсимликларни криосақлаш. Ўсимликларнинг соматик ҳужайраларини суюқ азотда (196°C ҳароратда) сақлаш биотехнологияда янги йўналиш бўлиб, XX асрнинг 70 йилларидан бошлаб кенг ривожлана бошлади. Бу технологиянинг мақсади *in vitro* културасида генофондни сақлаш, селекционерларни фойдали хусусиятларга эга: генотиплар, дурагайлаш учун зарур бўлган чанглар; ноёб нусхадаги уруғлар, шу жумладан қурғоқчиликка чидамсизлари билан ҳам; ҳар хил турларга мансуб бўлган ўсимликларнинг трансформацияланган, мутант, дурагай, *in vitro* морфогенезга қодир ҳужайралари; зиготик ва соматик муртаклар ва бошқалар билан ҳар қандай вақтда таъминлашдан иборатдир. Ҳозирги вақтда алоҳида култураланаётган ҳужайралар, каллус културалари, ажратилган протопластлар, поя учлари меристемаларини криосақлаш усуллари йўлга қўйилган.

Криосақлашни амалга ошириш учун ўсимлик ҳужайраси спецификасини (ўзига хос томонларини) ҳисобга олиш зарур. Бундай мақсадлар учун ҳужайраси майда, майда вокуолали ва таркибида сувнинг миқдори кам ҳужайралар танлаб олинади. Ўсимлик ҳужайраларини музлатиш сўнгра эритиш усуллари ҳар бир ҳолат учун алоҳида ишлаб чиқилади. Криосақлашда бир қатор қийинчиликлар юзага келиши мумкин, улардан бири, музлатилаётган ҳужайра ва тўқималарни осмотик стресслардан ва ҳужайралар ичида муз кристаллари ҳосил бўлиши натижасида структурасининг механик парчаланишидан ҳимоя қилиш билан боғлиқ. Шу билан бир вақтда ҳужайралар эритилгандан ва рекультивация қилингандан сўнг яшовчанлигини таъминловчи шароитни тўғри танлай билиш лозим.

Криосақлашда ҳужайраларни музлатишдан олдин ишлов бериш, криопротекторларни қўллаш, музлатишни маълум режимини $0 - 40^{\circ}\text{C}$ (камдан-кам ҳолларда $- 70$ гача) оралиғида сақлаш, шунингдек объектлар эритилганда махсус эҳтиёткорликни кўриш каби умумий қоидалар белгиланган.

Криоконсервация жараёни ҳужайралар културасини музлатишга тайёрлашдан бошланади. Бунинг учун ҳужайралар култураси турли осмотик фаол моддалар: 2-6% концентрациядаги маннит ёки сорбит, аминокислоталар, улардан ўсимликлар ҳужайрасидаги сувни ўзига

тортиб олиш хусусияти билан маълум бўлган пролин, шунингдек γ -аминомой кислота тутувчи озиқа муҳитларда култураланади.

Криопротекторлар яъни, ҳужайраларни механик ва осмотик стресслар зарарлашидан сақловчи моддаларни танлаш, эмпирик равишда заҳарлилик ва оптимал самараси тамойили асосида олиб борилади. Барча маълум криопротекторлар орасида ҳужайраларга осон кирувчилари диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%) глицерин (10-20%), шунингдек ҳужайраларга кира олмайдиган юқори молекуляр моддалар поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтилглицоль (ПЭГ) (6000 мол. оғирликка эга бўлгани) эканлиги аниқланган.

Криосақлаш учун музлатиш режимини тўғри танланиши (0°C дан – 40°C) муҳим аҳамиятга эга. Ҳамма объектлар учун музлатишнинг давомийлиги бир минутда $0-1^{\circ}\text{C}$ қилиб белгиланган ва барча ишлар музлатиш дастури асосида махсус қурилмаларда олиб борилади.

Шундай қилиб, секин-аста музлатиш ва криопротекторларни қўллаш ҳужайраларни эркин сувдан ҳоли қилишга ёрдам беради ва 40°C баъзида 60°C ҳароратда ҳужайралар батамом сувсизланади. Шундан сўнг ўсимлик материали солинган ампула музлатиш учун суяқ азотга солинади.

Материалларни суяқ азотда сақлаш вақти чегараланмаган. Масалан Россия фанлар академияси ўсимликлар физиологияси институтида сабзи тўқималари 20 йил, картошка меристемасини 10 йилдан буён суяқ азотда сақланмоқда.

Криосақлашнинг сўнгги босқичи, материалларни эритиш ва ҳужайралар тирикчилигини текширишдан иборат. Агар музлатиш аста-секин амалга оширилган бўлса, эритиш иложи борица тезроқ бўлиши лозим. Бунинг учун ампулалар $40-60^{\circ}\text{C}$ ҳароратдаги сув ҳаммомида музнинг охирги кристаллари эригунига қадар қолдирилади.

Криосақланган ҳужайралар суяқ азотда сақланганда ўзининг бўлинишга, ўсимлик регенерациялашга бўлган қобилятини йўқотмайди, иккиламчи метаболитлар синтез қилишдаги маҳсулдорлиги камаймаслиги тажрибаларда исботланган.

Шундай қилиб, ўсимлик объектларини криосақлаш билан боғлиқ бўлган технология ривожланмоқда ва мукаммаллашмоқда. Шубҳасиз, бу технология ўзининг келажагига эга, бугунги кунда криобанклар селекционерлар ишларини енгиллаштирмоқда, уларга ўсимликларни турли навлари, ёввойи турларини, шунингдек йўқолиб бораётган турлари генлари билан ишлаш имкониятларини яратиб бермоқда.

Ўсимлик ҳужайралари селекцияси. Ўсимликлар ҳужайра, тўқима ва органларини *in vitro* културалаш усули ҳужайралар биологияси, ўсимликлар физиологияси ва генетикаси муаммоларини ҳал қилишга хизмат қилиб келмоқда, шу билан бирга, ҳозирги кунда янги

биотехнологияларни яратилишида кенг қўлланилмоқда. Ўсимликларнинг ҳужайра, тўқима ва органларини културалаш бўйича биринчи натижалар олингандан бошлаб тадқиқотчиларни сунъий озиқа муҳитларида ўсаётган ажратилган ҳужайраларда қандай ўзгаришлар юзага келиши ва унинг сабаблари қизиқтириб келган. Каллус тўқималаридан регенерант ўсимликлар олиш техникаси ишлаб чиқилгандан сўнг, бошланғич ўсимликдан фенотипик ва генотипик хусусиятлари билан фарқ қилувчи ўсимликларни янги шакллари яратиш имконияти пайдо бўлди. Ҳужайра тизимлари ва регенерант-ўсимликлар орасидаги бундай хилма-хиллик «сомаклон» деб аталади.

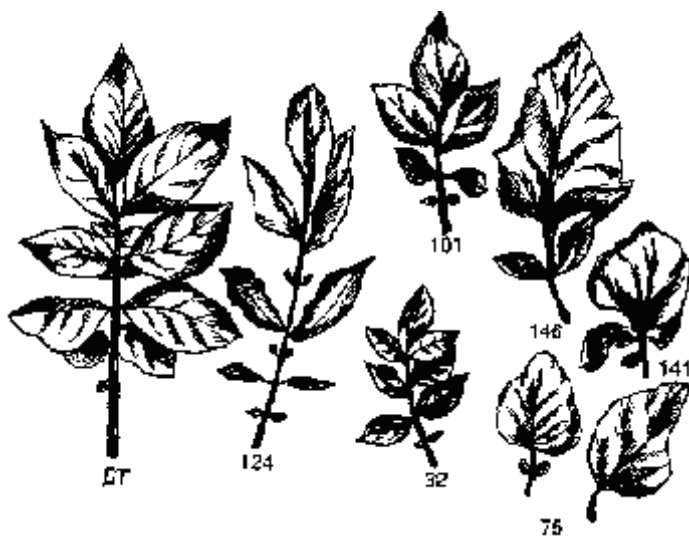
Сомаклонал ўзгаришларни генетик табиати ва пайдо бўлиш механизми ҳозиргача кам ўрганилган. Аммо сомаклон вариантларни пайдо бўлиши, бошланғич эксплантлар соматик ҳужайраларининг генетик гетерогенлиги, културалашнинг *in vitro* шароити томонидан индуцирланувчи генетик ва эпигенетик ўзгарувчанлик, озиқа муҳит таркиби ва тузлар, регулятор моддаларнинг миқдорига ва бошланғич эксплантнинг генотипига боғлиқ

Нормал ўсимликларда дифференцияланган ҳужайралар турли даражадаги плоидликка эга бўлади, лекин баъзи турлар учун фақат диплоид ҳужайралар бўлиши характерлидир. Аммо онтогенез жараёнида турли плоидликка эга бўлган ҳужайралар пайдо бўлиши мумкин. Масалан, меристема тўқималарида хромосомалар сонини турлардаги доимийлиги омили билан бир қаторда, деярли 80% ёпиқ уруғли ўсимликларда дифференцияланиш жараёнида соматик ҳужайраларда хромосомаларни эндоредупликацияси амалга ошиши ва турли даражадаги плоидликка эга тўқималар шаклланиши тажрибаларда исботланган. Вегетатив кўпаювчи ва апомиктик ўсимликлар учун юқори частотада анеуплоид ҳужайраларни ҳосил бўлиши характерлидир. Ўстириш шароити ўзгартирилганда, айниқса, тупроқ шўрланиши, юқори ёки паст ҳарорат, гербицидлар ёки пестицидлар, минерал ўғитларнинг оширилган меъёри қўлланилганда хромосомаларни қайта ташкилланиши кучайиши натижасида, ўсимликларда химерликни ва миксоплоидликни пайдо қилишни кузатиш мумкин. Бу ва бошқа омиллар аномал митозларни пайдо бўлишига, бошланғич тўқималарда хромосомалардан сони билан фарқ қилувчи ҳужайраларни шаклланиши каби физиологик бузилишларга олиб келади.

Цитологик тадқиқотлар *in vitro* културалаш шароити туфайли индуцирланувчи вариабеллик генетик ўзгаришлар билан боғлиқ эканлигини кўрсатди. Фенотипик вариантларни пайдо бўлишининг асосий манбаи бўлиб турли кариологик ўзгаришлар ва қайта ташкилланишлар хизмат қилади. Аммо улардан айнан қайси бири

фенотипик таъсирга эга эканлиги ва барқарор ген мутацияси сифатида авлоддан–авлодга берилишини аниқлаш анча қийин кечади. Хромосомалардаги майда бўлиниш, дупликация, транслокация, инверсия каби ҳар бир ўзгариш регенерант ўсимликларда ва уларнинг кейинги авлодларида фенотипик ўзгаришларни юзага келтириши мумкин. Хромосомалардаги ўзгаришлар кўпинча мейозда кузатилади. Регенерант ўсимликлар ҳужайраларини мейози таҳлил қилинганда, хромосомалардаги транслокация, инверсия, субхроматид алмашилиш, хромосомаларни қисман йўқолиши каби қайта тикланиши жадал равишда кетаётгани аниқланди. Бу фенотипик ўзгаришларга кўпинча генетик механизмлар сабаб бўлишидан далолат беради.

Сомаклон ўзгарувчанликни молекуляр даражада ядро ДНК сини нозик қайта қуришини баҳолаш орқали кузатиш мумкин. Сомаклон вариабелликдан ташқари геномнинг наслдан-наслга берилувчи қайта қурилиши билан боғлиқ бўлган фенотипик ўзгаришлар (эпигенетик), ҳам аниқланган бўлиб, бу ўзгаришлар янги ҳужайраларга ҳам берилади, лекин регенерант ўсимликларда ёки уларнинг жинсий авлодларида юзага чиқмайди. (3.15 расм).



3.15. расм. Картошканинг Смена нави соматклонал вариантларида барг шакллариининг ўзгариши. ДТ-дастлабки тип. Рақамлар билан турли тизимлар номлари белгиланган.

Сомаклонларни турли туманлиги бошланғич генотипга, эксплантни табиати ва ривожланиш босқичларига боғлиқ. Масалан, турли бошоқлиларда сомаклонлар орасидаги ўзгарувчанлик даражаси анча фарқ қилади: буғдойда ($2n=6x=42$) ўрганилган 192 та регенерант ўсимликлардан 29% анеуплоид, гексоплоид сули ($2n=6x=42$) да ҳам шундай частотадаги цитогенетик ўзгаришлар аниқланган, маккажўхори учун эса анеуплоид ўсимликлар пайдо бўлиши

частотаси 2-3% дан ошмаган. Полиплоид ва анеуплоидлар ҳосил бўлишини бошқа ўсимликларда масалан, картошкада ҳам кузатиш мумкин. Янги вариантлар ҳосил бўлиш эҳтимоли картошканинг маданийлаштирилган дигаплоид тизимларига нисбатан ёввойи турларида анча паст.

Бошланғич эксплант типлари ҳам миқдор ва сифат белгилари билан фарқланувчи соматик вариантларнинг пайдо бўлишига таъсир кўрсатади. Масалан, картошканинг бирламчи эксплант сифатида барг мезофил тўқималаридан фойдаланилганда, 12% ҳолатларда аномал ўсимликлар пайдо бўлади, гул тож барглар ёки тўпгуллар ўқидан фенотипик ўзгаришларга учраган ўсимликларнинг шаклланиши нормага нисбатан 50% ини ташкил этади.

Културалаш шароити ва кўпинча озиқа муҳитдаги гормон балансининг бузилиши култураланаётган ҳужайраларни генетик хилма-хиллигини юзага келиши сўнг ҳужайра циклининг айниқса митоз жараёни бузилишининг асосий сабабчисидир. Ҳужайралар популяцияларини цитогенетик структураси кўпинча озиқа муҳитлар таркибидаги фитогормонлар нисбатига кўп жиҳатдан боғлиқ бўлади. Аммо ҳужайралар популяциясини морфологик ва цитогенетик турли сифатлилиги озиқа муҳитининг алоҳида компонентларига: баъзи минерал тузлар, сахароза ёки углевод манбаи, витаминлар, ўсимлик экстрактлари, шунингдек ўстириш тартибига ҳам боғлиқ. Ҳужайраларни *in vitro* узоқ вақт културалаш ҳам самоклонларни генетик хилма-хиллигининг ошишига сабаб бўлади. Шу билан бирга баъзи ўсимликларда аниқланишича, ҳужайралар културасида турли плоидликдаги ҳужайралар иштирок этса ҳам регенерацияланган ўсимликлар кўпинча диплоид бўлади. Бу ҳолатни, културалаш жараёнида нормал морфологияга эга бўлган ва биринчи навбатда регенерацияланган ўсимликлар танлаб олингани сабабли деб тушуниш мумкин.

Морфогенезини турли-типлари соматик эмбриогенез ёки органогенез ҳам генетик ўзгаришларда ва ўсимлик фенотипига турлича таъсир этади. Соматик эмбриогенезда ҳужайра ўсимлик циклини ўташ вақти органогенезига нисбатан жуда қисқа, шунинг учун олинаётган материал ва бошланғич генотипни ўхшашлик даражаси анча юқори эканлиги тажрибаларда исботланган.

Соматик вариантларни бошланғич ўсимликлардан биокимёвий, миқдор, сифат белгилари билан шунингдек цитогенетик характеристикаси билан фарқланувчи шакллари қишлоқ хўжалик амалиётида амалий фойдаланилмоқда. Масалан, Россия олимлари (В.В.Сидоров ва бошқалар 1984,1985) картошкани Зарево нави самоклонларини олишга муваффақ бўлганлар. Бу самоклонлар

ҳосилдорлиги, касалликларга чидамлилиги, туганакларида протеин ва крахмал микдорининг юқорилиги билан ажралиб туради. Шунингдек наслдан – наслга бериладиган муҳим хусусиятлари туганаклардан кўпайтирилганда 3 йил давомида сақланиб қолади. Тамаки ўсимлиги каллус тўқималаридан олинган сомаклонлар тамаки мозаикаси вирусига чидамли, қанд лавлагини янги нави ҳосилдорлиги, касалликларга, айниқса Pijī касаллигига чидамлилиги билан характерланади.

Ҳозирги вақтда тўқималар култураси усулидан нафақат озикавий экинлар, шунингдек техник экинлар, манзарали ўсимликлар ва доривор ўсимликлар селекциясида ҳам кенг фойдаланилмоқда.

Шундай қилиб, олинган ижобий натижалар сомаклонал вариантларнинг турли усулларида селекция ишлари амалиётида янада кенгроқ фойдаланиш ва мавжуд тизим ва навларни яхшилаш, етишмайдиган хусусиятларни киритишда сомаклонал ўзгарувчанликни қўллаш зарурлигини тақазо этади.

Ҳужайра даражасидаги ўсимликлар селекцияси. Ҳужайралар селекциясини сомаклонлар олиш билан биргаликда қўллаш муҳим аҳамиятга эга. In vitro култураси қишлоқ хўжалиги учун технологиялар яратиш–сомаклонал вариациялар ёки индуцирланган мутациялар асосида қаттиқ селектив шароитда фойдали хусусиятларга эга ҳужайраларни танлаш имконини беради.

Ҳужайралар селекциясини амалга ошириш учун қуйидаги усуллардан фойдаланилади:

- тўғри (позитив) селекция, бунда маълум типдаги мутант ҳужайраларгина яшаб кетади;
- нотўғри (негатив) селекция, бўлинаётган чидамсиз ҳужайраларни нобуд бўлишига асосланган, лекин улардаги мутацион ўзгарувчанликни қўшимча аниқлашни талаб этади;
- умумий селекция, бунда барча ҳужайра клонлари индивидуал равишда синовдан ўтказилади;
- визуал селекция ва носелектив танлаш, тизим варианты барча ҳужайралар популяцияси орасидан визуал равишда ёки биокимёвий усуллардан (хроматография, радиоиммунли анализ, микроспектрофотометрия ва бошқ) фойдаланган ҳолда ажратилганда ишлатилади.

Ҳужайралар селекциясининг юқорида баён этилган усулларида тўғри селекция кенг тарқалган усул бўлиб, гербицидлар, антибиотиклар, токсинлар, оғир металллар, тузлар ва бошқа антиметаболитларга чидамли регенерант ўсимликларни ажратишда қўлланилади.

in vitro шароитида ўсимликлар ҳужайра селекцияси бўйича изланишлар олиб боришда объект сифатида каллус, суспензия културалари ёки ажратилган протопластлардан фойдаланилади. Объект ўсимлик турлари, қўлланиладиган технологияларнинг мавжудлиги, шунингдек, тадқиқот мақсадларига қараб танланади.

Каллус тўқимаси осон олинадиган материал бўлиб, кўпинча ҳужайралар селекциясида қўлланилади. Қоида бўйича, тадқиқотлар бирламчи ёки кўчириб ўтказилган, субкултуралаш давомида ўзининг регенерацияланиш қобилиятини йўқотмайдиган каллус тўқималарида олиб борилади. Аммо, каллус тўқимаси билан иш олиб борган тадқиқотчилар, бу объект тўқималарининг ўсиш тезлигини пастлиги, селектив омил сифатида қўлланиладиган заҳарли моддаларнинг барча ҳужайраларга бир хил таъсир этмаслиги, шунингдек каллус тўқималарининг қайта културалаш жараёнида регенерацияланиш қобилиятини йўқотиши каби камчиликлари мавжудлиги таъкидлаб ўтилган. Шубҳасиз, селекцияни якка ҳужайралар даражасида (суспензия култураси, протопластлар) ўтказиш мақсадга мувофиқдир. Лекин кўпчилик ўсимлик турлари учун якка ҳужайраларни културалашнинг самарали технологиялари ва усуллари ҳали яратилмаган. Шунинг учун, каллус тўқималари юқорида келтирилган камчиликларга эга бўлсада, баъзи ўсимлик турлари учун селекциянинг бу усули Ҳозирча ягона бўлиб қолмоқда.

Чидамли, барқарор тизимларни олиш узоқ жараёндир. Қоидага асосан, селекция ажратилган ўсимлик эксплантларидан етарли миқдорда каллус массаси олишдан бошланади, сўнг селектив омиллар миқдорини аниқлаш учун фойдаланилади, бунда бир вақтнинг ўзида каллус тўқимаси ўсиши, шу билан бирга каллус колонияларининг бир қисми нобуд бўлиши кузатилади. Селектив омилларнинг танланган миқдори оптимал деб топилади ва кейинги тажрибаларда фойдаланилади. Шунга қарамай, селектив омиллар тутувчи озиқа муҳитда олинган бирламчи ҳужайралар колонияси физиологик мослашишлари натижасида ёки ҳужайраларни маълум ҳолатдаги дифференцияланишидан генетик барқарор бўлмаслиги мумкин, у ҳолда селектив културада 4-6 марта субкултуралаш орқали олинган клонларни барқарорлиги ва бардошлилиги текширилади. Сўнг бу клонлар селектив омиллар қўшилмаган озиқа муҳитга ўтказилади ва яна 2-3 марта қайта экилади (субкултураланади), фақат селектив шароитга қайтгандан сўнг барқарор клонлар танлаб олинади, улардан регенерант – ўсимлик олишга ҳаракат қилинади. Аммо, тузларга, касаллик чақирувчи замбуруғлардан ажратилган токсинларга чидамли ўсимликларни олиш бўйича олиб борилган изланишларнинг кўрсатишича, ҳужайраларни ва ўсимликларни чидамлилиги

ўрганилаётган селектив омилларга мос келиши ва мос келмаслиги ҳам мумкин экан (*in vitro* ўсимлик ва ҳужайраларнинг паст ҳароратга, гербицидга, алюминийнинг юқори концентрациясига ва бошқа омилларга чидамлилиги орасидаги алоқадорлиги аниқланган).

Янги селекцион материаллар олиш мақсадида каллусни културалаш кўпгина ўсимликлар буғдой, АРПА, шоли, маккажўхори, шунингдек, картошка, помидор, беда ва камдан–кам ҳолларда дарахтлар билан шундай ишлар олиб борилган. Хозирда буғдой, шоли, картошкани NaCl ва Na₂SO₄ га чидамли ўсимликларини олиш бўйича яхши натижаларга эришилган. Озиқа муҳит таркибига аминокислотанинг захарли аналогини киритиш орқали сабзининг метионинни 20 марта кўп, триптофанни 30 марта кўп, лизинни 5 марта кўп синтезловчи ҳужайралари, ундан етук ўсимликлар олинган. Картошканинг эса халқасимон чириш касаллигига бардошли шакли олинган. Дарахтсимон ўсимликларда олиб борилаётган ишлар бўйича хозирча ижобий натижалар кам, лекин изланиш давом этмоқда. Шундай қилиб, селекция мақсадлари учун каллус културасидан фойдаланиш муҳим хусусиятларга эга бўлиб, инсоният учун зарур бўлган янги ўсимлик шакллари яратишда кенг имкониятлар очмоқда.

Юқорида санаб ўтилган объектлар (каллусли суспензия култураси, ажратилган протопластлар) билан бирга селекция учун бошланғич материал сифатида соматик ёки андроген эмбрионлар култураси, барг сегментлари ёки ўсимликни турли меристематик ва поя қисмлари каби органоген эксплантлар, шунингдек ажратилган муртаклар културасидан фойдаланиш мумкин. Масалан, арпанинг уруғидан муртакни *in vitro* културалаш ва селекциялаш йўли билан аминокислоталар аналогларига чидамли ва оксил таркиби бойитилган ўсимлиги олинди. Картошка учун ниҳоллар ва қаламчаларни мутагенлар билан ишлов бериш орқали хлорофилл танқислиги ва антибиотикларга чидамли химер мутантлар олишни самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай қилиб, селекциянинг анаъанавий усулларига нисбатан, ҳужайра даражасидаги селекцияни амалга ошириш орқали ўсимликларни янги шакллари 2-4 марта тезроқ яратиш мумкин.

Ҳужайралар муҳандислиги усуллари ёрдамида абиотик ва биотик стресс омилларга чидамли регенерант ўсимликлар олиш.

Қурғоқчилик. Тупроқдаги сув танқислиги бошқа барча омиллар билан биргаликда олингандагига нисбатан, ўсимликларга кўпроқ зарар келтиради. Қурғоқчилик тупроқда ва ўсимликларда сув танқислигини келтириб чиқаради ва уларда сув стрессини чақиради «қурғоқчилик» ибораси тупроқнинг сув стрессига нисбатан қўлланилса ҳам, иссиқликнинг ўсимликка таъсирини ҳам ўз ичига олади. Сув

тансиқлиги орқали юзага келган стресс курғоқчилик бўлганда бирламчи, шунингдек, паст харорат, иссиқлик ёки тузлар таъсири иккиламчи бўлади. Курғоқчиликдан юзага келган стресс натижасида ўсимликларда ферментлар фаоллиги бузилиши, биокимёвий йўллари ишдан чиқиши, захарли моддаларнинг хужайраларда йиғилиши, ионларни оқиб чиқиб кетиши, озикалар танқислиги ва бошқа сабаблар оқибатида ўсимликларнинг зарарланишига олиб келади.

In vitro курғоқчилик стресс самарасини яратиш учун, ташқи сув потенциалини камайтирувчи осмотик фаол моддалар қўшилган озика муҳитлардан, курғоқчиликка чидамлилиқ селекцияси учун эса селектив агент сифатида, таркибида хужайрага кира олмайдиган осмотик фаол модда тутувчи полиэтиленгликоль (ПЭГ) моддаларидан фойдаланилди. ПЭГ ёрдамида стрессга чидамлилиги оширилган тамаки тизимлари ажратилгани ҳақида биринчи хабарлар 1979 йилдан пайдо бўла бошлаган (Heyser, Nabors, 1979). Кейинроқ Р.Брессан ва бошқа ҳаммуаллифлар томонидан курғоқчиликка чидамлилиқ селекцияси помидор хужайра тизимларида амалга оширилган, улар каллус тўқималарини 15 % ли ПЭГ 6000 тутувчи озика муҳитларида ўстириб, сув танқислиги стресси пайдо қилишган, тажрибалар натижасида чидамли каллус тизимлари ажратиб олинган, лекин каллус тўқималари осмотик моддалар солинмаган озика муҳитларда култураланганда чидамлилиқ белгилари йўқолиб борган, бу адаптациянинг физиологик табиатдан эканлигидан далолат беради. Курғоқчиликка чидамли соя генотипларини аниқлашда каллус тизимларини ПЭГ иштирокида ўстириш орқали синаш усули таклиф этилган. Сув тансиқлиги стрессига бардошли хужайра тизимларини олиш учун, осмотик сифатида 99-880 мМ маннитол тутувчи озика муҳитлардан ҳам фойдаланиш мумкин. Юқоридаги ҳолатлардаги каби осмотик адаптация бўлган хужайралар шўрланиш стрессига ҳам бардошли эканлиги аниқланган.

Шўрланиш. Қишлоқ хўжалиги экинларининг ҳосилдорлигини чегараловчи омиллардан яна биттаси, бу тупроқнинг шўрланишидир. Сайёрамизнинг 900 млн.гага яқин майдони юқори даражада шўрланган ва шўрланиш миқдори йилдан-йилга ортиб бормоқда. Айниқса, сунъий суғориладиган майдонларда тупроқдаги тузнинг миқдорини ортиши барчани ташвишига солмоқда. Бу муаммони ҳал этиш, суғоришнинг тўғри усулларини топиш, суғориш учун тузнинг миқдори камайтирилган ёки умуман тузлардан холи сувлардан фойдаланиш каби рационал агротехник усуллари ишлаб чиқишни тақозо этади. Шу билан бирга, ўсимликлар биотехнологияси усулларида фойдаланиб, қишлоқ хўжалиги учун муҳим бўлган ўсимликларнинг соматик хужайралари даражасида селекция қилиб, протопластларни

бир-бирига қўшиб ёки рекомбинант ДНК молекулалари техникасидан фойдаланиб, генларни кўчириб ўтказиш орқали шўрланишга чидамли генотипларини яратиш мумкин.

Шўрланишнинг зарарли таъсири комплекс характерга эга бўлиб, ҳужайранинг осмотик баланси бузилишига, натрий ва хлор ионларининг ҳужайрадаги физиологик ва биокимёвий жараёнларга заҳарли таъсир этишига сабаб бўлади. Бундай таъсир натижасида, ҳужайранинг тургор ҳолати бузилади, мембраналар функцияси ва ферментлар фаоллиги пасаяди, фотосинтез тўхтайди, ионларнинг селектив транспорти бузилиши натижасида алоҳида ионларни танқислиги юзага келади, толерантликни ушлаб туриши учун кўп миқдорда энергия сарфланади. Ўсимликларнинг ташқи муҳитда тузлар миқдорини ортишига жавоб реакцияси 4.16 да берилган.



4.16-расм Ўсимликнинг шўрланишга жавоб реакциясининг асосий типлари

Кўпчилик олимлар томонидан олинган тадқиқот натижаларининг кўрсатишича, *in vitro* култураланаётган ҳужайра ва ўсимликлар учун шўрланишга чидамлилик ҳужайра механизми бир хил экан ва ҳужайра даражасидаги селекциялаш шўрланишга чидамли ўсимлик шакллари яратишнинг аниқ истикболини белгилайди. Кўпчилик селекцион дастурлар натрий хлор иштирок этувчи озиқа муҳитларда

култураланаётган *in vitro* хужайралар тизимини ажратишга йўналтирилган. Тамакининг гаплоид каллус хужайраларидан, уларни мунтазам равишда туз миқдори ошириб борилган озиқа муҳитда ўстириш орқали, 1% NaCl иштирокида ўса оладиган хужайралар тизими олинган. М.Набор ҳаммуаллифлар билан биргаликда тамаки суспензион културасига мутаген (0,15 % ли ЭМС да 60 мин) билан ишлов бериб, бир босқичли селекция йўли билан 0,5 % ли NaCl га бардошли хужайралар тизимини ажратиб олди. Олинган регенерантларни шўрланишига чидамлилиги бутун ўсимлик даражасида акс этиши аниқланган.

Россия олимлари томонидан қаттиқ ва юмшоқ буғдойнинг шўрланишга чидамли ўсимликларини олиш бўйича олиб борган илмий тадқиқот ишларида бирламчи эксплант сифатида ажратилган етилмаган муртаклари, шунингдек гаплоидларидан фойдаланилган. Хужайралар селекцияси 0,3% NaCl ва Na₂SO₄ тутувчи озиқа муҳитларида култураланаётган каллус тўқимарини 5-6 марта қайта экиш орқали ўтказилган. Тадқиқотлар натижасида шўрхокликка бардошли тизимлар ва регенерант ўсимликлар олинган. Бу регенерат ўсимликлар уруғидан олинган биринчи авлоди секинлаштирилган флоуресценцияли қайд қилиш усули орқали синалганда, баъзи регенерант ўсимликлар фотосинтез аппаратининг шўрга чидамлилиги бўйича бошланғич навга нисбатан юқори туриши аниқланган (Никифорова Д 1993,1994). Натрий хлориднинг турли концентрацияларига чидамли хужайралар тизимини ажратиш бўйича бошқа мисоллар 4.4-жадвалда келтирилган.

4.4-жадвал

Хужайралар култураси орқали олинган шўрга чидамли хужайра тизимлари ва ўсимликлар

Селекция учун бошланғич материал (плоидлиги)	NaCl миқдори	Хужайралар селекцияси натижалари
Medicado sativa (2n)	0,17 М	Каллус
Medicado sativa (2n=2x, 2n=4x)	0,08-0,17М	Ўсимлик
Citrus sinensis (2n)	0,08-0,17М	Каллус
Nicotiana tabacum (2n)	0,17М	Суспензия, ўсимлик
Datura innoxia (2n)	0,17-0,34М	Каллус, ўсимлик
Pennisetum americanum (2n)	0,19М	Эмбриоген суспензия
Ipomea batatas (2n)	0,17М	Суспензия
Crepis capillaris (2n)	0,12М	Суспензия
Oryza sativa (2n)	0,17М	Эмбриоген каллус, ўсимлик

Ўсимликларни шўрхокликка чидамлилигини осмотик стрессга нисбатан селекциялаш орқали ҳам ошириш мумкин. Масалан,

полиэтиленгликол ёрдамида индуцирланган сув стрессига мослашган помидор хужайраларининг NaCl ни оширилган миқдорига ҳам бардошлилиги аниқланган. Шўрланишнинг юқори миқдорига толерантлик хусусиятини, осмотик модда сифатида 99.870 мМ манитол тутувчи озиқа муҳитда ўстирилган сабзи хужайралар тизими ҳам намоён қилади. Бу натижалардан шундай хулосага келиш мумкинки, осмотик стрессларга мослашган хужайралар орасидан шўрланишга чидамли вариантларни ҳам танлаш мумкин экан.

Металларга чидамли ўсимликлар тизимларини олиш. Ўсимликка заҳарли таъсир кўрсатувчи металлларнинг тупроқда кўп миқдорда учраши ёки ўсимлик томонидан озиқа модда сифатида ўзлаштирилувчи ионларнинг танқислиги ўсимликлардаги ионлар (минераллар) стресси сабаби бўлиши ҳам мумкин. Тупроқдаги оғир металл ионларининг нафақат ўсимликларга шунингдек, ҳайвонларга таъсири олимларнинг диққатини тортмоқда. Рух, кадмий, мис, симоб каби тупроқда кўп учрайдиган оғир металл ўсимликларда стресс ҳолатини пайдо қилади. Ўсимликларнинг заҳарли ионларга чидамлилик механизми, плазмолемма ўтказувчанлигининг камайиши, ионларнинг органик моддалар билан боғланиши натижасидаги заҳарсизланиши (детоксикация), вакуолалардаги компартментлиги, шунингдек уларнинг нишони бўлган ферментлар структураси ўзгаришини ўз ичига олади.

Ионлар стрессига чидамли ўсимлик хужайралари селекцияси бўйича илмий изланишлар нисбатан яқинда бошланган бўлса ҳам, лекин ижобий натижалар олинган. Бундай тажрибаларда тўғридан-тўғри селекциялаш усулидан фойдаланилади ва бунда селектив агент сифатида тузларнинг заҳарли миқдори қўлланилади. Аммо, *in vitro* шароитида табиатдаги каби стресс селектив шароитни яратиш анча қийин. Табиий шароитда ионларнинг заҳарли таъсиридан ташқари яна бир қанча бошқа омиллар: тупроқда бошқа заҳарли моддаларнинг иштирок этиши, тупроқдаги кислотали муҳитнинг ҳам таъсири бўлади. Хужайра даражасидаги селекцияни амалга ошириш учун, табиий стресс шароитига хос бўлган барча моддалар киритилмаса ҳам, чидамлилик хусусияти экспрессиясини таъминлайдиган ва керакли вариантларни танлаб олишга имкон берадиган моддалар бўлиши зарур.

In vitro тўғридан-тўғри селекциялаш йўли билан, петуниянинг симоб, маккажўхорининг алюминий, сабзининг алюминий ва марганец; бангидевонанинг кадмийга чидамли хужайра тизимлари хужайралар суспензиясидан танлаб олинган. Зиғирнинг кадмий нитрат тузларига чидамли хужайралар тизими, регенерант ўсимлиги олинган ва бу тузнинг ўсимликка таъсири ўрганилган.

Тажрибалардан аниқланишича, тупроқдаги кадмий ўсимликнинг поя ва илдиз қисмини ўсишига салбий таъсир этар экан

Кескин ҳарорат. Ўсимликлардаги стресс омилларга маълум даражада юқори ёки паст ҳарорат сабаб бўлиши мумкин. Хужайралар селекцияси бўйича бундай стрессларга чидамлилиқ бўйича қилинган ишлар унчалик кўп эмас. Адабиётларда иссиқлик шокига чидамлилиқ бўйича хужайралар селекцияси ҳақида ҳам маълумотлар кам. Аммо хужайралар селекцияси бўйича паст ҳарорат омилларига чидамлилиқка оид маълумотлар етарли даражада.

Ўсимликларда совуқ стресслар катта диапазондаги 10-15⁰ дан 0⁰Сгача ҳароратда юзага келади. Бундай стрессга тропик ва субтропик зонадаги ўсимликлари кўпроқ учрайди. Ўсимликларни совуқ ҳароратга бардошлиги мембрана липидларининг юқори нисбатда тўйинмаган ёғ кислоталар ёки стеролларнинг юқори миқдорда тутиши сабабли суяқ ҳолатда қолиши билан боғлиқ. Ўсимликларнинг музлаши (0⁰С дан паст ҳароратда) хужайралар аро музлар пайдо бўлиши билан боғлиқ. Салбий таъсир этадиган ҳарорат таъсиридан юзага келган бузилишни антифриз моддалар аккумуляцияси ёрдамида сувсизланиш ва музлашга нисбатан қобилятини ошириш, боғланмаган сувлар миқдорини камайтириш орқали бартараф этиш мумкин. Адабиётлардан олинган маълумотларга кўра, ўсимликларда катта миқдорда захира озиқа моддалар, айниқса, совуққа бардошли дарахтларда ёғлар миқдори, камроқ чидамлилирида эса қанд моддалари тўпланади.

Култураланаётган ўсимлик хужайраларидан паст ҳароратга чидамли хужайралар тизимини ажратиб олиш бўйича ўтказилган тажрибалар ҳақида биринчи маълумотлар 1976 йилларда пайдо бўлди (Dix, Street, 1976). Бу ишда тамаки ва қалампир суспензия култураси агарли муҳитга экилди ва 21 кун давомида –3 ва 4⁰С ҳароратда ушлаб турилди. Танлаб олинган клонлар орасида совуқ ҳароратга чидамли клонлар топилди.

Бу соҳада олиб борилган изланишлар натижасига асосланиб, ўсимликлар *in vitro* селекцияси усулини совуққа чидамлилиқни амалга оширишда қўллаш ҳақида гапиришга ҳали эрта. Лекин *in vitro* индукциялаш орқали генетик хилма-хиллиқни топишда қўллаш йўли билан чидамлироқ вариантларни танлаш мумкин.

Ўсимликларнинг касалликларга чидамлилигини амалга ошириш. Озиқ - овқат маҳсулотларини ишлаб чиқаришни ошириш учун ўсимликларни касалликлар ва зараркунандалардан ҳимоя қилиш иқтисодий аҳамият касб этади. Ҳозирги кунда хужайралар селекциясидан чидамлилиқни оширишда фойдаланишнинг реал истиқболлари кўриб чиқилмоқда. Агар дала шароитида 1 йилда

картошканинг 50 дан 100 минггача уруғини касалликларга чидамлилигини баҳолаш мумкин бўлса, *in vitro* шароитида эса 9 гр картошка баргидан олинган 20 млн. та протопластларни бир уринишда синаш мумкин. Хужайралар селекцияси учун селектив агент сифатида патотоксинлар, културал филтратлар ва тўғридан-тўғри патогенлардан фойдаланиш мумкин.

Ўсимликларни патогенларга ўта сезувчанлиги асосида ётувчи асосий химоя механизмларидан бири *de novo* яъни ўсимликлар томонидан «фитоалексинлар» деб аталувчи антимикроб моддаларнинг синтезланиши ҳисобланади. Ўсимликларни химоя реакцияси Масалан, фитоалексинлар маҳсулоти, патогенез билан боғлиқ бўлган оксилларнинг ҳосил бўлиши, лигнификация, «элисаторлар» деб аталувчи қатор биотик ва абиотик табиатга эга моддалар томонидан индуцирланиши мумкин. Абиотик элисаторлар симоб ионлари, палиакрил ва салицил кислоталар бўлиши мумкин. Биотик элисаторларга эса замбуруғларнинг хужайра девори компопентлари, културал филтрларда иштирок ётувчи моддаларни киритиш мумкин.

Касалликларга чидамлилиқни *in vitro* селекцияси учун энг содда ёндашиш бу хужайраларни бевосита патоген иштирок этаётган озиқа муҳитларда културалашдир. Бу ёндашув айниқса патогенезга жавобгар захарли моддалар ҳақида кам маълумотга эга бўлинганда, ёки агар патоген токсин моддалар ажратиб чиқарилмаган ҳолларда фойдалидир. Аммо, селекциянинг бу усули тажрибалар ўтказишда баъзи қийинчиликларни туғдиради. Селекцияни тўғри схемасини тузиш учун патогеннинг яшаш цикли ҳақида билимга эга бўлиш зарур. Кўпчилик патогенлар, Масалан, замбуруғларнинг яшаш даври турли босқичлардан иборат, спора етилишинг бир неча босқичи, бунга боғлиқ ҳолда яшовчанлиги, ўсиши ва эпидемиологияси ўзгаради. Шунинг учун спора етилиш даврини ҳисобга олиш зарур, инфекция билан захарлаш учун ёруғлик ва ҳарорат, маълум даражада намлик, рН, озиқа моддаларнинг иштирок этиши, ёки танқислиги ва споранинг ўсиши учун зарур бўлган бошқа нарсаларни ҳисобга олиш керак.

Ўсимлиқни патогенлар иштирок ётувчи озиқа муҳитларда културалаш ишлари 1960 йилнинг ўрталаридан бошланган ва патогенлар таъсирига чидамлилиқни *in vivo* ва *in vitro* ўрганишга йўналтирилган. Патогенларга чидалилик бўйича хужайралар селекцияси олиб борилган тажрибалар ҳар доим ҳам муваффақиятли чиқмаган. Аммо, шундай бўлсада, бундай тажрибалар натижасида Хитой олимлари томонидан шолини пирикулярйозга чидамли, ҳосилдор иккита янги нави яратилган. Уларнинг селекцияси ажратилган чангдонлар културасида ўтказилган, селектив омил

сифатида замбуруғларнинг ўнта тизими аралашмаси қўлланилган. Ҳозирги пайтда янги навлар Хитойда 140 минг га ерни банд қилиб, ҳар гектаридан ўртача 7.5 минг килограммгача ҳосил олинади.

Касалликларга чидамлилик бўйича селекциянинг истиқболли усулларида бири, селектив агенти сифатида патогенлар томонидан синтезланувчи патотоксинлардан фойдаланишга асосланган. Токсинларнинг ўсимликлар касалликларидаги ролини аниқлаш қийин. Маълумки, фақат озгина миқдордаги патотоксинлар касалликнинг бошланишида ва ривожланишида муҳим ролни ўйнайди. Таъсирига қараб патотоксинларни учта гуруҳга бўлиш мумкин. Биринчи гуруҳга касалликни белгиловчи эмас, ҳўжайинга нисбатан носпецифик захарли таъсир хусусиятига эга ва кўпчилик ўсимлик турлари учун захарли бўлган токсинлар киради. Тамаки ва бактериал рябухани қўзғатувчисига *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* маҳсулоти таботоксин мисол бўлиб хизмат қилади. Бошқа гуруҳ патотоксинлар ҳам ўсимликларга нисбатан патоген каби шундай спецификликни намоён қилади, лекин улар ҳам ўсимлик касаллигининг ривожланишига жавобгар эмас. Бу категорияга Т-токсин (ёки HmT) *Drechslera maydis* (*Helminthosporium maydis*); маккажўхорини гельминтоспороз касаллиги қўзғатувчиси киради. Учинчи гуруҳ патотоксинлари ҳўжайинга нисбатан специфик ва касалликларни типик белгиларини чақаради. Масалан, сулини гельминтоспороз касалини қўзғатувчиси викторин (HV-токсин) илдиз чириши ва барглари доғланишини чақаради.

Чидамлилик бўйича ҳўжайра селекцияси схемаси қонунияти токсинларнинг таъсир этиш механизми билан бевосита боғлиқ. Патогенларнинг баъзи турлари ҳўжайраларни зарарлайди, сўнг токсин ажратади, бошқалари эса олдин токсин ажратади ва ҳўжайрани nobуд қилади, сўнг уларнинг парчаланган маҳсулотларидан озиқа сифатида фойдаланади. Табиийки, биринчи ҳолатда *in vitro* ва *in vivo* чидамлилик орасида боғлиқлик бўлмайди, иккинчи ҳолат бўйича ҳўжайралар селекциясини амалга ошириш мақсадга мувофиқдир. Биринчи марта *in vitro* шароитида касалликларга чидамли ўсимликлар олиш П.Карлсон (1973йил) томонидан амалга оширилган, у тамакини метиокинсульфосимин (таботоксин аналоги)га нисбатан, ҳўжайралар тизимини, сўнг патогенга чидамлилиги юқори бўлган ўсимликлар олган. Патотоксинларга чидамлилик бўйича ҳўжайра селекциясига ўтказилган илмий изланишларнинг баъзи натижалари 3.5-жадвалда келтирилган.

Патотоксинларга чидамли хужайра селекциясига оид мисоллар
(В.А.Сидоров бўйича, 1990 й)

Патоген	Хўжайин ўсимлик	Чидамли материал
<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар, олинган авлодлар
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар, олинган авлодлар
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар, олинган авлодлар
<i>Alternaria solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Хужайра тизимлари
<i>Drechslera sativum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Хужайралар тизимлари
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар
<i>Helminthosporium sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар, олинган авлодлар
<i>Fusarium coeruleum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Хужайра тизимлари, регенерант ўсимликлар
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mays</i>	Хужайра тизимлари

Баъзи патогенларнинг патотоксинларини тоза ҳолда ажратилмаган ёки тўлиқ ўрганилмаган чидамлилиқ бўйича селекцияни ўтказиш учун културал филтратлардан фойдаланиш ҳам мақсадга мувофиқдир. Уларни қўллашнинг зарурий дастлабки шарт уларнинг касалликдаги ролини аниқлаш, ўсимлик ва *in vitro* култураланаётган хужайранинг патогенга чидамлилиги ўртасидаги корреляцияни ўрганиш ҳисобланади. 1980 йилда Бенке фракцияларга ажратилмаган *Phytophthora infestans* културал суюқлигини картошка селекциясида қўллаб яхши натижалар олган. Чидамли ўсимликларнинг ўсишига асос бўлувчи клонлар ажратган. Баргларига *Phytophthora* споралари билан механик тарзда инокуляция қилинган 34 та ўсимликдан учтасида назоратга нисбатан камроқ зарарланиш ўчоқлари аниқланган. Ҳозирги кунга қадар Россия олимлари томонидан буғдойнинг септориоз, сабзининг— альтернариоз, картошкани ризоктониоз патогенларига чидамли шакллари олинган. Селектив омил сифатида замбуруғларнинг културал филтратларидан фойдаланилган. Олиб борилган тадқиқотлар натижасида буғдойнинг регенерант ўсимлиги олинган (3.17 расм). Биринчи авлод уруғларининг *Septoria nodorum* патогенига чидамлилиги текширилган. Натижаларга кўра олинган уруғларнинг замбуруғнинг културал филтратига нисбатан чидамлилиги 10-15 %га ортганлиги аниқланди (Калашникова Е.А.Лети Жос, 1998).

Шу каби ишлар сабзининг бешта генотибида ўтказилганда хужайралар селекцияси суспензион културада ўтказилиб, селектив омил сифатида *Alternaria radicina* култураси филтратидан фойдаланилди. Натижада чидамли хужайралар ажратилиб улардан регенерант ўсимликлар олинди (3.18-расм) (Калашников Е.А., Раскалиева В.А. 2000).

Мутагенлар ва уларни хужайралар селекциясида қўлланилиши. Ҳозирги кунда кимёвий моддалар, рентген, гамма ва ультрабинафша нурларининг мутаген фаоллиги ҳақида кўплаб тадқиқот натижалари тўпланган. Кимёвий мутагенлардан кўпинча этилметансульфонат (ЭМС)дан фойдаланилади. Бу модда билан ишлов берилган тамаки ўсимлиги хужайраларидан 25та фенотипик вариант олинган. Лекин ЭМС нинг мутаген фаоллиги пастлиги ҳақидаги маълумотлар ҳам мавжуд. Хужайралар култураси билан ишлашда мутаген сифатида N– нитрозомочевинадан (НЭМ) ҳам фойдаланиш мумкин. Бу кимёвий бирикма барқарор бўлмай озика муҳитда тез парчаланиб кетади, шунинг учун бу модда билан хужайрага ишлов берилгандан сўнг ювишнинг хожати йўқ. НЭМ нинг самарали мутаген таъсири гаплоид тамаки суспензияларида аниқланган ва нитратредуктазага дефектли мутанатлар ажратилган. Тамакининг гаплоид протопластларига НЭМ билан ишлов берилганда, хлоратга чидамли клонларнинг пайдо бўлиши 20 марта, шу билан бир вақтда худди шу турдаги ўсимликнинг диплоид протопластлари мутагенезида стрептомицинга чидамли клонлар пайдо бўлиши 30 марта ортган. Мутаген сифатида N–метил– N–нитро–N–нитрозогуанидин (НГ) ва N– нитрозометилмочевина (НММ)дан фойдаланиш мумкин.

Ионли нурланишдан мутаген сифатида фойдаланилганда ҳам мутациянинг кенг спектрини кузатиш мумкин. Хужайралар рентген нурлари билан нурлантириш орқали бангидевона ва петуниянинг пигмент дифектли тизимлари ва тамакининг паракватга чидамли тизимлари олинган. Гамма – нурлари билан нурланган ўсимлик баргидан олинган каллус тўқималари ва протопластларидан гербицидга ва валинга чидамли тизимлар ажратиб олинган. In vitro култураланаётган тамаки хужайраларини ультрабинафша нурлари билан нурлантириш орқали ҳам валинга чидамли тизимларни олишга муваффақ бўлинган. Нурлантиришнинг бундай усулини тамаки гаплоид протопластларида қўлланилганда турли–хил ауксотроф мутантлар пайдо бўлган.

Хужайралар колониясининг яшовчанлиги културага қайси ривожланиш босқичида мутагенлар билан ишлов берилганига қараб турлича бўлиши мумкин. Якка хужайраларга уларнинг биринчи бўлинишигача бўлган даврида мутаген билан ишлов бериш зарур, акс

ҳолда химер тизимлар пайдо бўлиши мумкин. Протопластларнинг радиосезгирлиги уларнинг културалаш босқичларига боғлиқлиги аниқланган. Тажрибаларнинг кўрсатишича, протопластларни нурлантиришни улар ажратилган заҳоти, ёки бир кундан сўнг ўтказиш мақсадга мувофиқдир. Чунки ионли нурланиш таъсирида озиқа муҳитда ҳужайра учун заҳарли моддалар пайдо бўлиши мумкин, шунинг учун протопластларни нурлантириш ўтказилган озиқа муҳитдан ювиб тозалаш зарур.

Кимёвий мутагенларнинг ҳужайраларга заҳарли таъсири аниқланган. Уларнинг юқори миқдордаги меъёри қўлланилганда ҳужайраларни бутун популяциясини нобуд бўлишига олиб келади. Шунинг учун кимёвий мутагенлар билан ишлаганда уларнинг кам концентрациясидан фойдаланилади. Шундай бўлганда баъзида протопластлар мутаген моддалардан тозлаш мақсадида ювилмайди ва мутаген солинган озиқа муҳитларда култураланади. Бундан ташқари нурланишнинг юқори меъёри ҳужайранинг метаболитик фаоллигини ҳам сақлаб қолган ҳолда репродукцион ва регенерацион қобилятини сусайтиради.

Соматик ҳужайраларни дурагайлаш. Ҳужайралар селекциясининг яна бир усули – соматик ҳужайралардан олинган пропластларни бир-бирига қўшиш орқали жинсиз дурагайлар олишдир. Бу усул оддий жинсий йўл билан чатиштириб бўлмайдиган ўсимликларни филогенетик узоқ турларини чатиштириш, икки, уч ва ундан кўпроқ ота-она ҳужайраларни бир-бирига қўшилишини амалга ошириш, бу ҳужайраларнинг бирининг тўлиқ генлар тўплами, бир неча хромосома ёки генларини тутувчи ёки бошқасининг фақат органелла ва цитоплазмасини тутувчи ассиметрик дурагайлар олиш имконини беради. Соматик ҳужайраларни дурагайлаш орқали нафақат узоқ турларга мансуб ўсимликлар генларини битта ядрога йиғиш, шунингдек шерикларнинг цитоплазматик генларини гибрид ҳужайрага бириктириш ҳам мумкин.

Протопластларни ажратиш, културалаш ва бир-бирига қўшиш. Соматик дурагайлаш усуллари қўллаш учун нормал бўлинадиган, ўсимлик регенерацияланадиган протопластларни олиш технологиясини ишлаб чиқиш зарур. Ўсимлик ҳужайраларидан протопластлар олиш XIX асрнинг охирида плазмолизис қилиш ва ҳужайралар деворини механик парчалаш усуллари ёрдамида амалга оширилган. Аммо, 1960 йилда И.К.Коккинг биринчи марта ҳужайралар деворини ферментлар ёрдамида парчалаб, протопластлар олганидан сўнггина алоҳида ажратилган протопластлар усули ривожлана бошлади.

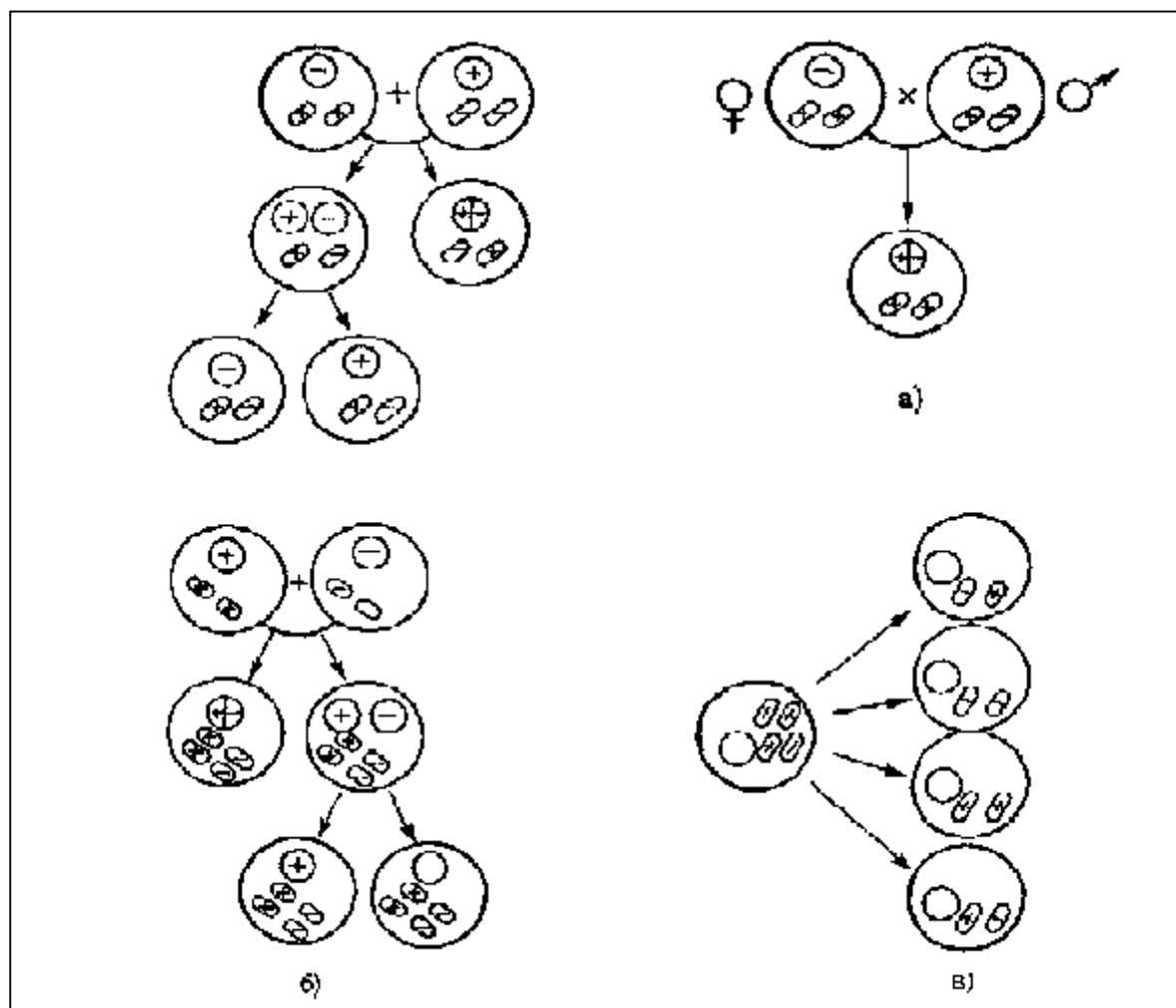
Ҳозирги вақтда протопластларни ажратиш ва сунъий озика муҳитда културалаш усуллари такомиллаштириш давом этмоқда. (3.19-расм) Протопластлар ҳам ажратилган ҳужайра ва тўқималарни културалаш учун фойдаланиладиган озика муҳитларида култураланади. Фақат културалашнинг бошланғич даврида таркибида юқори осмотик босимни таъминловчи манба сифатида маннит ёки CaCl_2 нинг юқори миқдори билан фарқ қилади.

Ажратилган протопластлар културалаш жараёнида ҳужайранинг янги деворини регенерациялайди ва бўлиниш хусусиятига эга каллус тўқимасини ҳосил қилувчи ҳужайраларга айланади. Протопластларнинг колониялар ҳосил қилишига озика муҳит таркиби таъсир этади. Навбатдаги вазифа – каллус тўқимасидан регенерант ўсимлик олиш бўлади. Ҳозирча кўпгина бошоқдошлар буғдой, арпа протопластларидан регенерант ўсимлик олишга эришилмаган. Лекин итузумдошлар оиласига мансуб (тамаки, картошка, помидор) ва бошқа ўсимликларда протопластлардан регенерант ўсимликлар олиш муваффақиятли амалга оширилмоқда.

Протопластларни каллус тўқималари ҳужайралар суспензияси, барг ҳужайралари, меристемалар ва поядан ажратиш мумкин. Баргдан протопласт ажратиш учун аввал эпидермисдан тозаланади, майда бўлақларга бўлинади ва пектиназа ёки целлюлаза ферментлари билан ишлов берилади (3.20 расм).

Протопластларнинг қўшилиши тасодикий бўлиши мумкин, аммо, бу жуда камдан – кам ҳолларда рўй беради. Ажратилган протопластлар қўшилишини индуцирлаш 1970 йилда Коккинг лабораториясида биринчи марта амалга оширилган. Индуктор сифатида натрий нитратдан фойдаланилган. Лекин бу усул кам самара берган ва ҳозир бошқа фьюзогенлар эритмалар (протопластларни қўшилиш индукторлари) топилган. Улардан рН (9-1)нинг ва кальций ионларининг миқдори юқори бўлган (100-300 мМ) эритмалар яхши самара беради. Протопластлар молекуляр оғирлиги 1500-600 бўлган полиэтиленгликол ёрдамида олдиндан қўшишга тайёрланади. У.Циммерман ва унинг ҳамкасблари томонидан ҳайвон ҳужайралари протопластларини қўшишнинг физикавий усули ишлаб чиқилди, бунда индуктор сифатида электр токи импульсидан фойдаланилди.

1972 йилда ажратилган протопластларини қўшиш орқали юксак ўсимликларни биринчи турлар аро жинсиз дурагай тамакининг *Nicotiana glauca* ва *N Langsdorfii* турларида олинган.



3.21-расм. Парасексуал дурагайлашда ирсийланиш схемаси
(Муромцев Г.С. ва бошқ. 1984)

А-парасексуал(чапда) ва жинсий (ўнгда) дурагайлашда отағона ядровий ва ядродан ташқари детерминанти; Б-пасексуал дурагайлашда камида иккита ядродан ташқари генофорларни ҳисобга олган ҳолда; в-соматик сеградация натижасида ядродан ташқари генофорларнинг цитоплазматик гетерозиготларга қўшимча пайдо бўлган парасексуал авлодларнинг генетик ҳилма-ҳиллиги.

Ҳозирги вақтда парасексуал дурагайлаш усули орқали турлараро, оилалараро ва тартиблараро дурагайлар олинган. Лекин кўпчилик ҳолатларда бундай йўл билан олинган дурагай ўсимликлар уёки бу даражада нормал эмас. Бунга арабидопсис ва турнепс (хашаки шолғом)нинг соматик дурагайи монстр – ўсимлиги мисол бўлиб хизмат қилади. Юзага келган анамалияга сабаб хромосоманинг мувозанатлашмаганлигидир (Ю.Ю. Глеб 1982).

Ҳайвон ва ўсимлик ҳужайралари протопластлари қўшилишидан ҳосил бўлган ҳужайралар катта қизиқишга сабаб бўлмоқда. Ҳозирда каламуш эритроцитлари ва ачитқи ҳужайралари протопластлари, сабзи ва одам протопластлари, тамаки ва одам протопластлари қўшилишидан ҳосил бўлган дурагайлар ҳақида маълумотлар мавжуд.

Соматик дурагайларни олиш бўйича тажрибалар микроорганизмлар генетикасига оид тадқиқотлар каби амалга оширилади. Бошқача қилиб айтганда, ота-она ҳужайраларининг катта популяциясидан фойдаланилади. Протопластлар суспензиясига фьюзоген эритмалар билан ишлов берилганда уларнинг бир қисми бир-бирлари билан қўшилади, лекин суспензияда қўшилмаган протопластлар ҳам қолади. Уларнинг барчаси кейинчалик ҳужайра деворини тиклайди ва бўлинишга ўтади. Шундан сўнг умумий массада дурагай нусхаларни ажратиш муоаммоси пайдо бўлади. Дурагайлар селекциясини ҳужайра даражасида ҳам ёки регенерацияланиш босқичида қўллаш мумкин ва у бир неча усуллар ёрдамида амалга оширилади.

Дурагайларнинг идентификацияси учун пластидалар хизмат қилади. Масалан, тамаки ва сабзи протопластлари қўшилганда, селектив маркер сифатида тамакининг яшил хлоропластлари ва сабзининг қизил – зарғалдоқ хромопластларидан фойдаланилган.

Дурагайларни танлашнинг бошқа усули, генетик комплементарликдир. Бу усул тамаки дурагайини аниқлаш учун қўлланилган, бунда ота-онанинг хлорофиллдефектли мутацияларининг дурагай маҳсулотлардаги комплементациясидан фойдаланилган. Тамакида иккита ядровий рецессив мутациялари биргаликда ёруғликка боғлиқ хлорофилл тансиқлигини юзага келтиради. Бу генларнинг исталганига гомозигот ўсимликлар интенсив ёритиши остида ўстирилганда рангсизланади ва нобуд бўлади. Бир–бирига қўшилгани ва регенерацияланганидан сўнг ҳужайралар колонияси орган ҳосил бўлишини индуцирловчи озиқа муҳитга кўчириб ўтказилади ва ёруғда ўстирилади.

Физиологик комплементация усулидан ҳам соматик дурагайларни танлашда фойдаланиш мумкин. Бу усул дурагай ҳужайраларнинг ота-она ҳужайралари ўсишга қодир бўлмаган шароитда ўсиш қобилиятига асосланади. Ота-она ҳужайраларнинг бундай шароитда ўса олмаслиги қандайдир мутация билан боғлиқ эмас, балки физиологик шароитга нисбатан ҳужайранинг нормал физиологик реакциясидир. Масалан, *N. glauca* ва *N. Langsdorfii* ларнинг жинсий дурагайи шиш ҳосил қилишга мойил бўлади, дурагай ҳужайралари эса *in vitro* шароитида гормонсиз озиқа муҳитларда ўсиш ва кўпайишига қодир бўлади. Тамакининг иккала тури барг мезофил ҳужайраларининг

протопластлари индуцирланган кўшилишидан сўнг бир мунча вақт ўтгач гормонсиз озиқа муҳитига кўчириб ўтказилди ва шу шароитида ўсишга қодир колониялари танлаб олинди.

Соматик дурагайлашнинг яна бошқа усуллари ҳам мавжуд бўлиб, улар физиологогенетик комплементация, физикавий усулларни қўллаш усули (протопластларни центрифугалаш орқали уларнинг зичлигига қараб ажратишга асосланган), механик ажратиш кабилардир.

Ажратилган протопластларни ўсимликлар селекциясида қўллаш имконияти уларнинг индуцирланган кўшилиши ва соматик дурагайлар олиш билан чекланмайди. Протопластлар атроф муҳитдан макромолекулалар ва органеллаларни ютиш хусусиятига эга, шунингдек, уларга бошқа ҳужайраларнинг ДНК ва органеллаларини кўчириб ўтказмай, ёт генетик ахборотни киритиш мумкин. Ҳозирда петуния ва тамаки протопластларига ажратилган ядрони трансплантацияси муваффақиятли амалга оширилган. Шунини қайд этиш лозимки, протопластлар томонидан бегона ядрони ютилиши ҳар доим ҳам дурагай ҳосил бўлишига олиб келмайди. Ажратилган протопластларга ядродан ташқари бегона хлоропластларни ҳам трансплантация қилиш (кўчириб ўтказиш) амалга оширилган. Бу протопластлардан Карлсон бошқа организм хлоропластини тутувчи регенерант ўсимлик олган.

Бироқ бегона органелла ва ДНК ларни кўчириб ўтказишга оид ишлар эндигина ўз ривожини топмоқда. Умуман, ажратилган протопластлардан ҳужайраларнинг генетик реконструкциясида фойдаланиш кўриб турганимиздек, ҳужайралар селекцияси олдида янги истиқболларни очмоқда.

3-бобга доир назорат саволлари

1. Биотехнологияда ўсимликлардан ажратилган ҳужайра ва тўқималар културасидан асосан қайси йўналишларда фойдаланилади ?
2. Каллусогенез, морфогенезнинг турли типларида ва ўсимликларни клонли микрокўпайтиришда фойдаланиладиган озиқа муҳитларининг асосий компонентлари номларини келтиринг.
3. Ўсимликлардан ажратилган ҳужайра, тўқима ва органларни културалаш усуллариининг ривожланиш тарихининг асосий даврлари нималардан иборат.
4. Каллус тўқимаси нима ва қандай олинади?
5. Каллус тўқималаридан биотехнологияда фойдаланиш имкониятлари.
6. Ҳужайралар дедифференцировкаси деганда нимани тушунаси?
7. Қайси гормонлар дедифференцировка индуктори ҳисобланади?

8. Нима учун каллус тўқималарини янги озиқа муҳитга кўчириб ўтказиш зарур?

9. Каллус ҳужайраларининг ўсиш цикли фазалари.

10. Шиш ва «мослашган ҳужайралар» қандай ҳосил бўлади? Уларнинг каллус билан ўхшашлиги ва фарқи қандай?

11. Каллус ҳужайраларининг генетик бир хил эмаслигининг сабаби нимад? Улардан биотехнологияда қандай мақсадларда фойдаланиш мумкин?

12. Соматик дурагайлаш нима?

13. Ажратилган протопластларни олиш ва културалашнинг ўзига ҳослиги нимада?

14. Каллус тўқималарининг тотипотентлиги деганда нимани тушунасиш? Унинг пайдо бўлиш частотаси қандай?

15. Каллус тўқимасидаги морфогенезнинг асосий типлари номини келтиринг.

16. Соматик эмбриогенезнинг асосий босқичлари. Унинг келиб чиқиш сабаблари ва унинг кейинги ривожланиши учун қандай шароитлар талаб қилинади?

17. Каллус тўқимаси културасида органогенезнинг турли типларини қандай қилиб индуцирлаш мумкин?

18. Морфогенезнинг генетик ва эпигенетик асослари ҳақида нималарни биласиз?

19. Ҳужайралар суспензия култураси қандай олинади ва қандай мақсадларда фойдаланилади?

20. Ҳужайралар селекцияси нима ва унинг қандай биотехнологик имкониятлари мавжуд?

21. Селекцион жараёнларни тезлаштиришнинг биотехнологик усуллари.

22. Ўсимликларни клонли микрокўпайтириш қандай амалга оширилади?

23. Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришнинг асосий босқичлари.

24. Ўсимликда мавжуд бўлган меристемаларни фаоллаштириш орқали ўсимликларни кўпайтиришни қандай амалга оширилади?

25. Эксплантда адвентив куртакларнинг пайдо бўлишини индукциялаш усулидан ўсимликларни кўпайтиришда фойдаланиш тўғрисида маълумот беринг.

26. Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришда гормонларнинг роли нимадан иборат?

27. Экиш материалларини вирусдан холи қилиш усуллари.

28. Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришнинг анъанавий усулларга нисбатан қандай афзаллик томонлари бор?

29. Ўсимликларни клонли микрокўпайтиришни таъминловчи шароитлари нималардан иборат?

30. Ўсимликларни клонли микроўпайтиришга эксплантнинг типи ва ёши қандай таъсир кўрсатади?

31. Ўсимликларни клонли микроўпайтиришга қайси физик омиллар таъсир этади?

32. Ўсимликларни клонли микроўпайтириш шароитини оптималлаштириш усуллари нималардан иборат?

Адабиётлар

1. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р.Г.Бутенко.- М.:Агропромиздат,1989.

2. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М.: Наука, 1975 г.

3. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология.- М.: Наука. 1986.

4. Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф., Корженевская Т.Г, Маркарова Е.Н. Клеточная инженерия. М., «Высшая школа», 1987, 127 с.

5. Бутенко Р.Г.Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе.- М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

6. Вилдонова Г.В. Индуцированный органогенез у некоторых видов Среднеазиатских можжевильников в культуре in vitro // Лесное хозяйство №

7. 2002 г. с. 35- Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе М."Колос" 1992.

8. Глеба Ю.Ю.,Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.-Киев: Наукова думка 1982.

9. Глеба Ю.Ю.,Сытник К.М. Клеточная инженерия растений.-Киев: Наукова думка 1984.

10. Калинин Ф.Л. и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка 1980.

11. Калинин Ф.Л. Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения. Киев: Наукова думка 1992.

12. Катаева Н.В.,Бутенко Р.Г.Клональное микроразмножение растений .- М.:Наука 1983.

13. Максимов П.Н. Многофакторный эксперимент в биологии.-М.:Изд-во МГУ,1980.

14. Муромцев Г.С.Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии.-М.: Наука 1990.

15. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.- Киев: Наукова думка 1990.

16. Шевелуха В.С. Новая биотехнология в селекции и растениеводстве //Вестник с/х науки.1986 №2.

17. Шевелуха В.С.Рост растений и его регуляция в онтогенезе.-М.: Колос,1982.

18. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин ва бош. Сельско хозяйственная биотехнология. Учеб. –М.: Высшая школа, 2003.

4-БОБ

БИОТЕХНОЛОГИЯ ВА ЎСИМЛИКШУНОСЛИКДА ФИТОГОРМОНЛАР ҲАМДА ЎСИМЛИКЛАРНИ ЎСИШИ ВА РИВОЖЛАНИШИНИ БОШҚАРУВЧИ СУНЪИЙ РЕГУЛЯТОРЛАР

Ўсимликларни ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи сунъий регуляторлар, ёки фиторегуляторлар ўсимликлар онтогенезини бошқаришда қудратли восита ҳисобланади. Шунинг учун улардан қишлоқ хўжалик ўсимликлари биотехнологиясида ва амалий ўсимликшуносликда кенг фойдаланилади.

Фиторегуляторлар - хужайраларнинг дифференцировкаси, бўлини-шини бошқаришда, янги тўқима ва органларни ҳосил бўлишида, ўсимликларни ўсиши ҳамда ривожланишини тезлаштиришда, ҳосилдорлигини оширишда, сифатини яхшилашдаги зарур моддалардир.

Ўсимликлар ген муҳандислиги ҳам фиторегуляторлар ҳақидаги билимларга таяниб иш кўради.

Замонавий ўсимликшуносликда фиторегуляторлар агроценозларнинг ҳосилдорлигини ва муҳитнинг ноқулай омилларига чидамлилигини оширишда қўлланилади, қатор технологик операцияларни бирмунча осонлаштириш имконини беради. Ҳозирги вақтда фиторегуляторларнинг ўсимликларга минимал (1га экинларга бор йўғи 1 неча миллиграмм) миқдорда таъсир этувчи янги авлодлари яратилмоқда. Бу эса алоҳида экологик аҳамият касб этади.

Ўсимликларнинг гормон тизими

Гормонлар ҳақида тушунча. Тирик организмлар гормон регуляцияси улар наслий дастурнинг амалга ошишида ва муҳитнинг ўзгарувчан шароитига адаптациясида ҳал қилувчи ролни ўйнайди (Дефлинг, 1985).

Ўсимликларда ҳам бошқарувчи табиатли моддаларнинг мавжудлиги ҳақида биринчи бўлиб Ч. Дарвин (1880) ниҳолларнинг ёруғлик манбаи томон интилиши бўйича ўтказган тажрибалари асосида ёзилган «Ўсимликларнинг ҳаракат қилиш қобилияти» асарида ўз фикрини баён этган эди. У билан бир вақтда, буюк немис ботаниги ва физиологи Ю.Сакс ҳам ўсимликларда поя, барг ва илдизнинг шаклланиши ҳамда ривожланишига жавобгар моддалар мавжудлиги

хақида айтиб ўтган эди, лекин бу тахминлар ўша даврдаги олимлар томонидан эътироф этилмади.

Ўсимликларнинг регулятор моддаларини аниқлаш ва ажратиб олиш бўйича изланишлар XX асрнинг бошларидан жадал ривожлана бошлади. 1909-1910 йилларда Г. Фиттинг томонидан орхидея ўсимлигининг тугунчасини ўсиб, уруғсиз мева ҳосил бўлишини юзага келтирувчи моддалари аниқланди ва уларга ҳайвонларнинг регулятор моддалари каби *гормонлар* деб ном берилди. Ундан бир неча йил илгари этиленнинг ўсимликларни бўйига ўсишини тезлаштирувчи хусусияти аниқланган эди. Ўша даврнинг ўзида Н. Г. Холдинг ва Ф. Вентлар томонидан ўсимликларнинг тропизми назарияси яратилган ва у асосчилари номи билан аталган, 1930 йилларни охирида М.Х. Чайлахян ўсимликларни генератив органларини шаклланиши ва гуллашини амалга оширувчи гипотетик фиторегуляторлар ҳақидаги флориген назариясини илгари сурди.

Ўсимликларнинг гормонларини ўрганиш ва ажратиб олиш бўйича 1950-1960 йилларда яхши натижаларга эришилди, цитокинин ва абсцис кислоталари ажратиб олинди ва уларнинг хусусиятлари аниқланди. Ҳозирги кунга қадар яна бир нечта эндоген регулятор моддалар – брассиностероидлар, фузикокцинлар, жасмин ва салицил кислоталари, баъзи олигосахаридлар ажратиб олинди, шунингдек ўсимликларни ўсишни бошқарувчи гормон табиатига эга бўлмаган регуляторлари - полиаминлар, бир қатор фенол бирикмалари ва бошқа моддалари ўрганилмоқда.

Шу билан бир вақтда регулятор моддаларни аниқлаш, яратиш ва уларни ўсимликшуносликда қўллаш ишлари ҳам олиб борилмоқда. Бундай моддалардан дастлаб ауксиннинг сунъий аналоги ўсимликларни вегетатив кўпайтириш ва илдиз ҳосил бўлишини индукциялаш учун фойдаланилди. 1960 йилда ўсимликларнинг бўйига ўсишини секинлаштирувчи стандарт моддалар аниқланди. Бу моддалар қишлоқ хўжалигида қўлланиладиган, кенг тарқалган фиторегуляторлардир. Ҳозирги кунда қимматли хусусиятларга эга, айниқса, антистресс ва репаратив таъсирга эга бўлган фиторегуляторларни аниқлашга катта эътибор берилмоқда.

Фитогормонлар - деб ўсимликда синтезланувчи, унинг бутун органлари бўйлаб ташилувчи ва озгина миқдори ўсимликнинг бўйига ўсиши ёки шаклланишига синтезланган жойидан ёки масофадан туриб таъсир этувчи моддаларга айтилади.

Фитогормонларнинг биринчи хусусияти, уларнинг эндоген келиб чиққанлигидир. Кўпчилик фитогормонлар органик кислоталардан, кўпинча аминокислоталардан ҳосил бўлади. У ёки бу фитогормоннинг синтезланиши ички ёки ташқи сабаблар таъсирида ўзгариши

натижасида ўсимликнинг бўйига ўсиши ёки шаклланиш жараёнидаги ўзгариши билан унинг жавоб реакциясини юзага келтиради.

Фитогормонларнинг иккинчи хусусияти, уларнинг ўсимликни бутун органлари бўйлаб ҳаракатидир. Бир органда ҳосил бўлган фитогормон, бошқа органнинг ўсиш ва ривожланиш жараёнларини бошқариши мумкин. Айнан шундай тарзда, органларнинг ўзаро таъсири ва ўсимликнинг яхлитлигига эришилади. Юқори регуляторлик қобилятига эга баъзи моддаларни, масалан, баъзи фенолли бирикмаларни фитогормонлар деб бўлмайди, чунки улар ўсимлик органлари бўйлаб ташилмайди ва фақат синтезланган жойигагина таъсир эта олади.

Учинчи хусусияти, бу моддаларнинг кам миқдорда ҳам ўсимликни бўйига ўсишига ёки шаклланишига таъсир этишидир. Фитогормонларнинг жуда кам концентрацияси ўсимликларга таъсир этади (10^{-13} - 10^{-7} М). Улар ўсимликлар поясининг бўйига ўсишини тезлаштириши ёки секинлаштириши, барглари тўкишига ҳам таъсир этиши мумкин.

Тўртинчи хусусияти, фитогормонларнинг фақат синтез бўлган жойигагина эмас, масофадан туриб ҳам таъсир этишидир.

Ҳайвон гормонлари билан ўсимлик гормонлари бир-бирларидан фарқ қилади. Ҳайвон гормонлари махсус органлар - ички секреция безлари орқали синтезланади, ўсимликларда эса бундай махсус шаклланган тўқима ва хужайралар йўқ. Ҳайвонларнинг гормонлари ўзи синтез бўлган жойига таъсир этмайди, фитогормонлар ўзи синтезланган хужайраларга ҳам таъсир кўрасата олади. Фитогормонларнинг бу хусусияти ҳайвонларни гистогормонларига ўхшашдир.

Фитогормонлар таъсирининг молекуляр механизми. Фитогормонларнинг амалда қўлланилиши, улар таъсирининг молекуляр механизми ҳақидаги билимларга асосланади. Ҳозирги вақтда, фитогормонлар ҳосил бўлишининг умумий асосланган схемаси, уларнинг ўтмишдошлари биосинтезини ўз ичига олувчи регуляторлик таъсирининг амалга ошиши, шу гормонга тегишли бўлган оксил рецептори билан боғланиши ва фаоллашган гормон-рецептор комплекс ҳосил қилиши, бу комплекснинг ўсимликлар геномига ёки муайян ферментлар тизимига таъсири аниқланган.

Фитогормонлар ўсимликларда органик кислоталардан синтезланади, баъзи ҳолларда бир нечта гормонлар бир хил асосдан синтезланади. Масалан, мевалон кислотаси фитогормонларнинг 4 та синфи-гибберлинлар, цитокининлар, брассиностероидлар ва ингибитор абсциз кислота учун бошланғич модда бўлиб хизмат қилади. (4.1-. расм)

Ташқи муҳит шароитининг ўзгариши у ёки бу фитогормон синтезидаги ўзгаришига сабаб бўлади. Фитогормонларни биосинтез йўллари тармоқланишига таъсир этувчи калит ферментлар муҳит омилларининг (ёритиш, ҳарорат ва бошқалар) ўзгаришига юқори сезувчанлик намоён қилади, бу эса муайян оксиллар синтезининг тезлашишига олиб келади. Ташқи муҳитнинг бундай таъсирига мисол бўлиб, ёруғликнинг давомийлиги ортганда гибберлинлар синтезининг ошиши, шўрланишни миқдори юқори бўлганда эса ауксин синтези ошиши, аксинча бўлганда эса камайиши ва ўсишда фенол ингибиторлари даражаси ортиши хизмат қилади.



4.1- расм. Фитогормонлар биосинтези схемаси

Ҳосил бўлган фитогормон молекуласи ўсимлик бўйлаб ўзининг синтез бўлган жойидан нишон-ҳужайраларга, яъни шу фитогормонларга нисбатан юқори сезувчанлик намоён қилган ҳужайраларга ташилади. Фитогормонларни ташилиши ўсимликларнинг ўтказувчи тизими ва ҳужайралараро масофаси орқали амалга оширилади.

Фитогормон молекулалари нишон -ҳужайрага икки хил йўл билан;

1. Ёнма-ён ҳужайраларни бириктирувчи протопласт каналлари-плазмодесмалари бўйича градиент концентрациясига мос равишда аралашиш орқали;

2. Хужайранинг чегара мембранаси плазмалеммаси орқали ташилиш йўли билан кира олади.

Гормонлар ўз таъсирини хужайрадаги стратегик муҳим бўлган оксил молекулаларининг конформациясини ўзгартириш йўли билан амалга ошириши аниқланган. Бундай оксиллар фитогормонларнинг рацептори, муайян фермент тизими ва рацепторлар орасидаги сигналларни қайта ҳосил қилувчи, шунингдек, ферментларнинг фаолаштирувчилари ёки ингибиторлари, транспорт тизими мембранасининг компоненти сифатида фаолият юритиши мумкин. Барча таъсирчан хужайраларда гормонлар таъсирини мазкур хужайрага хос бўлган кўпгина оксил шакллариининг мослашиб ўзгарган занжири сифатида кўриш мумкин.

Оксилнинг бирламчи структураси (аминокислоталарнинг муайян кетма кетлиги) оксил молекуласининг иккиламчи ва учламчи структураларини ҳосил қилиш учун зарур бўлган ахборотга эга бўлади.

Хужайраларда фитогормон молекулалари ўзига хос оксил-рацепторлар билан ўзаро ҳамкорлик қилади ва улар билан бирлашиб, гормон-рацептор комплексини ҳосил қилади (ГРК), натижада рацептор оксил молекуласининг фитогормон билан ўзаро ҳамкорлиги унинг фаоллашиши ҳисобига амалга ошади.

Фитогормонларнинг рацепторлари ҳозирги кунга қадар тўлиқ ўрганилмаган. Адабиётларда берилган маълумотларга қараганда уларнинг кўпчилиги глобуляр оксиллардир. Бир хужайрада битта фитогормоннинг бир неча хил рацептори мавжуд бўлиши, ўсимликнинг шу фитогормонга нисбатан турли хил реакцияларига сабаб бўлади.

Гормон-рацептор комплекси ҳосил бўлган вақтда фитогормон фаоллиги намоён бўлишининг 2 хил йўли пайдо бўлади:

Биринчи йўли - янги ферментлар ҳосил бўлиши ёки олдиндан мавжуд бўлган ферментлар миқдорининг ўзгариши билан боғлиқ. Бу фитогормонларни генетик жараёнларга таъсир этишига сабаб бўлади. Шунинг учун, генларни қайта қурилиши бошланади ва янги оксиллар синтез бўлади, фитогормонлар концентрацияси ўзгарган вақтдан фитогормоннинг таъсир самараси пайдо бўлгунига қадар ўтган вақт бир неча ўн минутлардан бир неча соатгача бўлиши мумкин.

Иккинчи йўли - хужайрада фитогормонлар концентрацияси ўзгармасдан олдин мавжуд бўлган оксиллар, ферментлар фаоллигининг ўзгариши, улар конформациясининг ўзгариши ҳисобига амалга ошади. Иккинчи йўли янги оксилларнинг синтези билан боғлиқ бўлмагани учун фитогормон самарасининг юзага

чиқиш вақти анча тез бўлиб, бор йўғи бир неча минутни ташкил қилади.

Генлар экспрессиясини бошқариш. Генлар экспрессиясини фитогормонлар орқали бошқариш, ўсимлик ҳужайраси ҳаётидаги дифференцировка ва дедифференцировка, ўсиш ва янги метаболитик шароитга мослашиши каби муҳим жараёнларни бошқариши билан боғлиқ. Фитогормонларнинг геном ишини бошқаришига кетган вақти бир неча соатни ташкил қилади. Шу билан бир вақтда ўсимлик бир неча ўн минутлар ичида баъзи гормонлар даражасига жавоб беришга қодир. Бу каби «тез» жавоблар фитогормонларнинг ўсимлик ҳужайрасида мавжуд бўлган ферментлар фаоллигини бошқариш хусусияти билан боғлиқ.

Ферментлар фаоллигини бошқариш. Фитогормонларнинг иккиламчи воситачилари. Фитогормонларга жавоб реакцияси унинг концентрацияси кескин ошган вақтдан бошлаб бир неча минут давомида пайдо бўлади. Бундай таъсирлар ферментлар фаоллигининг ўзгариши билан боғлиқ, чунки у ёки бу ферментнинг молекулалари сони деярли ўзгармайди, лекин аллостерик самара натижасида уларнинг фаоллиги ошади ёки пасаяди, бундай ролни фитогормон ёки унинг метаболити бажариши мумкин ва ферментлар билан субстратнинг ўхшашлигини ўзгартириши мумкин. Шундай қилиб, фитогормонлар таъсирига нисбатан ўсимликнинг тез жавоб реакцияси ҳужайрада мавжуд бўлган ферментлар фаоллигининг ўзгариши билан боғлиқ экан. Масалан, колеоптил ҳужайралари ауксин билан ишлов берилганда 5 минут ўтгандан сўнг, ҳужайраларнинг чўзилиши бошланишида ўсимликларнинг фитогормонлар таъсирига жавобини кўриш мумкин. Буни шундай изоҳлаш мумкинки, ауксин ўзининг плазмолеммада жойлашган рецептори билан ўзаро ҳамкорликка киришганда, плазмолеммадаги протонларни ҳужайрадан ҳужайра девори соҳасига ташилишини амалга оширувчи ферментнинг транспорт тизими протон помпаси ишини фаоллаштиради. Ҳужайра девори таркибига кирувчи гемицеллюлоза ва пектин моддаларининг кислоталик даражасининг ошиши натижасида, вакуола яратган тургор босим ҳисобига, унинг компонентлари орасидаги боғлар заифлашади ва ҳужайра чўзилади.

Кейинги вақтларда фитогормонларнинг иккиламчи воситачиларини (мессенжерлари) ўрганиш ишлари ҳам жадал давом этмоқда.

Иккиламчи воситачилар таъсирининг умумий кўриниши шундан иборатки, унча кўп бўлмаган гормон молекулаларининг сони, ҳужайрада иккиламчи воситачининг кўп сонли молекулалари маҳсулотларини ишлаб чиқаришни юзага келтиради, бу эса ўз

навбатида оксил молекулалари фаоллигига ижобий ёки салбий таъсир кўрсатади. Шундай тарзда гормоннинг рецептор билан боғланиши натижасида пайдо бўладиган сигналнинг ошиши амалга оширилади.

Фитогормонлар классификацияси, структураси ва функцияси.

Ҳозирги вақтда фитогормонларнинг 7та гуруҳи аниқланган бўлиб, булар ауксин, цитокинин, гибберлин, этилен, абсциз кислота, брассиностероид ва физиококциндир. Бу моддалар ўсимликларда жуда кам миқдорда учрайди, шунинг учун, янги фитогормоннинг очилиши камдан кам ҳолдир. Шунга қарамасдан, ўсимлик регулятор тизимларини ўрганишдаги изланишлар, уларни аниқлаш усуллари тақомиллашиши билан боғлиқ тараққиёти эътибордан холи эмас.

Ауксинлар. 1920 йилда ўсимликларнинг тропизми омили сифатида топилган. 1930 йилда Ф.Кегль томонидан тоза ҳолда ажратилиб, унинг кимёвий таркиби – индолил 3-сирка кислота (ИСК) эканлиги аниқланган.

Ауксинларнинг асосий синтезланадиган жойи поянинг апикал меристемаси ва ёш барглари бўлиб, у ердан бошқа органларга ташилади.

Ҳужайралар томонидан ауксиннинг ютилиш механизми икки фазадан иборат:

1. Тез қайтариловчи реакция, диффузия механизмига яқин механизм асосида ҳужайра ва уни ўраб турган муҳит орасида ауксин миқдори бўйича мувозанат пайдо бўлганда содир бўлади. Бу мувозанатга эришиш нафақат ҳужайрадаги ва эритмадаги ИСК миқдорининг фарқи, шунингдек эритма ва цитоплазманинг рН ига ҳам боғлиқдир. ИСКнинг ҳужайрага тушишида специфик ўтказувчилар ҳам қатнашиши мумкин, рН нейтралга яқин бўлганда уларнинг роли янада юқори бўлади. Бу фазанинг давомийлиги 25 – 30 мин.

2. Метаболитик тўпланиш. Бу вақтда ауксин кўпинча ҳужайраларнинг турли компонентлари билан глюкоза эфири ёки индолил 3-ацетиласпарагин кислота ҳосил қилиб боғланади. Бириккан ауксин ҳужайралар бошқарилишида қатнашмайди ва гормоннинг захира шаклини намоён қилади.

Ауксиннинг физиологик самараси, ҳужайра даражасидаги таъсири билан боғлиқ бўлиб, ҳужайранинг чўзилиши, бўлиниши ва дифференцияланишини амалга оширади.

Юқорида таъкидланганидек, ауксин таъсирида ҳужайраларнинг чўзилиш механизми ҳужайра девори рНининг кислоталигининг

ошиши, вакуолалинг тургор босими ҳисобига чўзилиши, протон помпаларининг фаоллашиши билан боғлиқ.

Ауксин фаоллаштирувчи протон помпалари таъсирида ҳужайраларнинг чўзилиши ва ҳужайра деворларининг юмшатилиши, ҳужайра дедифференцировка ва унинг кейинги бўлиниш жараёнларида, ҳужайра деворини шишишида иштирок этувчи ферментлар целлюлаза ва пектиназа билан бир қаторда муҳим рол ўйнаши мумкин.

Ауксин томонидан ҳужайралар бўлинишининг индукцияланиши ҳам нафас олиш жараёнини стимулланиши учун, РНК ва оқсил синтезланишини ўз ичига олувчи ДНК репликацияси учун зарур бўлган шароитни яратилиши билан боғлиқ.

Ауксин нафақат дедифференцировкани юзага келтиради, у меристема ҳужайраларининг ёки ўтказувчи тўқималардаги дедифференцияланган ҳужайраларнинг дифференцияланишини стимуллаш хусусиятига ҳам эга.

Ауксин таъсирида каллус тўқималарида ўтказувчи флоэма ва ксилема элементларининг шаклланиши ҳам кузатилган бўлиб, бу биотехнология ва ўсимликшунослик учун катта аҳамиятга эгадир.

Ауксиннинг озиқа моддаларни ҳужайраларга тортиш хусусияти, ўсимликлар учун муҳим хусусият бўлган апикал доминантликни амалга ошириши билан белгиланади. Бу фитогормонни ишлаб чиқарувчи апекс озиқа моддалар ва бошқа гормонлар (гибберлинлар, цитокининлар) оқиб келувчи марказга айланади. Бунинг натижасида озиқа моддалар ва фитогормонлар яширин куртакларга етиб бормайди, шунинг учун улар учки куртакларга нисбатан секинроқ ўсади ёки умуман ўсмайди. Ауксинларни ўзига тортиш (аттрагирлаш) механизми Ҳозирча тўлиқ ўрганилмаган, лекин уларнинг протон помпаларни фаоллашиши билан боғлиқ эканлигига асослар етарли.

Цитокининлар – 1955 йилда ҳужайралар бўлинишини стимулловчи омил сифатида топилган. Биринчи табиий цитокинин зеатин деб аталган, бу моддалар маккажўхорининг пишиб етилмаган донларидан ажратиб олинган. Ҳозирги кунда 12 та цитокинин аниқланган бўлиб, уларнинг кимёвий тузилиши зеатиннинг тузилишига яқин. Дифенилмочевина ва уларнинг қатор маҳсулотларининг ҳам юқори цитокининлик фаоллиги аниқланган.

Цитокининлар асосан илдиз апикал меристемасида синтезланиб, ундан ксилема бўйлаб ўтказувчи найлар орқали, ўсимликнинг барча органларига транспорт қилинади. Шунинг учун цитокининларнинг ҳаракат тезлиги ауксинларникига нисбатан юқори. Ташилиш йўналиши-ўсимликнинг юқори қисмига қаратилган бўлиб, айниқса фаол меристемалар ва уруғларда цитокининнинг миқдори кўп бўлади.

Ўсимликларда цитокининларнинг турғунлиги унчалик юқори эмас, зеатиннинг ярим парчаланиш вақти ўсимликнинг турига қараб 6-20 соатни ташкил этади. Ёш тўқималарда унинг парчаланиш тезлиги қари тўқималарга нисбатан кам, илдизда эса бу жараён янада секинроқ кетади. Цитокининларнинг деструкцияси сахароза (рибоза, глюкоза) ва аланин аминокислотаси билан конъюгациясидан сўнг бошланади. Бунда цитокининларнинг О-глюкозидларини ҳосил бўлиш йўлини гормоннинг заҳираланиши сифатида, бошқаларини эса–қайтарилмас деструкция сифатида кўриш мумкин. Яқинда цитокининни олдиндан гликозидламасдан оксидловчи цитокининоксидаза ферменти аниқланди. Бунда оксидланиш алифатик қисмнинг аденинга бирлашган жойида содир бўлади.

Цитокининнинг асосий физиологик таъсири-хужайралар бўлинишини фаоллаштиришдан иборатдир. Цитокинин митоз учун зарур шароитни яратиш учун РНК – полимераза фаолиятини, РНК ҳосил бўлиши ва оқсил синтези жараёнларини фаоллаштиради. Бу таъсирлар цитокининнинг озика моддаларни ўзига тортиш хусусияти билан ҳам боғлиқ бўлиши мумкин. Фитогормоннинг бу хусусияти, бошқа яна бир қанча таъсирлар билан ҳам боғлиқ бўлиб, буларга барг ва уруғкуртак хужайралари ўсишининг стимулланиши, апикал доминантликдан холи қилиниши, барглар қаришини тўхтатилиши ва ўсимликлардаги моддаларнинг қайта ҳаракатланишини бошқарилиши шулар жумласидандир.

Цитокинин онтогенезни бошқаришда муҳим рол ўйнайди. Бу тоифа гормонларнинг юқори миқдори илдиз ҳосил бўлишини тўхтатади ва пояда куртакларнинг пайдо бўлишини тезлаштиради. Шунингдек улар фотопериоднинг ноқулай шароитларида баъзи турдаги ўсимликларнинг баъзи турларининг гуллашини индуцирлайди. Цитокинин таъсирида уруғ ва тугунаклар тиним давридан чиқади. Бу гидролитик ферментлар фаоллашиши билан ҳам боғлиқ бўлиши мумкин. Цитокининлар баргларнинг қаришини тўхтатибгина қолмай, шунингдек улар ривожланишини бошланғич даврида хлоропластларининг шаклланиши, хлоропласт РНКси ва оқсилларнинг синтезини стимулланиши ҳисобига, ўсиши ва бўлинишини бошқаради.

Бу фитогормон барглардаги оғизчаларни очиш орқали сув буғланиши регуляциясида ҳам иштирок этиш орқали хлоропластлар шаклланишини стимулланиши ва баргларни қаришини тўхтатилиши натижасида фотосинтез жараёнини фаоллаштиради.

Цитокининларнинг жуда муҳим хусусиятларидан яна бири, улар ўсимлик хужайраларининг паст ёки юқори ҳарорат, сув танқислиги, шўрланиш, рентген нурлари, пестицидларнинг фитотоксинлик

таъсирлари каби ташқи ноқулай таъсирларга чидамлилигини оширади. Ҳимоя таъсирининг механизми ҳали яхши ўрганилмаган. Лекин ўсимликлар ҳаётидаги ноқулай шароитларда—citoкининлар миқдорининг ошиши натижасида ҳужайрани ҳимояловчи стресс оксиллар синтезининг стимулланиши аниқланган.

Гибберлинлар 1926 йилда аниқланган бўлиб 1938 йилда Японияда патоген замбуруғ *Gibberella fujisacchari*нинг прдукенти сифатида ажратиб олинган. 1955 йилда унинг кимёвий структураси ва қатор ўсимликлар ҳужайраларида иштирок этиши аниқланган. Гибберлинларни ўрганиш ишлари Ҳозирги кунда ҳам жадал давом этмоқда. Ҳозирда бу моддаларнинг 100 га яқин вакиллари маълум бўлиб, улардан 45 таси ўсимликлардан ажратилган.

Гибберлинлар биосинтезига тўсқинлик қилувчи қатор бирикмалар ҳам аниқланган. Бу моддаларнинг деярли ҳаммаси ретардант таъсирга эга, яъни ўсишни тўхтатувчи моддалардир. Гибберлинларнинг биосинтезини муайян ферментлар фаолиятига таъсир этиш орқали тўхтатиш мумкин.

Гибберлинлар транспорти қарама-қарши томонга йўналган эмас. Улар акропетал ва базипетал равишда ксилема ва флоэма найлари бўйлаб сувли эритмалар оқимга қўшилиб кетади. Шунинг учун бу фитогормоннинг ташилиши ва тарқалиш тезлиги нисбатан юқори.

Гибберлинларнинг физиологик таъсири, ўсимлик ҳужайраларининг чўзилувчанлиги ва меристема тўқималарининг митотек фаоллигини ошиши ҳисобига, ўсиш жараёнларини стимулланишида намоён бўлади. Гибберлинлар таъсирида ҳужайралар чўзилишининг стимулланиши, ауксинлардаги каби протон помпаларининг фаоллашиши ҳисобига эмас, балки, ҳужайра қобиғи материаллари синтезининг ошиши билан боғлиқ.

Гибберлинларнинг кўпчилиги кислоталар бўлгани учун, уларни ўзига мос индекс билан Гибберал кислота (Г) деб белгилаш қабул қилинган. Масалан: Г_{K₂₄}, Г_{K₅₃} ва ҳаказо.

Турли оилаларга мансуб ўсимликларнинг ўсиш реакциясида у ёки бу гибберлинга нисбатан муайян спецификлигини кузатиш мумкин. Масалан, қовоқдошлар ва бутгулдошлар оиласига кирувчи ўсимликларнинг ўсишига Г_{K₃} таъсир этмайди, лекин унинг бошқа баъзи оилаларга мансуб ўсимликлар ўсишига таъсири кузатилган, Г_{K₄} таъсирида эса уларнинг бўйига ўсишидаги сезиларли таъсирини кузатиш мумкин. Гибберлинлар даражасини ошишига ўсимлик турларининг спецификлигидан ташқари, турли органларнинг турлича специфик реакциясини ҳам кузатиш мумкин. Гибберлин поянинг ўсишини тезлаштириб, барглари ўсишига деярли таъсир этмайди ва илдиз ўсишини тўхтатади. Гибберлинларнинг илдизга салбий таъсири

озиқа моддаларни қайта тақсимланиши натижасида ўсимликнинг ер устки қисмининг ўсиши тезлашиши билан боғлиқ бўлиши мумкин.

Гибберлинларнинг танқислиги ўсимликнинг паканалигига кўра аниқланади. Ўсимликларнинг пакана бўлишининг сабаби, ушбу фитогормонларнинг фермент биосинтези тизими ишининг бузилиши билан боғлиқдир.

Гибберлинлар ўсимликларнинг генератив органларининг шаклланиши ва гуллашга ўтиш жараёнларида катта рол ўйнайди. Кўп йиллик ўсимликларда меристемалар ривожланишини генератив йўли детерминацияси даврида гибберлинлар даражасининг ошиши генератив органларнинг ҳосил бўлишига салбий таъсир этади. Шу билан бир вақтда гибберлинлар даражасининг камайиши ҳам меристемада гул элементларининг шаклланишини сўнгги босқичида генератив ривожланишга салбий таъсир кўрсатади.

Баъзи тўп баргли ўсимликларга гибберлин билан ишлов берилганда, ҳатто куннинг ноқулай шароитида ҳам, унинг гуллаши тезлашади. Унинг бу хусусияти академик М. Х. Чайлахянга (1988й.) гибберлинни гипотетик гормон флоригенининг зарурий қисми деб айтишига асос бўлди. Тахмин қилинишича, флориген таркибига гибберлиндан ташқари, ҳали ажратилмаган фитогормон- антезинлар ҳам кирар экан.

Гибберлинларни ташқаридан киритилиши кўпинча уруғлар ривожланишини тўхтатади ва партенокарпик мевалар шаклланишини таъминлайди.

Гибберлинлар ёрдамида ўсимликларнинг жинсини ўзгартириш бўйича 1970 йилда бодринг ва каноп ўсимликларида тажрибалар ўтказилган. Бодрингда чангчи ҳам уруғчи гулларини битта ўсимликда жойлашади, каноп эса икки уйли ўсимликларга киради. Гибберлин билан ишлов берилганда, каноп ўсимлигида чангчи ўсимликларнинг, бодринг ўсимлигида эса эркак гулларнинг пайдо бўлиши ортган.

Гибберлинлар уруғ ва тугунакларни тиним ҳолатидан чиқариш хусусиятига ҳам эгадир. Улар заҳира крахмалларни парчалаб муртакларнинг озиқаланиши учун қулай шаклга келтириб берувчи ферментлар, асосан α -амилаза ферментининг синтезини индуцирлайди. Бу жараён ғалла экинлари (бугдой, жавдар, арпа)да яхши ўрганилган. Уларнинг донлари муртак, эндосперм ва уруғ қобиғидан иборат. Заҳира моддалар эндоспермда крахмал ҳолатида тўпланган. Дон пишиш вақти яқинлашганда крахмал қаватида тирик хужайралар қолмайди, фақатгина эндоспермнинг устки қисмида заҳира оксилларга бой хужайралар юпқа алейрон қаватида қолади. Бошоқ зародиши эндосперм билан қалқонча орқали алоқа қилади (қалқонча озиқа моддаларни эндоспермдан олиб, муртакка бериб

туриш учун хизмат қилади). Қалқонча ўсганда гибберлин ажратади. Бу муртакнинг— уйғонганидан ва унга озиқа моддалар зарурлигидан далолат беради. Гибберлинлар эндоспермнинг крахмал доначалари зонасидан эндосперма қаватига диффундирланади. Тирик ҳужайраларда алейрон қаватидан крахмалларни парчаловчи фермент амилазанинг синтези учун ахборот РНКси синтези бошланади.

Гибберлинларнинг озиқа моддаларни ўзига тортиш хусусиятига яна бир мисол, унинг уруғсиз меваларни ривожланишини стимуллашидир. Уларнинг бу хусусияти айниқса, уруғсиз узум навларини етиштиришда жуда муҳимдир.

Гибберлин қўлланилганда мевалар йириклашади ва ҳосилдорлик ошади. Гибберлинлар нафақат бошоқли ўсимликларни, шунингдек, бошқа ўсимликларнинг ҳам ўсишини стимуллайди. Кунгабоқар ва қовоқ ўсимликларида бу гормонлар заҳира ёғларни парчалайди ва уларни қандгача оксидлайди, дуккаклиларда заҳира оксиллар гранулаларини ва бошқалар моддаларнинг ташилишини амалга оширади. Шунинг учун ҳам уруғ, тугунак ва пиёзларга экишдан олдин гибберлин билан ишлов берилса, уруғларнинг унувчанлик даражаси ортади ва ўсиши жадаллашади.

Этилен моддаси. 1901 йилда Санкт-Петербург университети лабораториясида тажриба учун нўхат ўсимлиги ўстирилганда, уруғдан қинғир-қийшиқ, учки қисми пастга қараб қармоқ шаклида эгилган калта ўсимталар ўсган. Иссиқхоналарда ва очиқ ерларда ўсаётган ўсимликлар эса ўсувчан, тўппа-тўғри бўлиб ўсган. Нелюбов бу физиологик таъсирни чакирувчи омил лабораторияда эканлигини тахмин қилган. Ўша вақтларда хоналар газ ёрдамида ёритилар эди. Ҳавоси тозаланган шароитда иссиқхонадаги ўсимликлар нормал равишда ривожлана бошлаган. Айнан қайси моддалар таъсир этишини ўрганиш мақсадида Нелюбов ёруғлик газининг турли компонентларини навбатма-навбат бериб, этиленнинг таъсирида:

- 1) ўсимталар бўйига ва энига ўсишида секинлашиши;
- 2) қайта тўғриланмайдиган поя учининг пастга эгилиши;
- 3) ўсимталар ўсиш йўналишидаги ўзгариш каби физиологик реакцияларини аниқлади ва буни ўсимталарнинг этиленга уч карра жавоби деб атади.

Шунингдек, этиленнинг ўсимлик баргларини тўкилишидаги, меваларнинг пишиб етилишидаги таъсирлари ҳам аниқланган. Этилен моддалари ўсимликларда ҳам синтезланади. Бу моддалар ягона газсимон фитогормон бўлиб, оддий тузилишга эга. Этиленни дезактивацияси унинг атроф муҳитга ажралишидан ташқари этилен оксиди ҳосил бўлиш йўли билан ҳам боради. Этиленнинг максимал фаоллиги унинг максимал оксидланиш вақтига тўғри келади,

оксидланишни сунъий тўхтатилиши фитогормоннинг таъсирини йўқотади. Буларнинг ҳаммаси этиленнинг оксидланиш унинг фитогормонал фаоллигини амалга ошириши билан боғлиқ эканлиги ҳақида тахмин қилиш имконини беради.

Ўсимликнинг деярли барча тирик ҳужайралари этиленни биосинтез қилишга қодир. Бу фитогормоннинг ҳосил бўлиш характери онтогенезда кескин ўзгаради. Ювенил даврдаги ўсимликларда этилен асосан меристема тўқималарида синтезланади. Кейинчалик пишиб етилаётган меваларда унинг миқдори ортади. Шунингдек, этиленнинг биосинтези ўсимлик шикастланганда ёки стресс таъсирларда кескин ошади.

Ўсимликларда этилен биосинтезига метионин аминокислотаси асос бўлиб хизмат қилади.

Этилен ўсимлик ҳужайраларининг изодеаметрик чўзилишини (йўғонлашиши) ошириш хусусиятига эга.

Этиленнинг қатор таъсирлари унинг антиауксинлик таъсирлари билан ҳам белгиланади. Ауксиндан фарқли, этилен ажратувчи қават ҳосил қилади, яъни барглари, гулларни, меваларни тўкилишига олиб келади. Бу унинг ҳужайра деворларини парчаловчи ферментлар эндополигалуктороназа ва целлюлазининг синтезини индуцирлаши билан боғлиқ. Этилен таъсирида ауксин томонидан индуцирланган ҳужайралар чўзилишдан тўхтади, митотик фаоллиги пасаяди. Шунингдек, этилен ауксиннинг транспортини ҳам тўхтатади.

Этилен меваларни тўкибгина қолмай, шунингдек уларнинг пишишини тезлаштиради. Бу фитогормон каучук берувчи ўсимликларда латекс (табиий каучук) ни чиқишининг ошишига таъсир кўрсатади.

Ўсимликлар ўсишига этилен турлича таъсир кўрсатади. Кўпчилик ўсимликларда ҳужайраларнинг бўлиниши ва чўзилиши жараёнларини секинлаштириш орқали вегетатив ўсишни тўхтатади. Аммо баъзи ҳолларда, масалан, шоли ниҳолларида этилен миқдорининг ошиши, унинг ўсишини жадаллаштиради.

Этиленнинг ҳимоя таъсири ҳам катта қизиқиш уйғотади. Юқорида айтилганидек, этиленнинг миқдори стресс таъсирлар ва механик шикастларда кескин ошади. Бу ўсимликнинг потенциал ҳавфга нисбатан биринчи жавоби бўлиши мумкин. Стресс этилени фитоалексинлар (ҳимояловчи моддалар) патоген замбуруғлар ҳужайра қобиғини ва баъзи фенол бирикмаларни парчаловчи хитиназа ферменти синтезини индуцирлайди. Фитоалексинларни кимёвий табиати ўсимликнинг систематик ҳолатига боғлиқ. Масалан: картошка сесквитерпеноидли фитоалексинлар ҳосил қилади, дуккаклиларда фитоалексинлар фенолли бирикмалар асосида синтезланади.

Ўсимликнинг шикастланган жойидан фитоалексинлар ва хитиназадан ташқари протеазаларнинг ингибиторлари ҳам ташилиб, у ўсимликнинг шикастланган жойидаги ҳужайра оксилларини парчаланишдан ҳимоя қилади. Бундан ташқари, этилен миқдорининг ортиши ўсимликлар ҳимоясида иштирок этувчи бошқа гормон-абсциз кислотанинг синтезланишини ҳам стимуллайд.

Абсциз кислота (АБК). 1965 йилда АҚШ олимлари Лью ва Кареслар томонидан гўзани яшил кўсагидан ажратиб олинган. Ўсимликларда мевалон кислотасидан синтезланади. АБК ксантофил виолаксантиннинг ёруғлик таъсирида ажратилган маҳсулотидан ёки липоксигеназа ферментидан ҳам ҳосил бўлиши мумкин. Стресс таъсирларда бу фитогормон синтезининг кескин ошишини аниқланган. АБК ўсимликларнинг деярли барча органларида синтезланади. Унинг ҳосил бўлиш интенсивлиги ўсимликнинг қариши, ноқулай таъсирлар, айниқса намлик етишмаслиги натижасида кескин ошади. У қари барглари, пишган мевалар, тиним ҳолатидаги уруғ ва куртакларда кўп миқдорда бўлади. Ўсимликнинг уруғнинг муртаги пишиб етила бориши билан ўзи АБК синтезлаш хусусиятига эга бўлиши орқали, ўзининг тиним ва чидамлилиқ жараёнларини бошқаради. АБКнинг синтези кундузига нисбатан кечаси 50-60 марта юқори бўлади. АБКнинг миқдориға ҳароратнинг пасайиши, ёруғлик таркибида кўк ва ультрабинафша квантларининг кам бўлиши стимулловчи таъсир кўрсатади.

АБК акропеталь ва базипеталь равишда флоэма ва ксилема бўйлаб транспорт қилинади. Ҳаракат тезлиги жуда юқори АБК учун озика моддаларни тортувчи марказ бўлиб, фаол бўлинаётган меристема хизмат қилади. АБК метаболизми қанд моддалари билан конъюгат ҳосил қилиш орқали амалга ошиши, улар қайтариладиган ва қайтарилмайдиган бўлиши мумкин, шунингдек фазеев кислотаси орқали оксидланиши ҳам мумкин.

АБКнинг физиологик самараси хилма-хилдир. Улар таъсирида муҳим физиологик жараёнлар ингибирланиши ҳам ёки аксинча стимулланиши ҳам мумкин. Абсциз кислота кучли ингибитор таъсирга эга фитогормондир. Улар нуклеин кислоталар, оксиллар ва хлорофиллар парчаланишини тезлаштиради, протон помпанинг фаоллигини пасайтиради. АБК таъсирида оғизчалар ёпилади ва фотосинтетик фосфорланиш тўхтайди.

АБК томонидан уруғ, куртак ва тугунакларнинг тиним даври бошқарилади, атиргулнинг партенокарпик мевалари ривожланиши ва картошка тугунакларини ҳосил бўлиши, бодринг гипоктилини чўзилиши, ловия қаламчаларида илдиз ҳосил бўлиши стимулланади.

Бу фитогормон ғалла экинлари хужайраларидаги захира оксиллар таркибининг ўзгаришига ҳам таъсир этади.

Ўсимликларнинг стрессларга чидамлилигини оширида абсциз кислотанинг роли жуда муҳим. У ҳам цитокинин каби стресс оксиллар, шунингдек, оксилларнинг ўзига хос гуруҳи, синикация оксилларининг синтезини индуцирлайди. Бу моддалар уруғ таркибидаги намликни тутиб туришга жавобгар бўлиб, бу унинг тиним даврига ўтишида жуда муҳимдир. Бу гормонни ўзи синтезлаш қобилиятига эга бўлмаган ўсимликлар тезда нобуд бўлади.

Брассиностероидлар. Бу фитогормонлар 1979 йилда Гроув ва бошқ олимлар (Grovt et al.) томонидан рапс (*Brassica napus*) ўсимлиги чангининг ёғдаги экстракти ниҳолларининг бўйига ўсишини стимуллаши аниқланган, 10 кг рапс чангидан 4 миллиграмм регулятор таъсирга эга моддалар ажратиб олинган. Бу моддаларнинг стероид бирикмалар эканлиги аниқланган. Рапснинг лотинча номидан келиб чиқиб брассинолид деб, бошқа шунга ўхшаш физиологик фаол моддалар брассиностероидлар деб аталган. Кейинчалик маълум брассиностероидлар сони ортиб борди. Ҳақиқий каштандан (*Castanea sativa*) – кастастерон, атиргулдан (*Typha*) – тифастерол, чойдан (*Thea*) – теастерон, катарангусдан (*Catharanthus*) – камастерон ва бошқалар ажратиб олинган. Ҳозирги кунга қадар 60 га яқин брассиностероидлик фаолликка эга бирикмалар аниқланган.

Брассиностероидлар биосинтези мевалонат йўли билан боради ва бошқа терпенли бирикмалар учун умумий бўлган босқичлар: изопентент илпирофосфат, геранилпирофосфат, фарнезилпирофосфат ва сквалендан иборат бўлади.

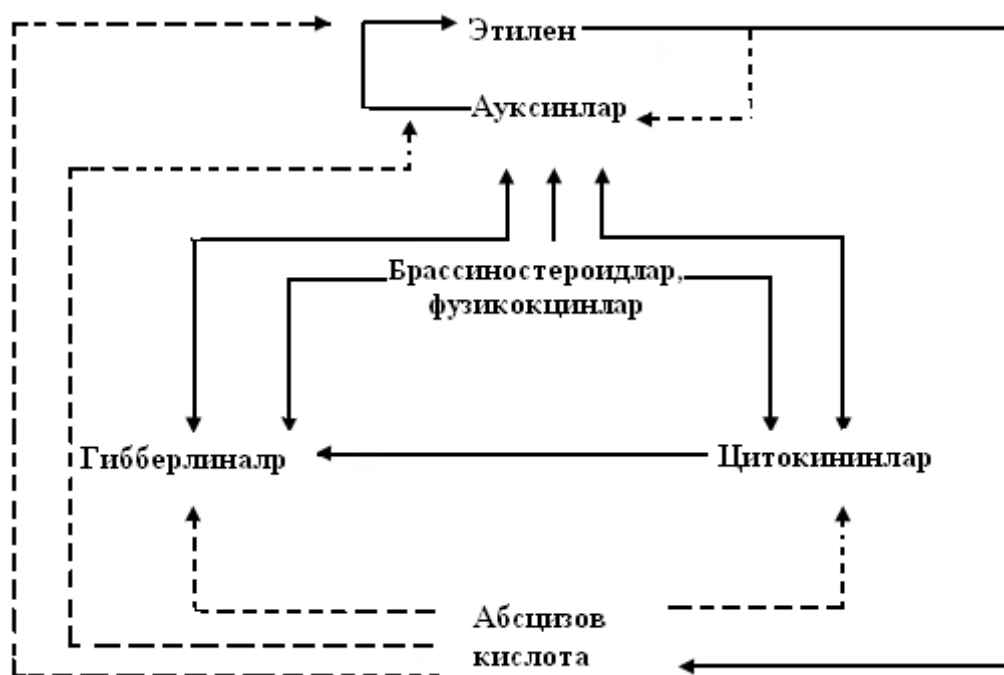
Маълумки, ўсимликларнинг гул тўқималари, барглари ва ёш пояларида бу фитогормонлар кам миқдорда бўлади. Брассиностероидларнинг максимал концентрацияси гул чангида бўлади.

Брассиностероидларни физиологик таъсири бошқа фитогормонлар таъсирига яқин. Улар ауксин каби хужайралар чўзилишини, гибберлин каби бодринг уруғпалласи ўсишини стимуллайди. Шунингдек брассиностероидлар этиленга хос хусусиятларга ҳам эга. Бу фитогормонларнинг специфик таъсири уруғ куртакнинг ўсишини бошқаришдир. Брассиностероидларнинг озгина миқдори чанг билан биргаликда уруғ куртакка тушиб, унинг ривожланиши ва уруғ ҳосил бўлишини стимуллайди. У ўсимликларни стресслар ва замбуруғли касалликлардан ҳам ҳимоя қилади. Бундай таъсирнинг сабаби, ўсимликнинг фитоиммунитет тизими стресс оксиллари, шунингдек фитоалексинлари ва бошқа компонентлари синтезининг ошиши билан боғлиқ. Кўп миқдордаги брассиностероидлар ўсимликларнинг бўйига

ўсишини тўхтатиб, атроф муҳитнинг ноқулай таъсирлари (паст ёки юқори харорат, қурғоқчилик, инфекциялар) га чидамлилигини оширади. Ҳозирги вақтда кўпгина мамлакатларда брассиностероидлардан қишлоқ хўжалик экинларини ҳосилдорлиги, чидамлилигини ошириш мақсадида фойдаланиш учун изланишлар ишлари олиб борилмоқда.

Фузикоқцинлар. Фузикоқцинлар стероид моддалардир. Илгаридан замбуруғлар ҳаёт фаолиятининг маҳсулоти сифатида маълум бўлган, бу фитогормон ўсимликларда ҳам синтезланади ва унинг ўсиш жараёнини бошқаради. (Г.С.Муромцев, 1996). Фузикоқциннинг муҳим физиологик таъсири унинг хужайраларнинг чўзилишини стимуллаши, қоронғуда оғизчаларни очиши, сув буғланишини кучайтириши, уруғларни тиним ҳолатидан чиқариши ва ўсишни жадаллаштириши билан боғлиқдир.

Ўсимликларда фитогормонларнинг ўзаро ҳамкорлиги. Ўсимлик гормонлари бир-бирларининг синтези, парчаланиши ва ташилишига фаол таъсир кўрсатади. Фитогормонлар тизимининг бирор компоненти миқдорининг ўзгариши, бутун тизимнинг ўзгаришига олиб келади (4.2- расм).



4.2- расм. Гормонларнинг ўзаро таъсири натижасида у ёки бу фитогормонлар миқдорининг ошиши (текис чизиклар билан) ёки пасайиш (пунктир чизиклар билан).

Ўсимликларни гормон статуси. Ўсимликларни онтогенез давридаги фитогормонал тизимининг ҳолати, ҳосил бўлиш жараёнларида фитогормонлар миқдори ва улар орасидаги нисбат, уларнинг ташқи таъсирга жавобан ҳосил бўлиши, ҳаракатланиши, фойдаланилиши ва инактивацияланиши-ўсимликларнинг гормон статусидир.

Ўсимликларларнинг гормон статуслари фитогормонларни миқдорий аниқлашнинг мураккаблиги сабабли кам ўрганилган.

4.3. Ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи сунъий регуляторлар.

Фитогормонларни бошқариш механизмлари ҳақидаги билимларга эга бўлиш, ўсимликларнинг ҳосилдорлигини, чидамлилигини оширишга эришишда, уларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқаришда катта имкониятлар беради.

Ўсимликларнинг фитогормон тизимига йўналтирилган таъсирлар ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи регуляторлари (фиторегулятор) ёрдамида амалга оширилади.

Фиторегулятор - ўсимликларнинг бўйига ёки энига ўсишига таъсир этувчи, қўлланилаётган миқдорига кўра, озика манбаи ва фитотоксин бўлмаган табиий ёки сунъий моддалардир. Демак, ўсимликларни ўсишига таъсир этувчи ҳар қандай модда ҳам, агар у ўсимликлар ўсишини ўғит каби стимулламаса ва гербицид каби ўсимликларнинг нобуд бўлишига сабаб бўлмаса, у ҳолда фиторегулятордир. Ҳозирги кунда регулятор фаолликка эга 5 мингга яқин бирикмалар аниқланган бўлиб, амалиётда уларнинг фақат 1% гина қўлланилади.

Кўпчилик фиторегуляторларнинг физиологик фаоллиги, уларнинг фитогормон тизимини қайсидир компонентига таъсир этиш хусусияти билан боғлиқ. Бунга ҳужайрага ташқаридан унинг аналогини киритиш орқали фитогормонлар миқдорини ошириш; фитогормоннинг биосинтезига таъсир этиш (стимуллаш ёки тўхтатиш); фитогормон транспортини тўхтатиш; фитогормоннинг инактивация тизимида таъсир этиш (стимуллаш ёки тўхтатиш); фитогормоннинг рецепторига уланиши учун рақобат ҳосил қилиш; фитогормон-рецептор комплексининг инактивацияси ҳисобига эришилади.

Сунъий регуляторларнинг ўсимликларнинг гормон тизимида таъсири. *Ауксиннинг аналоглари ва антогонистлари.* Ауксинга таъсир этувчи регулятор бирикмалар орасида, бу фитогормоннинг сунъий аналогларидан индолил-3-сирка кислота (ИСК), индолил-3-мой кислота (ИМК), 1-нафтилсирка кислота (НСК) ҳамда уларнинг тузлари ва амидлари илдиз ҳосил қилишни стимуллашда кенг қўлланади. Бу

бирикмалардан ўсимликларни қаламчалаш усули орқали вегетатив кўпайтиришда, биотехнологик жараёнларда ва анъанавий ўсимликшуносликда кенг фойдаланилади. Улар билан ишлов бериш-препаратни озиқа муҳити таркибига 1-100 мг/л концентрацияда киритиш, қаламчанинг базал қисмини шу препаратнинг 200 мг/л концентрациядаги спиртли эритмасига солиш ёки қаламчалар препаратнинг 25-50 мг/л концентрациядаги сувли эритмасида 12-14 соат ушлаб туриш усуллари орқали амалга оширилади. Бу бирикмаларнинг захарлилик таъсири кам бўлиб, уларни одамлар томонидан истеъмол қилинадиган экинларга қўллаш мутлақо ҳавфсиздир.

Ауксин аналоглари орасида 2,4-дихлорфеноксисирка кислота (2,4-Д); 4-хлорфеноксисирка кислота (4-Х); 2,4,5-учхлорфеноксисирка кислота (2,4,5-Т); 2(2,4,5-учхлорфенокси) пропион кислота (2,4,5-УП) муҳим ўринни эгаллайди. Бу бирикмалар ауксин таъсир этадиган ҳудудда юқори ауксин фаоллигига эга бўлиб, протон помпасини фаоллаштириши ва тропизм, ҳужайраларнинг чўзилиши ва дедифференциалланиши жараёнларини амалга оширади. Бу моддалар паст концентрацияларда каллус тўқималарини олиш учун (0,5-2,0 мг/л), юқори концентрацияларда эса, гербицид сифатида қўлланилади. Бу гуруҳ ауксин аналогларининг захарлилик таъсири бошқа гуруҳ вакиллариликка нисбатан кам, аммо улар кучли мутаген таъсирга эга бўлганлиги учун экологик ҳавф туғдиради.

Антиауксин таъсирга эга қатор фиторегуляторлар ҳам мавжуд. Уларнинг таъсири бу гормонлар транспортини тўхтатиши билан боғлиқ: морфактинлар, нафтилфаламин кислота ва унинг тузлари, шунингдек 2,3,5-учйодбензой кислота (УЙБК)дир. УЙБКнинг таъсири ауксин томонидан яратилган апикал доминантликнинг бузилишида намоён бўлади. Бунинг натижасида баъзи ўсимликлар куртакларининг уйғониши ортади, масалан: соя ўсимлигида ҳосилдор новдалар сонини ошириш ҳисобига ҳосилдорлиги юқори бўлади.

Цитокинин аналоглари ва антагонистлари. Кейинги вақтларда цитокинин препаратларининг антистресс таъсирлари аниқланганидан сўнг, уларга бўлган қизиқиш тобора ортиб бормокда. Зеатин қатори (кинетин, 6-бензиламинопурип) цитокининларини сунъий аналоглари шундай хусусиятга эга. Цитокининлар қатори аналог, дифенилмочевина-дропп (тидиазурон)нинг антистресслик хусусияти кам.

Цитокининлар ўсимликлар биотехнологиясида каллус тўқималари олишда, ҳужайралар бўлинишини фаоллаштиришда, каллусда пайдо бўлган ниҳолларнинг дифференциалланишини индукциялашда, шунингдек апикал доминантликни бартараф этишда ва ўсимликларни

клонли микроўпайтиришда, уларнинг кўпайиш коэффициентини оширишда қўлланилади. Бундай мақсадлар учун айниқса 6-БАП ва кинетинлардан кўпроқ фойдаланилади.

Цитокинин аналоглари озиқа моддаларни ўзига тортиш хусусияти туфайли, мевали дарахт кўчатларининг апикал доминантлигини бартараф этиш, кўчатзорлардаги дарахтларнинг шохлари ва баргларининг тез ва сифатли ҳосил бўлиши, шунингдек уруғсиз узум навларининг меваларини йириклаштириш ва массасини оширишда қўлланилади. Бунинг учун цитокинин аналоглари сунъий гибберлинлар билан биргаликда қўлланилса яхши натижа бериши мумкин.

Дропп препарати ғўза дефолианти сифатида муҳим аҳамият касб этади. Унинг таъсирида эндоген этиленнинг синтези стимулланиши натижасида барглар тўкилади.

Цитокинин аналоглари чекланган миқдорда сабзавотларни сақлашда, жинсни бошқаришда, шунингдек уруғларни тиним давридан чиқаришда ва ўстиришда қўлланилади.

Цитокининларнинг антагинистлари аниқланган, лекин улар амалиётда қўлланилмайди ва ҳозирча фақат илмий аҳамиятга эга.

Гибберлинларнинг аналоглари ва антагонистлари. Гибберлинлар аналоглари патоген замбуруғ *Gibberella fujisacchari*дан микробиологик синтез йўли билан олинади. Улар ўсимлик томонидан синтезланадиган гибберлинларнинг аниқ нусхаларидир. Улардан айниқса, ГК₃, ГК₄, ГК₇ кенг қўлланилади. Бу моддалардан асосан уруғсиз узум навлари мевасининг ўсиши ва пишишини стимуллашда фойдаланилади. Бундан ташқари, гибберлинлар уруғлар ва тугунакларни тиним ҳолатидан чиқариш ва уларнинг униб чиқишини тезлаштиришда ҳам қўлланилади.

Ўсимликлар биотехнологиясида гибберлинлардан вируссиз экиш материаллари олиш учун апикал меристема хужайраларининг чўзилиши ва бўлинишини стимуллашда фойдаланилади.

Гибберлинларнинг антагонистлари аналогларига нисбатан қишлоқ хўжалигида кенгроқ қўлланилади. Унинг деярли барча антагонистлари ретардант таъсирга эга.

Брассиностероидлар аналоглари ва антагонистлари. Ўсимлик хужайраларидан брассиностероидлар ажратилиши билан бир вақтда, унинг аналогларини ҳам синтезлаш ишлари амалга оширила бошланди. Ҳозирги кунга қадар синтезланган брассиностероид аналоглари уларнинг табиий фитогормонларидан ён занжир структураси билан фарқ қилади. Брассиностероид аналогларининг кўпроқ тарқалган турларига 22S, 23S-изомерлари, гомобрассинолид, норбрассинолид бирикмалари киради (В.А.Хрипач ва бошқ. 1993).

Брассиностероидлар ва уларнинг аналогларининг экдистероидлар билан антиэкдизонлар ролига кириб, экдизонли рецепторларга боғланиш кўра ўзаро муваффақиятли рақобатлаша олиши ҳақида ҳам маълумотлар мавжуд. Брассиностероидларга экдизонлар билан бир қаторда гомоксистероидлар синфининг бошқа баъзи вакиллари (хиограстеринлар, азераахол) ҳам структураси бўйича яқиндир.

Брассиностероидлар ва ауксинлар ўсимликлар илдиз тизимида таъсирига кўра фарқ қилади. Ауксинлар ён илдизларнинг ҳосил бўлишини стимуллайдди, брассиностероидлар эса уларнинг ўсишига ингибиторлик таъсир кўрсатади. Брассиностероидларнинг юқори меъёри ўсимликлар ўсишини тўхтатиб, унинг ташқи ноқулай омиллар (совуқ уриши, қурғоқчилик, иссиқ ҳарорат ва инфекциялар) га чидамлилигини оширади.

Фузикоқцинларнинг аналоглари ва антагонистлари. Фузикоқцинларнинг гибберлинлар билан аналогияси кучли бўлиб, уларнинг иккаласи ҳам ҳар томонлама юқори регулятор фаолликка эга, фитопатоген замбуруғлар томонидан синтезланади ва кимёвий бирикмаларнинг битта гуруҳи - дидитерпенларга киради.

Терпеноидларга брассиностероидлар ва абсциз кислота ҳам мансуб бўлиб, бу фитогормонлар фитопатоген замбуруғлар томонидан синтезланади. Шу маълумотлар асосида Г.С.Муромцев (1987) фузикоқциннинг гормон табиатли модда эканлиги ҳақидаги ўзининг тахминларини келтирган ва уларни ўсимлик ҳужайраларида ҳам аниқлаган.

А.Баллио ва бошқа ҳаммуаллифлар томонидан (Ballio et al, 1979) плазматик мембранада молекуляр оғирлиги 40 минг далтон бўлган фузикоқциннинг рецептори – гликопротеин аниқланди. Фузикоқцин плазмолеммада жойлашган фаол протонлар ташилиш тизимини бошқарувчи нафас олиш занжири билан ҳам ўзаро ҳамкорлик қилади.

Этилен аналоглари ва антагонистлари. 2-хлорэтилфосфон кислотанинг (2-ХЭФК, этефон) $pH > 4,0$ бўлганда этилен ажратиб парчаланиш хусусияти аниқланганидан сўнг, ўсимликшуносликда этилен аналогларидан фойдаланиш имконияти пайдо бўлади.

2-ХЭФК асосида кўплаб препаратлар : этрел, кампозан, флордимекс, гидрел, дигидрел, декстрел ишлаб чиқариш йўлга қўйилган. 2-ХЭФК ва унинг асосидаги препаратлар иссиқ қонли организмлар учун умуман зарарсиздир. Гидрел ва дигидрел бундан мустасно бўлиб, уларнинг синтези учун симметрик бўлмаган диметилгидразиндан фойдаланилади, унинг мазкур препаратлардаги жуда кам миқдори ҳам уларнинг заҳарли ва мутагенлик таъсири юзага келтиради.

Этилен продуцентлари турли таъсирлар учун: ажратувчи қаватни ҳосил бўлиши (барг билан поя, поя билан мева ўртасида), ўсимликларни тиним ҳолати ва чидамлилигини стимуллаш ва индукциялаш учун ретардант сифатида қўлланилади.

Сўнгги йилларда органик кремний асосида қатор этилен продуцентлари яратилган бўлиб, улар орасида стирел катта аҳамиятга эгадир, у 2-ХЭФК га ҳос бўлган камчиликлардан холи, бундан ташқари, иссиқ қонли организмлар учун унинг заҳарли таъсири кам.

Баъзи ҳолларда, мевали дарахтларни мевасини тўкишини камайтиришда ва баъзи бир биотехнологик тадқиқотларда ўсимликдаги эндоген этиленнинг миқдорини камайтириш зарур бўлади. Бунинг учун этилен биосинтезини тўхтатувчи Ag^+ аминосирка кислота (АСК) ризобиотоксин ва аминоэтоксивинилглицин (АВГ) каби моддалардан фойдаланилади. Лекин бу препаратларнинг нархи қиммат бўлгани учун унчалик кенг қўлланилмайди.

Абсциз кислота аналоги ва антагонистлари. Абсциз кислотанинг физиологик фаол структуравий аналоглари нархи юқори бўлгани учун қишлоқ хўжалигида кам қўлланилади. Лекин унинг ҳосил бўлишини фоллаштириш орқали ўсимликдаги миқдорини ошириш мумкин. Абсциз кислота ҳосил бўлишининг индуктори ва стимулятори сифатда бошқа фитогормон-этилен ёки унинг продуцентлари хизмат қилади.

Абсциз кислота миқдорининг ошиши, бу фитогормон томонидан сувни боғлаб туришга жавобгар стресс оксиллар синтезининг индукцияланиши, шунингдек ўсимлик тиним ҳолатини стимуллаш хусусияти билан боғлиқ ҳолда маҳсулотларининг исроф бўлишини камайтиришни таъминлайди.

Абсциз кислотанинг специфик антагонистлари ҳали аниқланмаган, носпецифик антагонистлари рўйхатига эса стимуляторлик таъсир характерига эга барча гормонларни киритиш мумкин.

Биотехнологияда ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи фитогормон ва сунъий регуляторлар

Ўсимликлар биотехнологиясида фиторегуляторлар каллус ҳосил қилиш, хужайраларнинг дифференцияланиши, регенерант-ўсимликлар ўсиши ва ривожланиши жараёнларини бошқариш имконини берувчи асосий воситадир.

Онтогенезни бошқариш. Ю.Сакс 1880-йиллардаёқ ўсимликларнинг асосий органлари - илдиз, поя, барглариининг дифференцировкаси ва ривожланишини бошқарувчи моддалар мавжудлиги ҳақида ўз тахминларини айтган, ҳамда уларни мос равишда ризоколин, кауликолин ва фалиоколинлар деб атаган эди. Ўша пайтда унинг замондошлари томонидан қўллаб қувватланмаган бундай

ғоялар вақт ўтиши билан ўз ишботини топди. Уларнинг бундан кейинги ривожланиши буюк олим М. Х. Чайлахян (1988) томонидан таклиф этилган флориген назарияси билан давом этди. Флоригенларни қидириш бўйича ишлар ҳали тугалланмаган бўлсада, ауксин таъсирида илдизнинг ўсиши ва ривожланиши, ниҳолнинг цитокинин таъсирида ўсиши ва ривожланишини бошқарилиши ҳақидаги ҳозирги кундаги маълумотлар Сакс ғояларининг ҳаққонийлигини тасдиқлагани каби, бу назариянинг қонуний ҳуқуққа эга эканлигини ҳам кўрсатди.

Қишлоқ ҳўжалик ўсимликлари биотехнологияси ривожлана бориши билан фитогормонларнинг органозонезни бошқариши ҳақидаги маълумотларнинг аҳамияти тобора ортиб бормокда, чунки айнан фитогормонлар *in vitro* ўсимлик тўқималар ва ҳужайралари културасида турли муолажаларни амалга оширишда асосий қурол бўлиб хизмат қилади.

Илдиз ҳосил бўлиши. Ўсимликшуносликда новда, барг ёки пояларда илдиз ҳосил бўлишини сунъий равишда бошқариш ҳамма вақт ҳам кенг қўлланилган, лекин бу усул кўп сарф-харажат ва меҳнат талаб этганлиги учун кўпайтиришнинг бу усулидан барча ҳолларда ҳам фойдаланиб бўлмайди. 1930 йиллар бошларида ауксиннинг кашф этилиши, унинг адвентив илдиз ҳосил бўлишини индуцирлаш ва илдиз тизимнинг ривожланишини стимуллаш хусусиятлари аниқлангандан сўнггина деярли барча турдаги ўсимликларни ёппасига қаламчалаб кўпайтириш имконияти пайдо бўлди.

Ҳозирги кунда фан- техниканинг юксак тараққиётига қарамасдан ўсимликларни кўпайтиришда - қаламчаларга экишдан олдин ауксиннинг аналоги билан ишлов бериш орқали илдиз оттириш усулининг моҳияти ўзгармасдан қолди.

Адвентив илдизлар камбий ҳужайраларидан ҳосил бўлади. Айниқса камбий тўқималари бўлинишининг максимал фаоллашган даврида бу жараённинг самараси юқори бўлади. Меристема тўқималари ҳужайраларидан илдизларнинг шаклланиши генетик детерминланган бўлади . Ризогенезга олиб келувчи генетик дастурларнинг транскрипциясидаги ўзгаришлар ауксин томонидан назорат қилинади. Ауксин муайян рецептор билан ўзаро алоқасидан сўнг ва мос гормон – рецептор комплекси ҳосил бўлгандан кейин, илдиз ҳосил бўлишига олиб келувчи ва метаболизмни ўзгартирувчи ферментлар генларининг оперонларидан репрессор қуршовини йўқотишга олиб келувчи жавоб тизимини ишга туширади.

Ауксиннинг барча сунъий аналоглари ҳам илдиз ҳосил бўлишини индуцирлаш хусусиятига эга эмас. Лекин ауксиннинг индолил-3-мой кислота (ИМК) ва нафтилсирка (НСК) кислота каби сунъий аналоглари

таъсири ҳақиқий табиий гормон ИСКнинг таъсиридан бирмунча кучлироқдир. Бунинг сабаби сунъий аналогларнинг хужайрадаги турғунлигининг юқорилиги ва уларнинг гормонларни дезактивацияловчи ферментларга кам ўхшашлигидир. Шу билан бир вақтда ауксиннинг бошқа аналоги 2,4-дихлорфеноксисирка кислота (2,4-Д) ризогенез чақириш хусусиятига деярли эга эмас, ва бу моддадан узоқ вақт фойдаланилганда тўқималар илдиз морфогенезга бўлган қобилятини йўқотади.

Сунъий ауксинларнинг илдиз ҳосил қилиш фаоллиги витаминлар ва кўпинча аскорбин кислотаси билан биргаликда қўлланилганда стимулланади.

Бошланғич ўсимликларга ретардантлар билан олдиндан ишлов бериш ҳам илдиз ҳосил бўлишини сезиларли даражада стимуллайди. Регуляторларнинг бундай таъсири земляника, картошка, олма, олча, қорақат, крижовник ва бошқа ўсимликларда аниқланган. Барча ҳолатларда ҳам бошланғич ўсимлик қаламчалар кесилишидан олдин, ёки меристемалар ажратилишидан олдин, ретардантлар билан ишлов берилган ўсимликларнинг илдиз тизими яхши шаклланган. Бундай таъсирни бир қанча сабаблар билан тушунтириш мумкин, улардан энг ҳақиқатга яқини, ауксин ва гибберлинларнинг илдиз ҳосил бўлиши жараёнига таъсири бўйича улар орасидаги антагонизмидир. Антигибберлинлик хусусиятига эга бўлган ретардантлар, гормонлар нисбатини ауксиннинг фойдасига ўзгартириш орқали ризогенез жараёнини стимуллайди.

Ниҳол ҳосил бўлиши. Ниҳолнинг органогенези цитокинин гуруҳи фитогормонлари томонидан назорат қилиниши, барча турдаги ўсимликларнинг каллусли култураларида аниқланган. Цитокининларнинг озиқа муҳитида иштирок этиши каллусда куртак ҳосил бўлишини индуцирлайди. Каллусда вегетатив куртаклар шаклланишини стимуллашга йўналтирилган да озиқа муҳитидаги ауксин ва цитокининларнинг абсолют даражасига ва бу фитогормонларнинг нисбатига эътибор қаратиш лозим.

Ф.Скуга ва К.О.Миллер томонидан тамакининг дифференцияланмаган каллус тўқималари онтогенезини бошқаришда цитокининлар қатнашиши аниқланган. Тажрибаларда ИСК ва кинетин ёрдамида каллусда илдиз ва ниҳоллар ҳосил бўлиши чақирилган.

Ниҳол органогенезидаги доимий ҳоллардан бири қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришда муҳим аҳамиятга эга тугунакларнинг ҳосил бўлишидир. Бу жараён ауксинлар томонидан тўхтатилади, каллус културасида органогенез билан параллел ўтказишга йўл қўяди ауксинларнинг оширилган меъёри таъсирида илдиз ҳосил бўлади ва тугунакларнинг шаклланиши тўхтайди.

М. Х. Чайлахян ва бошқа тадқиқотчи олимларнинг фикрига кўра илдиз ҳосил қилишни фитогормонлар орқали бошқариш гибберлинлар ва абсциз кислота ёрдамида (АБК) қуйидаги тартибда амалга оширилади: олдин гибберлинлар таъсирида ниҳолларни ҳосил бўлиши ва ўсиши стимулланади, навбатдаги босқичда АБК таъсирида ниҳоллар ўсиши тўхтатилиши натижасида улар йўғонлашади ва ниҳолларда тугунаклар шаклланади. Картошка ўсимлигига АБК билан ишлов берилганда тугунаклар массасини ошириш ҳисобига ҳосилдорлиги анча юқори бўлади.

Каллус ҳосил бўлишини гормонлар орқали бошқариш. Ўсимликлар биотехнологияси ишларининг асосий босқичларидан бири, ниҳол, барг ва илдизнинг дифференцияланган тўқималаридан каллус тўқимасини олиш билан боғлиқ. Каллус тўқималари олишнинг асосини ўсимлик эксплант хужайраларининг дедифференцияланиши, уларни меристематик, бўлинаётган ҳолатига қайтариш ташкил этади. Бунинг учун 1) хужайраларнинг бўлиниш жараёнига тўсқинлик қилаётган хужайранинг структура элементлари модификацияси (иккиламчи қалин хужайра қобиғининг юпқаланиши); 2) митоз жараёнига жавобгар генларнинг экспрессияси амалга ошириш зарур.

Ўсимликларнинг шикастланган жойи каллус тўқимаси билан тез қопланиб, сўнг дифференцияланади. Кўп ҳолларда каллус меристема тўқималаридан, асосан камбийдан ҳосил бўлади. Бундай ҳолларда хужайра структураларининг модификациясига эҳтиёж пайдо бўлмайди.

Кўпинча *in vitro* шароитида каллус ҳосил қилиш учун эксплант дифференциалланиши жараёнини стимулловчиси сифатида таркибида юқори миқдорда ауксиннинг сунъий аналоги 2,4-Д тутувчи озиқа муҳитига экилади. Бундай стимуллашнинг механизмини ауксиннинг: “нордон ўсиш” самараси ҳисобига хужайра қобиқларининг юпқалашиши билан боғлиқ бўлган протон помпаларининг фаоллашиши, хужайра қобиғининг қисман гидролизланишини юзага келтирувчи қатор ферментлар синтезининг индукцияси, шунингдек, ДНК репликациясини индукциялаш каби регуляторлик таъсирлари билан тушунтириш мумкин. Бундан ташқари, шуни ҳам таъкидлаб ўтиш лозимки, айнан 2,4-Д цитокининнинг таъсири каби билан нуклеин кислоталар синтезини кучайтириш орқали хужайралар бўлинишини стимуллайди.

Каллус тўқималари узоқ вақт ўстирилганда улар шиш тўқималарига яъни ўсиши организм томонидан назорат қилинмайдиган тўқималарга айланиши мумкин. Бунинг сабаби, тўқима ўзининг бўлиниши учун зарур бўлган фитогормонлар (ауксин ва цитокинин) ни бошқа органлардан олмай, ўзини ичида синтезлаш

хусусиятига эга бўлишидир. Ташқи муҳитдаги фитогормонлар концентрациясининг ўзгаришига таъсирланмайдиган *in vitro* културасидаги шиш тўқималари, гормонга боғлиқ бўлмаган ёки “мослашган” тўқималар дейилади.

Гормонга боғлиқ бўлмаслик ҳолатининг пайдо бўлиши ўсимликлар биотехнологияси имкониятларини чегаралаб қўяди, чунки бу хусусиятга эга тўқима ҳужайралари дифференцияланиш, сўнгра етук ўсимлик регенерациялашга умуман қодир эмас. Гормонга қарам бўлмаслик сабаблари ва механизмини ўрганиш жуда муҳим бўлиб, нафақат қишлоқ хўжалик биотехнологияси муаммоларини ҳал қилишда, шунингдек инсонлардаги онкологик касалликларни даволаш йўллари топишда ҳам ёрдам бериши мумкин.

Каллус тўқималарини узоқ вақт ўстирилганда гормонга боғлиқ бўлмаслигини енгиш учун фитогормонлар ва уларнинг рецепторларининг ортиқча синтезини тўхтатиш лозим. Немис тадқиқотчилари тамакининг ауксинга боғлиқ бўлмаган морфогенезни индукциялаш бўйича жуда қизиқарли натижалар олишган, озиқа муҳитига бошқа фитогормонлар – брассиностероидлар киритилганда, каллус эмбрионид структуралар пайдо қилиш қобилиятини пайдо қилган. Каллуснинг морфоген қобилиятини оширишнинг яна бошқа йўли, каллус тўқималари ўсаётган озиқа муҳитга этилен ҳосил бўлишини тўхтатувчи сифатида кумуш нитратнинг киритилиши эмпирик равишда топилган.

Гормон статуси ўзгартирилган трансген ўсимликлар олиш

Табиатда гормон статуси ўзгартирилган трансген тўқималар пайдо бўлиш жараёnlари инсоният аралашувисиз содир бўлади.

Эволюция жараёнида агробактерияларнинг икки турида (*Agrobacterium tumefaciens* ва *A. rizogenes*) нафақат ҳўжайин ўсимлик генетик аппаратида фойдаланиб зарур оксилларни синтезлаш, балки шикастланган ҳўжайраларга пластик моддаларнинг доимий оқиб келиши, зарарланган ҳўжайраларнинг дедифференцияланиши ва пролиферациясини амалга ошириш механизмлари ҳам шаклланган.

Агробактериялар паразитлик механизмининг асосини-уларнинг бактерия оксилларини специфик генлари (нопалин ва октапин) билан бир каторда, ауксин ва цитокинин фитогормонлари синтезига жавобгар ферментлари генларини ҳам тутувчи ва ўсимлик хромосома ДНКсига уланувчи плазмидаларни ўсимлик ҳўжайрасига киритилиши ташкил этади. Натижада бу фитогормонлар даражаси ортади, ихтисослашган ўсимлик ҳўжайралари дедифференцияланади ва тўхтовсиз бўлиниб, *A. tumefaciens* билан зарарланган ҳўжайралар галлар (шишлар), *A. rizogenes* билан зарарланган ҳўжайралар эса кўплаб ипсимон енгил

илдизлар ҳосил қилади. Агробактерия плазмидаси ҳўжайин ўсимлик геномига бирикканида, ўсимлик ҳужайрасига ҳос бўлган фитогормонларнинг синтези тўхтатилиши ҳақидаги янги маълумотлар ҳам мавжуд.

Агробактерий плазмидалари асосида ўсимликнинг хромосома геномига генларни киритиш учун вектор тизимлар яратилган.

Ҳозирги вақтда ўсимликлар ген муҳандислиги соҳасидаги ишлар гербицидлар, патогенлар ёки зараркунанда ҳашаротларга чидамли ўсимликларнинг бошланғич шакллари олиш билан боғлиқ. Бундай тор даражадаги йўналтириш асосан 2 та сабабга боғлиқ деб кўрсатиш мумкин: Биринчидан, ўсимликларга юқорида қайд этилган хусусиятларни бериш заҳарли кимёвий моддаларни қўлланиш заруратини анча қисқартиради, ўсимликшуносликда катта экологик ҳавфсизликни таъминлайди; Иккинчидан, ўсимликлар генетик муҳандислигини ривожланиш даражаси бугунги кунда ўсимлик геномига генларни киритиш ва уларнинг экспессияланишини амалга ошириш имкониятини беради.

Саноат ўсимликшунослиги амалиётида нафақат серҳосил ҳосилли ва чидамли ўсимликлар, шунингдек ўсишнинг муайян характериға эға, об-ҳаво ва агротехника шароитларига ҳамда кишлоқ ҳўжалик техникасига мослаштирилган ўсимликларни яратиш жуда муҳим бўлиб қолди. Бу ҳосилни йиғиш жараёнини механизациялашда муҳим аҳамиятға эға. Бундай ҳолларда ўсимликларнинг фитогормон статусини ферментлар генлари “меъёрини”, синтезини ўзгартириш ёки унинг промоторини алмаштириш ҳисобига у ёки бу фитогормон маҳсулотини ошириш ёки камайтириш орқали бошқариш мақсадға мувофиқдир.

Фитогормон статуси ўзгартирилган ўсимликлар яратишнинг истиқболли аҳамияти билан боғлиқ ҳолда дунёнинг кўпгина мамлакатларида бу ишлар бажарилмоқда. Масалан: Россия олимлари И. В. Корнеева, В. В. Мазин, М. Н. Агафодорова (1999) беданинг гормонал статуси ўзгартирилган трансген ўсимлигини олишган. Трансформант ўсимликлар бошланғич шаклларида ер устки қисми, баргларининг яшил рангини узоқ вақт сақлаши, ниҳолларининг узунлиги, бутадаги шохлар оралиғини яқинлиги ва сонининг кўплиги, илдизининг массаси, ризогенезға бўлган қобиляти, репродуктив органларининг морфофизиологик характеристикалари бўйича, эркин пролиннинг миқдори бўйича, протеин, хлорофилл ва каротиноидларни юқори миқдорда тутиши бўйича фарқланади. Муаллифлар бу фарқларни ўсимликлардаги фитогормонлар ва гормонсимон моддаларнинг нисбати ва концентрациясидаги силжиш ва генларнинг гетерологик экспрессиясига ўсимликларнинг корреляцион ва

адаптацион жараёнлари билан жавоби эканлигини таъкидлашади. Баргларининг яшил рангни узоқ вақт сақлаши, улардаги баргларнинг қариши ва хлорофиллнинг парчаланишини тўхтатувчи цитокининлар миқдорининг юқорилиги билан боғлиқ.

Трансформацияланган ўсимликлардан ҳўжалик аҳамияти қимматли хусусиятлар манбаи сифатида: беданинг озикалик сифатини яхшиланиши, уруғ маҳсулдорлигининг ва стрессларга чидамлилигининг ошиши, уларнинг яйловларда ўсишга мослашган, рақобатбардош навларини яратишда қимматли селекцион материал сифатида фойдаланиш мумкин.

Фитогормон ва фиторегуляторларни олишнинг биотехнологик усуллари

Микроорганизмлар ёрдамида фитогормонларни яхлитлигича ёки қисман синтезлаш мумкин. Айнан шу йўл билан гибберлинлар, фузикооксинлар олинади, абсциз кислота ишлаб чиқариш йўлга қўйилмоқда, брассиностероидларни синтезлаш учун зарур маҳсулотлар ишлаб чиқарилмоқда.

Сўнгги вақтларда микроорганизмлардан, айниқса, визиккуляр-арбускуляр микориза комплекси компонентларидан ажратилган, умумий стимуляторлик таъсирга эга, юқори самарали фиторегуляторлар пайдо бўлди. Бунга *симбионт-2* ва *эмистим* препаратларини мисол қилиб келтириш мумкин. Бу бирикмалар ауксинлар ва цитокининлар типи бўйича таъсир этиб, у ёки бу ўсимлик културасида турлича намоён бўлувчи қатор хусусиятларга ҳам эга. Кўпчилик микробиологик синтез қилинган препаратлар витаминлар каби таъсир этиб, бир қатор биокимёвий реакцияларни фаоллаштириш натижасида ҳосилдорликни оширади ёки бошқа ижобий хусусиятларни намоён қилади. Бундай препаратларнинг жиддий камчиликларига уларнинг кўп таркиблилиги сабабли таъсир этувчи асосини ажратиш, уларнинг регулятор аралашмалари компонентларининг заҳарли таъсирини аниқлаш, бутун препарат ва уларнинг қолдиқлари аралашмасини назорат қилиш қийинлигидир.

Ўсимликшуносликда фитогормон ва ўсишни бошқарувчи регуляторлар

Ўсимликлар ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи регуляторлар 1950-1960 йиллардан кўп йиллик ўсимликлар қаламчаларида илдиз ҳосил қилиш, сўнгра ғалла экинларининг ерга ётиб қолишини олдини олишда қўлланила бошланди, ҳозирги кунда эса регулятор моддалар қишлоқ ҳўжалиги ўсимликларини кўпайтиришнинг барча интенсив технологияларида фойдаланилади. Фиторегуляторлар ёрдамида

ўсимликларнинг ташқи ноқулай таъсирларга чидамлилигини ошириш, баъзан юқори ҳосилли навларнинг камчиликларини йўқотиш мумкин.

Онтогенезни бошқариш. *Тиним даври ва уни бошқариш усуллари.* Ўсимликларни тиним даври бу организмнинг ташқи ноқулай шароитга бардошлилигининг эволюцион мослашишдир. Шунингдек у киши кунларининг паст ҳароратига чидамлик ҳосил қилиб, яшаш усули сифатида ҳам шаклланган. Тиним даври шаклланишининг бошқа шароитлари ҳам маълум бўлиб, уларга ярим чўллардаги қурғоқчиликни киритиш мумкин. Бундай шароитларда ўсишга эфемер-ўсимликлар мослашган бўлиб, уларнинг вегетатив даври жуда қисқа, заҳираловчи орган (пиёздан) дан униб, уруғ ҳосил қилгунга қадар ўтган вақт бор йўғи бир неча ўн кунни ташкил этади. Ўсимликларнинг тиним даврига ўтишини эндоген омиллар билан бир қаторда ташқи омиллар ҳам индуцирлайди.

Тиним даврига бутун ўсимлик ва унинг алоҳида қисмлари ёки органлари ўтиши мумкин. Бундай ҳолатга мисол қилиб, ўсимликнинг ер устки қисми ва илдизи жадал ўсиши давом этаётган вақтда пиёзи, тугунаклари, куртаклари ва уруғларининг тиним даврига ўтишини келтириш мумкин.

Куз бошидан то баҳор ойларигача чўзиладиган тиним даври узок давомли тиним даври деб аталади. Ўсимликнинг тиним даврида моддалар алмашилиши бутунлай тўхтаб қолмайди. Узок давомли тиним даври чуқур ва мажбурий тиним даврларидан иборат:

Чуқур (физиологик) тиним даврини картошка ва дарахт куртакларида кузатиш мумкин. Дарахтлар ёз, куз фасллари давомида яъни ўсиш учун жуда қулай бўлган шароитда тиним давридаги ҳимоясини таъминловчи тангачалар билан қопланган уруғ ва қишлоғчи куртаклар ҳосил қилади. Ўсимликларнинг чуқур тиним давридан чиқиши кўпинча уларнинг паст ҳароратли ($0-5^{\circ}\text{C}$) шароитда етарли даражада узок вақт (250-1000 соат) бўлиши билан боғлиқдир. Маълум муддат ўтгандан сўнг шароит ноқулай бўлишига қарамай, куртак ва тугунакларда ўсиш жараёни бошланганини кузатиш мумкин.

Ташқи ноқулай омиллар таъсирида ўсимликлар ўсишдан тўхташи ва ўсиш шароити яхшиланганда эса, дарҳол яна ўсишга ўтишини мажбурий тиним даври дейиш мумкин. Кўпчилик ўтчил ўсимликлар, масалан турли бошоқли ва икки паллали бегона ўтлар қишда вегетация учун паст бўлган 0°C га яқин ҳарорат таъсирида мажбурий тиним даврига ўтади. Ҳарорат кўтарилганда эса бундай ўсимликлар яна ўсишни давом эттиради.

Ўсимликларнинг тиним даврини бошқариб-ўсимликлар ўсиши учун қулай шароитлар юзага келганда уларнинг ўсишини таъминлаш

орқали уларнинг яхши ривожланиши ва ҳосилдорлигини оширишга эришиш мумкин.

Уруғлар униши ва ўсишини регулятор моддалар ва яна бир қанча таъсирлар ҳисобига стимуллаш мумкин. Масалан, раъногулдошлар оиласига мансуб мевали дарахтлар уруғларининг тиним даври давомийлиги уруғ қобиғининг ўтказувчанлиги билан белгиланади. Уларнинг уруғ қобиғини эритишга қодир моддаларни ажратиш фаолияти юқори микрофлорада узоқ вақт бўлиши натижасидагина уруғлар униши табиий шароитда стимулланади. Бундай ҳолларда уруғлар унишини скарификация қилиш, яъни уруғлар қобиғини қандайдир йўл билан парчалаш орқали тезлаштириш мумкин.

Уруғлар секин унишининг асосий сабаби, унинг таркибидаги ингибитор табиатли моддаларнинг иштирок этишидир. Уруғкуртак шакллана бориши билан ўсишни ингибирловчи моддалар унда, ёки уни ўраб турувчи тўқималарда тўпланиб боради. Улар бу ерга уруғкуртакнинг моддаларни ўзига тортиш хусусияти орқали ёки уруғкуртакни ўраб турган тўқималарда синтезланиши орқали аста-секин ассимлянтлар билан тушади. Уруғлар унишининг табиий ингибиторларига абсциз кислота, жасмин кислота каби фитогормонлар, шунингдек, ҳозирги кунга қадар тўлиқ ўрганилмаган қатор фенолли бирикмалар киради.

Уруғларнинг унувчанлиги пастлигининг бошқа сабаби, уруғкуртакнинг ўсиши учун зарур бўлган заҳира моддаларни осон эрувчи мономерларга парчаловчи гидролазалар фаоллигини оширувчи стимулятор моддалар, айниқса, гибберлиннинг ва ҳужайраларнинг бўлиниш жараёнларини фаоллаштирувчи цитокининларнинг танқислигидир. Стимулятор моддаларнинг танқислигининг сабаби, уруғкуртакнинг она ўсимликдан эрта ажратилиши, унинг фитогормонлар синтезлаш қобилятининг йўқлиги, фитогормонларни заҳира шаклидан фаол шаклга ўтказувчи ферментлар фаоллигининг пастлиги, гормонларни парчаловчи фермент комплексларнинг юқори фаоллиги билан боғлиқдир.

Стимулятор моддалар миқдорини оширувчи ёки ингибитор моддалар миқдорини камайтирувчи фиторегуляторлар уруғлар унишини тезлаштиради ва аксинча.

Уруғлар унишини фиторегуляторлар ёрдамида стимуллаш ўсимликларда кенг қўлланилади. Улар таъсирида уруғкуртакларнинг тупроқ намлигидан фойдаланиш, бегона ўтлар билан рақобатлашиш қобиляти ҳам ортади ва ҳосилдорлиги ошади. Айниқса сабзавотлардан бу йўналишда яхши натижалар олинган.

Ўсишни тўхтатиш орқали уруғларнинг тиним даврини узоқроқ чўзиш ҳам мумкин. Бу тиним даври суст бўлган ўсимликлар учун катта

аҳамиятга эга бўлиб, ҳосил йиғим –терим вақтида намликнинг юқори бўлиши уларда энзим микоз танқислигининг пайдо бўлиши (ЭМТ) га, ёки уларнинг она ўсимлик ичида ўсиши ҳосилнинг камайишига сабаб бўлади. Юқорида қайд этилган камчиликларга қарши курашда бу фитогормонлар миқдорини камайтирувчи ёки фаоллигини оширувчи, гидролитик ферментлар фаоллигини оширувчи антигибберлин таъсирига эга фитогормонларни қўллаш, шунингдек, ўсишни тўхтатувчи ингибиторлар миқдорини оширувчи фиторегуляторлар, масалан, этилен маҳсулотларидан фойдаланиш катта аҳамият касб этади. ЭМТ га қарши фиторегуляторлар билан ишлов бериш ҳам донни сақлашдаги йўқотишларнинг олдини олишда қўшимча ижобий таъсирга эга бўлади.

Уруғларнинг тиним ҳолатини стимулланиши қишлоқ хўжалик ўсимликларини кузда экилишида ҳам аҳамиятга эга. Кузда экилган уруғ эрта баҳорда униб чиқади, бунда ниҳоллар эриган қорнинг намлигидан ўзининг ўсиши ва ривожланиши учун фойдаланиш имкониятига эга бўлади, бу эса юқори ҳосилни таъминлайди. Шу билан бир вақтда кунлар илий бошлаши билан чуқур тиним ҳолатидан чиққан уруғлар униб ўса бошлайди, лекин кунинг такрорий совиши бундай экинларга тузатиб бўлмас зарар келтириши мумкин. Бундай ҳолларда уруғнинг чуқур тиним даврининг давомийлигини бошқариш, уруғларнинг вақтидан олдин унишини олдини олиш, тупроқ намлигидан максимал даражада фойдаланишининг оптимал шароитини топиш имконини беради. Бунинг учун, экиш олдидан уруғларга гидрофоб пленкалар қоплаш билан биргаликда ўсишга ингибитор таъсир кўрсатувчи фиторегуляторларнинг қўлланишни яхши самара беради.

Ўсимликларнинг вегетатив органлари ва уруғларини тиним ҳолатига ўтиши ва ўсишини бошқариш механизми деярли бир хил. Бундай бошқаришнинг мақсад ва усуллари ҳам бир хилдир.

Бизнинг мамлакатимизда картошкадан бир йилда икки марта ҳосил олиш учун тугунакларнинг тиним ҳолатидан чиқишини ўсишини стимулловчи фиторегуляторлардан фойдаланиш орқали амалга ошириш мумкин. Бунинг учун тугунаклар гибберлин ва тиомочевина эритмаларида қисқа вақт ивителиди.

Аскинча, чуқур тиним ҳолати стимулланганда, тугунакларни унишини кескин равишда тўхтайди ва қишлоқ хўжалик экинларини сақлаш учун қўйилган илдиз мевалар, пиёзларнинг сифати бузилмайди ва ёз ойларигача деярли тўлиқ сақланади. Тиним даврини чўзиш учун тугунакларни сақлаш учун жойлаштиришдан олдин ёки ўсимлик ҳосили йиғиб олинанишидан олдин этилен продуцентлари билан ишлов берилади. Этилен тиним ҳолатига жавобгар фитогормон-абсциз кислотанинг биосинтезини стимуллайди. Шунингдек, этилен

томонидан фитоалексин моддаларнинг ҳосил бўлиши индуцирланади. Бу моддалар ёрдамида ўсимлик патоген замбуруғларга қарши курашади, шунингдек, патоген замбуруғларнинг хужайра қобиғини парчаловчи хитиназа ферментининг фаоллигини оширади. Тиним даврига ўтказиш ва тиним давридан чиқаришни бошқариш усуллари кўп йиллик дарахтлар учун ҳам муҳим аҳамиятга эга. Бу ўсимликларни қишнинг ноқулай шароитидан сақлаш ўсимликларнинг тиним ҳолатда бўлиши билан боғлиқ. Ҳозирги кунда мевали дарахтларнинг тиним даврини стимуллаш усуллари яратиш ишлари олиб борилмоқда.

Поянинг ўсишини стимуллаш. Ўсимликлар ўсиши-хужайраларнинг бўлиниш ва чўзилиш жараёнларидан ташкил топган бўлиб, нафас олиш, фотосинтез, ўсимликлардаги моддаларнинг транспорти, сув ва минерал озиканинг тушишини таъминловчи биологик жараёнлар йиғиндисидир. Ҳар қандай фиторегулятор қўлланилганда ўсимликлар ўсишига қандайдир таъсир кўрсатади.

Ўсимликлар оламида гигантизм ва паканалик фактлари кузатилиб, улардан ўсимликшунослик амалиётида кенг қўлланилади. Бундай ҳолатнинг асосий сабаби фитогормонларни бошқариш тизимиининг бузилиши бўлиб, натижада ўсимлик бўйининг хаддан зиёд ўсиб кетиши ёки пакана бўлиши кузатилади.

Ўсимликларнинг илдиз тизими ауксинлар, пояси гибберлинлар, генератив аъзолари брассиностероидлар, гибберлинлар ва цитокининлар томонидан стимулланади.

Кўпчилик ўсимлик ниҳолларининг ўсиши субапикал зонадаги хужайраларнинг бўлиниши ва чўзилишини фаоллаштирувчи гибберлинлар томонидан стимулланади, этилен, абсцис кислота ва баъзи фенолли моддалар, томонидан тўхтатилади (ингибирланади). Ниҳолнинг ўсиш характери апикал доминантликни стимулловчи ауксинлар томонидан ва бу жараёни тўхтатувчи цитокининлар томонидан белгиланади. Ўсимлик хужайраларига гибберлин аналоглари киритилганда, гибберлинлар миқдорининг ортиши натижасида, унинг ўсиши бўғин оралиғи масофасининг чўзилиши ҳисобига стимулланади. Аммо, бунда поя ингичкалашади, унинг механик мустаҳкамлиги ва ёғочланиш даражаси пасаяди. Турли хил оилаларга мансуб ўсимликларнинг гибберлинларга таъсирчанлиги турличадир. Масалан қовоқдошлар оиласи вакиллари ниҳолларининг ўсиши фақат ГК₄ ва ГК₇ томонидан, ғалладошларда эса ГК₁ ва ГК₃ томонидан стимулланади. Гибберлин аналогларининг нархи қимматлиги сабабли амалиётда ниҳолларнинг вегетатив ўсишини стимуллаш ҳозирча кенг тарқалмаган. Бу препаратларни олишнинг

арзон технологиялари ишлаб чиқарилса, ўсимликларни яшил массасини ўстиришда қўллаш муҳим аҳамият касб этиш мумкин.

Ўсимликларга брассиностериод ва фузикокцинлар аналоглари билан ишлов бериш орқали ҳам уларнинг ўсишини тезлаштириш мумкин, лекин бу препаратлар қимматлиги учун улардан бу мақсадда кам фойдаланилади.

Шунингдек, ниҳоллар ўсишини тезлаштириш учун гумин ва фульвокислота препарати эритмаларидан, шунингдек симбиотик бактериялар ва замбуруғлардан микробиологик синтез қилинган бир қатор препаратлардан фойдаланиш ҳам мумкин. Бу препаратларнинг таъсир механизми ҳозиргача тўлиқ ўрганилмаган.

Ўсимликшунослик амалиётида ниҳолнинг бўйига ўсишини тўхтатишни ҳам бошқариш мумкин. Фиторегуляторлар орасида ўсимликларнинг вегетатив ўсишини тўхтатувчи *ретардантлар* ҳам муҳим ўринни эгаллайди. Бу синф фиторегуляторларининг биринчи препарати 1950 йилда АҚШ профессори Толберт томонидан синтезланган ва буғдойнинг ерга ётиб қолишини олдини олишда самарали қўлланилган саноат аҳамиятига эга бўлган. Кейинги йилларда бу фитогормонлар синфи ўсишни бошқарувчи фаолликка эга бошқа кимёвий бирикмалар гуруҳлари билан тўлдирилди.

Ретардантларнинг таъсир механизмидаги фарқ, бу препаратлар компонентларининг синергик таъсирга эга композицияларини яратиш имконини берди. Этилен продуцентлари балан аммонийнинг тўртламчи тузлари, триазол ва гидразин маҳсулотлари аралашмаси синергизм хусусиятига эга компонентларнинг муайян концентрациялари ва нисбатларида синергизм намоён бўлади ва аралашма таркибига кирувчи препаратлар, гибберлинларнинг фитогормонал фаоллигининг амалга ошиши ёки биосинтезнинг турли босқичларига таъсирига асосланган.

Ретардантлар эритмаси пуркалган ғалла экинларида поясининг қисқаради ва йўғонлашади, ерга ётиб қолиш ходисалари кузатилмайди.

Фотосинтезни бошқариш. Фитогормон тизимининг барча компонентлари фотосинтезга қандайдир таъсир кўрсатади. Лекин бу жараён асосан цитокининлар ва абсциз кислота томонидан назорат қилинади.

Цитокининлар хлорофилл синтезини, хлоропластларнинг дифференцияланишини стимуллайтиди ва оғизчалар очилишини таъминлайди. Абсциз кислота эса оғизчаларни ёпилишига жавобгардир.

Фиторегуляторларнинг фотосинтез жараёнига таъсири морфология билан ҳам боғлиқ бўлиши мумкин, масалан фотосинтезнинг

маҳсулдорлиги барг пластинкаси қиялик бурчагининг пояга нисбатан ўзгариши билан ўлчанади.

Фотосинтез жараёнига ретардантлар ҳам таъсир кўрсатади. Бу препаратлар ўсимликларнинг вегетатив ўсишини қисқартириш ва генератив органлар пайдо бўлиш жараёнларини стимуллаш мақсадида қўлланилганда, кўпинча, барглар майдони, хлорофилл миқдори, баргдаги қанд миқдорини ошириши билан бирга бориши кузатилган.

Фотосинтезнинг умумий маҳсулдорлигини оширувчи препаратлар орасида, фотонафас олиш регуляторлари алоҳида ўринни эгаллайди. Фотонафас олишни пасайтирувчи фиторегуляторлар (миксталол ва бошқалар) нинг таъсир механизми етарлича ўрганилмаган.

Моддалар ташилишини ва ҳосилнинг сифатини бошқариш. Ўсимликларда моддаларнинг транспортини гормонлар орқали бошқарилиши кам ўрганилган. Бу жараёни бошқаришда ауксинлар, гибберлинлар ва цитокининлар ҳамкорликда қатнашиши ҳам аниқланган.

Фотосинтез маҳсулотларининг баргдан захира органларга ташилишини стимуловчи қатор сунъий фиторегуляторлар яратилган. Улар орасида 3,6-дихлор-2-метоксибензой кислота метил эфири (дизугран ёки ракуза) ва N,N- *бис* (фосфонометил) глицин (глифосин ёки поларис) нинг самараси юқоридир. Булардан биринчиси қанд лавлагида, иккинчиси эса шакар қамишида яхши самара берганлиги ҳақида маълумотлар олинган. Фиторегуляторлар баргдан ассимилянтларнинг ташилишини фаоллаштириб, фотосинтезнинг умумий маҳсулдорлигини оширади, ҳосилнинг сифатини яхшилади.

Ўсимликларнинг абиотик стрессларга чидамлилигини бошқариш. Ерда хароратнинг кўтарилиши қурғоқчиликнинг ортишига сабаб бўлади ва натижада қишлоқ хўжалик маҳсулотларини етиштиришнинг камайишига олиб келиши мумкин. Бунга йўл қўймаслик учун ўсимликларнинг сув танқислигига чидамли навлари селекцияси олиб борилмоқда. Юқори хароратнинг ноқулай таъсирларини енгишга йўналтирилган чоралар ишлаб чиқилмоқда. Бунда антистресс таъсирга эга фиторегуляторлар яратишга катта эътибор қаратилмоқда.

Маълумки, цитокинин, абсциз кислота ва брассиностериод фитогормонлар ўсимликларни стресс таъсирларга чидамлилигини оширади. Фитогормонларнинг бу хусусияти, уларнинг ўсимлик ҳужайраларида стресс оксиллар синтезини стимуллаши билан боғлиқ.

Стресс оксиллар – тирик организмнинг стресс таъсирлардан ўз – ўзини ҳимоя қилишининг махсус механизмидир. Бу моддалар организм томонидан ташқи муҳит шароитининг кескин ўзгаришига жавобан ишлаб чиқарилади, шу билан бирга стресснинг табиатига қараб,

махсус яъни айнан шу таъсир турига характерли стресс оксилларни пайдо қилиши мумкин. Стресс оксилларни ўрганиш 1980 йилларни иккинчи ярмидан бошланди. Бу моддаларнинг структураси ва ҳужайралардаги роли ҳақида баъзи маълумотлар олинган. Бу оксиллар орасида иссиқлик шоки оксиллари (ИШО) кўпроқ ўрганилган.

ИШО 1974 йилда ҳайвонларда, сал кейинроқ ўсимликларда аниқланган. ИШОнинг микроорганизмлар, ўсимликлар, ҳашаротлар, паррандалар ва сут эмизувчиларда ҳам бир хил эканлиги эътиборни тортади. Бу оксилнинг келиб чиқиши барча организмлар консерватилигидан ва қадимийлигидан далолат беради. ИШО организмда стресс ҳарорат юзага келганда яъни ҳарорат нормадан $8-10^{\circ}\text{C}$ юқори бўлганда синтезлана бошлайди. Унинг синтезланиш ҳарорати турли ўсимликларда турлича бўлиб, масалан, арабидопсисда – 37°C , буғдойда – 40°C , шолида – 45°C ни ташкил этади. ИШО нинг синтези жуда тез амалга ошади. ИШО нинг ахборот РНКси стресс бошлангандан 5 дақиқа ўтганидан сўнг пайдо бўлади, яна 10 дақиқадан сўнг эса ИШОнинг ўзини аниқлаш мумкин. Стресс бошлангандан 1,5-2 соат ўтганидан сўнг, ҳужайрада ИШО нинг максимал концентрацияси юзага келади ва бу миқдор 2-4 соат давомида ушлаб турилади. Стресс таъсир давом эттирилганда организм нобуд бўлади. Стресс таъсир тўхтатилганидан 2 соат ўтгандан сўнг эса ИШО биосинтези тўхтайтиди, ИШОни ўсимликларда тахминан икки кунгача аниқлаш мумкин.

ИШОни биосинтезини бошқарилиши ген даражасида ИШО генларининг промотори ҳудудида махсус регулятор элементлар (RE) ёрдамида, шунингдек транс – омил (tF) регулятор оксиллар ёрдамида амалга оширилади. Стресс юзага келганда транс омил регулятор элементлар билан қайтар ҳамкорликка киришади ва бу билан ИШО синтезини амалга оширади.

ИШО келиб чиқишининг умумийлиги ва қадимийлигининг исботи оддий организмлар, ўсимлик, ҳайвонлар регулятор элементлари ва транс омилларнинг тузилишидаги ўхшашликдир.

Ҳужайрада ИШО синтези бошланиши билан бошқа оксилларнинг синтези секинлашади ёки умуман тўхтайтиди. Бу унинг қуйидаги хусусиятлари билан боғлиқ: қоида бўйича ИШО генларида интронлар мавжуд эмаслиги, процессингга кетадиган вақт ва энергия сарфларини кескин қисқартиради, полисомалар ҳосил бўлишида ИШО матрицаси бошқа оксилларнинг ахборот РНКсига нисбатан устунлик қилади. Бу уларнинг 3'-учидаги лидер изчилликларнинг тузилиши билан боғлиқдир.

ИШО ва бошқа стресс оксилларнинг абсолют миқдори хатто уларнинг энг юқори концентрациясида ҳам жуда кам бўлиб, фақат

радиоактив нишон ёрдамидагина аниқланиши мумкин. Ҳозирги кунга қадар ҳаммаси бўлиб 100 га яқин индивидуал ИШОлар ўрганилган.

Ўсимлик ҳужайраларида цитокининлар ва брассиностериодлар томонидан синтези стимулланадиган оксилларга, ИШОдан ташқари, стресс оксилларнинг яна қатор гуруҳларини киритиш мумкин, улар орасида синтези абсциз кислота томонидан фаоллаштириладиган синикация оксиллари (СО) ҳам олимларнинг эътиборини тортмоқда. Бу оксиллар ўсимлик уруғларининг намлигини сақлаши, осмотик ва туз стрессларига чидамлилиги, кучли сув бўғланишида сувни кескин йўқотилиши каби жараёнларда сувнинг сақланишини таъминлайди. СО ИШО оксилларига нисбатан кам ўрганилган. Улар ҳақида фақат юқори даражадаги гидрофил оксилларни намоён қилишигина маълум. Бу уларнинг коллоид эритмалар ҳосил қилиш орқали ҳужайрада губка каби сув захирасини яратиш хусусияти билан боғлиқ.

Осмотик ёки шўрланиш стрессларига жавоб тариқасида ҳосил бўладиган СОнинг даражасидан кўпинча ўсимликларнинг қурғоқчилик ва шўрланишга чидамлилиқ кўрсаткичи сифатида фойдаланилади.

Ўсимликшунослик амалиётида ўсимликга ташқи омилларни аста – секин таъсир эттириш орқали уларни ноқулай шароитида ўсишга чиниқтириш ишлари амалга оширилмоқда. Чиниқтиришнинг физиологик моҳияти стресс-оксиллар миқдорини секинлик билан ошириш орқали организмнинг ўзгарган ташқи муҳитида яшашини таъминлашдан иборатдир. Фитогормонларнинг бу хусусияти аниқланиши билан ўсимликларнинг абиотик стрессларга чидамлилигини оширишнинг қўшимча имконияти пайдо бўлди.

Ҳозир бутун дунёда ўсимлик кимёгарлари ва физиологлари антистресс таъсирга эга препаратларни излаб топиш ишларини олиб бормоқдалар. Аниқланишича, цитокинин аналоглари шундай таъсирини пайдо қилиши мумкин экан. Аммо, цитокининларнинг яқин структуравий аналоглари (6-БАП, кинетин) таннархининг қимматлиги учун кенг фойдаланилмайди. Цитокининларнинг узоқ структурал аналогли картолинларнинг топилиши юзага келган вазиятдан чиқишга сабаб бўлса ажаб эмас.

Картолинлардан аввал ўсимлик ҳужайралари култураси ўсишини бошқариш учун цитокининларнинг ўрнини босувчи сифатида фойдаланилган. Кейинги изланишлар натижасида бу моддаларнинг кенг таъсир спектрига эга эканлиги аниқланди, масалан, ғалла ўсимликлари (арпа, буғдой, сули) картолинлар билан ишлов берилганда уларнинг сув танқислигича, юқори ва паст ҳароратга, шунингдек замбуруғ патогенларга чидамлилиги ошганлиги аниқланди.

Бундай кўп функциялик картолинга хос бўлган турли стресс оксиллар синтези, геномининг фаоллиги ва ўсимликлар метаболизмини стимуллаши каби хусусиятлари билан боғлиқ. Картолин билан ишлов бериш билан буғдой ва арпанинг совуққа чидамлилигини оширишга, куруқ массасининг ҳўл массасига нисбатан, хужайрадаги боғланган сувнинг эркин сувга нисбатан нисбатининг ошиши, шунингдек, углеводлар ва сувда эрувчи оксилларнинг хужайрада тўпланиши ҳисобига эришилади. Бу шундан далолат берадики, биосунъий жараёнлар интенсификацияси натижасида хужайраларнинг чўзилиш орқали ўсиш вақтинча тўхтайди, уларнинг вакуолизацияси, цитоплазма ҳажмининг ортиши ва тўқималарнинг қаттиқ совуққа чидаш имконини берувчи структуравий ва фазовий ташкилланиши амалга оширилади.

Картолин билан ишлов берилган ўсимликларда курғоқчиликка чидамлилигининг ривожланишида метаболизмнинг фаоллашиши ҳам аниқланган. У сув тансиқлигини бошдан кечираётган хужайралардаги РНК- полимераза фаоллиги, оксиллар синтезининг тезлашиши ва уларнинг денатурацияланиш хароратининг ошиши, полисомаларнинг парчаланишини тўхтатилиши, хлорофиллар биосинтезини ва унинг фотохимёвий фаоллигини таъминловчи хлоропластлар мембрана тизимининг турғунлигини стимулланиши натижаси ҳисобланади,

Ўсимликларни ҳимоя қилиш тизимида фиторегуляторлар. 1940-1950 йилларда фиторегуляторлардан қишлоқ ҳўжалик ўсимликларининг зараркунанда ва касалликларига қарши курашда фойдаланиши мумкинлиги аниқланган, лекин фақат, ҳозирга келиб, регулятор моддалар ҳақидаги бир томондан патоген ёки зараркунандалар орасидаги ҳамкорлик ва иккинчи томондан, ҳўжайин-ўсимлик билан ўзаро алоқаси ҳақидаги замонавий тасаввурлар ривожланиши натижасида фиторегуляторлардан ўсимликлар тизимини ҳимоя қилишда самарали ва йўналтирилган фойдаланиш имконияти пайдо бўлди.

Зараркунандалар ва касаллик чақирувчи организмлар ўзи учун қулай шароит яратиш орқали ҳўжайин ўсимликка регуляторлик таъсир кўрсатади.

Жуда кўп паразит организмлар цитокинин аналогларини синтезлайди, улар хужайраларни зарарлаб цитокинин билан бойитади, ўзининг ривожланаётган жойига ўсимликнинг бошқа қисмларидан озиқа моддаларнинг тушишини таъминлайди. Масалан, сарғайган баргнинг замбуруғлар билан зарарланган қисми «яшил оролчалар» кўринишида бўлади, чунки сарғайган қисмидан озиқа моддаларни ўзига тортиб олади. Шундай «яшил оролчалар» ўсимлик баргида хашаротларнинг личинкаларини пайдо қилади, бу личинкалар барг

ҳужайраларига сўлак безларидан цитокининларни юборади. Паразит ўсимлик зарпечак (*Cuscuta reflexa*) ҳам юқори миқдорда цитокинин тутади, бу унга ҳўжайин ўсимлик ҳужайрасидан озиқа моддаларни олишига ёрдам бериши эҳтимолдан ҳоли эмас.

Сўнгги йилларда ўтказилган катор изланишлар натижасида хашаротларнинг ўзининг ривожланиши учун ўсимликларнинг баъзи гормонларига эҳтиёж сезиши, бу гормонлар хашаротлар организмида ўсимликларнинг регулятор моддаларига айланиши кўрсатилган. Бу биринчи марта чўл чигирткасининг нормал жинсий етилиши учун озиқа билан биргаликда гибберлин ГҚ₃ нинг нормада тушиши талаб етилиши орқали аниқланган. Бошқа фитогормон брассинолид хашаротларнинг туллашини тезлаштиради, бу брассиностериодлар ва экдизонларнинг кимёвий тузилиши ўхшашлиги билан боғлиқ бўлиши мумкин. Шунингдек, абсциз кислотанинг хашаротларнинг ювенил гормонлари ва тубан замбуруғлар жинсий ривожланиш гормони триспора кислотаси билан ҳам ўхшаш тузилишга эга эканлиги аниқланган.

Зараркунандалар ўзларининг нормал ривожланиши учун озиқа билан бирга ўсимлик гормонларини ҳам олиш зарурати тадқиқотчиларнинг бу ёки тузилиши жиҳатидан шунга яқин бошқа шу каби моддалардан инсектицидларнинг янги авлодларини яратишда фойдаланиш ҳақидаги фикрларининг пайдо бўлишига туртки бўлди. Бу препаратлардан фойдаланилганда хашаротлар сонини камайтириш ёки улар келтирган зарарини қисқартиришга метаболизмнинг қайсидир зарурий звеносини тўхтатиш ҳисобига эмас, балки метаморфоз бошланиш вақтини ўзгартириш ёки жинсий етилишга таъсир этиш орқали эришиш мумкин.

Ўсимликлар эволюция жараёнида патоген ва зараркунандаларга қарши ўзининг ҳимоя тизимини яратган. Бу тизимнинг сигнал ва регулятор маркази этилен фитогормони ҳисобланади. Патоген ва зараркунандалар таъсирида пайдо бўлган жароҳатларда этилен биосинтези кескин ошади. Этилен синтезининг автокатолиз хусусияти бу фитогормоннинг миқдори фақатгина шикастланган жойида эмас, балки бутун ўсимликда ошишига олиб келади.

Ўсимлик ҳужайраларидаги этиленнинг юқори миқдори фитоалексинлар (ўсимликларда антибиотик ролини бошқарувчи моддалар)нинг ҳосил бўлишини стимуллайди, хитиназанинг (хашаротлар овқат ҳазм қилиш тизимида хитинни ва патоген замбуруғлар гифлари қобиғини ташкил этувчи хитинсимон моддаларни парчаловчи ферментлар) фаоллигини оширади, ҳужайраларнинг бўлиниш ва ўсиш жараёнларини тўхтатувчи ва стресс оксиллар синтезини стимулловчи фитогормон – абсциз кислотанинг синтезини стимуллайди. Этилен баъзи ўсимликларда кўпгина

хайвонлар учун зарарли бўлган ва ўсимликлар ўсишини ингибирловчи фенолли моддалар миқдорини оширади.

Этиленнинг ҳимояловчи таъсиридан қишлоқ хўжалик экинлари маҳсулотлари (картошка, пиёз, илдизмевалар)ни сақлашдаги касалликлардан ҳимоя қилишда қўлланилади. Бундай мақсадлар учун ўсимлик маҳсулотлари сақлашга қўйишдан олдин этилен продуцентлари эритмаларини пуркаш ёки уларда ивитиш орқали ишлов бериш мумкин. Брассиностероидлар билан картошка ўсимлигига вегетацияланаётган шоналаш даврида ва тугунакларини йиғиш даврида ишлов берилганда фитоалексинлар ҳосил бўлиш интенсивлигини ошиши ҳисобига ҳам шундай самара бериши аниқланган.

Янги маълумотларга қараганда, ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи регуляторлари ўсимликларнинг бўйига ўсиши ва шаклланишига регуляторлик таъсир этиши билан бир қаторда уларнинг зараркунанда организмларга нисбатан чидамлилигини ҳам оширади экан. Бу қуйидаги сабаблар билан боғлиқ бўлиши мумкин:

- 1) препарат регуляторлик таъсири билан бирга қайсидир паразитга нисбатан заҳарли таъсирга ҳам эга бўлади. Паклобутазол ретардант (культар) олма ва нокнинг ун шудринг ва парша касаллигини келтириб чиқарувчиларига нисбатан шундай хусусиятга эга;

- 2) фиторегуляторлар таъсирида ўсимликнинг қайсидир морфологик кўрсаткичларининг ва умумий ҳолатининг яхшиланиши, унинг касаллик ва зараркунандалар таъсирига чидамлилигини оширди. Масалан, ғалла экинлари холинхлорид билан ишлов берилганда поясининг қисқариши, йўғонлашиши натижасида ерга ётиб қолмайди замбуруғли касалликлар билан зарарланиши камаёди;

- 3) фиторегулятор таъсирида хўжайин ўсимлик метаболизмидаги ўзгаришнинг паразит организмлар учун номуқобиллиги;

- 4) хўжайин-ўсимлик ривожланиш фазасининг паразит фазасига нисбатан ўзгариши, озиқланиш даврининг қисқариши, шунингдек зараркунанда таъсирининг камайишини таъминлайди (шу каби таъсирлар натижасида уруғлар униши ва ниҳоллар ўсиши бошланғич босқичларида стимулланиши ҳисобига маданий ўсимликларнинг ўсиши тезлашгани кузатилган).

Умуман олганда, ўсимликларнинг ўсиш ва ривожланиш регуляторларини қишлоқ хўжалик ўсимликларининг касалликлари ва зараркунандалардан ҳимоя тизимида қўллаш ва ўрганиш борасидаги изланишлар ривожланишининг бошланғич даврида турибди, яқин келажакда ўсимлик маҳсулотларини етиштириш ва сақлашдаги нобудгарчилиларни сезиларли даражада қискартириш имконига эга бўламиз.

Ўсимликшунослик ва биотехнологияда фиторегуляцияни ўрганиш ва қўллашнинг ривожланиш истиқболлари

Фиторегуляторлар пайдо бўлганидан сўнг, улар қисқа вақт ичида ўсимликлар биотехнологиясида, ўсимликшуносликда, озик-овқат ва дори-препаратлар ишлаб чиқариш тармоқларида муҳим ўринни эгаллай бошлади. Сўнгги йилларда жамоатчиликнинг қишлоқ хўжалигини кимёлаштиришга қарши эътирози фиторегуляторларни қўллашга ҳам қаратилган бўлса ҳам, бу препаратларнинг тавсия этилаётган меъёри заҳарлилик таъсир жуда кам ва ўсимликларда тўпланмайди шубҳасиз келгусида истиқболга эга бўлади. Мазкур моддалар ўсимликларнинг ҳосилдорлигини, чидамлилигини оширади, ўсимлик маҳсулотларини ишлаб чиқаришни кўпайтиради. Фиторегуляторларнинг ўсимликнинг ҳаёт фаолиятини бошқаришдаги ролининг аҳамияти кун сайин ортиб бормоқда.

Яқин келажақда ўсимликларнинг ўсишни бошқарувчи регуляторларни ўрганишнинг ривожланиши қуйидаги йўналишлар бўйича амалга оширилиши кўзда тутилмоқда (башорат):

ўсимликларни ўсишини бошқаришда табиий регуляторларни қўллаш, уларнинг гормон баланси ва таъсир механизмини ўрганиш;

заҳарлилик таъсири кам, самарали, тор доирасидаги таъсирга эга препаратларни синтез қилиш;

ўсимликларнинг ўсишини бошқарувчи регуляторларни хужайралар селекциясида ва ўсимликларни клонли микрокўпайтиришда қўллаш;

ўсимликларни ўсишини бошқарувчи регуляторларни ўғитлар, пестицидлар ва микроб препаратлар билан биргаликда қўллаш технологиясини яратиш;

ўсимлик ўсишини бошқарувчи фиторегуляторларни ўсимликлар ҳимоясида қўллаш;

экинларнинг ҳолатини баҳолаш усуллари ва критерийларини ишлаб чиқиш;

фиторегуляторлар қўлланилишининг экологик ва генетик назорати.

4-бобга доир назорат саволлари.

1. Ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини генетик бошқариш қандай амалга оширилади?

2. Қандай механизмлар ёрдамида фитогормонлар синтезини бошқариш мумкин?

3. Муайян органдаги фитогормонлар миқдори қайси жараёнларга боғлиқ?

4. Фитогормонал бошқариш билан боғлиқ бўлган қандай сабаблар ўсимликларнинг паканалигини юзага келтиради?

5. Илдиз, поя ва барг хужайраларининг ауксининг бир хил концентрациясига таъсирчанлиги турлича бўлишининг сабаби нимада?

6. Фитогормон ва фиторегуляторлар тушунчалари орасидаги фарк нимада? Ўсимликларнинг гормонал статуси ва унинг мониторинги усуллари.

7. Ўсимликлардаги абсцис кислота миқдорини қандай усуллар ёрдамида ошириш мумкин?

8. Қишлоқ хўжалик экинларига фиторегуляторларни қўллаш самараси қайси омилларга боғлиқ?

9. Ўсимликшуносликда ўсиш регуляторларини қўллашнинг генетик ва экологик ҳавфсизлиги. Назорат қилиш усуллари.

10. Ўсимлик хужайраларининг дифференцировка ва дедифференциацияларини гормонлар ёрдамида бошқариш қандай амалга оширилади?

11. Нима учун каллус тўқималари 2,4-Д тутувчи озиқа муҳитда узок вақт ўстирилганда илдиз ҳосил қилиш қобилиятини йўқотади?

12. Чуқур тиним даврининг физиологик ўзига хослиги нимада? Фиторегуляторлар ёрдамида уруғларнинг ўсиши ва тиним даврига ўтишини бошқаришга мисоллар келтиринг.

13. Ретардантлардан аммонийнинг тўртламчи тузлари ва этилен маҳсулотларининг поянинг ўсишига таъсир механизмидаги фарқни айтиб беринг.

14. Фиторегуляторларнинг таъсир самарасини қандай ошириш мумкин?

15. Қишлоқ хўжалик экинларида фиторегуляторларни қўллашнинг самараси қайси омилларга боғлиқ?

4-бобга оид адабиётлар руйхати.

1. Алимова Р.А., Сагдиев М. Ўсимликлар физиологияси. Тошкент 2006й
2. Деева В.П., Шелег З.И., Синько Н.В. Избирательное действие химических регуляторов роста на растение. Физиологические основы. - Минск. Наука и техника, 1988.
3. Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход.-М., Мир, 1985.
4. Жученко А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы) – Кишинев: Штиинца, 1990
5. Кефли В.И. Физиологические основы конструирования габитуса растений, - М., Наука, 1994.
6. Ковалев В.М. Теоретические основы оптимизации формирования урожая.- М., МСХА, 1997.
7. Муромцев Г.С., Достижения и перспективы исследований по биологии сельскохозяйственных растений // С/х биология – М., 1996, №5 с.3-9 .
8. Насыров Ю.С. Физиологическая стратегия селекции растений // Селекция продуктивных сортов. Сер. Биология – М., 1982. с.31-43.
9. Никелл Л.Дж. Регуляторы роста растений. - М.: Колос, 1984.
10. Полевой В.В. Фитогормоны – Л.: ЛГУ, 1982.
11. Сельскохозяйственная биотехнология// В.С. Шевелуха.- М. Высшая школа, 1998
12. Сельскохозяйственная биотехнология// В.С. Шевелуха.- 1-том М. Воскресенье, 2000.
13. Сельскохозяйственная биотехнология// В.С. Шевелуха.- 2-том М. Воскресенье, 2001.
14. Хрипач В.А. и др. Брассиностероиды. - Минск.: Наука и техника. 1993.

5-БОБ

ТУПРОҚ УНУМДОРЛИГИНИ ОШИРИШДА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Симбиотик азотни ўзлаштирилишида биотехнологиянинг генетик асослари

Ўсимликлар ривожланишининг чекловчи асосий омиллардан бири уларнинг азотли бирикмалар билан етарли даражада таъминлаб турилмаслигидир. Фақат баъзи тупроқлар, масалан қора тупроқларда ҳаракатчан азот бирикмаларининг миқдори ўсимликлар эҳтиёжини тўлиқ қондириши мумкин. Бундай ҳолатда, яъни азот танқислиги шароитида ўсимликлар атмосфера ҳавосининг қарийб 80% ини ташкил этадиган молекуляр азот (N_2) қуршовида бўлади.

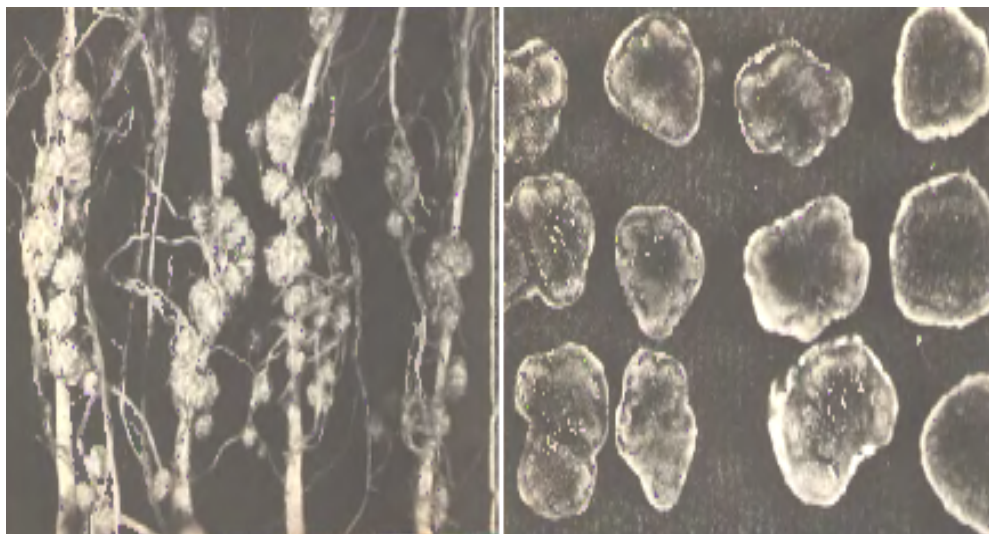
Биологик боғланган азотнинг аҳамияти, биринчидан, уни олиш иқтисодий жиҳатдан арзон, тежамли жараён эканлигига асосланади. Техник азотни ишлаб чиқариш юқори ҳарорат ($300\text{ }^{\circ}\text{C}$) ва юқори босим (350 атм)ни талаб қилса, атмосфера азотини ўзлаштирилиши оддий ҳарорат ва босимда амалга ошади. Азотни ўзлаштирувчи микроорганизмлар томонидан олинадиган азот, моҳияти жиҳатидан мутлақо «текин» ҳисобланади. Иккинчидан, микроорганизмлар томонидан ҳаводан ўзлаштирилиши ҳисобига ҳосил бўладиган биологик азотнинг аҳамияти ва унинг миқдори жуда катталигидадар.

Илмий адабиётлардаги маълумотларда бутун ер юзидаги қишлоқ хўжалиги экинлари тупроқдан бир йилда 100 млн тонна азотни ўзлаштирилиши; ундан минерал ўғитлар билан бирга 12 млн тоннасининг қайтарилиши, қолган етишмайдиган 88 млн тонна азотфиксатор микроорганизмлар ҳисобига компенсация қилиниши қайд этилади.

Кўплаб микроорганизмлар биологик азотни ўзлаштириш хусусиятига эгадирлар. Кейинги йилларда олиб борилган тадқиқотлар микроб-азотфиксаторлар гуруҳи тўғрисида маълумотларни бойитди. Улар тахмин қилингандан кўра кўпроқ бўлиб чиқди. Ҳозирда тугунак бактериялар ва азотобактердан ташқари анаэроб азот тўпловчи (*Clostridium pasteurianum*), шунингдек бир қатор микобактериялар, баъзи термофил бактериялар, кўпгина замбуруғлар, алвон ранг бактерияларнинг ҳам учраши исботланган.

Кўпгина тадқиқотчиларнинг эркин яшовчи азотфиксаторларнинг бир йилда 1 га ерга 10-15 кг атрофида азот тўплашига оид фикрлари ўхшаш бўлиб, дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактериялар фаолияти натижасида турли ўсимликларнинг илдиз ва ер усти қисмларида йилига ҳар гектарига 75-100 кг ва ундан ортиқ азот тўпланиши исботланган. Дуккакли ўсимликларнинг турли хил турлари фосфор ва калий билан тўлиқ

таъминланганда йилига ҳар бир гектар ерга: себарга-150-160, бўри дуккаги-160, беда-300 кг гача азот тўплай олади (5.1 - расм).



5.1 - расм. Дуккакли ўсимликлар тугунакларининг умумий кўриниши.

Маълумки, азот ўсимликлар томонидан бевосита ўзлаштирилмайди. Унинг ўзлаштирилиши учун нитрогеназа ферменти зарур бўлиб, ўсимликларда бошқа эукариот организмлар сингари бу фермент учрамайди. Фақат баъзи прокариотлар – молекуляр азот - N_2 ни ўзлаштириш хусусиятига эга бўлиб, улар билан кўплаб ўсимликлар симбиоз муносабатига киришадилар. Симбиотик азотфиксация тизимлари генетикаси тизимини ишлаб чиқилиши уларнинг йўналтирилган конструкцияларини тузиш ва қишлоқ хўжалигида кенг фойдаланиш имконини беради.

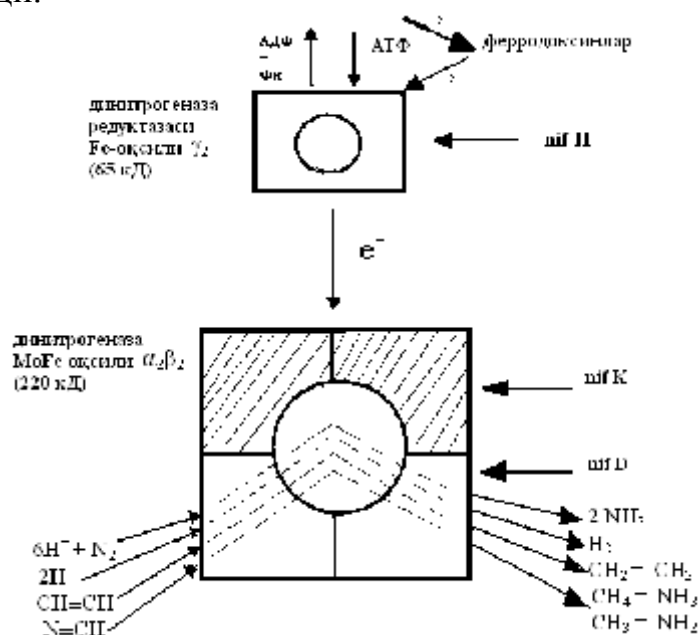
Азотни ўзлаштирувчи тизимларнинг хилма-хиллиги ва ўзига хослиги

Азотфиксаторлар микроорганизмларнинг алоҳида таксономик бирлигини ташкил этмайди. Улар прокариотларнинг деярли барча асосий гуруҳлари: грамманфий ва граммусбат эубактериялар, цианобактериялар, актиномицетлар ва архебактериялар орасида учрайди. Азотни ўзлаштирувчи микроорганизмларнинг кўпчилиги диазотрофлар бўлиб, молекуляр азот (N_2 ни азотнинг ягона манбаи сифатида ўзлаштира оладилар. Шу билан бирга баъзи азотфиксаторлар N_2 ни фақатгина ўсимликлар билан (*Rhizobium*, *Frankia*) симбиоз муносабатдагина ўзлаштирадилар.

Шунингдек, қатор микроорганизмлар (*Azorhizobium*, *Anabaena*, *Nostoc*) диазотрофия ва ўсимликлар билан симбиоз муносабатга киришиш хусусиятининг иккаласини ҳам ўзида мужассамлаштирган бўлади.

Нитрогеназа реакцияси. Молекуляр азотни қайтарилиши нитрогеназа ферменти билан катализланади (5.2 - расм). Мазкур фермент уч хил типдаги оксиллар (α , β , ва χ) ва иккита кофактор: молибден-темир-(MoFe) сақловчи омиллардан иборат. Нитрогеназа иккита суббирлик, таркибига-Mo-Fe- кофактор кирувчи катта-денитрогеназа (уни II компонент деб ҳам юритилади) ва Fe-кофактор сақловчи кичик-редуктаза (I компонент) дан ташкил топган. N_2 молекулаларининг қайтарилиши унинг MoFe-кофактори билан ўзаро таъсири натижасида, яъни денитрогеназада амалга ошади.

Редуктазанинг вазифаси электронларни денитрогеназага ўтказиш билан яқунланади. Темир ионлари геминли (динитрогеназалар редуктазаси) ёки геминсиз (денитрогеназа) шаклдаги иккала компонент таркибига киради.

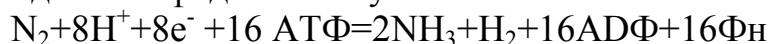


5.2-расм- Нитрогеназанинг тузилиши ва вазифалари

Ўзининг мураккаб тузилишига қарамасдан нитрогеназа паст даражадаги субстрат спецификлигига: у уч боғли бирикмаларнинг кенг спектрини қайтариш, шунингдек ацетиленни этиленга айлантириш хусусиятига эга. Бу реакция нитрогеназа фаоллиги билан аниқланадиган, ацетилен ва этиленнинг хроматографик ажаратилиши осонлигига асосланган “ацетиленли усул” билан таҳлил қилинади. Баъзи бир чекланишлар (ацетилен билан таъсирлашганда нитрогеназанинг каталатик хусусиятлари ўзгариши; микроб-ўсимлик симбиоз муносабатларида – ацетиленнинг ўсимлик тўқималарини физиологик хусусиятига таъсири)га

карамасдан, ацетиленли усул генетик ва селекцион тадқиқотларда кенг қўлланилмоқда.

Нитрогеназа катализлайдиган умумий реакция тенгламасини қуйидагича ифода этиш мумкин:



Реакция тенгламасидан кўриниб турибдики, нитрогеназа реакциясининг энергия сарфи жуда юқори. Бундан ташқари нитрогеназалар синтези ва унга хизмат қиладиган ферментлар (нитрогеназа оксилани шаклланишини назорат қилувчи кофакторлар синтези, электронларни узатиш ва азотфиксация маҳсулотларини ассимиляция қилувчи ферментлар) ҳосил бўлиши учун катта энергия сарфланиши талаб этилади. Аниқланишича, 1г азот ўзлаштирилиши учун 100-200г глюкоза сарф қилинар экан. Бундан аниқ хулосага келиш мумкинки, микроблар нитрогеназа комплексини боғланган азотнинг қатъиян танқис бўлган ва энергия билан етарли даражада таъминланган шароитидагина синтез қила оладилар.

Микроорганизмлар учун самарали энергия манбаи - оксидланувчи фосфорилланиш ва фотосинтез жараёнларидир. Бироқ азотфиксацияни бу жараёнлар билан боғлаш қийинлиги шундаки, нитрогеназа эркин кислородга нисбатан жуда сезгир бўлиб, у O_2 нинг жуда кам концентрацияларида ҳам инактивацияга учрайди. Бунинг учун турли хил механизмлар мавжуд, улар азотофиксатор - микробларда вужудга келувчи «кислородли парадокс», яъни нитрогеназани кислороддан ҳимоя қилишда энергия олишнинг юқори интенсивлигини сақлаб қолган ҳолда, нитрогеназани эркин кислороддан ҳимоя қиладди. Бу эркин яшовчи диазотрофларда нитрогеназани кодирлайдиган генларнинг фақат анаэроб ёки микроаэрофил шароитларда фаоллашуви ҳисобига (эркин яшовчи эубактериялар, архебактериялар), ёки азот тўпловчи ҳужайраларда кислородни жуда қийин ўтказадиган қалин қобиқ (цианобактерияларнинг гетероцисталари) ҳосил бўлиши ҳисобига амалга ошади. Ўсимлик ва азотфиксатор-микроблар билан симбиозда нитрогеназани кислороддан ҳимоя қилиш вазифасини, одатда ҳўжайин ўсимлик бажаради.

Нитрогеназанинг синтези ва етилиши кўпчилиги барча азотфиксаторлар учун умумий бўлган *nif* – генларнинг мураккаб тизими орқали кодирланади. Уларнинг ичида энг кўп ўрганилгани – *Klebsiella pneumoniae* энтеробактериялари ҳисобланиб, бу тизим битта кластерга жойлашган еттита транскрипция бирликларига бирлашган 25 та гендан иборат.

nifH, *nifD*, *nifK* генлари нитрогеназанинг γ , α ва β оқсиллари структурасини; *nifM*, *nifS*, *nifU*, *nifY* – мазкур оқсилларнинг процессингини кодирлайдилар. Генларнинг махсус гуруҳи (*nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV*) $\text{Mo} - \text{Fe}$ – кофактори синтезини назорат қиладди. Нитрогеназа

комплекси компонентлари структурасини кодирлайдиган генлардан ташқари *Klebsiella* нинг *nif* оперонини иккита регулятор ген тутати. *nifA*, *nifHDK* генлари ва бошқа *nif* генлар транскрипциясини фаоллаштирувчи оксилни кодирласа, *nifL* гени маҳсулоти *nif* – генларнинг кислород ёки боғланган азот иштирокидаги транскрипциясини репрессорлайди. Бироқ кўпчилик азотфиксаторларда *nifL* мавжуд бўлмайди, унинг вазифасини бошқа генлар бажаради.

Ўсимликларнинг азотфиксаторлар билан симбиози. Микроблар орасида азотни ўзлаштириш қобилятини кенг тарқалишини таъминлайдиган асосий омиллардан бири - бундай хусусиятига эга бўлмаган ва натижада азотга муҳтож бўлган организмлар билан симбиоз муносабат ҳосил қилиши ҳисобланади. Азотфиксаторлар билан симбиоз яшашга энг муҳтож организмлар ўсимликлар ҳисобланади, улар азотли бирикмаларни бошқа бирикмалардан (ҳайвонлар каби) ёки органик қолдиқлардан (замбуруғлар каби) ўзлаштира олмайдилар.

Ахебактериялардан ташқари деярли барча азотфиксаторлар ўсимликлар билан узвий муносабатга киришиш хусусиятига эгадир.

Ўсимликлар билан симбиоз муносабатга киришадиган азотни ўзлаштирувчи микроорганизмлар уч гуруҳга бўлинади: ҳужайра ички симбионтлари (*Rhizobium-Frankia*, *Nostoc-Gunnera* билан симбиозда); 2) ўсимлик ичида жойлашган, лекин ҳужайра ичига кириб бормайдиган микроблар (*Azolla* билан симбиозда-*Anabaena* ёки *Nostoc*; *Acetobakter* ва *Azoarcus* - эндофит бактериялари); 3) илдизда яшовчи ассоциатив диазотрофлар (*Azospirillum* *Flavobakterium*). Азот ўзлаштириладиган симбиоз муносабатларда шерикларнинг ўзаро таъсири умумий мақсадлар билан таърифланади: а) микробнинг азотфиксация маҳсулотларини ҳўжайин ҳужайраси (тўқимаси) га экспорт қилиши, натижада унинг боғланган азотга нисбатан қарамлиги сусайиши ҳисобига экологик потенциали сезиларли даражада ортади; б) ҳўжайин микросимбионт учун экологик бўшлиқ яратиб беради (бунда у эркин яшовчи микроорганизмлар билан рақобатдан халос бўлади), шунингдек азот ўзлаштириш учун сарфланадиган энергияни микроорганизм ҳисобига қоплайди.

Азотни ўзлаштирувчи микробларнинг фототроф организмлар билан симбиозида икки хил фундаментал биокимёвий жараён азотфиксация ва фотосинтезнинг симбиоген бирикмаси ҳосил бўлади. Лекин симбиотик муносабатни N - метаболитларни фотосинтатларга «табиий алмашинуви» деб қараш нотўғри бўлар эди. Кўпгина ўсимликларнинг азотфиксацияловчи бактериялар билан муносабатга киришишида шерикларнинг узвий структуравий – функционал интеграцияси кузатилади, у ўсимлик ва бактерия генларининг ўзаро регуляцияси ва йўналтирилган мувофиқлашган экспрессиясига асосланади. У шерик

хужайраларнинг чуқур дифференциаллашуви, шунингдек улар орасида узвий регулятор муносабатлари шаклланиши билан бориши ҳам мумкин.

Дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактериялар (ризобийлар)нинг симбиоз муносабати

Дуккакли ўсимликлар (Fabaceae оиласи) билан тугунак бактериялар (ризобийлар) орасидаги симбиоз муносабати энг яхши ўрганилган организмлар аро тизимлар ҳисобланади. Бунинг бир қанча сабаблари мавжуд. Ризобийлар (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) факультатив симбионтлар ҳисобланиб, ex-planta шароитида осон ўса олади ва барча замонавий молекуляр генетик усуллар билан тадқиқ этиш учун қулай ҳисобланади. Дуккакли экинларнинг тугунаклари ўсимликларнинг муҳим функциялари: сигнал жараёнлари ва генлар экспрессияси, хужайраларнинг дифференциаланиши ва органогенез, азот ва углерод алмашинуви таҳлил қилиш учун жуда қулай модел ҳисобланади. Дуккакли – ризобиал симбиозни ўрганишда асосий омил унинг амалий аҳамияти, яъни кўплаб дуккакли ўсимликлар муҳим қишлоқ хўжалик экин турларига кириб, уларнинг ҳосилдорлигини ошириши долзарб муаммо ҳисобланиши билан боғлиқ.

Ризобийлар ва ўсимликларнинг ўзаро таъсири жуда юқори спецификликга (ўзига хосликка) эга (5.1-жадвал). Бу биринчидан, симбиознинг деярли фақат дуккакдошлар оиласига хос бўлиб чекланганлиги, бироқ бунга истисно равишда фақат *Parasponia* ўсимлиги (*Ulmaceae* оиласи) дуккакдошларга мансуб бўлмаса ҳам ризобийлар билан тугунаклар ҳосил қилиши орқали ифодаланади. Иккинчидан, ризобийларнинг кўпчилиги дуккакли ўсимликларнинг чегараланган қисми билан битта авлод (*R. galegae*, *R. leguminosarum* bv. *Trifoli*) га мансуб ёки бир неча таксономик авлодлари билан (*Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viceae*) симбиоз муносабатга киришади.

Дуккакли – ризобиал симбиоз кўп босқичли мураккаб жараён бўлиб, у тўрт хилдаги жараён: эрта (преинфекцион) таъсир; тугунаклар морфогенези; эндосимбионтлар тараққиётини бошқариш; тугунакларнинг азот тўпловчи аъзо сифатида фаолият юритиши кабиларни ичига ўз олади. Бу жараёнларнинг барчаси бактериялар, шунингдек хўжайин-ўсимлик томонидан қатъий назорат остида бўлади.

Преинфекцион (сигнал) таъсирлар. Ҳар қандай симбиоз муносабатда шериклар ўртасида молекуляр сигналлар билан алмашинув содир бўлади. Симбиознинг дастлабки босқичларида сигналнинг организмларнинг эркин яшаш тарзидан симбиоз ҳолатига ўтишини, кейинги босқичларида – симбиознинг фаолиятини таъминлашга хизмат қиладиган метаболитик ва морфогенетик жараёнларни кечишига сабаб бўлади. Сигналлар кўпинча нишон–генларнинг транскрипцияси ва трансляцияси даражаларида таъсир

кўрсатиб, симбиоз муносабатларни юксак ўсимликларда генларнинг дифференциал экспрессиясини ўрганиш учун қулай моделга айлантиради.

5.1. Жадвал

Дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактериялар ўзаро таъсирининг ўзига хослиги

Б а к т е р и я л а р	Ў с и м л и к л а р
Rhizobium meliloti	Medicago (беда), Melilotus (қашқарбеда), Trigonella (йўнғичқа)
R. leguminosarum bv. trifolii	Trifolium (себарга)
R. leguminosarum bv. viciae	Pisum (нўхат), Vicia (вика), Lathyrus (кўк нўхат), Lens (ясмик)
R. leguminosarum bv. phaseoli (R. etli),	Phaseolus (ловия)
R. tropici	Galega (галега)
R. galegae	Glycine (соя)
Sinorhizobium fredii	Lotus (лядвинец), Lupinus (бўри дуккаги)
Mezorhizobium loti	Glycine (соя)
Bradyrhizobium japonicum	

Сигналларнинг синтези ва ажралиб чиқиши. Тугунак бактериялар ва ўсимликлар орасидаги симбиоз муносабати ризобийларнинг бактерия вирулентлик генлари фаоллаштирувчисини (nod-инглиз тилидан nodulation-тугунак ҳосил бўлиши) ўсимлик флаваноидларига таъсир реакциясидан бошланади. Бундай генлар назорати остида ризобийлар тугунаклар шаклланишининг илк босқичларини бошлаб берувчи липохито-олигосахаридли Nod-омилларни синтезлайдилар. (5.3-расм) Ҳозирги вақтда ризобийларда 50 дан ортиқ вирулентлик генлари аниқланган. Уларнинг бир қисми барча ризобийлар учун «умумий» (структуравий-функционал жиҳатдан ўхшаш) бўлса, бошқалари – ҳар бир тур ёки штамм учун спецификдир. «Умумий» nod –генлар (nod A, nodB, nodC) даги мутациялар симбиоз таракқиётининг илк босқичларидаёқ ўзгаришларидиз тукчаларининг буралиши келиб чиқишига сабаб бўлади.

Ҳўжайинга тегишли генлар (*nodH*, *nodF*, *nodQ*, *nodZ*, *nodX*) мутациялари натижасида ўзаро таъсир этишнинг сўнгги, яъни инфекцион иплар ҳосил бўлиши ва тугунак меристемалари шаклланиши билан боғлиқ босқичлари издан чиқади. Бундай вирулентлик генлари гуруҳлари орасидаги муҳим тафовутлар уларни ризобийларнинг турли хил турларига кўчириб ўтказилганда ҳам кузатилади. Ҳўжайинга хос ўзига хослик генларини кўчириб ўтказиш реципиент штаммлар донор-штаммнинг ҳўжайин-ўсимликларида тугунаклар шаклланишига олиб келади. Бундай самара «умумий» *nod* генлари кўчирилиб ўтказилганда кузатилмайди, агар реципиент сифатида ўзининг «умумий» *nod*-генлари бузилган авирулент

мутант қўлланилса, унда дастлабки ҳўжайин-ўсимликларда тугунак ҳосил қилиш хусусияти тикланади.

Ҳар иккала гуруҳ генлари индуцибел ҳисобланади: уларнинг фаоллигини фақат ризобийларнинг ўсимлик ризосферасига тушганидан сўнг қайд этишга муваффақ бўлинган. Бунда, дуккакли ўсимликлар уруғи ёки илдизларидан тупроққа ажралиб чиқадиган флаваноидлар бактерияларнинг NodD оксили билан ўзаро таъсирланади, натижада у қолган *nod*-генлар (*nodD* -ризобийларнинг ягона конститутив фаолият юритувчи гени) нинг транскрипциясини фаоллаштириш хусусиятга эга бўлади. *nodD* гени транскрипцияни бошқарувчи оиланинг вакили ҳисобланиб, бу оилага яхши ўрганилган, *lysR* ва *araC* генлари ҳам киритилади. NodD оксида иккита домен: ДНК билан боғланадиган бирмунча консерватив бўлган, тахминларга кўра, флавоноидлар билан ўзаро таъсирга киришадиган С-қисм аниқланган. NodD оксили ризобиал ҳўжайранинг флаваноидлар ўтадиган ички мембранаси билан боғланган бўлади. Улар билан ўзаро таъсирлашган NodD оксили ўзининг конформациясини ўзгартиради, натижада унинг вирулентликнинг индуцибел генлари промоторларида жойлашган консерватив «*nod – box*» кетма – кетлиги билан боғланиш имкониятига эга бўлади. Бунинг оқибатида мазкур промоторларнинг ДНК –полимераза билан ўхшашлиги ортади ва уларнинг транскрипцияси индуцирланади.

Вирулентлик генларининг таъсири натижасидаги охирги маҳсулот Nod-омиллар ҳисобланади, уларни синтез қилиш қобилияти ризобийлардаги энг нодир хусусиятдир. Бу омиллар модификацияланган липо – олигосахаридлар бўлиб, улар – ацетилглюкозаминнинг 3 – 6 қолдиғи ва 16 – 20 тагача углерод атомларини сақловчи тўйинган ёғ кислотаси радикалларида иборат (5.3 (а) - расм). Бу омилларнинг биосинтези қуйидаги жараёнларни ўз ичига олади. (5.4- расм):

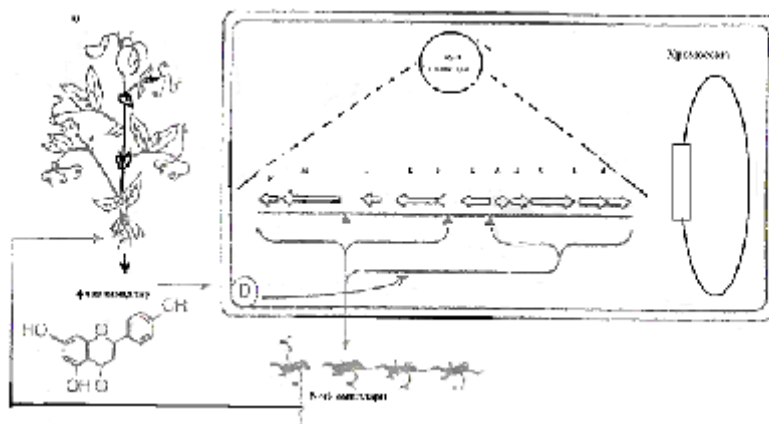
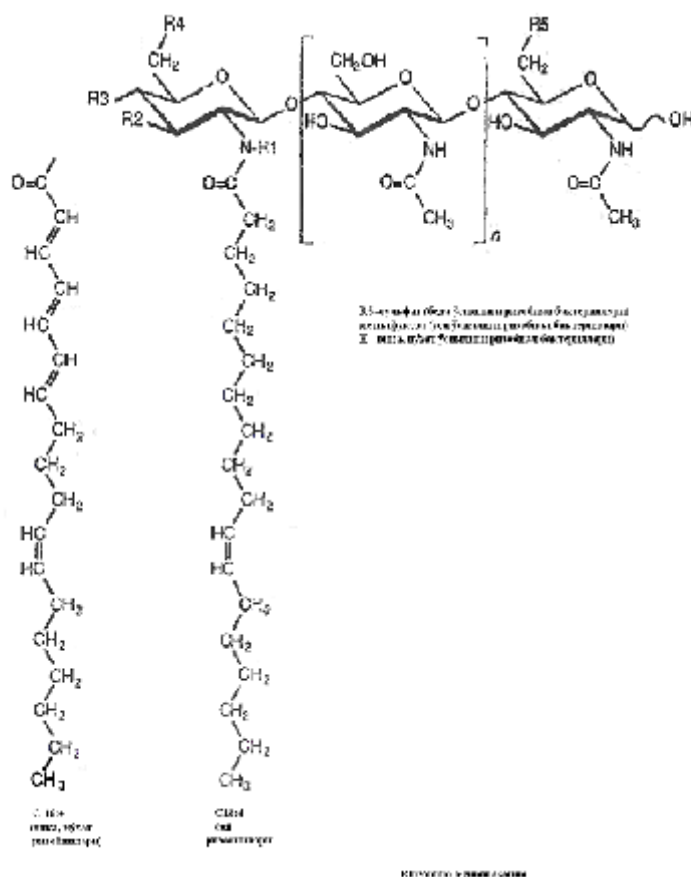
1) 1-4-β-глицозидли боғлар ҳосил бўлиши билан боғлиқ N-ацетилглюкозаминнинг полимеризацияси (NodM оксили назорати остидаги фукозадан синтезланади). NodC оксили катализлайдиган ушбу реакция хитин олигомерларининг ҳосил бўлишига олиб келади;

2) глюкозаминнинг охирги (NodB блоки томонидан катализланадиган) қолдиғини «редукцияламайдиган» R1 ҳолатда деацетилланиши ва мой кислотаси қолдиғининг азот атомига бирикиши (NodA оксили билан катализланади);

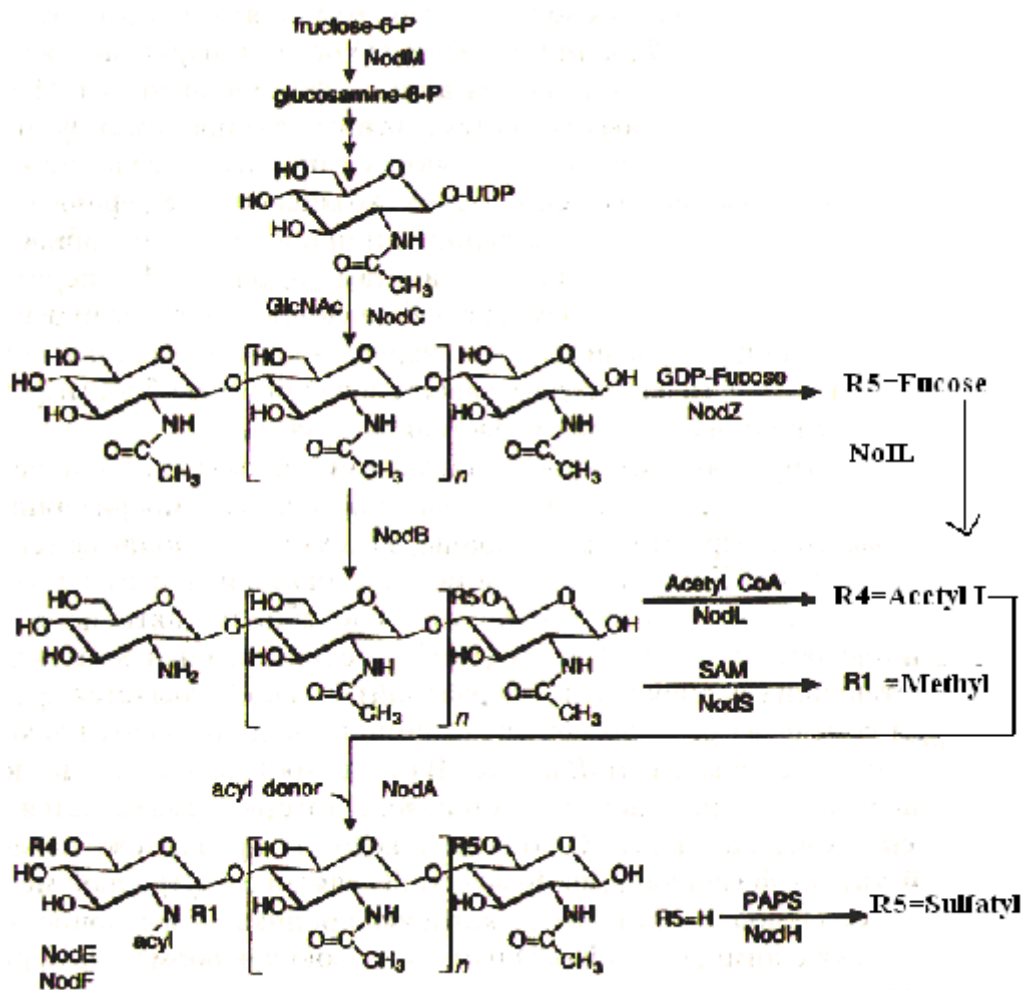
3) ҳосил бўлган липо-хито-олигосахарид (Nod – омилнинг пўстлок қисми) модификацияси; «редукцияловчи» ва «редукцияламайдиган» қисмларидаги водород атомлари турли хил радикал (фукозил, сульфат, метил, ацетил ва ҳ.к.) ларга жойлашади.

Шуни таъкидлаш лозимки, Nod – омил биосинтезининг ушбу босқичлари *nod*-генларнинг турли гуруҳлари томонидан назорат қилинади:

пўстлоқ қисмининг синтези «умумий» *nod*-генлари назорати остида бўлса, унинг модификацияси эса - ҳўжайинга хос генлар назоратида бўлади.



5.3. расм. Дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактерияларнинг ўзаро сигнал муносабатлари тизими: а-ризобийларнинг Nod-омиллари структураси(энг муҳим ўриндошлар кўрсатилган: редукцияланмаган қисм (C18:1ёки C18:4) даги ацил гуруҳлар ва R5 йўналишдаги ўриндошлар редукцияланадиган қисмда; б- Rhizobium leguminosarum бактерияси билан нўхат ўсимлиги орасидаги сигнал молекулалари билан алмашиниш схемаси (ўсимлик илдизлари специфик флаваноидларни ажратади, улар бактериал NodD оксиди билан комплекс равишда бактерияларнинг сигнал молекулалари – Nod-омилларни фаоллаштиради. Охирги маҳсулотларнинг биосинтези Sym- плазмидада жойлашган генларда кодирланади.



5.4. - расм. Nod-омилларнинг биосинтези

GlcNAc-N-ацетилглюкозамин; GDP-Fucose-гуанозиндифосфо-фукоза; Acetyl CoA-ацетилкофермент А, PAPC-3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат; SAM—аденозил-метионин.

Концентрацияси атиги 10^{-8} – 10^{-12} М бўлган, тозаланган Nod-омиллар симбиоз шаклланишининг дастлабки босқичлари: илдиз тукчаларининг бурилиши, тугунак меристемалари шаклланиши, баъзи дуккаклар (беда)да, ҳаттоки тугунаклар гистогенезининг бошланғич босқичларини ҳам инициациялайди. *Vicia sativa* ўсимлиги учун Nod-омилларни 5-10 минут давомида таъсир эттириш бир соатдан кейин содир бўладиган илдиз тукчаларининг деформацияси (шакл ўзгариши), 3 соат ўтгач эса илдизнинг шимувчи қисмларидаги илдиз тукчаларининг ярмидан кўпроғининг шакл ўзгаришларига кифоя қилади. Nod-омиллар чақирадиган биринчи биокимёвий реакциялар (инокуляциядан 10 минут ўтгач содир бўладиган) илдиз тукчалари хужайра мембранаси деполяризацияси (кутбсизланиши) ва эпидермис хужайраларида ион оқимларининг модулланиши ҳисобланади.

Шуни қайд этиш керакки, Nod-омиллар – бу барча симбиотик ўзаро таъсирларнинг ўзига хослигини маълум даражада аниқлайдиган сигналлардир. Бунда хўжайинга хос генлар назорати остида амалга ошириладиган Nod-омилларнинг такомиллашиши муҳим рол ўйнайди. «Редукцияловчи қисм» да R6 ҳолатининг сульфатланиши беда ўсимлигининг ризобийлари (*R. meliloti*) учун хос бўлиб, у «гомологик» хўжайин (беда)да кечадиган бошланғич симбиотик реакциялар индукцияси учун зарур бўлади, сульфат гуруҳларнинг учрамаслиги эса (вика ўсимлигида) худди шу реакцияларнинг индукциясига сабаб бўлади. Сульфатланиш жараёнини катализлайдиган инактивлаштирувчи NodH оксиди мутацияларида *R. meliloti* бедага нисбатан вирулентлигини йўқотади, бироқ унинг симбионтлари (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) *nodH* гени йўқотилган викага нисбатан вирулентликка эга бўлади.

Nod-омил модификацияларининг хўжайинга хослик белгисини назорат қилишдаги иштирокининг энг кўп ўрганилган мисоли бу – *nodX* гени катализлайдиган R6 ҳолатининг «редукцияланувчи қисм»ининг ацилирланишидир. Бундай модификация нўхат тугунак бактериялари (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) га «афғон» нўхатларини зарарлаш (инфекциялаш) хусусиятини беради. «Афғон» нўхатларининг мазкур бактериялар билан инокуляцияланишига мойиллиги бўлмайдиган, чунки бу ўсимликлар *sym2* аллеллари бўйича гомозигот бўлади. *nodX* генини ундан ҳоли бўлган штаммларга кўчириб ўтказилганда улар ацетилланган Nod-омилни синтезлаш қобилиятига эга бўлади ва «афғон» нўхати ўсимлигида тугунак ҳосил қилади. Ризобийларга R6 ҳолатини фукозилланишини белгиловчи *nodZ* генини кўчириб ўтказилганда, ўсимликларнинг *sym2*-генлари назорат қиладиган чидамлилигини енгиш хусусиятини ҳосил бўлиши кутилмаган ҳодиса бўлиб чиқди. Бу ген соя тугунак бактерияларидан ажратиб олинган бўлиб, улар «афғон» нўхатларида симбиознинг энг дастлабки реакцияларни ҳам қақира олмайдилар.

Сигналлар рецепцияси ва процессинги. Nod-омилларнинг синтези ва фенотипик самараси (эффекти) яхши ўрганилган, чунки улар бактериялар томонидан озика муҳитига ажралиб чиқарилади, шунингдек, улар фаолиятини *in vitro* тизимида осон моделлаштириш мумкин. Бактериал сигналлар рецепцияси ва унинг ўсимликка кетма-кет узатилиш жараёнларини ўрганиш бирмунча қийин. Ўсимлик лектинлари рецепторлари Nod-омилларнинг рецептори ҳисобланади. Уларнинг симбиоздаги ролини ўрганишга бўлган қизиқиш ўтган асрнинг 70-йиллари охирига келиб ортди. Бу даврга келиб илдиз тукчалари юзасига ризобиал хужайраларнинг адсорбцияланиши натижасида тугунакларнинг ривожланиши, ризобий хужайралари ташқи юзасида учрайдиган полисахаридларнинг дуккакли ўсимликларнинг лектинлари билан ўзаро таъсири билан боғлиқ эканлиги аниқланди. Ўсимлик ва бактерия

хужайраларининг юза структуралари ўзаро комплементар таъсирининг натижаси сифатида симбиознинг ўзига хос хусусиятини изоҳлайдиган «лектинли» назария (гипотеза) 1980 йиллар бошида тақдим этилди.

Бугунги кунга келиб илдиз лектинларининг баъзи фракциялари синтезини назорат қилувчи генларни турли хил дуккаклилар ўртасида кўчириб ўтказилиши симбиотик хусусиятларнинг кенгайиб бориши билан ўз тасдиғини топди. In vitro шароитларида Nod-омиллар билан ўзига хос боғланиш ҳосил қиладиган дуккаклиларнинг илдиз лектинлари фракциялари аниқландики, улар симбиоз муносабат ҳосил бўлишида муҳим ҳисобланади (мазкур лектинларга қарши антитаналар билан ишлов берилган илдизларда тугунак ҳосил бўлиши блокировкаси кузатилган). Бундан шундай хулоса келиб чиқадики, ўсимлик лектинлари Nod-омиллар рецепцияси тизимининг компонентларидан камида биттаси бўлиб ҳисобланадилар.

Nod-омиллар тузилмасининг ва тугунак ҳосил бўлишининг ўзига хослиги ўртасидаги боғлиқликни изоҳлайдиган назариялардан бири - ўсимлик хитиназалари таъсирига чидамлилигини мазкур омилларнинг модификациялари деган ғояни илгари суради. Дуккаклилар илдизи бир қатор хитиназаларни (шунингдек хитиолигосахаридларни парчалайдиган бошқа хил литик ферментларни ҳам) синтезлаши аниқланди. Бунда: а) баъзи хитиназаларнинг синтези Nod-омиллар томонидан фаоллашиши, б) хитиназаларга чидамлилиқ Nod-омиллар тузилмасига боғлиқлиги кабилар келиб чиқди. Юқорида мисол қилиб, келтирилган *R. leguminosarum* bv *viciae* нинг «афғон» нўхати билан ўзаро таъсири шуни кўрсатадики, Nod-омилнинг ўсимлик хитиназаларига чидамлилиги R6 ҳолатнинг модификацияси натижасида бирикувчи қолдиқ қисмининг тузилиши (ацил ёки фукозил гуруҳга мансублиги)дан қатъий назар ортиши аниқланди. Айнан шу мўътадилланиш R6-модификацияланган сигналларни ҳосил қиладиган бактерияларнинг *sym-2* аллеллар кодлайдиган чидамлилиқни енгишни белгилайди. Шунингдек, ўсимлик рецепторлари билан Nod-омилнинг ўзи эмас, балки литик ферментлар таъсири нишон-хужайраларда ҳосил бўладиган унинг процессинги маҳсулотлари ўзаро муносабатга киришиши эҳтимоли жуда юқоридир.

Симбиознинг тузилмавий асоси тараққиёти. Дуккакли ўсимликларнинг тугунаклари бир қатор комплекс ўзаро боғлиқ вазифаларни бажариб, эндосимбионтлар учун экологик макон, шериклар ўртасида метаболитлар алмашинуви учун структуравий асос бўлиб, бактерияларнинг физиологик фаоллиги ва сонини назорат қилишга хизмат қилади. Бу аъзолар ўсимликнинг тараққиёти генетикасини ўрганиш учун ажойиб модел бўлиб ҳисобланади. Тугунаклар тараққиёти, бошқа аъзолар сингари генларнинг дифференциал (ихтисослашган) экспрессиясини чакирувчи сигнал жараёнларига асосланади. Бироқ симбиоз

муносабатларда бу жараёнлар ўсимликка шерик орқали тушадиган экзоген сигналлар билан боғлиқ, бу эса сигналлар таъсирини қатор ҳолатларда лаборатория шароитларида, шу билан бирга *in vitro* тизимидан фойдаланиш орқали ҳам нисбатан осон ўрганиш мумкин. Бундан ташқари, тугунакларнинг ҳосил бўлиши ўсимликлар учун нормал ўсиш ва кўпайишда шартли бўлмаган, яъни, факультатив ҳолат ҳисобланиб, бу ривожланиш жараёнининг генетик ўзгарувчанлиги тўғрисидаги кенг, батафсил маълумот олиш имконини беради. Тугунаклар морфогенези учун зарур асосий генетик маълумот симбиоз муносабатнинг ўсимлик шериги геномида жойлашган. Шунга қарамасдан, морфогенларнинг бир қисми ризобийларнинг геномида сақланади. Бу эса тугунаклар тарракқийетини генетик таҳлил қилишда геноми тузилмасига аралаштирмаган ҳолда, ўсимлик аъзоси таракқийетининг ирсий дастурини ўрганиш ва модификация қилишнинг янада кенгроқ имкониятларини очади.

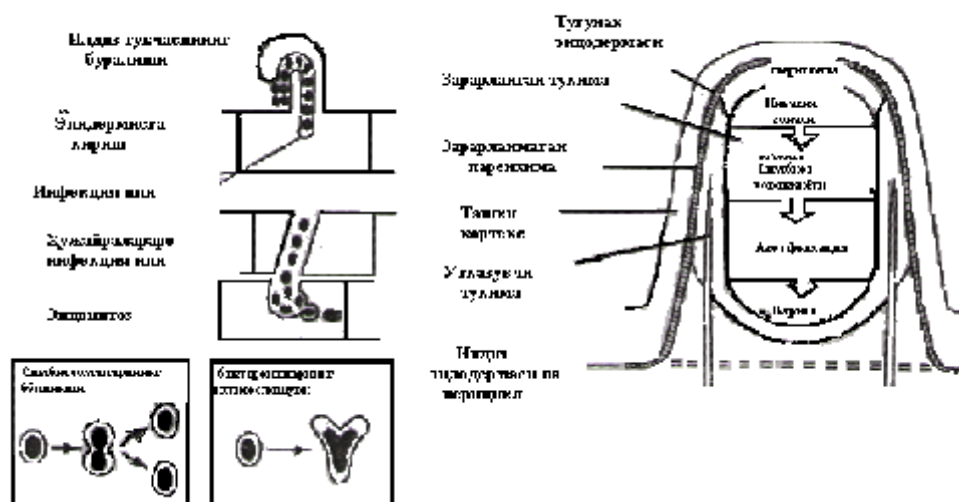
Тугунаклар морфогенези. Бу қисмда нўхат, себарга ва беда каби дуккаклиларнинг хос «но детерминацияланган поя» типига мансуб анча батафсил ўрганилган тугунаклари мисолида симбиознинг структуравий асоси таракқийетини кўриб чиқилади.

Мазкур дуккакли ўсимликларнинг ризобийлар билан зарарланиши илдиз тукчалари орқали боради натижада илдиз тукчалари буралиб «соёбон ушлагичи» шаклини олади (Нас босқичи, инглиз тилида hair curling). Тукчаларнинг кескин буралиши билан бирга илдиз тукчаси ҳужайраси гидролизи ва плазмолемманинг чуқур инвагинацияси содир бўлади, бунда ўсимлик ҳужайрасининг мембрана структуралари (Гольжи аппарати, эндоплазматик тўр) иштирок этади. Шундай қилиб бактерияларнинг илдиз тукчаларига нофаол кириб бориши ва тез орада микросимбионтни тўлиқ қамраб олиши кузатилади. Натижада бактерия ҳужайралари атрофида ўзига хос туннел – инфекция ипи (ИИ) ҳосил бўлиб, унинг деворлари ўсимлик ҳужайралари девори билан ўхшаш, ички бўшлиғи эса матрикс билан тўлган бўлиб, унинг ҳосил бўлишида иккала шерик ҳам иштирок этади (*Itf*- босқичи, инглиз тилидан Infection thread formation).

ИИ таракқийети билан бир вақтда тугунак меристемаси ҳосил бўлишига замин тайёрлана боради, у митоз жараёнлари реактивацияси, Nod-омил орқали индуцирланувчи кортекс ҳужайраларининг дедифференциацияси ва пролиферацияси (*Ced* босқичи, инглиз тилидан Cortical cell division) билан боғлиқ бўлади. Ҳосил бўлган тугунак примордийларида гистогенез жараёнлари бошланади (*Ntd* жараёни, инглиз тилидан Nodule tissue differentiation), унда тугунакларнинг қопловчи, ўтказувчи ва азот тўпловчи тўқималари шаклланади. ИИ инокуляциядан 2-3 сутка ўтгач, илдиз тукчалари асосигача етиб боради ва кортексга ўтиб, ўсиб келаётган тугунак ичига кириб олади ва шу ерда ривожланиб, шохланади (5.5.-расм).

Эндосимбиоз тараққиётидаги асосий босқич бактерияларнинг ИИ дан ўсимлик ҳужайрасига ўтиши ҳисобланади, у эндоцитоз йўли билан амалга ошади (Bad босқичи, инглиз тилидан Bacterial release). ИИ нинг ўсимлик ҳужайрасига ботиб кириш жойида вақтинчалик тузилмалар – инфекциян томчилар шаклланиб, улардан бактерия сақловчи мембрана пуфакчалари ўсиб чиқади. Шундай қилиб, бактериялар ҳеч қачон ўсимлик цитоплазмасида эркин жойлашмасдан, Гольжи аппарати ва эндоплазматик тўр иштирокида ҳосил бўлган «перибактероид» мембраналари (ПБМ) ичида жойлашади, лекин улар алоҳида бактериал оксилларга ҳам эга. ПБМ билан қопланган бактерия ҳужайраси (ҳужайралар тўплами) симбиознинг асосий субҳужайравий бирлиги – симбиосома ҳисобланади.

Ризобийлар ИИ дан ажралиб чиққач ўзларининг ўлчамларини ва таёқчасимон шаклини маълум вақтга қадар сақлаб қолади, шундан сўнг алоҳида шакл – бактероид шаклида (Bad босқичи, инглиз тилидан Bacteroid differentiation) ихтисослашади. Бактероидлар эркин яшовчи бактерияларга нисбатан анча йирик (3-5 баробар) бўлиб, уларнинг шакли себаргада шарсимон ва ноксимондан тортиб, нўхатда Y ва X симонгача бўлади.



5.5.-расм. Нўхат ўсимлиги азот тўпловчи тугунақлари тузилиши ва тараққиёти. а-эндосимбиотик бирлашмалар тизимининг шаклланиши асосий босқичлари; б-тугунақнинг гистологик тузилмаси (нодетерминацияланган тип).

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, бактерияларнинг ихтисослашуви уларнинг автоном ўсиши учун зарур бўлган кўплаб генларнинг репрессияси билан боғлиқ. Кўплаб муаллифларнинг фикрича, бу репрессия шунчалик чуқур давом этадики, бактероидлар шаклланган эркин яшайдиган тугунақларга айлана олмай қоладилар ва тугунақлар нобуд бўлгач, улар ҳам нобуд бўладилар. Бактероидларда N_2 ни NH^+ га қайтарилишини катализловчи нитрогеназа, шунингдек, нитрогеназа

реакцияси учун хизмат қиладиган бошқа ферментлар синтези фаоллашади ва шундан сўнг атмосфера азоти ўзлаштирилиши жараёнлари (Nif - инглиз тилидан Nitrogen fixation) бошланади. Шундай қилиб, бактероидларни ҳўжайин ўсимликни боғланган азот билан таъминлаб берадиган ўсимликларнинг вақтинчалик органеллалари сифатида қараш мумкин.

Симбиосомаларнинг шаклланиши билан параллел бир вақтда инфицирланган ўсимлик ҳўжайралари ихтисослашуви ҳам рўй беради. У ички ПБМ шаклланиши ва биосинтетик жараёнларда иштирок этадиган ички мембрана тузилмалари сони ортиши билан ифодаланади. Инфицирланган (зарарланган) ҳўжайралар учун хроматиннинг транскрипцион фаоллиги ортиши билан боғлиқ полиплоидизацияси ва деконденсацияси хосдир. Биокимёвий жиҳатдан уларнинг ихтисослашуви de novo шароитида бир қатор оксилларнинг синтези сифатида акс этади.

Кўрсатиб ўтилган жараён «нодетерминацияланган» типга мансуб мураккаб тузилган тугунакнинг шаклланиши билан якунланади. Унинг асосий тузилмалари: а) молекуляр азотни ўзлаштирилиши кечадиган бактериялар билан зарарланган тўқима; б) ўсимлик фотосинтатлари келиб тушадиган ва азотфиксация маҳсулотлари чиқиб кетадиган ўтказувчи толалар; в) тугунакнинг ўсиши амалга ошадиган апикал меристема кабилар ҳисобланади. Апикал меристема азотфиксация қилувчи тўқималарнинг доимий янгилашиб туришини таъминлайди, унинг натижасида симбиознинг турли босқичларига мос зоналарга тугунакнинг марказий қисмларининг ихтисослашуви кузатилади. Тугунаклар морфогенезининг асосий натижаси симбиотик шериклар (компаратментлар) нинг уйғунлашган тизимини шаклланиши ҳисобланади, бу эса бактерияларнинг ҳўжайралараро (инфекция ишларидаги) шаклидан ҳўжайраици (симбиосомалардаги) шаклига ўтишини таъминлайди.

Генетик таҳлил. Ҳозирги вақтда дуккакли ўсимликлар «симбиотик» генларининг икки гуруҳи чуқур ўрганилмоқда. Биринчи гуруҳ генларини формал генетика усуллари қўллаш – симбиоз таракқиёти учун дефектли мутантларни олиш ва таҳлил қилиш орқали аниқланади. Иккинчи гуруҳ генларини «тескари генетика» - симбиозда синтез бўладиган ген маҳсулотлари (оксиллар, мРНК) ни таҳлил қилиш усуллари орқали ўрганилади.

Ўсимлик мутантларини тугунак ҳосил қила олмайдиган (Nod) ёки уларда азотфиксация фаоллигини индуцирлаш хусусиятига эга бўлмаган азотсиз муҳитда ўса олмаслик хусусиятига қараб танлаб олинади. Кўплаб дуккаклилар (нўхат, соя, беда, йўнғичка, ловия, нут, хашаки дуккаклилар, қашқарбеда, себарга) да бундай мутантларни қўллаш орқали симбиознинг ҳосил бўлиши ва фаолиятида бевосита иштирок этадиган 100 дан ортиқ генлар идентификация қилинган. Симбиоз муносабатнинг генетикасини ўрганишнинг қулай объекти ҳисобланилган – экиладиган нўхат (*Pisium*

sativum L) да 40 дан ортиқ генлар аниқланган. Ўсимликларни тугунак ҳосил қилиш хусусиятига эга бўлмаслигини назорат қилувчи мутант аллеллар, камдан-кам ҳолларда, баъзи истисноларни инобатга олмаганда рецессив бўладилар. Азотфиксация қилиш хусусиятига эга бўлмасликни назорат қиладиган аллеллар рецессив (нўхат, себарга, бедада) ҳам доминант (сояда) ҳам бўлиши мумкин. Симбиоз тараққиётига зарар келтирадиган мутантлар ўсимликларнинг морфологияси, ривожланиш тезлиги ва етилиши (фертиллиқ) га таъсир кўрсатадилар.

5.2. жадвал.

Симбиоз тараққиётининг асосий босқичларини назорат қиладиган дуккакли ўсимликларнинг генлари

Тараққиёт босқичлари	Кодлар	Маълум босқични назорат қилувчи генлар (дуккаклилар турлари)
Преинфекция (инфекция олди босқичи)		
Ризобийларнинг вирулентлик генлари индукцияси	<i>Ngi</i>	Аниқланмаган
Илдиз тукчалари деформацияси	<i>Hac</i>	<i>sym8, sym9, sym19, sym30</i> (Ps); <i>rj1=nodI</i> (Gm); <i>rnI</i> (Ca) <i>nn1, nn2</i> (Ms); <i>sym3</i> (Ma)
Тугунаклар морфогенези		
Инфекция ипларининг шаклланиши	<i>Itf, Iti, Ith</i>	<i>sym7, sym14, sym35</i> (Ps), <i>sym1, sym5</i> (Ma), <i>r, t</i> (Tp) <i>sym 2, sym 36</i> (Ps)
Кортикал ҳужайралар бўлиниши индукцияси	<i>Itr, cd</i>	<i>sym5, sym34</i> (Ps) <i>sym5</i> (Ps)
Тугунак тўқималари ихтисослашуви	<i>Ntd</i>	<i>sym35</i> (Ps)
Ўсимлик цитоплазмасига бактерияларнинг эндоцитози	<i>Bar, Itn, Idd</i>	<i>sym33</i> (Ps), <i>d, li, ie</i> (Tp) <i>sym40</i> (Ps)
Бактероидлар ихтисослашуви	<i>Bad</i>	<i>sym31, sym32</i> (Ps), <i>in1, in2, in4, in5</i> (Ms)
Эндосимбионтлар тараққиётининг бошқариши		
Тугунак ҳосил бўлиши авторегуляцияси	<i>Aut</i>	<i>nod3, sym28, sym29</i> (Ps), <i>sym5</i> (Vf); <i>nod</i> (Pv), <i>ntsI-nod 2</i> (Gm)
Тугунаклар фаолияти		
Азот ўзлаштирилиши	<i>Nif</i>	Ўсимликларнинг мазкур босқичи издан чиққан мутантлар <i>Bar⁻, Bad⁻</i> , ёки <i>Nop⁻</i> фенотипларига эга бўлади
Тугунаклар барқарорлиги	<i>Nop</i>	<i>sym13, sym25, sym26, sym27</i> (Ps)

*Ca – *Cicer areatinum* L., Gm – *Glycine max* (L.) Merr., Ma – *Melilotus albus* Medik, Ms – *Medicago sativa* L., Pv – *Phaseolus Vulgaris* L., Ps – *Pisum sativum* L., Tp – *Trifolium pratense* L., Vf – *Vicia faba* L.

Симбиоз тараққиёти генетик таҳлилларининг кўрсатишича, «ёввойи тип» даги тугунакларни ўрганиш натижасида аниқланган йирик босқичларни бирмунча майда («элементар») босқичларга бўлиш мумкин, уларнинг ҳар қайси кам миқдордаги (хатто якка) генлар билан назорат қилинади. Масалан, *Itf* босқичи 3 га бўлинади: *Iti* (инфекция ипи шаклланиши инициацияси), *Ith* (илдиз тукчасидаги ипнинг ўсиши) ва *Itg* (*III*нинг илдиз кортексидида ўсиши; *Bar* эса икки босқичга: *Itn* (*III*нинг тугунак хужайралари ва тўқималаридаги тараққиёти ва *Idd* («Инфекция томчиси»нинг дифференциаллашуви - ихтисослашуви).

Дуккаклиларнинг симбиотик генларини, уларнинг маҳсулотларини идентификацияси (кўпинча ўша маҳсулотларнинг ўзини) аниқлаш орқали (агар улар тугунакларда *de novo* шароитида фаоллашса) уларни нодулинлар ёки (уларнинг илдизга нисбатан тугунаклардаги фаоллиги сезиларли орта борса *Nst*-генлар) деб аталади. Мазкур генларни аниқлаш тугунак ёки стерил илдизларда, ёхуд азотни ўзлаштирадиган ёки ўзлаштирилмайдиган тугунакларда синтезланадиган оксил (РНК) спектрларини таққослаш йўли билан ўрганилади.

Нодулинлар ва *Nst* генларни мос равишда «эртанги» (азотфиксация бошлангунга қадар фаоллашадиган) ва кечки (азотфиксация бошланиши билан ёки азотфиксация даврида фаоллашадиган) турларга бўлинади.

5.3-жадвал

Дуккаклиларнинг эртанги нодулинлари

Генлар	Ўсимликлар	Нодулинларнинг таснифи	Тугунаклардаги жойлашуви	Тахмин қилинадиган фаолияти
ENOD2	Нўхат, соя, вика, беда, себарга	Хужайра деворининг экстенсинлари типига хос бой оксил-гидроксипролин	Паренхима	Кислородли тўсиқнинг шаклланиши
ENOD5	Нўхат	Сигнал кетма-кетликлари ва пролин-домени	Инфекция иплари охирини сақловчи хужайранинг инфекция зонаси	Инфекцияда (зарарланиш) иштирок этиш
ENOD12	Нўхат, ловия, беда, мош, нут, дуккаклилар	Пролинга бой участкаларга эга	Инфекция зонаси	Инфекция иплари ва хужайра деворини қуриш
ENOD40	Соя, нўхат	Структураси жиҳатидан РНК-бошқарувчи (регулятор) ни эслатади	Ўтказувчи боғламларнинг перицикли	Гормонал мувозанатни аниқлаш (мувофиқлаштириш)

Кўпгина тугунакка хос оксиллар учун субхужайравий жойлашув (ўсимлик хужайраси цитозоли, бактероид олди мембранаси, инфекция ипи девори) ёки ферментатив фаоллик (кўплаб «кечки» нодулинлар азотли ёки углеродли фермент алмашинувининг изоформаси ҳисобланиши) аниқланган. Баъзи нодулинлар симбиознинг тузилмавий асосини шаклланишида иштирок этади (4.3 расм). Уларнинг қаторига тугунак паренхималарида фаол синтезланадиган эртанги ENOD2 нодулини ва *III* деворларида тўпланадиган ENOD5 ва ENOD12 ни киритилади. Эндоцитоз даврида синтез бўладиган нодулин - N-26, ПБМ таркибига киради, у шериклар ўртасидаги регулятор ёки трофик омилларнинг транспорти учун зарур бўлса керак, деб тахмин қилинади.

Тугунаклар тараққиётида фитогормонларнинг ролини ўрганиш жуда катта қизиқиш уйғотади. Аниқланишича, илдизларга ауксинлар транспортининг ингибиторлари билан ишлов бериш тугунаксимон тузилмаларнинг ҳосил бўлишига олиб келар экан. Тугунак ўсишининг гормонал статусини белгилашда иштирок этадиган ENOD40 нодулини ҳам аниқланган. Унинг вазифаси эндосимбионт таъсирида ўзгарадиган ауксин ва цитокининлар мувозанатининг назорати билан боғлиқ ва у тугунаклар гистогенези ҳамда тугунакли примордийлар шаклланишида асосий ўрин тутди. Шуни ҳам қайд этиш лозимки, кўплаб нодулинларнинг вазифаси тўғрисидаги ғоялар олдиндан аниқланган оксиллар ва аминокислота қисмларини солиштириш орқали таҳлил қилишга асосланади. Нодулинлар симбиоз тараққиётида кўп ҳолларда айнан шу вазифаларни бажаради деган тўғридан-тўғри далиллар ҳанузгача аниқланган эмас.

Эндосимбионтлар тараққиётининг бошқарилиши. Симбиознинг тузилмавий асоси шерикларнинг бошқарувчилик ўзаро алоқалари билан боғлиқ бўлиб, уларнинг натижаси симбиотик тузилмаларнинг тараққиёти оптималлашуви, шунга мос равишда ризобийлар сони ва кўпайиш тезлигининг ортиши билан изоҳланади. Бундай регуляция жуда муҳим, чунки бактерияларнинг потенциал бўлиниш тезлиги ўсимликларга нисбатан анча юқоридир. Эндосимбионт микроорганизмларнинг назорат қилинмайдиган кўпайиши хўжайин ўсимлик учун кўп ҳолларда зарарлидир, унинг симбионтлар кўпайишини қатъий назорат қилиш хусусияти мутуалитик симбиознинг паразитизмдан асосий фарқ бўлиб ҳисобланади.

Симбионтларнинг хўжайин организм химоя тизимлари билан ўзаро муносабати. Дуккакли ўсимликларда симбиознинг шаклланишида патоген микроблар кириши натижасида содир бўладиган вақтдаги каби бир қатор химоявий жараёнларнинг индуцирланиши кузатилади. Бу флавоноидлар, феноллар, хитиназалар, каллозалар ва пероксидазалар синтезидир. Бироқ тугунакларда бу реакциялар патогенлар билан зарарланишга нисбатан кучсиз ифодаланади, бу реакцияларнинг натижаси

микроорганизмларнинг инактивациясига эмас, балки метаболитик фаоллиги ва кўпайишини бошқарилиши ҳисобланади. Бу бактерияларнинг ўсимлик ҳимоя тизимлари билан симбиотик тизим тараққиётида нозик ўзаро мувофиқлашган таъсири натижасида содир бўлади.

Шерикларнинг ўзаро мувофиқлашган муносабатлари ризобийлардаги бир қатор генларнинг ҳўжайин ўсимлик ҳимоя тизими билан ўзаро мулоқоти орқали ифодаланади. Мазкур генлардаги мутациялар симбиоз тараққиётини тўсиб қўяди, натижада одатдаги тугунаклар ўрнига «сохта тугунаклар» ҳосил бўлади, улар бактерия ҳужайралари ва инфекция ипларига эга бўлмасдан, шаклланмаган тўқима билан тўлган бўлади (бундай мутантларнинг фенотиби *Nod⁺Inf⁻* белгилар билан белгиланади). Ҳўжайин организм билан «муносабатни аниқлаш» га жавобгар бактерия генлари ичида энг кўп ўрганилганлари ҳужайра ташқарисидаги турли компонентлар – экзополисахаридлар ва циклик глюканлар синтезини кодирлайдиган генлар ҳисобланади. Мазкур генлар бўйича мутантларни дастлаб колониялари морфологиясининг ўзгаришлари, шунингдек флуоресцияловчи бўёқ калькофлуорни адсорбция қила олмаслиги бўйича танлаб олинади.

Ризобийларнинг анча чуқур ўрганилган, ўсимлик ҳимоя тизимлари билан ўзаро муносабатига жавобгар ҳужайра сирти компонентларидан бири кислотали экзополисахарид ёки сукциноглюкан (ЭПС-1) ҳисобланади. Унинг синтези беда ўсимлиги ризобийлари (*Rhizobium meliloti*) да 20 дан ортиқ ехо-генлар билан назорат қилинади, уларнинг катта қисми мазкур бактерияларда мавжуд бўлган 2 та мегаплазмидаларнинг бирида кластер бўлиб жойлашади. Бир қатор ехо-генлар учун экспрессия механизми ва бирламчи структура аниқланган бўлиб, бу ЭПС-1 синтезининг бир қадар тўлиқ чизмасини беради. У ўз ичига: оралиқ маҳсулотлар шаклланиши, улардан (саккиз моносахарид қолдиқларидан ташкил топган) мономерлар синтези, уларнинг модификацияси (сукцинил, пирувил ва ацетил гуруҳларнинг бирикиши), полимеризацияси ва периплазмага кўчиб ўтиши кабиларни олади.

Тугунаклар ҳосил бўлишининг авторегуляцияси. Дуккакли ўсимликларнинг ҳимоя тизимлари орқали амалга ошириладиган симбиоз тараққиётининг бошқарилуви эндосимбионт микроорганизмлар ривожланишини назорат қилишда ўсимликларга ёрдам берадиган барча механизмларнинг кўп хиллигини истисно этмайди. Шунингдек, дуккакли ўсимликларгагина хос тугунак ҳосил бўлиши авторегуляцияси механизмлари ҳам катта қизиқиш уйғотади, улар ўсимликларда ортиқча тугунаклар ҳосил бўлишини олдини олади, бу эса ўз навбатида симбиоз жараёнида ҳамиша танқис бўлган энергияни тежаш имконини беради. Дуккакли ўсимликлар тугунак ҳосил бўлишини бирмунча қатъий

авторегуляция қилиш хусусиятига эга, у “системали” характерга эга бўлиб, ер устки қисмлари воситасида амалга оширилади.

Кўплаб дуккакдиларда тугунак ҳосил бўлишининг авторегуляциясини бузилиши бўйича мутантлар олинган. Уларни танлаб олишда ўта кўп тугунаклар ҳосил қилиш (Nod^{++}) фенотипик белгиси, яъни, тугунакларни «ёввойи типга» нисбатан 2-10 баробар кўп ҳосил қилиш хусусиятига кўра танлаб олинади. Одатда бундай мутантлар дастлабки ўсимликларда симбиоз тараққиётини тўхтатадиган нитратларнинг юқори дозалари иштирокида кўплаб тугунаклар ҳосил қилади (Nts -фенотиби – Nitrate tolerant symbiosis). Nod^{++} мутантларда умумий нитрогеназа фаоллиги (битта ўсимликка нисбатан ҳисобланганда) ошган бўлса, специфик нитрогеназа фаоллиги (тугунаклар массасига нисбатан) камайган бўлади.

Шуни ҳам таъкидлаш лозимки, кўплаб Nod^{++} мутантларда ўсимликларининг ер устки массасининг пасайиши кузатилади. Бу энергиянинг катта қисмини азотфиксация қилувчи жуда кўплаб тугунакларга сарфланиши билан изоҳланади. Шундай қилиб, мазкур мутантлар мисолида эндосимбионтларнинг миқдорини назорат қилиш ўзаро муносабатнинг мутуалитик характерини сақлаб туришда муҳим шарт-шароит эканлиги ойдинлашади. Агар шериклар орасидаги бундай назорат камайтирилса, гарчи асосий биокимёвий жараён, яъни симбиознинг асоси (N_2 нинг ўзлаштирилиши) бузилмаса-да, бу муносабат паразитизмга ўтиши мумкин.

Азотнинг ўзлаштирилиши. Симбиознинг яқунловчи босқичи, яъни, ризобийларнинг азотни фаол ўзлаштирилиши ва жараён маҳсулотини ўсимликка экспорти кўплаб дуккакли ўсимликларда бактерияларнинг эндоцитози ва бактериоидларнинг шаклланишидан сўнг бошланади. Бактероидларда нитрогеназа ферменти синтези фаоллашиб, у умумий оксилнинг 30% гача булган миқдорини ташкил этиши мумкин. Бирок нитрогеназанинг ҳосил бўлиши тугунакларнинг симбиотик азотфиксация аъзоси сифатида фаолият юритишида асосий, лекин ягона жараёни эмас. Жараённинг бошқа хил аҳамиятлилари сифатида: нитрогеназанинг молекуляр кислороддан ҳимоя тизимини шаклланиши, нитрогеназа комплексининг энергетик эҳтиёжларини қондирилиши ва азотфиксация маҳсулотлари ассимиляциясини кўрсатиш мумкин. Бу жараёнларнинг барчаси ўсимлик ва бактериялар билан бирга амалга оширилганлиги учун симбиознинг шериклари ўртасида структуравий ва функционал уйғунлашувни таъминланади.

Нитрогеназа комплексининг биогенези. Азотни ўзлаштирувчи бошқа микроорганизмлар сингари ризобийларда нитрогеназа оксили таркибини кодирлайдиган *nifHDK* генлари, шунингдек, унинг кофакторлари шаклланиши, синтези ва етилиши жараёнларини бошқарилишига бошқа хил *nif*-генлар мавжуд. Ризобийларда ва симбиотик

бўлмаган азотфиксаторларда нитрогеназа таркиби генлари транскрипцияси *nifA*- гени орқали фаоллашади.

5.4-жадвал

Симбиотик азотфиксацияни таъминлайдиган асосий биокимёвий жараёнлар

Жараёнлар	Шерикларнинг ҳиссаси	
	микросимбионт	хўжайин
Нитрогеназа жараёни биогенези	Нитрогеназанинг кофакторлари ва оксиллари синтези (<i>nif</i> -генлар), регулятор каскади (<i>FixLJ</i> + <i>FixK</i>) шаклланиши	Нитрогеназа генларининг бошқарилиши эҳтимоли (турли ўсимликларда <i>nif</i> -генлар индукциясининг ўзига хослиги тўғрисидаги дастлабки маълумотлар мавжуд)
Нитрогеназанинг кислороддан ҳимояланиши	Икки компонентли регулятор тизими <i>FixL</i> <i>J</i> ва транскрипцион активатор <i>nifA</i>	Леггемоглобин оксили ва кислородли тўсик
Тугунак энергетик эҳтиёжларининг қондирилиши	Дикарбон кислоталар (<i>dct</i> -генларнинг) бактероидларга транспорти, тугунакка хос цитохромоксидаза <i>cbb₃</i> нинг синтези (<i>fixNOQ</i> , <i>fix GHIS</i> -генлари)	Кўп микдордаги фотосинтат (сахароза) ларнинг тугунакларга томон транспорти, C-метаболизмининг тугунакка хос изоферментлари синтези
Азотфиксация маҳсулотлари ассимиляцияси	Аммонийнинг ўсимлик ҳужайрасига экспорти (қисман аланин шаклида)	N-метаболизмининг тугунакка хос изоферментлари синтези

Шу билан бирга ризобийларда симбиотик азотфиксацияга хос бўлган, яъни, *fixL*, *fixJ* ва *fixK* генларидан ташкил топган бошқарув тизими аниқланган. *fixLJ* генлари икки компонентли регулятор тизими (*fixL* мембрананинг оксил-сенсори, киназа ва фосфатаза фаолликларига эга, *FixJ* –транскрипциянинг цитоплазматик фосфорилланган регулятори) ни кодирлайдилар. Бундай бошқарув тизимининг фаоллиги фақат микроаэрофил шароитларда амалга ошади, чунки *FixLO₂* сенсори вазифасини бажаради, бу гем иштирокидагина амалга ошади. *FixK* оксили - *Сгp-Fnr* оиласига кирадиган транскрипцион регулятор. Ризобийларда азотфиксацияни бошқарув тизими, нитрогеназанинг таркибий генларидан ташқари, *dctABD* (улар азотфиксация жараёнининг асосий энергия манбаи бўлган дикарбон кислоталарнинг бактероидларга транспортини кодирлайдилар), *fixNOPQ* ва *fixGHIS* (бактероидларнинг нафас олиш занжирида электронлар транспортини таъминлайдиган *cdd₃* типдаги бактероид цитохромоксидазаси синтезини кодирлайдиган) генларнинг экспрессиясини ва геннинг биосинтезини назорат қиладилар.

nif – генлар бошқарув тизимидан фарқли равишда симбиотик бўлмаган азотфиксаторлар ризобиал тизими *nif*-генларнинг боғланган азот билан репрессияси учун жавобгар, яъни *Klebsiella* нинг *nifl*- генига хос бўлган элементларни сақламайди. Бу тугунаклардаги азотни ўзлаштириш жараёни

боғланган азот миқдори ортиқча бўлган шароитлардагина амалга ошиши билан боғлиқ, тугунакларнинг ҳосил бўлишини ва боғланган азот миқдори меъёридан ошиқ бўлганда, азотфиксация жараёнини бошқаришни ҳўжайин-ўсимлик амалга оширади.

Нитрогеназанинг кислороддан ҳимоя қилиниши. Тугунакларнинг фаолият юритиши учун зарурий шароит уларда анаэроб муҳитнинг сақлаб турилишидир, чунки бактериялар томонидан синтезланадиган нитрогеназа кислород таъсирида тез ва қайтмас даражада фаоллигини йўқотади.

Бироқ оксидланган фосфорилланишнинг юқори даражасида анчагина кўп миқдорда энергия талаб қиладиган азотфиксация жараёни содир бўлади, унинг учун бактериал цитохромоксидазаларга O_2 нинг катта миқдори келиб тушиши зарур. Иккала шериклар генетик тизимларининг мувофиқлашган фаолияти натижасида ҳосил бўладиган «кислородли парадокс» масаласи ечилади. Бактерияларда нитрогеназа синтезининг кислородга сезгирлиги FixLJ ва NifA тизимлари даражасида амалга оширилади. Ўсимликлар, шунингдек, азотфиксацияни «кислороддан ҳимоялаш» икки хил механизм: а) тугунакларнинг кислороддан ҳимояланишида пўстлоқ ичи муҳим роль ўйнаб, қопловчи тўқималарида кўп компонентли диффузион тўсикқа: б) кислородни боғлаб ва симбиосомаларга ташилишини таъминлайдиган гемоглобинсимон оқсил – леоглобин (у тугунаклар умумий оқсилларининг 30%гача миқдорини ташкил этади) га эга.

Узоқ вақт леоглобин синтезини симбиознинг молекуляр даражаси сифатида қаралган. Полипептидли (глобин) қисми ўсимлик генлари, ген қисми – микросимбионт генлари томонидан кодирланади, деб ҳисоблаб келинган. Бу фикр ризобийларнинг азотфиксация қилиш хусусиятига эга бўлмаган аминолевулин кислотаси синтези бўйича дефектли мутантлари, гем ёки унинг оралиқ шакли, тўғрисидаги маълумотларга асосланган эди. Бироқ кейинги тадқиқотларнинг кўрсатишича, леоглобиннинг иккала қисми ҳам ўсимлик ҳўжайралари томонидан синтезланар экан. Тугунакларда жойлашган бактериоидлар ҳам гемни синтезлайди, лекин унинг азотфиксациядаги иштироки нитрогеназага электронлар транспортини таъминловчи цитохромлар биогенезидан иборат бўлади.

Дуккакли ўсимликларда леоглобин синтези ўзаро бириккан бир нечта Lb-генлари оиласи иштирокида кодирланади. Ҳозирги вақтда мазкур генларнинг структуравий – функционал ташкиллашуви ўрганилган: уларнинг интрон – экзон структураси аниқланган, промоторларнинг ташкилланишини кодирлайдиган ва кодирламайдиган участкаларининг жойлашуви ўрганилган. Lb-генларнинг тугунакларга экспрессияси, кўп ҳолларда, иккала шерикларнинг регулятор сигналларига асосланади. Бу ҳақда баъзи бактериал промоторларда гомологик ва сигнал молекулаларга нишон бўлиб хизмат қиладиган, ўсимлик ҳўжайраларига бактериялардан

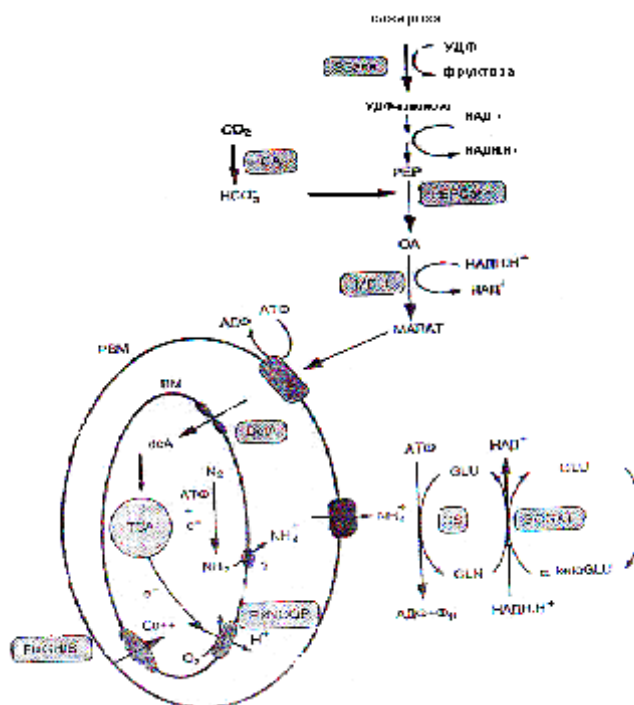
келиб тушадиган мазкур генлар кетма-кетликларининг промоторларда мавжуд бўлиши далолат беради. Шунингдек, леоглобин генлари промоторлари билан муносабатга киришадиган, бактериал ДНКни боғловчи оқсилларни ҳам аниқлашга эришилган.

Эндосимбиотик бактериялар тугунаклардаги микроаэрофил шароитларга боғлиқ равишда интенсив нафас олиш (бусиз симбиотик азотфиксациянинг юқори фаоллигига эришиб бўлмайди) ва нитрогеназининг фаол ишлаши каби жараёнларни уйғунлаштириш муаммосига дуч келади. Бу ризобийларда тармоқланиб кетган электрон транспорт занжири борлиги туфайли таъминланади, унда баъзи компонентлар аэроб шароит (*exp-lanta*) да ишласа, баъзилари анаэроб (микроаэрофил) шароитларда, шунингдек тугунакларда фаолият юритади. Симбиоз учун бу занжирларда *fixNOQ* ва *fix GHIS* генлари кодирлайдиган цитохромоксидаза *cbb₃* муҳим роль ўйнайди. Бу генлардаги мутациялар симбиотик азотфиксацияни издан чиқаради, лекин эркин яшовчи бактерияларнинг нафас олиш фаоллигига таъсир кўрсатмайди. Шу билан бир вақтда, ризобийлардаги бошқа хил цитохромоксидазалар шаклланишини издан чиқарадиган мутациялар симбиотик азотфиксацияга таъсир ўтказмайди.

Азотфиксациянинг энергетик таъминоти. Симбиотик азотфиксациянинг асосий энергия манбаи ўсимликнинг ер усти қисмларида амалга ошириладиган фотосинтез жараёнидир. Фотосинтатлар тугунакларга сахарозага ўхшаш шаклда транспорт қилинади. Шундан сўнг ўсимлик сахароза катаболизмини анаэроб босқичи (гликолиз) ни амалга оширади, бу жараён давомида кўп миқдорда энергия ажралиб чиқади. Микросимбионтнинг улушига катаболизмнинг анчагина энергетик самарадор қисми – уч карбон кислоталар цикли (УКЦ) ни амалга ошириш тўғри келади. Бактероидларга хўжайин – ўсимликдан тушадиган асосий углеводлар C_4 дикарбон кислоталари (асосан сукцинат ва малат) ҳисобланади, улар УКЦ да бевосита иштирок этадилар. Шунинг учун бактериоидларнинг нитрогеназа тизими интенсив фаолияти бактериоидларга дикарбон кислоталарнинг ташилишини таъминлайдиган генлар билан маълум даражада боғлиқдир. Бу жараёнда учта ген *dctA* (мембранавий сукцинат пермеазани кодирлайдиган), *dctB* ва *dctD* (*dctA* транскрипциясини белгилайдиган, икки компонентли регулятор тизим оқсилларни кодирлайдиган) генлари асосий ўрин эгаллайди. *DctB* оқили сенсор ҳисобланиб, у бактериоидлар мембранасига жойлашиб олиб дикарбон кислоталарга сезгирдир. *dctD* гени эса *dctA* гени промотори билан муносабатга киришиб, унга РНК-полимеразанинг ўрнашишини осонлаштиради. Шуни таъкидлаш лозимки, дикарбон кислоталар транспорти тизими симбиотик азотфиксациянинг интенсивлиги миқдорини чекловчи «нозик нуқта»лардан биридир. Бу ҳақда азотфиксациянинг фаоллиги ва симбиознинг самардорлигини ризобийларга *dct*-генларини

қўшимча нусхаларини киритиш орқали сезиларли даражада ошириш мумкинлиги далолат беради.

Тугунакларнинг энергетикаси ҳўжайин-ўсимлик томонидан С-метаболизмининг тугунакка хос фермент изоформалари синтези туфайли таъминланади. Улар орасида сахарозани уридиндифосфат иштирокида гидролизлайдиган сахарозасинтетаза (SS) марказий ўринлардан бирини эгаллайди. Соя ўсимлиги тугунакларида эрувчан цитозол оксиллари умумий миқдорининг 3-4%ини SS ташкил этади. Гидролиз натижасида ҳосил бўлган гексоза (глюкоза ва фруктозалар) катаболизмнинг оддий йўли –гликолизга учрайди. Бунда муқобил-пентозофосфат цикли иккиламчи аҳамиятга эгадир (5.6-расм).



5.6 – расм. Азот ўзлаштирилувчи симбиоз муносабат шаклланишида шерикларнинг метаболитик интеграцияси

Ssase-сахарозасинтетаза, PEP-фосфоенолпируват, PEPCase- фосфоенолпируват-карбоксилаза, OA-оксалоацетат, MDH- малатдегидрогеназа, DctA-сукцинатпермиаза, GS-глутаминсинтетаза, GOGAT-глутаминситаза, dcA-дикарбонкислоталар (сукцинат, малат), TCA-уч карбон кислоталар цикли, GLU-глутамин, GLN-глутамат, α keto- GLU α -кетоглутарат, FixGHIS ва FixNOQP-бактеоидлар учун махсус цитохромлар, PBM-перибактеоид мембрана, BM – бактеоид мембранаси.

Тугунакларда азотнинг ўзлаштирилиши миқдорини белгилайдиган -асосий омиллардан бири тугунаклардаги углерод миқдори бўлиб ҳисоблангани учун фосфоенолпируваткарбоксилаза (PEPC) катализлайдиган CO_2 нинг нофотосинтетик (коронғудаги) ўзлаштирилиши муҳим аҳамият касб этади: фосфоенолпируват + CO_2 = малат. Бу реакция

бактероидларга малат ва бошқа энергетик субстратлар таркибидан келиб тушадиган углерод атомининг 25 % ига яқин микдорининг манбаи ҳисобланади. Шундай қилиб, РЕРС фаолияти туфайли тугунакларда фаол кечадиган, нафас олиш жараёнида ажралиб чиқадиган карбон кислоталарнинг асосий қисми рециклга учрайди.

Ўзлаштирилган азотнинг ассимиляцияси. Тугунакларга келиб тушадиган С (углерод)-бирикмалари азотфиксация учун фақат энергия манбаи бўлибгина қолмай, балки фиксация қилинган азотнинг ассимиляцияси учун углеродли «скелет» вазифасини ҳам ўтайди. Азотфиксация жараёнида ҳосил бўлган аммоний бактероидлардан тугунакларнинг ўсимлик хужайралари цитоплазмасига эркин шаклда ёки аланин (бу бактериялар аланин – дегидрогеназа фаоллиги натижасида ҳосил бўлади) таркибидан келиб тушади. Ўзлаштирилган азот ўсимлик хужайралари метаболизмига ўтади. Бунда азотнинг дастлабки ассимиляцияси (аммонийнинг хужайра метаболизмига қўшилиши), ўзлаштирилган (тугунаклардан илдизнинг ўтказувчи қисмига ўтадиган) азотнинг транспорт шакллариининг ҳосил бўлиши ва ўзлаштирилган азотнинг транслोकацияси (унинг ўсимлик турли аъзолари ўртасида қайта тақсимланиши) каби босқичлар фарқланади. Дастлабки ассимиляция ва ўзлаштирилган азотнинг транспорт шакллари ҳосил бўлишида ўсимлик томонидан синтезланадиган азотли алмашинувнинг тугунакка хос фермент шакллари муҳим рол ўйнайди.

5.5-жадвал

Азотфиксация қилувчи тугунакларга хос ўсимлик ферментлари

Ферментлар	Ўсимликлар	Тугунакларда фаолликни оширадиган механизмлар
Углеродли алмашинув		
Сахарозосинтетаза	Соя	Янги изо шакл (нодулин N-100) синтези
Малатдегидрогеназа	Бўри дуккаги, нўхат	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Алкогольдегидрогеназа	Люпин (бўри дуккаги)	Тўрт хил янги изошакл (нодулинлар) синтези
Лактатдегидрогеназа	Люпин (бўри дуккаги)	Тўрт хил янги изошакл (нодулинлар) синтези
Фосфоенолпируват-карбоксилаза	Нўхат, дуккаклар, ловия, беда, бўри дуккаги	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
фосфофруктокиназа	Бўри дуккаги	Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Азотли алмашинув		
Глутаминсинтетаза	Ловия, беда, нўхат, соя	Янги изошакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши

NADH га боғлиқ глутаматсинтаза	Ловия, бўри дуккаги	Янги изошакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Asp-аминотрансфераза	Беда, нўхат, бўри дуккаги	Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Gln га боғлиқ аспарагинсинтаза	Бўри дуккаги, соя, беда, дуккакдилар, нўхат	Nst шакл AS1 ва AS2 синтези кучайиши
Уриказа	Соя, ловия	Янги изошакл (нодулин) синтези

Ўсимлик хужайраларида аммонийнинг бирламчи ассимиляцияси «глутаматсинтаза цикли» глутаминсинтаза (GS) ва NADH га боғлиқ глутаматсинтаза (NADH-GOGAT) ферментлари билан назорат қилинадиган реакциялар билан бошланади. GS ловия ўсимлиги тугунак бактерияларидан ажратиб олинган бўлиб, молекуляр оғирлиги бир хил – 40 кД га яқин суббирликлардан ташкил топган октамер ферментдир. Уч хил изофермент (GS_{N1} , GS_{N2} , GS_{L2}) аниқланган бўлиб, уларнинг иккитаси цитоплазмада, учинчиси зарарланган ўсимлик хужайраларининг пластидаларида жойлашган. Бунда фақат GS_{N1} , аникрофи унинг суббирликларидан фақат биттаси тугунакка хос изошакл (нодулин) ҳисобланади.

Тугунакка хос GS дан фарқли ўлароқ глутаматсинтаза циклининг иккинчи ферменти ўсимлик хужайралари пластидаларида жойлашган NADH-GOGAT ҳисобланади. Шундай қилиб, тугунак бактериялар хўжайраларида глутаматсинтаза цикли ферментларининг алоҳидаланиши (GS-цитоплазмада, NADH-GOGAT пластидаларда) аниқланган. Кўплаб маълумотларнинг кўрсатишича, фиксация қилинган азот ассимиляцияси миқдорини белгиловчи босқич айнан NADH-GOGAT томонидан катализланадиган реакция ҳисобланади: NADH-GOGATнинг энг фаол тугунакларда ҳам активлиги юқори эмас. Нофаол тугунакларда ҳам мазкур ферментнинг активлигини (шунингдек унинг м-РНКсини) аниқлашга кўпинча муваффақ бўлинмаган. Тугунак ҳосил бўлишида индуцирланадиган беда ва нўхат тугунагининг NADH-GOGATи оғирлиги 200 кД дан ортиқ биргина молекула сифатида қайд этилган. Ловия тугунакларидан NADH-GOGATнинг иккита изоферменти синтезланиб, уларнинг биттаси тугунак-стимуловчи ҳисобланади.

Глутаминдан ташқари, мўътадил иқлим минтақаларида тарқалган кўплаб дуккакли ўсимликлар (масалан, беда ва нўхат) да азотнинг ташиладиган шакли амидлар, асосан – аспарагин ҳисобланади. Бу дуккакдиларни «амидли» типга киритилади. Бошқа дуккакдилар (ловия, соя, вигна) да азотнинг ташилиши уреидлар - аллатоин ва аллатоин кислота шаклида амалга оширилади. Бу дуккакдиларни уреидли типга киритилади.

«Амидли» дуккаклиларда ўзлаштириладиган азотнинг барча асосий ассимиляция реакциялари симбиосомалар сақлайдиган хужайраларда кечади. Бунда аспартатнинг оралиқ маҳсулоти-аспарагин ҳосил бўлиши реакциясини катализлайдиган аспаратаминотрансфераза (ААТ) алоҳида роль ўйнайди. «Уреидли» тугунақлар метаболизмида уриказа ферменти муҳим аҳамият касб этади. У уреидлар биосинтезининг охириги босқичларидан бири – пуринлар оксидланганда ҳосил бўладиган сийдик кислотасининг оксидланиши натижасида аллатоин ҳосил бўлишини амалга оширади.

Ўсимликларнинг цианобактериялар билан симбиоз муносабати

Азотни ўзлаштирувчи цианобактериялар бир қатор ўсимликлар, жумладан, ёпиқ уруғлилар, очик уруғлилар, қирққулоқлар, йўсинлар ва ҳатто бир хужайрали денгиз диатом сув ўтлари билан ҳам симбиоз муносабатга киришади. Энг кўп ўрганилганлари гетероцистали цианобактериялар *Anabaena* (*Nostoc*)нинг сув қирққулоғи *Azolla*, шунингдек, *Nostoc* нинг гулли *Gunnera* ва *Anthoceros* ўсимлиги билан эндосимбиоз муносабатидир. *Nostoc*- *Gunnera* симбиози хужайра ичи симбиозига мисол бўлса, қолганлари – хужайра ташқариси симбиозидир (*Azolla* да цианобактерия барг юзасида жойлашса, *Anthoceros* талломнинг ён томонидаги бўшлиқларда бўлади).

Микроорганизмлар боғланган азотсиз муҳитда ёруғликда ҳам (минимал озиқа муҳитида, яъни автотроф С-ли озиқланишда), қоронғуда ҳам (углерод манбалари мавжуд муҳит, яъни гетеротроф С-озиқланишда) ҳам диазотроф равишда ўса олади. Бу симбиотик цианобактерияларда азотфикация билан боғлиқ жараёнларни генетик таҳлил қилишда кенг имкониятлар очади. Ўсимликлар учун цианобактериялар билан муносабатда симбиозга қарамлик турли даражада ифодаланади: *Azolla* учун у облигат бўлса, *Gunnera* ва *Anthoceros* учун – факультативдир.

Азотни ўзлаштирувчи цианобактериялар билан симбиозларнинг баъзилари экологик ва қишлоқ хўжалик аҳамиятига эгадир. Шоли етиштиришда «*Azolla*-*Anabaena*» тизими азот манбаи сифатида юқори самарадорликка эга. «*Nostoc*- *Gunnera*» симбиозини эса дуккакли бўлмаган ўсимликларнинг кенг ҳажми учун азотни ўзлаштиришда симбиотик муносабат ҳосил қилиш хусусиятини бериш учун модел сифатида қараш мумкин.

Хужайравий ихтисослашуви. Анабаенани азотсиз муҳитга кўчириб ўтказилганда унинг ипи бўйлаб тартибсиз жойлашган хужайраларининг 10% гетероцисталарга қадар ихтисослашади. Бу хужайралар ҳажми жиҳатдан йириклашиб, цитоплазмага эркин кислород ўтишини тўсиб қўядиган қалин қобик билан ўралади. Гетероцисталарда фотосинтез жараёни бормайди, натижада азотни ўзлаштириш учун микроаэрофил

шароит вужудга келади. Бу цианобактерияларга аэроб шароитларда ҳам азотни ўзлаштиришга имконият яратади.

*Anabaena*да гетероцисталарнинг шаклланишини назорат қиладиган генларнинг мураккаб тизими аниқланган. Улар орасида *hetR* гени кўпроқ ўрганилган бўлиб, унинг инактивацияси гетероциста ҳосил қилиш хусусиятининг йўқолишига олиб келади. *hetR* гени бўйича мутантлар азотсиз муҳитда микроаэрофил шароитларда ўстирилганда азотни ўзлаштира олса, аэроб шароитларда ўзлаштира олмайдилар. Агар *hetR* генини кўп нусхали плазмидалар таркибига амплификация қилинса ёки «кучли» промотор таъсири остида унинг экспрессиясини кучайтирилса, аммоний тузлари мавжуд озика муҳитларида ҳам гетероцисталар ҳосил қилиши индуцирланади.

Anabaena штаммига кўп нусхали *hetR* генини киритиш орқали қўшимча гетероцисталар ҳосил қилмайдиган транспозонли мутантларни олиш мумкин. Мазкур мутантларда транспозон инсерциялари *patA* ва *patB* генларида жойлашган. *patA* генидаги мутациялар ҳужайра ихтисослашуви жараёнларининг ғайриоддий бузилишларига олиб келади: гетероцисталар ҳужайра занжири охирларидагина ҳосил бўлади. *patB* гени мутациялари гетероцисталар ҳосил бўлишини тўхтатиб қўйилишга олиб келади: агар *Anabaena* 7120 «ёввойи» штаммида бу ҳодиса азотсиз муҳитга олиб ўтилгандан сўнг 24 соат ўтгач бошланса, *patB* мутантларида 48 соат ўтиб бошланади. Бироқ мутант штаммларни азотсиз муҳитга бир неча марта экилгандан сўнг гетероцисталарнинг умумий миқдори ёввойи штаммга нисбатан ортади. *patB* мутациясини *patA* мутациялар (ёки *hetR* гени бўйича кўп нусхалиликни) бирга қўшилганда цианобактерия нобуд бўлади.

*Anabaena*нинг баъзи мутациялари нитрогеназани кислороддан ҳимоя қила олмайдиган морфологик жиҳатдан нормал гетероцисталарни ҳосил қиладди. Шунинг учун мазкур мутантларда микроаэрофил шароитларда азотфиксация қилиш хусусияти бузилмаган бўлса, аэроб шароитларда уни амалга ошириш мумкин эмас. Бу мутациялар ёрдамида гетероцисталарнинг ҳужайра деворида гликолипидлар тўпланишини назорат қиладиган *hglB*, -C, -D, -K генлари оиласи аниқланган. Тахмин қилинишича, бу генлар O₂ нинг гетероцисталарга диффузияланишига тўсқинлик қилувчи, ҳужайра девори гликолипидлари таркибига кирадиган мой кислоталари синтезини кодирлайдилар.

Молекуляр ихтисослашув. *Anabaena*нинг азотфиксация қилишга ўтиши, CO₂ни фиксациясини назорат қилувчи генлар репрессияси билан кузатилади, бунинг натижасида гетероцисталарда молекуляр O₂ ажралиб чиқиши тўхтатади. Бундан ташқари аммонийнинг ассимиляцияланиши учун зарур бўлган азот метаболизмининг баъзи генлари (масалан, *glnA*) фаоллашади. Мазкур жараён натижасида ҳосил бўлган глютамин

цианобактерияларининг вегетатив ҳужайраларига транспорт қилинади ёки ҳўжайин организмга кўчириб ўтказилади.

Гетероцистали цианобактерияларнинг азотфиксация қилувчи тизимидаги нодир хусусият нитрогеназа синтезига олиб келувчи *nif*-генларнинг қайта қурилишидир. *Anabaena*нинг вегетатив ҳужайраларида нитрогеназанинг синтези амалга ошиши мумкин эмас, чунки *nifD* гени таркибида ўлчами 11 м.н.ж. бўлган ДНК бўлаги жойлашган. Бу бўлак эндонуклеазани кодирлайдиган *xisA* гени тутади. Гетероцисталар дифференциалланишида эндонуклеаза фрагментлар жойидан қирқади, шундай қилиб, *nifD* генининг яхлитлиги тикланиб, *xisA* гени экстрахромосома ҳолатига ўтади. Шунингдек, *xisA* гени *nifC* ва *fdxN* генлари оралиғида жойлашган ўлчами 55 м.н.ж. бўлган яна бир ДНК бўлаги эксцизиясини белгилайди. Бунинг натижасида азотни ўзлаштирувчи гетероцисталарда учта алоҳида генлар гуруҳидан еттита гендан ташкил топган ва нитрогеназа комплексини кодирлайдиган ягона оперон ҳосил бўлади.

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, *Anabaena* гетероцисталарида *nif* генларнинг қайта қурилиши гетероцисталар морфогенезини назорат қилувчи генлардан маълум даражада мустақил амалга ошади. *hetR* гени бўйича мутантларда бу қайта қурилиш анаэроб шароитларда нормал кечади, у нитрогеназа фаоллиги индукцияси жараёни билан ўз ифодасини топади. Ўз навбатида нитрогеназанинг структуравий генлари (*nif*ДНК) ни инактивацияловчи ёки ДНК (*xisA*) процессингини издан чиқарадиган мутациялар, азотни ўзлаштириш хусусиятини йўқолишига сабаб бўлади, лекин азотсиз муҳитда гетероцисталарнинг шаклланиш сақланиб қолади.

Симбиоз таракқиёти. Азотни ўзлаштирувчи цианобактерияларнинг ўсимликлар билан симбиози таракқиёти «*Nostoc-Gunnera*» тизими мисолида яхши ўрганилган бўлиб, мазкур тизимнинг ташкил топиши иккала шерик учун факультатив ҳисобланади. Бу организмларнинг ўзаро муносабати юқори спецификликка эга эмас: *Gunnera*дан ажратиб олинган *Nostoc* штаммлари нафақат шу ўсимлик, балки очик уруғли *Macrozamia*, *Anthoceros* ўсимликлари ва ҳатто *Peltigera* лишайниги билан ҳам симбиоз ҳосил қила олади. Шунингдек, *Nostoc*нинг барча изолятлари ҳам симбиотик тизимни ҳосил қила олмайдилар.

Цианобактериялар барг бандлари орасида жойлашган махсус безчаларда яшайди. Бу безлар папиллаларга эга бўлиб, уларнинг орасида ўсимлик тўқималари тубига олиб борадиган каналчалар мавжуд бўлади. Безчага мувофиқ келувчи цианобактерия штамми келиб тушиши билан иккала шерикларда бир қатор морфогенетик жараёнлар индуцирланади, улардан биринчиси безчалар тубига фаол кириб борадиган цианобактерияларнинг ҳаракатчан шакллари – гормогонийлар

(гетероцисталар сақламайдиган ҳаво вакуолаларидан ташкил топган (майда хужайралардан иборат калта ипчалар) ҳосил бўлишидир.

Симбиотик безчалар ичига кириб борган цианобактериялар фаол кўпая бошлайди ва ўсимлик хужайраларини зарарлайди. Шерикларнинг ўзаро алоқаси кучли жойларда ўсимлик хужайра девори эриб кетиши (лизиси) кузатилади. Шундан сўнг эндосимбионтлар ўсимлик хужайраларига кириб олади, хужайра деворлари эса ўзининг яхлитлигини тиклайди. Ўсимлик хужайралари ичида цианобактериялар гетероцисталарга қадар ихтисослашиб, уларда нитрогеназа фаоллиги индуцирланади. Эндосимбиотик цианобактерияларда гетероцисталар 60-80% гача хужайра ҳосил қилса, эркин яшовчиларда бу кўрсаткич 5-10% ни ташкил этади. Gunnerанинг симбиотик безчалари ичида эркин яшовчи цианобактерияларга хос ҳаракатсиз спора (акинетлар) ҳосил бўлиши кузатилмайди.

Gunnera билан симбиозда цианобактериялар нитрогеназа реакциялари натижасида ҳосил бўлган аммонийни ассимиляция қилмайди, балки уларни ўсимлик хужайраларига етказиб беради. Бу симбиотик тизимда (худди дуккакликлар ва ризобийлар ўртасидаги симбиоз каби) аммонийнинг бирламчи ассимиляциясини хужайин ўсимлик амалга оширади.

Азотни ўзлаштирувчи симбиотик биотизимлар генетик асослари ва эволюцияси концепцияси

Ўсимликларнинг азотфиксаторлар билан симбиози ўсимлик микроорганизм муносабатининг энг кенг тарқалган ва чуқур ўрганилган шакллари билан бири ҳисобланади. ҳосил бўлган симбиозлар ўзининг асосига кўра икки томон учун ҳам фойдали (мутуалистик) бўлиб, бироқ баъзи шароитлар (муҳитда боғланган азот миқдорининг кўплиги, етарли бўлмаган озикланиш, генетик ўзгаришлар)да бу муносабат паразитизмга ўтиши ҳам мумкин. Бундан ташқари, дуккакликларнинг ризобийлар билан муносабат механизмлари ўсимликлар билан фитопатогенлар билан муносабатига ўхшаб умумий босқичларга эга. Шундай қилиб, азотфиксацияловчи симбиозларни ўрганиш бундан 25 йил илгари Антон Де Бари таклиф этган симбиоз концепциясининг тўғри эканлигини тасдиқлайди. Бу олим симбиознинг асосий хусусияти унинг «фойдали» ёки «зарарли» лигида эмас, балки шериклар ўртасидаги алоқанинг узоқ давом этишидандир, деб ҳисоблашни таклиф этган. Бундай ёндашув симбиотик тизимларни организмдан юқори мўътадил комплекслар сифатида, яъни, бу тизимга кирган организмлар эркин яшаган ҳолатида эга бўлмаган янги экологик ва метаболитик имкониятларга эришадилар, деган қарашни юзага келтиради.

Икки хил типдаги азотни ўзлаштирувчи тизимлар – дуккакли-ризобиал симбиозининг ва цианобактерияларнинг ўсимликлар билан симбиози

генетик назорати тўғрисидаги маълумотларга таққослаб кўриб, бу муносабатларга хос бир катор умумий белгиларни кўриш мумкин. Биринчидан, симбиознинг иккала гуруҳи ҳам шерикларнинг сигнал муносабатига асосланади, сигналлар эса бевосита генлар экспрессиясига таъсир кўрсатади. Бунинг натижасида симбиотик тузилмаларнинг морфогенези ва ўсимликлар билан бактерияларнинг метаболитик узвий интеграциясига олиб келадиган шериклар генларининг мувофиқлашган бошқарилуви ва дифференциал экспрессияси кузатилади. Иккинчидан, ҳар иккала тизимда ҳам ўзаро муносабатларнинг асосий самараси – азотфиксация ва симбиоз тузилмалари тараққиёти турли ген тизимлари билан назорат қилинади ва уларни генетик усуллар орқали алоҳида-алоҳида таҳлил қилиш мумкин.

Шу билан бирга кўриб чиқилган тизимлар ўртасида қатор фарқлар мавжудлиги ҳам равшандир. Биринчи фарқ шундан иборатки, цианобактериялар азотни тоза културада фототрофлик билан мувофиқлаштирган ҳолда ўзлаштира, ризобийларнинг кўпчилиги тоза културада азотни ўзлаштира олмайди, фототроф ҳам эмас. Шунинг учун ҳам цианобактерияларда азотфиксация қилувчи хужайра шакли – гетероциста ҳосил қилишнинг махсус механизми мавжуд, унда фотосинтез амалга ошмайди, нитрогеназининг ҳимояси эса қалин хужайра девори орқали таъминланади. Цианобактерияларда гетероцисталарнинг ихтисослашувини таъминлайдиган мураккаб генлар тизими мавжуд, у диазотроф яшашга мосланиш орқали шаклланган бўлиб, бироқ симбиотик тизимда фойдаланилади. Ризобийларда цитодифференциалланиш одатда фақат *in planta* шароитида амалга ошириб, нитрогеназининг кислороддан ҳимоя қилиш билан боғлиқ эмас.

Азотфиксация қилувчи симбиозларнинг келиб чиқиши ва эволюцияси ҳақидаги масала ғоятда муҳимдир. Сўнгги йилларда дуккаклиларнинг симбиотик генлари молекуляр структураси ҳақидаги маълумотлар бу масалага ойдинлик киритиш имкониятини беради. Масалан, лядвинец (*Lotus japonicus*) да *nif* гени аниқланган бўлиб, ундаги мутациялар тугунакларнинг Ҳосил бўлмаслиги (инфекция иплари тараққиётини тўсиб қўйиши) га олиб келади, бироқ ўсимликларнинг бошқа аъзолари тараққиётига таъсир кўрсатмайди. Бу геннинг оқсил маҳсулоти азот етишмаслиги (азотли очлик) шароитида гаметогенезни назорат қиладиган *Mid Chlamydomonas* омилига ўхшаш бўлиб чиқди. Шундай қилиб, мазкур ген симбиотик тизимда эволюцион қадимги, яъни, метаболитик стресс (азот етишмаслиги) таъсирида амалга оширадиган тараққиёт жараёнларини бошқариш вазифасини саклаб қолганлиги аниқланди. Шунга ўхшаш турли нодулинлар ва Nst-оқсиллари синтези тизимлари ҳам эволюцияга учраган бўлиши мумкин. Тугунаклар ҳосил қилмайдиган кўплаб ўсимликларда леггемоглобин генларининг ўхшашлари аниқланган бўлиб, бу ген

махсулотлари леггемоглобин сингари кислородни боғлаб олиб, унинг сенсори вазифасини бажаради. Деярли барча нодулинларнинг гомологлари, шунингдек, С - (углеродли) ва N- (азотли) метаболизмнинг тугунакка хос ферментлари, тугунаклар ҳосил қилмайдиган ўсимликларда аниқланган ёки дуккакли ўсимликларнинг ер устки қисмларида фаолият юритади. Бундан келиб чиқадики, молекуляр генетик жиҳатдан симбиоз эволюцияси симбиоз билан боғлиқ бўлмаган функцияларни бажарадиган анцестрал генларни ўсимлик-микроб муносабатлари бошқарув тизимига жалб этилиши сифатида қараш мумкин.

5.6-жадвал

Азотни ўзлаштирувчи ўсимлик-микроб симбиоз муносабати икки хил типининг қиёсий таҳлили

Белгилар	Дуккакли ризобиал симбиоз	«Цианобактерия-ўсимлик» симбиозлар
Микроорганизмларга дастлабки ўсимлик сигналлари таъсири	Nod-генларнинг (ўсимлик флавоноидлари таъсири остида) фаоллашуви	Ҳаракатчан гормогонийларнинг шаклланиши
Микросимбионтларнинг цитодифференциаллашуви	Фақат ўсимликларда (бактероидлар)	Ўсимликларда ва тоза културада (гетероцисталар)
Нитрогеназанинг кислороддан ҳимояланиши	Бактериялар билан (NifA ва FixJ оксиллари) ўсимликлар орасида (легоглобин, тугунак тўқималарида диффузион тўсиқ)	Фақат бактериялар билан (гетероцисталар)
Микробларни азотфиксацияга ўтишида <i>nif</i> - генлар ташкил-лашувининг ўзгариши	Аниқланмаган	Аниқланган
Ўсимликлардаги морфогенетик жараёнларни микросимбионт томонидан индукцияланиши	Пўстлоқ хужайралари митотик реактивацияси ёки дуккакли ўсимлик илдиз бошланғичининг тугунакка қадар ривожланиши индукцияси	Симбиотик безнинг ўсиши
Микросимбионтнинг диазотрофлик ва фототрофлик хусусияти	Одатда мавжуд эмас	Мавжуд
Симбиознинг иккала шериклар учун ҳам зарурийлиги	Иккала шериклар учун факултатив	Микроблар учун факултатив, хўжайин организмлар учун облигатив (<i>Azolla</i>) ёки факультатив (<i>Gunnera</i>)
Ўзаро муносабатнинг ўзига хослиги	Дуккаклилар оиласида чегараланган	<i>Nostoc</i> учун ер юзи ўсимликлари турли типларини ўз ичига олади

Сўнгги йиллардаги муҳим ютуқлардан бири азотфиксацияловчи симбиознинг арбускуляр микориза (АрбМ) билан узвий алоқасини аниқланиши ҳисобланади. Дуккакли ризобиал симбиознинг тараққиёти ва АрбМ бир қатор «умумий» генлар орқали назорат қилинишини формал ва молекуляр генетик усулларни қўллаш билан кўрсатиб берилди. Бу симбиозлар гомологик ўсимлик маҳсулотлари, шу қаторда перибактероидли ва периарбускуляр мембрана оксиллари, шу билан бир қаторда баъзи нодулинлар синтези билан бирга кечади. АрбМ ва тугунакларнинг ҳосил бўлиши билан ўсимликларни патогенлардан ҳимояланишига хос реакциялар содир бўлиши алоҳида аҳамият касб этади. Бошқарув характериға кўра, бу реакциялар бир-биридан фарқ қилади. Бу эса антагонизмда микроорганизмларнинг инактивацияси ва улар фаоллиги (микдори)нинг мутуализмдаги регуляцияси билан боғлиқ бўлиши мумкин. АрбМ нинг бошқа типдаги ўсимлик-микроорганизм муносабатларига нисбатан эволюцион жиҳатдан қадимийлигини инобатга олиб, шуни тахмин қилиш мумкинки, ўсимликларнинг дастлабки ҳимоя воситаларидан бири *in planta* шароитида эндомикоризали замбуруғлар тараққиётини бошқариш бўлган. Ўсимликларнинг кейинги эволюцион ўзгаришлари натижасида бу тизимлар патогенлардан ҳимоя вазифаси, ҳатто азотфиксацияловчи симбионтларни қўллаб-қувватлашни назорат қилиш вазифасига эга бўлган бўлиши мумкин.

Тугунаклар ҳосил бўлиши ва АрбМ шаклланиши учун замбуруғларнинг хужайра деворини асосий компоненти хитинга яқин бўлган рецепция ва ризобиал Nod-омиллари процессинги генлари компоненти умумий бўлиши ҳам мумкин. Тугунак ҳосил бўлишини фаоллаштирадиган Nod-омиллар микоризацияни мўътадиллаштирадилар. Дуккаклиларда Nod-омилларни парчалайдиган хитиназалар синтези эса ризобийлар, АрбМ-замбуруғлар томонидан ҳам индуцирланади. Бу маълумотлар шуни кўрсатадики, ризобийлар ўсимликлар билан коэволюция даврида микоризали замбуруғлар сингари сигнал омилларни синтез қилишни «ўрганиб» олишган.

Шундай қилиб, тугунаклар ҳосил бўлишини назорат қилувчи генетик тизимнинг сезиларли қисми ўсимликларнинг АрбМ-замбуруғлар билан коэволюцияси даврида пайдо бўлган. Шунинг учун АрбМ ҳосил шаклланишига олиб келадиган хусусиятни ўсимликларнинг азотфиксация қилувчи симбиоз ҳосил бўлишида шарт-шароит яратадиган асосий қайта мосланувчи (переадаптация) деб қараш лозим. Бироқ дуккаклилар ва ризобийлар коэволюцияси жараёнида ўзаро муносабатларнинг янги босқичлари пайдо бўлди (улардан энг аҳамиятлиси - эндоцитоз ва автоном симбиосомаларнинг шаклланишидир). Улар шерикларнинг чуқур функционал интеграцияси ва морфологик тизимларининг мураккаблашувини таъминлайдилар.

Симбиотик азотфиксациянинг барча тизимлари учун хос умумий белги, мазкур жараённинг интенсивлиги иккала шериклар генлари орқали мувофиқлаштирилишидир. Шунинг учун азотфиксацияловчи симбиозларни яхшилаш, бошқа хил ўсимлик-микроб муносабат тизимлари сингари микроорганизм ва ўсимликлар билан мувофиқлаштирилган ген муҳандислиги ва селекцион тадқиқотлар олиб боришни тақозо этади. Ўсимликлар ва бактерияларнинг кучли интеграциялашган симбиотик генлари функциялари ташкиллашувини аниқламасдан туриб, симбиотик тизимни яхшилаш, ҳатто янги симбиозлар ҳосил қилиш тўғрисида сўз очиш мумкин эмас. Бу маълумотни инобатга олиб ўсимлик-микроб муносабат тизимида максимал синергетик самарага эришиш учун селекцион тадқиқотлар олиб борилмоқда. Ҳозирги кунга келиб, амалда самарадор микроорганизм штаммлари ва дуққакли ўсимлик навларининг оптимал уйғунлашган вариантлари олинган.

Юқори специфик таниб олиш хусусиятини ҳосил қилишда ва ўсимликларнинг метаболитик ҳамда ҳимоя тизимлари билан микросимбионтларнинг ўзаро мувофиқ келишини яхшилаш йўлида жиддий ишланмаларни ишлаб чиқиш талаб қилинади. Кўплаб симбиозларнинг катта энергия талаб қилишини инобатга олиб, ўсимликларни энергия билан таъминлаш тизимлари, биринчи навбатда, фотосинтез аппарати билан эндосимбионтларнинг муносабатини тартибга келтириш, оптималлаштириш масаласи долзарб масала ҳисобланади. Бу борадаги фундаментал ва амалий муаммоларнинг ечими турли соҳа мутахассислари иштирок этадиган соҳалараро тадқиқотлар олиб боришни тақозо этади. Табиатдаги симбиотик тизимларни ўсимлик ва микроблар борасида юксак билим ва амалий кўникмаларга эга олимлар жамоаси – «илмий симбиози» фаолияти натижасида ўрганиш мумкин. Бундай жамоаларнинг ташкил этилиши жуда муҳим масала бўлиб, унда замонавий фаннинг молиявий ва ташкилий имкониятлари ишга солиниши мумкин.

5 бобга доир назорат саволлари:

1. Ўсимликлар билан симбиоз муносабатга кириш хусусиятига эга бўлган микроорганизмларнинг асосий вазифаларини тавсифлаб беринг.
2. Нитрогеназа комплексининг асосий хусусиятларини таърифлаб, унинг микроб-ўсимлик муносабати тизимидаги ўзига хосликларини кўрсатиб беринг.
3. Дуққакли-ризобиал симбиозда шерикларни таниб олишга хизмат қиладиган сигнал молекулаларнинг табиати қанақа?
4. Қайси генетик тизимлар тугунак бактериялар ва ўсимликлар томонидан сигнал муносабатларни назорат қилади?
5. Дуққакли ўсимликларда тугунаклар ҳосил бўлишини назорат қиладиган генларнинг асосий гуруҳларини тавсифлаб беринг.
6. Нодулинларнинг тузилиши ва вазифаларини ўрганиш услубиятининг мазмунини нимадан иборат?

7. Дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактерияларнинг С-ли ва N-ли метаболизм тизимлари интеграцияси механизмлари қандай?

8. Ўсимликда тугунак ҳосил бўлишини бошқариш механизмлари ва даражаларини таърифланг.

9. Ўсимликларнинг ризобийлар ва цианобактериялар билан симбиозлари ўртасидаги ўхшашлик ва фарқлар нималардан иборат?

10. Симбиотик азотфиксациянинг эволюцияси ва келиб чиқиши қандай йўللار билан амалга ошган бўлиши мумкин?

11. Азотни ўзлаштирувчи микроорганизмлар ва ўсимликларнинг симбиотик жуфтлари селекциясини симбиотик муносабатлар самарасига таъсирининг ўзига хос хусусиятлари.

Адабиётлар:

1. Кретович В.Л. Биохимия усвоения азота воздуха растениями. – М.: Наука, 1994.
2. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений / Под ред. С.Г.Инге-Вечтомова. – СПб.: Наука, 2000.
3. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М.: Наука, 1973.
4. Симаров Б.В. Генетические основы селекции клубеньковых бактерий. – Л.: Агропромиздат, 1990.
5. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции. – СПб.: Наука, 1998.
6. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе. Журн. Общ. Биол. 2001, Т., 62 №6, с. 472-495.
7. Spaink H., Kondorosi A., Hooftaas P.J.J. The Rhizobiaceae. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ. 1998. 566 p.
8. Stacey G., Burris R.H., Evans H.J. Biological Nitrogen Fixation. New York, London/ Chapman and Hall. 1992. 755 P.

6-БОБ

ЎСИМЛИКЛАРНИ ҲИМОЯ ҚИЛИШДА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Ҳозирги вақтда қишлоқ хўжалик экинларининг катта қисми-30% га яқини зараркунанда ва ҳашаротлар ҳисобига нобуд бўлади. Ўсимликлар ҳимояси бўйича мутахассисларни маданий экинларнинг касаллик, зараркунандалари ва бегона ўтларига қарши кураш борасидаги барча уринишлари кутилган натижаларни бермаяпти. Шунинг учун ўсимликларни ҳимоя қилишдаги долзарб муаммоларни ҳал этишда тубдан янгиланган усуллар ва йўналишларни излаш лозим. Бундай муаммоларни ечимини топишда биотехнологиянинг ўрни ғоятда муҳимдир. Масалан, ажратиб олинган тўқима ва органлар културасидан фойдаланиш, ўсимликшуносликда катта ҳажмдаги соғломлаштирилган экиш материалларини олиш имконини беради.

Биотехнологиянинг мазкур соҳа бўйича эришган ютуқлари билан бир қаторда, қишлоқ хўжалик экинларини касаллик ва зараркунандалардан ҳимоя қилишда анъанавий биологик ва кимёвий кураш чораларини ҳам инкор этиб бўлмайди. Ҳозирги замон биотехнологиясининг ривожланиши туфайли инсектицид вирусларни ишлаб чиқариш ва улардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш имконияти пайдо бўлди. Уларни кенг ҳажмда ишлаб чиқариш ва ҳайвон ҳужайраларида ўстириш ишлари амалга оширилмоқда.

Маълумки, ўсимликларни биологик йўл билан ҳимоя қилишда тирик организмлар ёки уларнинг фаолияти маҳсулотларидан зараркунанда организмлар етказадиган зарарнинг олдини олиш ва камайтириш тушунилади.

Ўсимликларни ҳимоя қилишда турли хил заҳарли кимёвий моддалардан фойдаланиш натижасида ҳашаротларда уларга нисбатан кўникиш пайдо бўлади. Бундан ташқари кимёвий препаратлар мақсадга мувофиқ таъсир кўрсатмасдан, фойдали ҳашаротлар ва микроорганизмларга бир хилда зарарли таъсир кўрсатади.

Шунингдек, зараркунандаларга қарши курашда уларнинг нейтрал турлари чексиз кўпайиб кетади, натижада одамларга ҳам ҳавф туғдиради. Умуман, пестицидлар одам ва ҳайвонлар учун заҳарли ҳисобланади. Уларнинг кўп миқдорда тўпланиши атроф муҳитнинг ифлосланишига сабаб бўлади. Одам учун энг ҳафли пестицидлар хлороорганик табиатга эга бўлиб, ўн йиллар давомида тупроқда сақланиб туриши билан бирга, одам ва ҳайвонларнинг тўқималарида ҳам тўпланади. Бутун дунё соғлиқни сақлаш ташкилоти маълумотларига кўра, ер юзида ҳар йили ярим

миллионга яқин аҳоли пестицидлар таъсирида турли хил касалликларга чалинса, беш мингдан ортиғи заҳарланиш оқибатида ҳалок бўлади.

Дунё олимларининг саъйи ҳаракатлари туфайли пестицидларнинг заҳарлилиги кейинги йилларда бирмунча пасайтирилган. Препаратларнинг тегишли туридан фойдаланиш натижасида пестицидларнинг атроф муҳитга зарарли таъсири кескин камайиб бормоқда. Ҳозирги кунда тупроқда заҳарли қолдиқлар қолдирмасдан тезда парчаланиб кетадиган препаратлар яратилган ва амалиётда фойдаланмоқда.

Шунга қарамасдан, пестицидларни ишлаб чиқариш ва улардан қишлоқ хўжалигида фойдаланиш бир қатор жузъий камчиликларга эга. Статистик маълумотларга кўра, синтез йўли билан олинган препаратларнинг ўндан биригина амалиётда фойдаланиш учун яроқлидир.

Ўсимликларни ҳимоя қилишда кимёвий усулларни қўллашнинг асосий камчиликларини бартараф этишда биотехнологик усулларига катта эътибор қаратилмоқда. Биотехнология ўсимликларни ҳимоя қилишда вируслар, бактериялар, замбуруғлар, содда ҳайвонлар ва ҳашаротлар, шунингдек, тирик организмларнинг биологик фаол моддалари (антибиотиклар, гормонлар, феромонлар ва ҳ.к) ишлаб чиқариш технологиялари билан шуғулланади.

Шундай қилиб, мутахассисларни ўсимликларни ҳимоя қилиш борасида тегишли воситалардан фойдаланиш муаммоси қизиқтирса, биотехнологларни уларни ишлаб чиқаришни қандай ташкил этиш лозимлиги муаммоси қизиқтиради. Бу ерда шуни ҳам қайд этиш лозимки, бактерия ва замбуруғларни ўсимликларни ҳимоя қилиш мақсадида етиштириш, турли хил моддалар, масалан, антибиотикларни олиш борасидаги ишланмалардан тубдан фарқ қилмайди. Шу билан бирга биотехнология ва ген муҳандислиги ўсимликларни ҳимоя қилиш воситаларидан фойдаланиш имкониятларини янада кенгайтиради.

Ўсимлик касалликларига қарши курашда биотехнологик усуллардан фойдаланиш истиқболлари

Қишлоқ хўжалигида етиштирилаётган ўсимликларнинг катта қисми ҳар йили турли хил касалликлар ҳисобига нобуд бўлади. Ўсимлик касалликларини асосан уч тоифага мансуб паразит микроорганизмлар чақиради. Улар вируслар, бактерия ва замбуруғлардир.

Вируслар 300 га яқин турли хил қишлоқ хўжалик экинларида касаллик туғдиради. Фитопатоген замбуруғлар ва бактерияларга нисбатан бу кўрсаткич унча юқори эмас: ўсимликларда касаллик қўзғатадиган замбуруғ ва бактерияларнинг сони бундан 100 марта кўпроқдир. Бироқ вирусли касалликларнинг ҳавфи, келтирадиган зарари, бактериал ва замбуруғли касалликларга нисбатан кам эмас, балки улардан юқори ҳамдир.

Касалланган ўсимликларнинг ташқи кўриниши ўзгаради, ҳосилнинг сифати ва миқдори камайиб кетади.

Вирусли инфекцияларга қарши курашнинг қийинлиги шундаки, улар ўсимлик ёки ҳайвон организмида облигат паразит ҳисобланади. Уларни йўқотиш тирик организм хўжайраларининг ўзини нобуд бўлишига сабаб бўлади. Вируслар билан касалланган ўсимликларни амалда тўлиқ даволаш мумкин эмас улар билан кураш усуллари, асосан, вирусларни келиб чиқиши ва тарқалишини олдини олишга асосланади.

Экиш материалларини соғломлаштириш ва уларни вирусли инфекциялардан ҳимоя қилишда ажратиб олинган тўқима ва органлардан фойдаланиш усули кенг имкониятлар очди. 1943 йилда тўқималар културасига асос солган олим Ф.Уайт тамаки вируси билан зарарланган ўсимликларнинг илдизлари учки қисмида вируслар учрамаслини айтиб ўтган эди. Шунга ўхшаш натижалар бошқа муаллифлар томонидан ҳам келтирилган. Бу маълумотларга таяниб, Франция Миллий агрономик институти ходимлари томонидан георгина ўсимликларининг озиқа муҳитларида ўстирилаётган меристемаларидан соғломлаштирилган экиш материални олиш усуллари таклиф этилган. Улар ўсимликларнинг апикал меристемасидан вирусдан ҳоли етук ўсимликларни етиштиришга муваффақ бўлганлар. Картошканинг Бель де фонтене навининг зарарланган қисмидан ажратиб олинган ва сунъий озиқа муҳитида ўстирилган соғлом меристемаларидан фойдаланиб уни вирусдан батамом ҳоли қилишга эришилган.

Француз олимларининг соғломлаштирилган экиш материалларини олиш борасидаги тадқиқотлари ушбу соҳадаги барча ишларга пойдевор ясади.

Инфекциялардан ҳоли ўсимликларни олиш жараёнини қуйидаги босқичларга бўлиш мумкин:

- вируслар мавжудлигини аниқлашга ёрдам берадиган ўсимликлар ёрдамида соғломлаштириладиган намуналарнинг зарарланиш даражасини аниқлаш;
- термотерапия ва меристемаларни ўстириш;
- ўсимлик меристемаларидан олинган регенерация қилинган кўчатларда вируслар мавжудлигини текшириш.

Ўсимликларни вируслардан самарали ҳимоя қилишда ўлчами 0,1-0,2 мм бўлган, меристемадан ажратиб олинган эксплантлардан фойдаланилади. Эксплантнинг ўлчами қанча кичик бўлса, у шунча қийин яшаб кета олади ва етук ўсимликка қадар регенерация бўлади. Картошкадан меристема тўқималарини ажратиб олишда тугунаклардаги куртаклардан ёки ўсимликларнинг поя учки қисмидан фойдаланилади. Эксплантларни олишда поя учки қисмларини кальций гипохлорид

эритмасида стерилланади, кейин бир неча марта стерил сув билан ювиб ташланади.

Вируслардан ҳоли қилишда эксплантларга термик ишлов бериш усулидан ҳам фойдаланилади. 30-40⁰С ҳароратда ўсимликлар таркибидаги вируслар концентрациясининг кескин пасайиши, айниқса, бу ҳолат, ўсувчи қисмларида кузатилади. Мазкур усул бирмунча йирик, осон яшаб кета оладиган эксплантлардан фойдаланишда самара беради.

Ажратиб олинган тўқима бўлагини агарли муҳити солинган 3-4 мг ҳажмли пробирка юзасига кўчириб ўтказилади, кейин оғзини пахта тикин билан беркитилади. Ж.Морел картошка эксплантларини илдиз олиши учун озиқа муҳити таркибини таклиф этган. Бу озиқа муҳити, худди шу мақсадда тайёрланган озиқа муҳитларидан калий ва аммоний микдорининг кўплиги, ўсиш ва ривожланишни стимулловчи модда сифатида гиббереллин қўшилганлиги билан фарқ қилади.

Меристема ўтказилган пробиркаларни ҳарорати 25⁰С бўлган ёруғ хонага жойлаштирилади. Шундай сўнг ҳар йигирма-ўттиз кунда меристемалар алоҳида пробиркаларда поялар бера бошлайди. 3-4 см ли пояларни 0,5-1,0 см ли бўлақларга бўлинади. Уларнинг ҳар бири барг ва яширин куртакларга эга бўлиши керак ва илдиз ҳосил қилиши учун айнан ўша озиқа муҳитига экиб борилади. Шундан сўнг ўсимликларни тупроққа кўчириб ўтказилади.

Тўқималар култураси усули вируслардан ҳимоя қилишда қўлланиладиган самарали усуллардан бири бўлиб ҳисобланади. Чунки вирусли инфекцияларга чалинган ўсимликлар, кўпинча энг яхши навлар ҳам 100% гача зарарланган бўлади. Унга қарши қўлланиладиган меристемалар култураси усули навни қайта тиклаш имконини беради.

Мазкур усул ёрдамида кулупнай, маймунжон картошка ва кўплаб мевали экинлар, шунингдек, манзарали ўсимликлардан соғломлаштирилган экиш материалларини олишга муваффақ бўлинган.

Тўқималар култураси усулидан ташқари ўсимликларни вирусдан ҳоли қилишда ген муҳандислиги усуллари ҳам муҳим аҳамиятга эгадир. Масалан, нуклеин кислоталарни клонлаш ўсимлик тўқималаридаги вирусларни аниқлаш ва зарарланган ўсимликларни ажратиб олиш имконини беради. Бу йўл билан АҚШ Қишлоқ хўжалик хизмати тадқиқот марказида картошканинг урчуқсимон вируси РНК си вироиди ажратиб олиниб, унга мос ДНК нусхасини тескари транскриптаза ёрдамида синтезлаб, клонлашга муваффақ бўлинган. Бу вироиддан қутулиш жуда қийин, уни картошка тугунакларида аниқлаш ҳосилни сезиларли даражада ошириш имконини беради. Фақат соғлом тугунақлардан фойдаланиш ҳам ҳосилдорликни кўтаришга ёрдам беради. Шундай қилиб, клонланган ДНК вирус ва вироидларга аниқ ва ишончли равишда ташхис қўйиш имконини бўлиб, у вирус РНК си билан гибридизация бўла олади.

Табиий шароитларда фитопатоген замбуруғлар - ўсимликларнинг касаллик чакирувчиларида бошқа замбуруғларнинг паразит ҳолда яшаб, кўпайиши ҳолатлари ҳам кўп учрайди. Бошқа паразит замбуруғларда ривожланадиган паразит замбуруғлар иккиламчи тартибдаги гиперпаразитлар деган ном билан юритилади. Агар биринчи паразит қайсидир касалликни чакирувчиси бўлса, иккинчисидан шу касаллик билан курашда фойдаланиш мумкин. Биотехнологиянинг вазифаси очиқ ва ҳимояланган ер шароитидаги фитопатогенларга қарши курашда ишлатиладиган микробиологик препаратларни ишлаб чиқариш жараёнларининг ишланмасини тузишдир.

Ўсимликларни касалликлардан ҳимоя қилишда микроорганизмлар ишлаб чиқарадиган антибиотик моддалар алоҳида ўрин тутди. Улар эволюция жараёнида микроорганизмларнинг бир-бирига нисбатан кучли кураш воситаси сифатида келиб чиққан. Ўсимликларни ҳимоя қилишда баъзи антибиотиклардан фойдаланиш биотехнологияда янги йўналишлар - турли хил агрохимикатлар, улар орасида микроблар асосида олинган гербицидлар, ҳайвонлардан олинадиган аттрактантлар, экдизонлар, фитогормонлар ва бошқа хил моддаларни ҳам олиш йўллари ва қишлоқ хўжалигида қўллаш истиқболларини очиб берди.

Антибиотиклар фитопатоген микроорганизмларга қарши курашда фойдаланиладиган бошқа воситаларга қараганда бир қатор афзалликларга эга. Улар ўсимликларнинг орган ва тўқималарига осон кириб боради, шунинг учун уларнинг таъсир этиш механизми ташқи муҳит омилларига жуда кам даражада боғлиқдир. Ўсимлик ҳужайраларига айниқса, нейтрал табиатли (хлорамфеникол, пенциллин) осон ўтса, амфотерлари (хлортетрациклин, окситетрацикин) ва асосли-антибиотиклар (неомицин, стрептомицин) қийин ўтади. Ўсимлик тўқималарига нисбатан ҳайвон тўқималари антибиотикларни бирмунча қийин инактивациялайди. Шундай қилиб, антибиотикларни ўсимлик тўқималарига тез ўтиши ва уларнинг аъзолар бўйлаб тез тарқалиши, нисбатан қийин парчаланиши фитопатоген микрофлоранинг нобуд бўлиши учун зарур антибиотиклар билан маълум даражада тўйинишга шароит яратади.

Олимларнинг кўплаб тадқиқотлари натижасида антибиотикларнинг ўсимлик тўқималаридаги биологик фаоллиги ҳайвон тўқималарига нисбатан кучлилиги исботланди. Кўпгина фитопатоген замбуруғ ва бактерияларни улар ёрдамида нобуд қилиш мумкинлиги қайд этилади.

Бундан ташқари фитопатоген бактерия ва замбуруғларга қарши қўлланиладиган антибиотиклар ўсимликлар ва улар билан озикланадиган ҳайвонлар учун ҳам заҳарсиздир. Баъзан антибиотиклар ўсимликларнинг ўсиб ривожланиши учун ижобий таъсир кўрсатиб, уларнинг ҳосилдорлигини оширишга ёрдам ҳам беради. Сув ҳавзалари ёки тупроққа тушган антибиотиклар осон парчаланади улар қишлоқ хўжалигида

қўлланиладиган сунъий препаратлардан фарқ қилади. Олимлар антибиотикларнинг деградациясининг тезлигини уларнинг синтезида иштирок этувчи фермент тизимлари билан боғлайдилар. Бу ферментлар иштирокида антибиотикларнинг парчаланиши амалга ошади. Кимёвий йўл билан синтезланган бирикмалар табиатда жуда қийин парчаланаяди, чунки уларни парчаловчи микроорганизмларда тегишли ферментлар учрамайди. Ўсимликшуносликда антибиотиклардан фойдаланишга бўлган қизиқишнинг кескин ортишига сабаб, захарли кимёвий моддалардан фойдаланишнинг оқибатлари ва улар қўлланилган ўсимликлар билан озиқланадиган ҳайвонларнинг захарланиши билан боғлиқдир. Тупроқдан сув ҳавзаларига тушган захарли кимёвий моддалар сув ҳайвонларининг турли хил вакиллари ва бошқаларнинг ҳам нобуд булишига олиб келади.

Антибиотиклар биринчи марта ўсимлик касалликларига қарши баъзи Европа мамлакатлари ва АҚШда қўлланилган. Стрептомицин тетрациклин билан комбинацияда сабзавот ва полиз экинларининг бактериал касалликларига қарши қўлланилган. Кейинроқ айна шу мақсадда циклогексемид ва гризеофульвин ишлатила бошланди. Ҳорижий мамлакатларда ўсимликларни касалликлардан ҳимоя қилишда ҳозир ҳам тиббий мақсадларда фойдаланиладиган антибиотиклар ишлатилади. Масалан, агрисепт препарати 37% ли стрептомицин сульфат, фитомицин-20%ли стрептомицин нитрат, агримидин-10-15% ли стрептомицин ва окситетрациклиннинг 10:1 нисбати ва ҳоказолардан иборатдир.

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, одамда касаллик туғдирадиган кўплаб микроорганизмлар тупроқ ва ўсимликлар юзасида учрайди. Ўсимликларга тиббиёт мақсадларида фойдаланиладиган антибиотиклар билан ишлов бериш одамларда касаллик чақирувчи микроорганизмларни чидамлик белгисига кўра танланишига ва оқибатда тиббиётда қўлланиладиган антибиотикларнинг самараси пасайиб кетишига олиб келади. Шунинг учун кейинги йилларда айнан ўсимликларда касаллик туғдирувчи микроорганизмларга қарши қўлланиладиган антибиотикларни излаб топишга жиддий эътибор қаратилмоқда. Бундай изланишлар Японияда кейинги 15 йил ичида кўп миқдорда ўндан ортиқ препаратлар – бластицидин, касугамин, валидамицин, целлоцидин, тетранактин ишлаб чиқариш борасида кенг кўламда олиб борилмоқда.

Ўсимликларнинг турли касаллик ва заракунандаларига қарши дунёнинг кўплаб мамлакатлари – Канада, Нидерландия, Австралия, Руминия, Польша, Миср, Покистон ва Филиппинда Японияда ишлаб чиқарилган антибиотик ва синтетик фунгицидлар тутувчи комплекс препаратлар қўлланилмоқда.

Ҳозирги вақтда помидор ва бошқа ўсимликларда сўлиш, ун шудринг каби касалликларга қарши ўсимликларни ҳимоя қилишда қўлланиладиган препаратлар АҚШ да ишлаб чиқарилаётган бўлса, Ҳиндистонда

аурефунгин, Белгияда никомицин ишлаб чиқарилмоқда. Уларнинг таъсир доираси кенг бўлиб бактериал ва замбуруғли касалликларларга қарши ишлатилади.

Бундай антибиотиклардан бири - фитобактериомицин, у бактерия ва замбуруғларга қарши кенг спектрга эга. Уни *Actinomyces lavendulae* актиномицетидан ажратиб олинади. Фитобактериомицин асосида бир неча хил товар кўринишидаги препаратлар ишлаб чиқарилади: уруғларга ишлов бериш учун 2-5% ли фитобактериомицин дуст, ўсимликларга сепиш учун фитолавин-100 нинг 10%ли эрувчан кукуни қўлланилади. Фитобактериомициннинг 12% ли дуст лавия бактериозига, 5% лиси буғдой ва илдиз чиришига қарши қўлланилади. Уруғларга экиш олдидан ишлов берилганда лавия ўсимлигида бактериоз билан касалланиш 70% га камайиши ва ҳосилдорлик 1,5-3 га/ц ошиши аниқланган. Умуман, бу препаратларни уруғларга экиш олдидан ишлов беришда 2-3кг/т миқдорда қўлланилади.

Олинган тадқиқот натижаларининг кўрсатишича, фитобактериомицин ғўза гоммози, дуккакли экинларда фузариоз сўлиш, гармдорида вертициллёз сўлиш, қорақатда антракноз, бедада доғланиш каби касалликларга қарши курашда яхши самара беради.

Препаратларнинг самарадорлигини аниқлаш асосида уни саноат миқёсида ишлаб чиқариш технологияси йўлга қўйилган. Янги технологик ишланмаларни амалиётга жорий этиш уларни қўллаш самардорлигини ортишига сабаб бўлган, бундай препаратларни қўллаш етиштириладиган ҳосил таннархининг арзон бўлишига олиб келади.

Фитолавин -100 фитобактериомициннинг фаол моддаси ҳисобланади. Уни буғдой ва арпа уруғларида илдиз чириши ва соя ўсимлигида бактериозни олдини олиш учун пуркалади.

Трихотецин - кенг спектрдаги таъсир доирасига эга антибиотик. Уни пушти ранг трихотециум (*Trichothecium roseum*) замбуруғидан ажратиб олинади. Бу нетротроф микроорганизм гиперпаразит сифатида кўплаб фитопатоген замбуруғларда учрайди. Трихотециумнинг замбуруғларда паразитлик қилиши унинг таркибида замбуруғларга қарши трихотецин антибиотиғи ажралиб чиқиши билан боғлиқ. Бу антибиотик замбуруғ гифаларини nobуд қилади ва пушти трихотециум уларга жойлашиб олиб, nobуд бўлган ҳужайралардан озиқ моддаларини шимиб олади.

Трихотецин 10% ли эрувчан кукун ёки 20% ли дуст сифатида ишлаб чиқарилади. Уни экиш олдидан уруғларга ишлов бериш, ўсимликларда илк касаллик белгилари кўриниши билан пуркаш орқали қўлланилади. Трихотецин очик ва химояланган ер шароитида етиштириладиган бодрингни ун шудринг, тамакининг ун шудринг, узумнинг оидиум, данак мевали дарахтларнинг мониал куйиши, олма паршаси кабиларда қўлланилади.

Микроорганизмларда антагонизм хусусияти анча илгари аниқланган. Уларни 20 йилларда антибиотиклар кашф этилганга қадар фитопатоген микрофлорага қарши қўлланилган. Актиномицетлар ва миколитик бактериялар зиғир, ғўза, сабзавот экинлари, данакли меваларнинг касалликларига қарши қўлланилганда ижобий самара берган.

Антагонист микроблардан тупроқни соғломлаштириш мақсадида ҳам фойдаланилади.

Антибиотикларнинг кашф этилигач сўнг микроорганизмларнинг ўзи эмас, балки улар ажратиб чиқарадиган моддалар қўлланила бошланди. Бироқ ҳозирда ҳам кўпчилик мамлакатларда микроб препаратлари ишлаб чиқарилмоқда. Улар ўсимлик касалликларига қарши нобуд қилувчи таъсир кўрсатади. Шу йўсинда ушбу соҳада икки хил йўналиш – антибиотиклар ва микроб – антагонистлардан фойдаланиш тармоқлари келиб чиқди. Ўсимлик уруғларидаги инфекциялар ва ўсимликларнинг ўсув давридаги касалликларига қарши ишлов бериш учун антибиотик моддаларидан фойдаланилса, ўсимлик қолдиқлари билан бирга сақланиб қолган тупроқ инфекцияларига қарши ёки тупроқни бойитиш мақсадида компост сифатида микроб антагонистларнинг ўзидан ёки тоза културасидан фойдаланилади. Чунки антибиотикларнинг ўзидан фойдаланиш самарадорлиги паст бўлиб, бу уларнинг тупроқ микроорганизмлари иштирокида тез парчаланиб кетиши билан боғлиқдир. Антагонист сифатида бактериялар, вируслар, замбуруғлар қўлланилиши мумкин.

Антагонист – замбуруғлар орасида триходерма авлоди вакиллари кенг қўлланилади. Триходермани мевали дарахтлар куйдиргисига қарши қўлланилади. Ҳозирда АҚШда триходермани ерёнғоқ склеротиниясига қарши тупроққа бериш мақсадида ишлаб чиқариш усуллари такомиллаштирилмоқда. Францияда узумнинг қўнғир чириш касаллигига қарши триходерма препаратлари билан ишлов бериш ижобий натижалар берган. Исроилда картошканинг ризоктониоз касаллиги ва бошқа касалликларига қарши препарат ишлаб чиқариш йўлга қўйилган.

Триходермин препарати триходерма замбуруғини турли хилдаги ўсимлик чиқиндилари ва бошқа субстратлар (нон мағзи, сомон, ғалла чиқиндилари, торф) да ўстириш асосида олинади. У тупроқда учрайдиган турли хил қишлоқ хўжалик экинларининг касалликлари - илдиз чириши, зиғир ўсимлиги касалликлари, ғўзанинг вертициллез сўлиши ва бошқаларга қарши қўлланилади.

Яшил триходерма (*Trichoderma viridae*) ва у асосида ишлаб чиқарилган препарат таркибида икки хил антибиотик – глиотоксин ва виридин бўлиб, улар антибактериал ва замбуруғларга қарши таъсир хусусиятига эга.

Триходермин чуқур давомли экиш усулида махсус ускунада ўстириш йўли билан олинади.

Тадқиқот натижаларининг кўрсатишича, буғдой уруғларига экиш олдида 4 кг/га миқдорда ишлов бериш ўсимликларнинг бутун вегетация давомида касалланишини 54-71% га камайтириб, ҳосилни 2 га/ц га оширади.

Триходерминни торф чиқиндиси солинган тувакчаларга 50 мг миқдорда киритиш бодрингни илдиз чириш билан касалланишини 60% га камайтириб, ҳосилини 31-74% га оширади. 1 грамм триходерминни ғўза ўсимлигида қўллаш самарадорлиги +51,2% га тенг.

Биотехнология ва ген муҳандислиги усуллари ўсимлик касалликларига қарши микроорганизмларнинг одам ва ҳайвонларга зарарсиз ва юқори самардор янги шакллари яратишга имкон беради.

Қишлоқ хўжалик экинлари зараркунанда ҳашаротларига қарши кураш усуллари

Бактериал препаратлар

Ҳозирги вақтда ўсимлик зараркунанда ҳашаротларига қарши кўплаб микроорганизмлар мажмуалари ўрганилган ва улар асосида микроб биопрепаратлари тайёрлашнинг илмий асослари яратилган. Саноат асосида кўплаб препаратлар ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда кенг қўлланилмоқда.

Бундай препаратларни тайёрлаш учун бактериялар, замбуруғлар ва вируслардан фойдаланилади. Препаратларни ишлаб чиқариш технологиялари ҳам хилма хилдир. Уларни ишлаб чиқаришда микроорганизмларнинг физиологияси ва биокимёвий хусусиятлари ва препарат нима мақсадда қўлланилиши эътиборга олинади. Микроб препаратларини ишлаб-чиқариш учун қўйидаги талаблар қўйилади:

- уларнинг спецификлиги, фақат маълум турдаги заракунандаларга таъсир қилиб, фойдали ҳашаротларга зарарсизлиги;
- юқори самарали таъсир кучига эга бўлиши;
- ишлаб чиқариш ва қўллашнинг қўлайлиги;
- одам ва ҳайвонлар учун ҳавфсиз бўлиши;
- препаратнинг фойдали хусусиятларининг узоқ сақланиши;
- унинг яхши намланиши ва эритмасининг барқарорлиги;
- ўсимлик барги ва бошқа аъзоларига ёпишувчанлиги ва у ерда узоқ вақт сақланиши ва ҳоказо.

Дунёда 50 га яқин ўсимликларни зараркунанда ҳашаротлардан химоя қилиш учун микробиологик препаратлар яратилган.

Уларнинг кўпчилиги спорали энтомопатоген *Bacillus thuringiensis* бактериялари асосида ишлаб чиқарилади.

Бу бацилла бошқа бир қанча энтомопатоген бактериялар қатори *Bacillaceae* оиласи *Bacillus* туркумига киради. *Bacillus* туркуми таёқчасимон, спора ҳосил қилувчи, граммусбат турларни бирлаштиради,

кўпчилиги ҳаракатчан (хивчинлари мавжуд) факультатив ва облигат аэроблар бўлиб, аксарияти тупроқда тарқалган. *Bacillus thuringiensis* ўзининг асосий хоссалари жиҳатидан *Bac.sereus*га яқиндир. Шунинг учун улар бир гуруҳга бирлаштирилади, сунъий озиқа муҳити ва ҳашарот ичида яхши ривожланади.

Bacillus thuringiensis бактерияси жуда кўп муҳим хусусиятларга эга: тез кўпаяди; жуда кўплаб озиқа муҳитларида спора ҳосил қилади; вегетатив ўсиши тугагандан сўнг, фақат спора ҳосил қилибгина қолмасдан, зараркунанда ҳашаротларни нобуд қиладиган асосий восита – кристалл ҳолдаги эндотоксинни синтез қилади. Бу бактериянинг айрим штаммлари кристалл ҳолдаги эндотоксиндан ташқари ўзи ўсадиган муҳитга юқори ҳароратга чидамли, ҳашаротлар учун ўта зарарли β -экзотоксин ва ферментлар ажратиб чиқаради.

Шунингдек мазкур бактериялар турли хил технологик ишлов беришларга чидамли, сепарация, вакуумли бўғлатиш, қуритишнинг турли хил усуллари, субстрат-ташувчилар (бактерияни ўзига бириктириб турувчи восита) билан аралаштириш ва бошқалар учун қулай. Қуритилган ҳолатда тайёр препарат ўзининг дастлабки хусусиятини йўқотмасдан бир неча йилларгача яхши сақланади.

*Bacillus thuringiensis*нинг ҳамма кўрсатилган сифатлари уни ўсимликларни зарарли ҳашаротлардан ҳимоя қилиш воситаси сифатида биринчи ўринга чиқарди. Энтомопотоген бактерияларда вирулентлик ва фермент фаоллигининг ўзаро боғлиқлиги ва штаммнинг юқори вирулентликка эга бўлишида С-фосфалипаза ферменти алоҳида ўрин тутиши аниқланган. *Bacillus thuringiensis* бактериясининг махсус фосфалипаза билан патогенлик хусусияти орасидаги боғлиқлиги ўрганилган ва С-фосфолипаза *Bac.thuringiensis* бактерияларнинг энтомоцид таъсирида асосий фактор ҳисобланади деган хулосага келинган.

Кристалл оксилли δ -эндотоксин – ёки жуфт спора кристалли эндотоксин бактериянинг спора ҳосил қилиш жараёнида хужайранинг бир қисмида спора шакллангандан сўнг ҳосил бўлади, синтез жараёни културанинг стационар фазасида тахминан уч соат давомида кечади. Хужайрада турли кўринишдаги бир нечта кристаллар ҳосил бўлиши мумкин (тўғри бипирамидал, ромбсимон, кубсимондан овалсимонгача).

Уларнинг ўлчамлари 0,5x1,3 дан 1x3,5 мкм гача ва ҳаттоки субмикроскопик кўринишигача кичик бўлиши мумкин, рН кўрсаткичи кучли ишқорий (рН 11,5 дан юқори) шароитда яхши эрийди. Кристаллар 100⁰С ҳароратда 30-40 минут қиздирилгандагина ўзининг захарлилик хусусиятини йўқотади.

Дунёда ушбу препаратларни ишлаб чиқаришнинг 20 га яқин саноат шакллари яратилган, уларнинг барчаси асосида *Bac. thuringiensis* нинг у ёки бу турлари ётади. Асосан саноат асосида қуйидаги турлардан

фойдаланилади: *Bacillus thuringiensis*, var.*thuringiensis*, *kurstaki*, *galleriae* *dendrolimus*, *israelensis*.

Мамлакатимизда, Республика Фанлар Академияси Микробиология институтида, профессорлар Қ. Д. Давронов ва Т. Ю. Юсуповлар раҳбарлигида *Bac. thuringiensis* ни маҳаллий штаммлари асосида биопрепарат ишлаб чиқариш технологиясининг илмий асоси яратилди. Н. А. Хўжамшукуров томонидан колорадо кўнғизи личинкаларига қарши *Bac. thuriengiensis* энтомопатоген бактериясининг мутант штаммлари асосида

«Биокристалл» инсектицид биопрепарати яратилди ва препаратнинг дастлабки нусхалари лаборатория ва дала шароитида синовдан ўтказилиб муваффақиятли деб топилди.

Россияда эса, бундай препаратларнинг 10 дан ортиқ хиллари ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда кенг қўлланилмоқда. Масалан, “энтобактерин” номи билан *Bac. thuringiensis* var. *galleriae* бактерияси асосида саноатда биринчи марта кукун кўринишидаги препарат тайёрланган. Препарат таркибида 30 млрд/г спора, шунча миқдорда кристалл ҳолидаги эндотоксин ва ёпишқоқ қўшилмалар (каолин) мавжуд. Тангача қанотли ҳашаротларнинг кўпгина турлари: қарам ва шолғом оқ қапалаги, қарам қуяси, ботқоқ қапалаги, мева қуяси ва бошқаларга қарши қурашда самарали фойда беради. Ичакда таъсир қилувчи препарат озиқа билан ҳашаротнинг организмига кириб, уни заҳарлайди, ҳашаротларда ташқи таъсир натижасида вужудга келадиган фалажлик уйғотади, ичак тизимининг яхлитлиги бузилади. Шундан сўнг споралар гемолимфаларга кириб у ерда ўсиб, кўпая бошлади ва ҳашаротда сепсис бошланади, натижада ҳашарот нобуд бўлади. Энтобактерин одам ва иссиққонли ҳайвонлар, балиқлар, асаларилар ва энтомофагларга таъсир қилмайди, лекин ипак қурти учун ҳавфлидир.

Препарат эритмаси ўсимликка пуркаш йўли билан қўлланилади. Уни 2-5 кг/га миқдорда 300-1500 л/га махсус пуркагичли мосламалар ёрдамида ҳам, катта майдонларга самолёт ёрдамида ҳам сепилиши мумкин. Энтобактеринни қўллашнинг мўътадил ҳарорати 18-32⁰С дир.

Ҳозирги кунда шунга ўхшаш, турли хил номлар билан бир қанча препаратлар бутун дунёда ишлаб чиқарилмоқда ва ўсимлик зараркунанда ҳашаротларига қарши қурашиш амалиётида кенг қўлланилиб келинмоқда. Масалан: *дентробациллин*, *битоксибациллин* (БТБ), *БИП-биологик инсектицид препарат*, *гомелин*, *ленидоцид*, *бактокулицид*, *дипел*, *бактоспеин* ва бошқалар. *Bac. thuriengiensis* бактерияси асосида тайёрланган биопрепаратлар юқори самарадорликка эга. Бу препаратларнинг барчаси *Bac. thuriengiensis* бактерияси штаммлари асосида тайёрланган бўлиб, ҳашаротлар турига кўра таъсири, препаратни тайёрлаш технологияси, самарадорлиги ва бошқа бир қанча хусусиятлари билан бир-бирларидан фарқ қилади.

Ўзбекистонда бу препаратларни етарли миқдорда ишлаб чиқариш ва кенг миқёсда қишлоқ хўжалик экинлари, мева ва сабзавот экинлари зараркунанда ҳашаротларига қарши қўллаш кимёвий инсектицидларга нисбатан истиқболли ва экологик ҳавфсиз чралардан бири бўлиб ҳисобланади.

Вирусли энтомопатоген препаратлар

Ҳамма энтомопатоген препаратлар ичида вирусли препаратлар хўжайин ҳашаротга нисбатан ўзининг спецификлиги билан характерланади. Улар одатда бир турдаги ҳашаротларгагина таъсир кўрсатади. Уларнинг тор доирадаги таъсирининг ўзи бу препаратларнинг инсон, флора ва фауна учун зарарсизлигини кўрсатади. Вируслар ноқулай ташқи таъсирлар (ҳарорат, намлик)га ўта чидамли бўлиб, улар ҳашаротлардан ташқарида, алоҳида ҳам 10-15 йилгача ўз таъсир кучини йўқотмайди.

Ҳашаротнинг вируслар билан касалланиши уларнинг озиқланиши орқали юз беради. Ҳашарот ичакларига тушган вирус танаси ишқорий муҳитда парчалана бошлайди. Ажралиб чиққан вирионлар ичак деворларидан ҳужайраларга ўтиб, ядроларда вируслар репликацияси рўй беради. Ҳужайралардан ажралиб чиққан вируслар бошқа ҳужайраларни ҳам зарарлай бошлайди ва оқибатда ҳашаротлар личинкаларининг nobуд бўлишига олиб келади. Вирусларнинг ўзига хос белгилари уларнинг фақат тирик тўқималардагина кўпая олишидир. Бу эса ўз навбатида саноат миқёсида вирусли энтомопатоген препаратларни ишлаб чиқаришда бир мунча қийинчиликлар туғдиради, чунки вирусларни кўпайтириш технологияси жараёнида фақатгина тирик хўжайин-ҳашаротлардан фойдаланиш талаб этилади. Ҳозирги пайтда 3 хил вирусли энтомопатоген препаратларни ишлаб чиқариш йўлга қўйилган: вирин-ЭКС (карам қуртига қарши), ЭНШ (ток ичак қурти касалига қарши), АББ (америка оқ капалагига қарши).

Ҳар қандай вирусли препаратни ишлаб чиқариш хўжайин ҳашаротни физиологик соғломлигини таъминловчи сунъий озиқа муҳитида ўстиришдан бошланади. Маълум бир ривожланиш фазасида (одатда вояга етган ҳашарот даврида) ҳашаротлар овқатига вирусли суспензия қўшиш йўли билан улар зарарлантирилади. Бунинг учун инокулят олдиндан бир қанча касалланган личинкалардан олиб тайёрланади. Ҳашаротлар зарарлангандан сўнг унинг тўқимасида максимал даражада вируслар тўпланишини таъминловчи қатъий аниқ шароитда сақланади. 7-9 кундан кейин nobуд бўлган ва чалажон личинкалар йиғилади, 33-35⁰ С да улар қуритилади, механик усулда тўқималар йиғиндиси майдаланади. Ҳар бир қўнғизга физиологик эритма ёки дистилланган сув 1 мл ҳисобида қўшилади, майдалангач, суюлтирилган тўқима филтрлаб ишлатилади.

Замбуруғлар асосида олинадиган энтомопатоген препаратлар

Замбуруғли энтомопатоген препаратлар зарарли ҳашаротларда микоз касаллигини туғдириш орқали уларнинг нобуд бўлишига олиб келади. Энтомопатоген бактериялар ва вирусларга нисбатан замбуруғлар қуйидаги ўзига хос хусусиятларга эга:

а) нобуд бўлиш овқат ҳазм қилиш йўллари орқали эмас, балки бевосита кутикула орқали руй беради;

б) ҳашаротлар ғумбак ва имаго ривожланиши фазасида нобуд бўлиб, бу бошқа микроорганизмлар билан бўладиган ўзаро муносабатларда кузатилмайди;

в) замбуруғлар нисбатан тез ўсиши ва жуда катта репродуктив қобилятига эгаллиги билан характерланади, энтомопатоген фаоллигини пасайтирмасдан спора ҳолатида узоқ вақт табиатда сақланиши мумкин:

г) айрим ҳашарот турларини нобуд қилишда юқори даражада специфик бўлиб, уларнинг вирулентлиги кўлланиладиган замбуруғларнинг штаммига боғлиқ бўлади.

Замбуруғли препаратнинг ҳашаротга таъсири спораларнинг тана бўшлиғи тери орқали киришидан бошланади. Ҳашарот танасига тушган замбуруғ спораи ўсиб гифага, кейин мицелийга айланади, улардан энтомопатоген замбуруғларнинг инфекция бирлигини ташкил этувчи конидиялар ажралиб чиқади. Конидиялар ўсиб чиққандан кейин ҳашаротлар нобуд бўлиш даври ҳашаротларнинг катта-кичиклига қараб 2-8 суткача давом этиши мумкин.

Beauveria авлодига мансуб замбуруғларнинг *B. bassiana* vuill (60 дан ортиқ турдаги ҳашаротларга қарши) ва *B. tonella* Dell. (10 дан ортиқ турдаги ҳашаротларга қарши) турлари асосида саноат миқёсида препаратлар ишлаб чиқарилади.

Ҳозирги пайтда *B. bassiana* (Bals). Vuill. гифомицети конидиоспораларидан иборат замбуруғли энтопатоген препарат-боверин ишлаб чиқариш кенг йўлга қўйилган.

Тайёр ҳолдаги бу препарат оқ ёки куранг кўринишдаги кукун бўлиб, 1гр. препаратда 1,5 дан 6 млрд. гача конидиоспоралар мавжуд. Унинг фаоллиги замбуруғда синтез қилинадиган токсин-боверицин билан белгиланади. Бу препаратни қўллаш қишлоқ хўжалигида қўлланиладиган кимёвий препаратларни 90% гача қисқартишга имкон беради. Шу билан бирга препарат одам, иссиқ қонли ҳайвонлар учун зарарсиздир.

Боверин саноат асосида олиш учун ишлаб чиқариш штаммини суяқ ва қаттиқ озиқа муҳитида ҳам ўстириш мумкин. Конидиоспоралар ишлаб чиқаришда технологик-иқтисодий кўрсаткичлар иккала усулда ҳам деярли фарқ қилмайди.

Бирок, конидиоспораларни суяқ озиқа фазасида ўстириш орқали олиш оддий иш эмас, бунинг ўзига хос техник ноқулайликлари мавжуд. В.

bassiana Vuill замбуруғини суюқлида ўстириш усули орқали ўстирилганда улар вегетатив кўпайиб, ҳаво конидиоспоралардан фарқ қилувчи гонидия (бластоспора, цилиндроспора) деб номланувчи гифали тана ҳосил қилади.

Ҳашаротларга таъсири юзасидан гонидиялар, конидиялардан қолишмайди, аммо ишлаб чиқариш шароитида гонидиялар асосида юқори фаолликка эга препаратлар олиш имкони йўқ. Чунки улар қуритиш босқичида конидийларга нисбатан юқори ҳароратли пуркаб қуритгич мосламаларда қуритилганда 20-50% кўп нобуд бўлади. Шунинг учун қуритилгандан сўнг споралар яшовчанлиги ва уларнинг вирулентлиги кўра боверин ишлаб чиқаришдаги асосий эътибор конидиоспора миқдори максимал даража юқори бўлишига йўналтирилган. B.bassiana Vuill замбуруғини суюқ озикада ўстириш орқали конидиоспора олиш муаммоси фақатгина озика муҳитини ва ферментация шароитини тўғри танлаш муаммоси ҳал қилингандан сўнг ўз ечимини топди.

Ҳозирги вақтда қишлоқ ҳўжалик экинлари зараркундаларига қарши курашда замбуруғларнинг бошқа турлари, жумладан метаризиум, вертициллум, гирзутелла, гименостильбе, ашерсония, кониотириум, энтомофтора ва бошқалар ҳам жалб этилмоқда.

Зараркунада ҳашаротларга қарши кураш чоралари ичида ҳашаротларнинг биологик фаол моддаларидан фойдаланиш ҳам алоҳида ўрин тутди. Уларга феромонлар, ювенил гормони, туллаш гормони ва бошқалар кирилади.

Ўсимлик зараркунада ҳашаротларига қарши курашда биологик фаол моддалардан фойдаланиш

Феромонлар биологик фаол моддалар бўлиб, ҳайвонлар томонидан ташқи муҳитга ажратиб чиқарилади ва айна турнинг бошқа жинсининг метаболизми, физиологик ва эмоционал ҳолати, ҳатти-ҳаракатига таъсир кўрсатади. Одатда феромонлар ҳайвонларнинг махсус безларидан ҳосил бўлади. Таъсир хусусиятига кўра, уларни агрегацион феромонлар (тўпловчи-ғужловчи феромонлар), ҳимоя ва огоҳлантириш реакцияларини юзага чиқарадиган феромонлар, ҳашаротнинг овқат қидириш йўлини белгиловчи, из қолдирувчи феромонлар, жинсни таниб олишда ёрдам берувчи, бошқарувчи феромонларга бўлинади. Энг яхши ўрганилган феромонлар турли жинс вакилларининг учрашуви ва бир-бирини таниб олишини таъминлайдиган, жинсий ҳатти-ҳаракатларни тарбига солишда иштирок этадиган феромонлардир. Қарама-қарши жинс вакилларини жалб этадиган феромонларни аттрактантлар деб аталади.

1959 йилда немис биокимёғари Адольф Бутенант тут ипак қурти урғочисининг жинсий аттрактантининг тузилишини ўрганиб чиқди. Бу феромон бомбикол деб номланди.

Ҳаводаги концентрацияси 10^{-12} мг/л бўлганда улар эркак индивидларда да жинсий кўзғалиш реакциясини чақиради. 1980 йилларда 700 дан ортиқ ҳашаротлардаги феромонлар ўрганилиб, улардан 220 турининг кимёвий тузилиши аниқланди. Кимёвий табиатига кўра, феромонлар кимёвий бирикмаларнинг бирор синфига киритилади. Тангача қанотлиларнинг жинсий феромонлари одатда 10-18 углерод атомли спирт, ацетат ва альдегидларга яқин бўлади. Улар алоҳида кимёвий бирикмалар сифатида ифодаланади, лекин биологик таъсири бир неча хил компонентларни ўз ичига олади. Одатда феромонларнинг биологик таъсири учун тур спецификлиги хосдир. Ҳашаротларнинг турли хил турлари феромонлар сифатида муайян кимёвий бирикмалар ёки муайян тартибдаги компонентлар аралашмасидан фойдаланади.

Феромонларнинг кашф этилиши уларни зараркунанда ҳашаротларга қарши қўллашда кенг имкониятлар очди. Ҳашарот безларидан ажратиб олинган аттрактантларни ишлаб чиқариш самарадорлиги кўп меҳнат талаб қилиши ва маҳсулот чиқиши унуми пастлиги сабабли кам самарага эга.

Кимёвий феромонларнинг ҳам спецификлиги паст бўлиб ҳисобланади, чунки кўплаб ҳашаротларнинг табиий феромонлари алоҳида кимёвий бирикмаларнинг йиғиндисидан иборат бўлиб, бир қатор феромонларнинг баъзи компонентлари бир неча ҳашарот турлари учун умумий бўлади. Юқори специфик феромонларни ишлаб чиқариш кимёвий тоза бирикмалар ва уларнинг муайян нисбатдаги комбинацияларини олишнинг қийинлиги сабабли, шунингдек, ҳашаротларнинг жуфтлашиш жараёнидаги ҳатти-ҳаракатларини бошқаришда жинсларнинг алоҳида ўрни тўғрисидаги маълумотларнинг йўқлиги каби кўплаб муаммоларга дуч келмоқда. Маълумки, шарқ мевахўрида жуфтлашиш тўрт босқичда амалга ошади: эркагини урғочига жалб қилиниши, унинг яқинлашиши, урғочининг ориентацияси ва копуляция. Ҳар бир босқич муайян кимёвий компонент таъсири билан тавсифланади.

Сунъий феромонларнинг самараси пастлиги сабабли ўсимликларнинг табиий аттрактантлар ҳосил қилишдаги ролини алоҳида қайд этиш лозим. Масалан, дарахтларнинг луб қаватини кемириб зарар келтирувчи лубхўр кўнғизнинг феромон комплексига мирцен киради, у ўсимликларда ҳам ҳосил бўлади. Ҳашаротлар ўсимликларнинг баъзи алкоидларидан жинсий феромонлари синтезида оралик маҳсулот сифатда фойдаланадилар. Хўжайин-ўсимликларда учрайдиган α -пинен моддаси *Ips paraconfusus* кўнғизлари цис – вербеноли биосинтезида дастлабки бирикма сифатида хизмат қилади.

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, α - пиненнинг вербенолга айланишини *Bacillus cereus* штамми амалга оширади. Феромонларнинг оралик маҳсулотлари ўсимлик хўжайинларида синтезланиб, бактериялар иштирокида ҳашарот феромонларига айланиши уларнинг кимёвий йўл

билан эмас, биологик йўл билан олинган турларидан амалиётда фойдаланиш имконини беради. Биотехнологик усуллар, жумладан ўсимлик тўқималари култураси усуллари, шунингдек ген муҳандислиги усуллари юқори самарадор феромонлар ишлаб чиқаришни ташкил этишда истиқболли ҳисобланади.

Ўсимликларни ҳимоя қилишда феромонлардан фойдаланишнинг уч хил йўли мавжуд;

- ҳашарот турларини топиш;
- ҳашаротларни оммавий тутиш;
- турли хил жинс вакиллари фазовий жуфтлашишига хизмат қиладиган ҳид бўйича мўлжал олиш тизимини издан чиқариш.

Кимёвий ва табиий феромонларни зараркунанда ҳашаротларга қарши амалиётда қўллашнинг асосий йўллари билан бири - уларнинг популяцияларини мониторингини ўтказиш, тутқич ёрдамида зараркунандаларнинг сонини аниқлашдан иборат. Оддий кузатувларни экин майдонларида олиб бориш зараркунандаларнинг учраш даражаси ва экин майдонларининг зарарланганлик ҳолати тўғрисида аниқ ва тўлиқ маълумот бера олмайди. Тутқичга тушган алоҳида ҳашаротлар маълум турдаги ҳашаротнинг яқин атрофда учрашидан далолат берса, тутилган ҳашаротларнинг сони уларга қарши кураш чоралари тўғрисида бир тўхтамга

келиш имконини беради. Бундай тадқиқотлар натижасида, зараркунанда ҳашаротларга қарши кураш учун сарфланадиган ҳаражатларни кескин қисқартириш, ҳашаротларнинг бошқа ҳудудларга тарқалмаслигини олдини олиш мумкин.

Феромонларли тутқичлар карантин зараркунандаларини топиш имконини беради. Ҳозирги вақтда карантин объектларини эрта аниқлашда феромонлардан дунё амалиётида кенг фойдаланилмоқда (шарқ мевахўри, картошка куяси, америка оқ капалаги, калифорния қалқондори ва ҳ.к.) 1976 йилда АҚШда биринчи марта йирик ҳажмдаги майдонларда 17 мингдан ортиқ тримедлор, кюлор ва метилевгенол феромони сақловчи тутқичлар қўйилиб мамлакат жанубидаги уч хил ҳавфли зараркунандалар: ўрта ер денгизи мева пашшаси, қовун пашшаси ва шарқ мева пашшасини топишга муваффақ бўлишган. Улар зараркунандаларни янги майдонларга ўрнашиб олмасларидан олдин топиш ва йўқотиш имконини беради. Зараркунандаларни бундай эрта аниқлаш уларни кириш учун ишлатиладиган ўта ҳавфли интродуцентларни қўллашга сарфланадиган миллионлаб долларларни тежашга шароит яратади. Бундай мақсадларда импорт маҳсулотлари олиб ўтиладиган портларда тутқичлар халқа шаклида қўйилади. Агар қайсидир зараркунанда ҳашарот жойлашиб олган бўлса, феромонли тутқичлар зараркунандалар жойлашган жойни аниқлаб, уларга қарши қўлланиладиган кимёвий инсектицидларни мўлжал бўйича

қўллаш имконини беради ва табиатнинг ифлосланишни олдини олади. Масалан, 1956 йилда Флоридада ўрта ер денгизи мева пашшаси 0,4 млн га ерга тарқалиб кетади. Аттрактантлар билан қўлланилган тутқичлар зараркунанда ҳашарот жойлашган жойни аниқлаш ва ўрта ер денгизи мева пашшасини кимёвий инсектицидлар билан тўлиқ қириб ташлаш имконини беради.

Олимларнинг ҳисоб китобларига қараганда, зараркунандалар популяциясини йўқотиш учун агар уларнинг сони кўп бўлса, 1 га ерга 4,5 мингта ёки ҳар бир дарахтга 50 та тутқич зарур. Агар зараркунанда ҳашаротлар сони бирмунча кам бўлса боғ зараркунандаларга қарши 1 га ерга 30-50 та тутқич кифоя қилади.

Ўзбекистонда ҳам феромонлар заракунанда ҳашаротларга қарши курашда фойдаланилади. Феромон тутқичлар ўсимликнинг ўсув даврида ҳимоя тадбирлари ўтказишнинг зарурати ва муддатларини аниқлаш мақсадида қўлланилади. Жумладан, Армигаль препарати (цис-11-гексадециналь+цис-9-гексадециналь) 2 гектарга 1 дона миқдорда ғўза тунламига қарши, атрактон (транс-10, транс -12, цис-14-гексадектриенил ацетат) тут парвонасига қарши қўлланилади.

Зараркунанда ҳашаротларга қарши юқори самарадор препаратларни янгича турларини яратиш зарур. Феромонларнинг нархи жуда қиммат, шунинг учун олимлар улардан фойдаланишда бошқа усулларни ҳам таклиф қилмоқдалар, бунда таъсир этувчи модданинг буғланиши секин бориб, узоқ вақт давом этади. Уларга мисол сифатида диспарлюр – микрокапсулаларини келтириш мумкин. У тоқ ипак куртининг жинсий аттрактанти ҳисобланади.

Микрокапсулалар желатин ёки полиамид шарчалар бўлиб, диаметри 3-40 мкм гача, ички қисмига секин буғланувчи феромон жойлаштирилган. Бу феромон ёрдамида тоқ ипак куртини тўрт ҳафта ичида 98% гача йўқотиш мумкин.

Шунингдек, ҳозирги вақтда олимлар полимер диспенсер (ташувчи)лар ва уларни қўллаш устида ҳам изланишлар олиб бормоқдалар.

АҚШда Конрел фирмасининг икки хил турдаги диспенсери ва уч қаватли полимер пластинкалар (Геркон фирмаси маҳсулот) дан фойдаланилади. Феромоннинг 1 га ерга бир мавсумда ишлатиладиган миқдори бир неча граммни ташкил этади. Зараркунанда ҳашаротларнинг физиологик фаол моддларидан фойдаланиш ҳам жуда истикболли соҳа ҳисобланади.

Феромонлар билан бирга ўсимликларни ҳимоя қилишда ҳашаротларнинг бошқа хил физиологик фаол моддаларини ҳам қўллаш мумкин. Ички секреция безлари турли хил гормонларни ишлаб чиқаради. Улар ичида энг кўп ўрганилгани ювенил (личинка гормони) ва туллаш гормони (экдизон)дир. Улар ҳашаротларнинг гормон бошқарилувида

асосий аҳамиятга эга. Ўсимликларни ҳимоя қилиш соҳаси мутахассислари бу гормонлардан ҳашаротлардаги нормал ривожланиш ва кўпайиш жараёнларини издан чиқаришда фойдаланишлари мумкин.

Гормон препаратларидан зараркунанда ҳашаротларга қарши фойдаланиш ўзига хос хусусиятларга эга. Уларни қўллаганда ҳашаротга ўша заҳоти таъсир этмайди, шунинг учун кенг тарқалган ҳашаротлар ўсимликларга катта зарар етказиб қўйиши мумкин.

Бундан ташқари гормонларнинг таъсири маълум бир даврда эканлиги улардан фойдаланишни чеклаб, қийинчилик туғдиради. Бироқ гормон препаратларидан фойдаланишнинг афзалликлари ҳам мавжуд - улар организмда тўпланмайди, умуртқали ҳайвонлар учун заҳарсиз, уларга ҳашаротлар кўникиб қолмайди. Шунинг учун олимлар ушбу моддалардан ҳашаротларга қарши курашда фойдаланишнинг янги йўналишларини кашф этмоқдалар. Бундай тадқиқотлар биотехнология ва ген муҳандислиги усуллари асосида олиб борилса, янада самара бериши аниқ. Чунки ҳашаротлар гормонларига ўхшаш моддалар бир қатор ўсимликлар томонидан ҳам ишлаб чиқарилади. Бу моддалар, масалан, фитоэксдизонлар ўсимлик тўқималари култураси усуллари асосида ферментларда ҳам ишлаб чиқарилиши мумкин.

Бегона ўтларга қарши кураш усуллари

Ўсимликларни ҳимоя қилишдаги яна бир муҳим йўналиш – бегона ўтларга қарши кураш. Ҳозирги вақтда бегона ўтларга қарши кураш гербицидларни қўллашга асосланган кимёвий усулар билан олиб борилади. Замонавий ўсимликшуносликда гербицидларни қўллаш қишлоқ хўжалик экинларининг ҳосилдорлигини ошириш ва қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқариши самарадорлиги юқори кўтариш йўллари билан биридир. Гербицидларнинг асосий камчилиги - уларнинг ҳайвон ва одам организми учун оз ёки кўп даражада заҳарлилиги билан боғлиқ. Шунингдек, оқава сувлар ва аэрозоллар ишлатилиши натижасида улар тупроқ ва сув ҳавзаларига тушиши, ўсимлик озиқалари ва ҳайвон маҳсулотларида тўпланиб одам ва ҳайвонлар саломатлиги учун жиддий ҳавф туғдириши мумкин.

Кўплаб мутахассислар бегона ўтларга қарши курашда биологик усуллар, тирик организмлар ва уларнинг маҳсулотларидан фойдаланиш устида тинимсиз изланмоқдалар. Бунда биотехнология ва ген муҳандислиги ютуқларини қўллаш кенг имкониятлар очмоқда. Биотехнологик усуллар воситасида бегона ўтларни нобуд қилувчи организмларни кўпайтириш, мазкур мақсад йўлида тегишли моддаларни ҳам ишлаб чиқариш мумкин.

Ҳозирги вақтда экотоксикологик ва самарадорлиги жиҳатдан ҳам юқори бўлган гербицидларнинг янги авлодлари яратилмоқда. Уларни

кўпинча микроорганизмлардан олинади. Микроб гербицидлари ишлаб чиқаришнинг афзаллиги – гербицид синтезловчи микроорганизмларни ўстириш ускуналари (ферментерлар)нинг универсаллигидир. Иккинчи яна бир муҳим афзаллиги – уларни ишлаб чиқаришдаги чиқиндиларнинг атроф муҳитга нисбатан зарарсизлигидир. Учинчидан, микробли гербицидлар табиат учун бегона эмас. Чунки тупроқда яшовчи актиномицетлар уларни доимий равишда ишлаб чиқиб, ташқи муҳитга ажратиб туради. Табиийки, тупроқ биоценозида эволюция давомида актиномицетлар томонидан ишлаб чиқариладиган моддаларни парчалайдиган тизимлар ҳам келиб чиққан. Мазкур тизимлар ўсимликларга фақат актиномицетлар асосида олинган гербицидлар билан ишлов берилганда ишга тушади. Натижада табиатда заҳарли моддалар тўпланмайди. Бу хусусият ўз навбатида инобатга олиниши лозим, чунки уларни кўпчилигининг самараси бевосита тупроққа киритилганда юқори эмас.

Ҳозирги вақтда гербицид ишлаб чиқувчи микроорганизмларнинг бир қатор турлари аниқланган. Уларни амалиётга жорий этиш, ген муҳандислигига оид чуқур тадқиқотларни ўтказиш, биотехнологик ишлаб чиқаришда микроорганизмлардан кенг фойдаланиш имкониятларини очади.

Японияда бегона ўтларга қарши *Streptomyces hygroscopicus* ва *S.viridochromogenes* актиномицетлари ажратиб чиқарадиган биалофос гербицидидан фойдаланиш таклиф этилмоқда. Бу гербицид кенг спектрга эга бўлиб, бир қатор бегона ўтларга қарши униб чиқиш давридан бошлаб бутун ўсув даври мобайнида фойдаланиш имконини беради. Бироқ, биалофосни бевосита тупроққа киритилганда, унинг самараси деярли бўлмайди, бунинг сабаби юқорида келтирилган эди.

Ўсимликларга гербицид эритмаси пуркалганда, у ўсимлик илдизларига ўтади ва ўсимлик нобуд бўлади. Ушбу гербициднинг бу борадаги таъсири глифосат (фосфонаметилглицин)га ўхшаш, лекин унинг бегона ўтларга таъсири бирмунча кучлидир. Унинг таъсири этиладиган меъёри 1 га/кг. Ҳозирги вақтда Японияда бу препаратни ишлаб чиқариш йўлга қўйилган.

Актиномицетларнинг баъзи штаммлари анисомицин деб номланувчи модда ишлаб чиқаради. У маймунжон, беда, помидор каби ўсимликларнинг ўсимталарида илдиз ўсишини пасайтиради. Бир йиллик бегона ўтларнинг кўпчилигига қарши самарали таъсир кўрсатади. Бу модда анисомициннинг жуда кўп ҳосилаларини олиш учун дастлабки материал бўлиб хизмат қилади. Бундай ҳосилаларнинг тузилиши ва биологик фаоллигини ўрганиш натижасида янги гербицид «Метоксифенон» олинган. «Метоксифенон» ўсимликларнинг униб чиқиши олдида кўлланилади. Униб чиққан кўплаб бир йиллик бегона ўт ўсимталари гербицид таъсирида хлорозга учрайди ва нобуд бўлади. Бу

гербицид шоли экинларидаги бегона ўтларига қарши курашда қўлланилади.

S. saganonensis 4075 штамми филтратларида гербицид фаоллигига эга иккита метаболит топилган бўлиб, кейинчилик яна учтаси аниқланди – С,Д, Е. Улар икки паллали бегона ўтларга қарши танлаб таъсир кўрсатиш хусусиятига эга бўлиб, уруғ унувчанлигини пасайтиради.

Илмий манбаларда микроорганизмларнинг гербицидсимон моддаларидан яна бошқа хил турлари - нарамицин, тойокамицин, пиолютерион, цитобарицин, формицин А ва В турлари ҳам келтирилади.

Гербицидсимон моддаларнинг истиқболли продуцентлари сифатида *S. toyocaensis*, ирпекс замбуруғлари (*Irex rasyodon*) кабиларни кўрсатиш мумкин. Шунингдек, *Rhizobium japonicum* бактериясининг баъзи штаммлари 0,2 га/кг меъёрида гербицид таъсирга эга ризобитоксин ишлаб чиқариши ҳам маълумдир.

Ўсимликларни бегона ўтлардан ҳимоя қилишда қўлланиладиган микробли гербицид препаратлари ҳажми анъанавий гербицидларга нисбатан кўп эмас. Лекин микробли препаратлар теварак – атроф ва одамга зарарсизлиги билан янги истиқболли имкониятларни очади. Ўсимликларни ҳимоя қилиш соҳаси мутахассисларининг фикрича, биотехнологик саноат асосида микробли гербицидлар ишлаб чиқариш кўлами яқин келажакда анча ортади. Бу борада уларни ишлаб чиқаришда ген муҳандислиги ҳам алоҳида ўрин тутди.

Гербицидларни нафақат микроорганизмлардан балки ўсимликлардан ҳам олиш мумкин. Чунки улар ҳам илдизлари орқали тупроққа ажралиб чиқадиган турли хил физиологик фаол моддаларни ишлаб чиқарадилар. Бу моддалар орасида бошқа ўсимликларни нобуд қилувчи таъсирга эга моддалар ҳам мавжуд. Бактериоцид, фунгицид ва шу билан бирга гербицид таъсирга эга агропирин шулар жумласидандир. Бу модда ўрмаловчи буғдойиқ бегона ўти томонидан ажратиб чиқарилади. Агар ушбу ўсимлик илдизидан эфир мойлари ажратиб олинса, унинг 95% и агропиринга тўғри келади. Агропирин илдиз ва баргларга шимилиб дастлаб илдиз қинчаси, кейин бутун илдиз тизимининг нобуд бўлишига олиб келади. У най-толали боғламлар орқали ўсимлик бўйлаб тарқалади ва ўсимликнинг бир мунча ёш аъзоларини захарлайди.

Ҳозирда дунё олимлари бегона ўтларга қарши махсус моддалар ишлаб чиқарадиган ўсимликлар коллекцияларидан турли экин навларини топишни тадқиқ этмоқдалар. Бундай хусусиятга эга навлар экилганда гербицидларни қўллаш талаб қилинмайди.

Ген ва хужайра муҳандислиги усуллари асосида касаллик, зараркунанда ва захарли моддаларга чидамлилик белгилари киритилган ўсимликлар тўғрисида юқоридаги бобларда батафсил маълумот берилган

бўлиб, мазкур йўналиш ҳам қишлоқ хўжалиги ишлаб чиқаришида муҳим аҳамият касб этаётганлигини яна бир бор таъкидлаш жоиздир.

6-боб учун назорат саволлари:

1. Ўсимликларни кимёвий ва биологик усулда химоя қилишдан биотехнологик усулларнинг афзаллиги нимада?
2. Ўсимлик касалликларининг қандай турларини биласиз ва уларга қарши биотехнологик кураш чоралари нималардан иборат?
3. Ўсимликларни вируслардан ҳоли қилиш йўллари изохлаб беринг.
4. Қишлоқ хўжалик экинларини касалликлардан химоя қилишда микроорганизмлар ишлаб чиқарадиган антибиотикларнинг ўрни қандай?
5. Антагонист микроорганизмлардан ўсимлик касалликларига қарши курашда фойдаланишнинг афзалликлари.
6. Қишлоқ хўжалик экинлари зараркундаларига қарши курашда микроорганизмлардан олинадиган қандай препаратлар мавжуд?
7. Зараркунада ҳашаротларга қарши қўлланиладиган бактериал препаратларнинг қулайликлари ва камчиликлари нимада?
8. Вирусли ва замбуруғли энтомопатоген препаратларнинг ўзига хослиги.
9. Қишлоқ хўжалик экинлари зараркундаларига қарши курашда қандай биологик фаол моддалар қўлланилади?
10. Феромонлардан фойдаланишнинг ютуқ ва камчиликлари нималардан иборат?
11. Бегона ўтларга қарши биотехнологик кураш чораларининг ўзига хослиги.
12. Ҳозирги вақтда микроорганизмлар асосида олинадиган қандай гербицид препаратлари мавжуд?

Адабиётлар:

1. В.И.Артамонов.Биотехнология агропромышленному комплексу. М.«Наука»1989 157с.
2. Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы /Под ред. Шевелухи В.С. «Евразия» 2000 , 264с.
3. Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология./ Москва «Агропромиздат», 1990, 334 с.
4. Биотехнология Принципы и применение. Изд. «Мир» 1988-479 с.
5. Биотехнология в 8-ми книжках под редакцией Егорова Н.С. и Самуилова В.Д. М. «Высшая школа» 1987, 141 с.
6. Биотехнология сельскому хозяйству. Под редакцией А.Г.Лобанка. Минск «Ураджай», 1988 г, 199 с.
7. Н.А.Хўжамшукуров *Bacillus thuringiensis* энтомопатоген бактериясининг мутант штаммлари асосида колорадо кўнғизига (*Leptinotarsa desemlineata* Say L.) қарши инсектицид биопрепарат яратиш. (номзодлик диссертация ишининг автореферати).2002 й.

7-БОБ

АГРАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШДА БИОТЕХНОЛОГИЯ ВА БИОМУХАНДИСЛИК ЮТУҚЛАРИДАН ФОЙДАЛАНИШ

Умумий қоидалар:

Биотехнологик ва биомуҳандислик усуллари фан ва ишлаб чиқаришнинг жуда кўплаб тармоқларида қўлланилмоқда. Айниқса, ген муҳандислигида улардан фойдаланиш, мамлакат агросаноат комплекси тараққиётига сезиларли таъсир кўрсатиши мумкин. Дунёнинг етакчи биотехнолог ва иқтисодчи олимлари ҳисоб китобларига кўра, юқорида номлари келтирилган фан йўналишлари ва ҳозирги кунга қадар эришилган ютуқлари асосида дунё бозоридаги умумий товар айланмасининг 20-25% ини биотехнологик маҳсулотлар ҳисобига ортиши тахмин қилинмоқда.

Селекция ва ўсимликшунослик

Биотехнология ва биомуҳандисликда ўсимликлар селекцияси муҳим ўрин тутди. Ҳозирги вақтда дунё биотехнологларининг асосий эътибори янги генотипга эга белгилари бирмунча яхшиланган қишлоқ хўжалик экинларининг алоҳида, бир гуруҳ ёки комплекс равишда ташқи муҳитнинг биотик ва абиотик стресс омилларига чидамли ва шу билан бир вақтда ҳосилдорлик ва сифатини ўзида сақлаб қолган янги навларини яратишга қаратилган. Кейинги вақтларда ҳосилнинг қарийб 30% (баъзан ундан ҳам ортиғини) нобуд бўлишига сабаб бўладиган, қишлоқ хўжалик экинларининг кенг тарқалган ҳавфли замбуруғли, вирусли ва бактериал касалликларининг эпифитотик характерда бўлиши, дунёнинг кўплаб мамлакатларида анъанавий селекция ва биотехнологиянинг янги усуллари билан уйғунликда қишлоқ хўжалик экинлари заҳираларини янгилашга эҳтиёж сезилмоқда.

Дунё мамлакатларининг қишлоқ хўжалик экинлари экиладиган ката майдонларида буғдой, арпа ва бошқа донли экинлар комплекс касалликлар - илдиз чириши, занг, септориоз, гельминтоспориоз, ун шудринг ва бошқалар билан зарарланиши жуда кўп кузатилмоқда. Кузги буғдойнинг бошоқ фузариози (*Fusarium nivale*) билан касалланиши буғдой донида инсон ва ҳайвон организми учун ҳавф туғдирувчи микотоксинлар тўпланишига сабаб бўлади. Бу касаллик билан баъзи намлик юқори бўлган йилларда йиғиштириб олинган ҳосилнинг ярми ҳам зарарланиши мумкин. ҳарорат паст ва намлик юқори бўлган йиллари кунгабоқарнинг склеротиния ва фомопсис билан касалланиш эҳтимоли 50% ва ундан юқори даражага ошади. Картошка ва помидор ўсимликлари фитофтороз билан касалланиши оқибатида бу қимматли озиқа

экинларининг ҳосилдорлиги пасаяди ва уларни сақлаш даврида анча йўқотишларга сабаб бўлади. Переноспоров эса деярли ҳар йили катта майдонлардаги бодринг ва пиёз экинларини нобуд бўлишига олиб келади.

Узоқ давом этадиган сув танқислиги юқори бўлган қурғоқчилик йиллари ғалла ва бошқа экинларнинг зарарланиши, нобуд бўлиши, қишлоқ хўжалик экинларидан олинадиган ялпи ҳосилнинг кескин пасайишига сабаб бўлади. Саноат корхоналари томонидан захарли бирикмаларни атмосферага чиқарилиши, ҳаво, сув ва тупроқнинг оғир металл тузлари ва бошқа хилдаги техноген табиатга эга маҳсулотлар билан захарланиши экин майдонларининг зарар кўришига, уларда одамлар учун ҳавфли бирикмаларнинг тўпланишига олиб келади.

Селекционер мутахассисларнинг қишлоқ хўжалик экинларини комплекс хусусиятга эга нав ва гибридларни яратишдаги фақат анъанавий селекцион усулларга асосланган барча уринишлари ҳам кутилган натижаларни бермади. Узоқ турларни гибридизациясига асосланган трансгрессив селекциядан фойдаланиш ташқи муҳитнинг стресс омилларига чидамли маданий ўсимликлар олишдаги айрим муаммоларни ҳал этиш имконини берди. Бироқ бу муаммо ҳанузгача долзарблигича қолмоқда. Келажакда иқлимнинг кескин ўзгаришлари тахмин қилинаётган бир даврда у янада жиддий тус олиши мумкин.

Мазкур йўналишда биотехнологлар – хужайра ген муҳандислари амалда қандай ишларни олиб боришмоқда ва нималарга қодир?

Улар янги ва энг янги биотехнологик усулларида фойдаланиб, яхшиланган ёки тамомила янги сифатларга эга ташқи муҳитнинг биотик ва абиотик омилларига чидамли якка, бир гуруҳ, камдан кам ҳолларда комплекс белгиларга эга қатор ўсимлик генотипларни ишлаб чиқишди.

Бу муаммонинг ечимини топишда генетик, биотехнолог ва селекционер олимларнинг ҳатти ҳаракатлари ташқи муҳитнинг биотик ва абиотик стресс омилларга чидамлилиқни белгиловчи асосий белгиларни детерминацияловчи самарали генларни аниқлашга қаратилган. Мазкур мураккаб вазифани дунёнинг кўплаб генетик тадқиқотлар олиб бориладиган марказлари ва лабораториялари мутахассислари, жумладан ЎзРФА Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси («Биолог» илмий-ишлаб чиқариш маркази), Ўзбекистон Пахтачилик илмий-тадқиқот институти («Пахта» илмий-ишлаб чиқариш маркази), Ўзбекистон ғўза селекцияси ва уруғчилиги илмий-тадқиқот институти, Ўзбекистон шолчилик илмий-тадқиқот институти, Ўзбекистон сабзавот-полиз ва картошқачилик илмий-тадқиқот институти, Шредер номидаги Ўзбекистон мевачилик, узумчилиқ илмий-тадқиқот институти, Ботаника ИЧБ, Тошкент Давлат аграр университети, Самарқанд қишлоқ хўжалик институти олимлари ўсимлик ресурсларини тўплаб, уларни ўрганиш ва улардан фойдаланиш асосида бажариб келмоқдалар. Бунинг учун биринчи

навбатда ўсимликларнинг чидамлилиқ белгилари аниқланган ва ўрганилган манбалар ва селекция марказларида аниқланган ва яратилган донорларидан фойдаланилади.

Ўзбекистонда биотехнология ўсимликлар селекциясининг асосий усуллари билан бирга замонавий усуллар, ген муҳандислиги, молекуляр хариталаш, ҳўжалиқ аҳамияти қимматли генларни ажратиб олиш, ҳужайра ва тўқималар култураси каби соҳалар асосида ривож топмоқда.

Ўзбекистонда олиб борилаётган биотехнологияга оид тадқиқотларда ғўза ўсимлиги асосий ўринни эгаллайди. Бу борада мазкур ўсимликнинг уруғмуртак ва ҳужайралар културасидан фойдаланиб, *in vitro* шароитида янги самарадор навларини олишда фундаментал, амалий тадқиқотлар амалга оширилмоқда. Ғўза ўсимлигига ҳўжалиқ аҳамиятига молик қимматли белгиларни киритиш орқали қуйидаги вазифаларни ечиш масаласи қўйилган:

1. Ғўзанинг алоҳида ҳужайралари ва каллус тўқималарини олиш учун ген муҳандислиги реципиент тизимларини яратиш.

2. Регулятор элементларни аниқлаш.

3. Қимматли ҳўжалиқ аҳамиятига молик белгиларини кодирлайдиган нишон белгиларини молекуляр клонлаш.

4. Ғўза ўсимлигига трансформация қилиш учун бир қатор вектор молекулалари конструкцияси тузиш.

Бу борада қатор изланишлар олиб борилиб, сезиларли натижаларга эришилди.

Жумладан, регулятор элементларни аниқлаш учун ғўза геномининг молекуляр тизимини тадқиқ этиш борасида бир қатор мувффақиятларга эришилди. Бу мақсадда ғўзанинг бир неча минг алоҳида генлар банки олинган. Ғўза геномининг клонларидан иборат муайян ДНК бўлақларининг нуклеин кислоталари кетма-кетлиги аниқланди.

Қимматли ҳўжалиқ аҳамиятига молик белгиларини кодирлайдиган нишон белгиларини молекуляр клонлаш борасида ҳам бир қанча ютуқларига эришилди.

Ғўза ўсимлигига трансформация қилиш учун бир қатор вектор молекулалари конструкцияси тузилган ва сезиларли натижаларга эришилмоқда. Tn5 –бактерия транспозонини клонлаш амалга оширилди. У ўсимликлар трансформациясида нишон (маркер) сифатида фойдаланилди, шунингдек, баъзи генларнинг терминатор ва промотор қисмлари учун ҳам маркер бўлиб хизмат қилади.

Шунингдек, ғўза ўсимлигига *Agrobacterium tumefaciens* нинг канамицинга чидамлилиқ генини сақловчи Ti-плазмидаси асосидаги вектори трансформация қилинган.

Ўсимликларга генларнинг трансформацияси бўйича илмий тадқиқотлар борасида профессор Т.Ю.Юсуповнинг ишларини алоҳида таъкидлаш

лозим. У ғўза ўсимлигидан плазмидасимон тузилмаларни ажратиб олишга муваффақ бўлган. Шунингдек, у шогирдлари билан бирга pCaVItxneo плазмидасини ғўза ўсимлиги чангчисига, мош ўсимлиги тугунак бактерияларига киритиб, заракунанда ҳашаротларга чидамли трансген ўсимликлар олиш мумкинлигининг назарий асосини ишлаб чиққан.

Трансформация қилинган каллус тўқимасини ва хужайра суспензиясини селектив шароитларда ўстириш борасида тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Ўсимликлар генетикаси ва экспериментал биологияси институтида ғўзанинг турли навлари геноми фрагментларига тегишли ДНК бўлақларини киритиш мақсадида рекомбинант молекулаларнинг бир қанча вариантлари конструкцияси тузилмоқда. Шунингдек, бир неча йиллардан бери ғўзанинг трансформант хужайраларини етук даврига қадар ўстириш борасида изланишлар олиб борилмоқда.

Ќўза ўсимлиги геномидан микросателлитларни ажратиб олиш, уларнинг тузилишини ўрганиш ва клонлаш борасида ҳам замонавий селекцияга асосланган илмий – тадқиқот ишлари олиб борилмоқда. Шунинг учун кейинги ўн йиллар давомида ғўзанинг ассоциатив селекцияси учун маркер сифатида микросателлитларнинг янги коллекциясини яратиш устида изланилмоқда.

Бу борада ғўзанинг *G.hirsutum* L. геномидан ажратиб олинган янги микросателлитлар, уларнинг нуклеотид кетма-кетликлари аниқланган, уларни молекуляр клонлаш ишлари амалга оширилган.

Ќўзанинг янги микросателлитларининг нуклеотид кетма-кетликлари модел ўсимлик *Arahidopsis thaliane* нинг илгари тўлиқ ўрганилган геноми билан таққослаш ишлари олиб борилмоқда. Ќўза геномини таҳлил қилиш учун ҳар бир микросателлит учун ПЗР (Полимераза занжир реакцияси) специфик жуфт праймераларини тузиш борасида ҳам бир қатор изаланишлар олиб борилмоқда. Энг йирик ютуқлар сифатида ғўза геномидан 10 мингдан ортиқ фрагментларни ажратиб олинганлигини кўрсатиш мумкин. Уларнинг баъзиларини махсус векторларга клонланганлигини кўрсатиш мумкин.

Шунингдек, биотехнологияда бир қатор қишлоқ хўжалик экинлари: буғдой помидор, шоли, помидор, сабзи, сабзавот-полиэ экинларининг янги навларини яратиш борасида тадқиқотлар олиб борилмоқда. Ўзбекистон биотехнологиясининг олдида турган истикболли муаммоларнинг асосийлари қишлоқ хўжалик экинларинининг генофондини тузиш, уларни сақлаш усулларини ишлаб чиқиш, шунингдек турли хил касаллик ва зараркунанда ҳашаротларга чидамлилик, ташқи муҳитнинг турли хил стресс омиллари: қурғоқчилик, шўрланиш, юқори ва паст ҳароратга бардошлилик каби комплекс белгиларга эга трансген навларни яратишдан иборат.

Дунёнинг кўплаб мамлакатлари, жумладан, Ўзбекистонда ҳам самарали генларнинг замонавий банкини яратиш устида ҳам тадқиқотлар олиб борилмоқда.

Ўсимликлар генетик трансформациядаги ишларнинг муҳим босқичларидан бири генларни ажратиб олиш ва уларни клонлаш, улар асосида донор хужайрадан реципиент – хужайраларга бегона генларни кўчириб ўтказиш учун векторлар яратишдир. Плазмида, транспозон, вирус, пневмобаллистик ва бошқа хилдаги вектор тизимларидан фойдаланиш мутахассисларга ўсимлик генотиплари трансформациясини амалга ошириш ва қўшимча ёки ўзининг белгисига ўхшаш ҳамда сифат белгиларига эса трансген (модификация) қилинган ўсимликлар олиш имконини беради.

Ген муҳандислиги технологияларига асосланган дунёнинг етакчи марказ ва лабораториялари, асосан АҚШ, Аргентина, Канада, Хитой, Япония, Германия, Голландия, Франция, Ҳиндистонда гербицид ва зараркунанда ҳашаротларга чидамли: соя, маккажўхори, ғўза, қанд лавлаги, рапс, картошка, помидор ва бошқа ўсимликларнинг, шолининг – перекуляриоз; картошканинг колорадо қўнғизи ва фитофторага; буғдойнинг – шўрланиш, занг ва бошоқ фузариози, септориоз, қанд лавлагининг – циркоспороз, ризомания, рапснинг – ҳашаротлар ва замбуруғ касалликларига бардошли шакллари олинган. Ҳозирги вақтда ўсимликларнинг трансген нав ва гибридлари экиладиган экин майдонлари дунё бўйича 50 млн га майдонни эгаллаган ва йилдан йилга ортиб бормоқда. Ген муҳандислиги усуллари асосида олинган трансген ўсимликлар ва организмларни амалиётга жорий этишдаги қатъий тақиқлашлар уларнинг ҳавфсизлиги ва ишончлилигини юқори даражада назорат қилувчи давлат назорати сақланиб қолган ҳолда секин-аста кучсизланмоқда. Дунёнинг кўплаб мамлакатлари органлари, раҳбариятининг қўллаб қувватлаши натижасида кейинги йилларда ген муҳандислиги борасидаги тадқиқотларнинг ўсиш суръати илгарилаб, трансген экинлар экиладиган майдонларининг кенгайтирилишига олиб келди.

Қишлоқ хўжалик экинларининг трансформация қилинган нав ва гибридлари экиладиган майдонлар, экин турлари, мамлакатлар ва ген муҳандислиги модификацияси йўналишлари бўйича олинган маълумотларнинг ҳозирги ҳолатини қуйидагича ифода этиш мумкин: (7.1-7.4 жадваллар), «Монсанто» фирмаси; АҚШ, Сент- Луис, Миссури штати маълумоти.

7.1.Жадвал

Дунёда трансген экинлар экиладиган экин майдонларининг эгаллаган ҳажми (йиллар бўйича).

Йиллар	Майдон	
	Млн.га	Млн.акр
1996	1,7	4,3
1997	11,0	27,5
1998	27,8	69,5
1999	39,9	98,6
2000	44,2	119,5

7.2.- жадвал

Трансген экинлар экиладиган майдонларининг мамлакатлар бўйича тақсимланиши

Мамлакат	Майдон	
	млн.га	%
АҚШ	28,7	71
Аргентина	6,7	17
Канада	4,0	10
Хитой	0,3	10
Бошқа мамлакатлар	0,2	1,0
Жами	39,0	100

7.3.-жадвал.

1999 йилда асосий доминант трансген экинлар килган майдонларнинг тақсимланиши.

Экин тури	Майдони	
	млн.га	%
Гербицидларга чидамли соя	21,6	54
Bt- маккажўхори	7,5	19
Гербицидларга чидамли кузги рапс	3,5	9
Гербицидларга чидамли Bt- маккажўхори	2,1	5

Чидамлилик белгиси тавсифи бўйича трансген экин турлари экиладиган майдонларнинг тақсимланиши (1999 йилдаги маълумот бўйича)

Чидамлилик тури	Майдони	
	млн.га	%
Гербицидларга	28,1	71
Ҳашаротлар (Bt)	8,9	22
Гербицидлар (Bt)	2,8	7
Вирус ва бошқалар	< 0,1	< 0,1
Жами	39,9	100

Трансген экинлар экиладиган асосий майдонлар тўртта мамлакат – АҚШ, Аргентина, Канада ва Хитойда тўпланган. Барча экиладиган трансген экинларининг қарийб 80% и соя ва маккажўхори ўсимликларига тўғри келади. Трансген экинлар экиладиган майдонларнинг деярли барчасини гербицидларга чидамли (71%) ва зараркунанда ҳашаротларга чидамли гибрид ва навлар эгаллаган. 1997 йилда трансген экинлар экиладиган майдонларнинг ҳажми ер юзида 4 марта, 1998 йилда 2 марта, 1999 йилда 1,5 марта ошганлиги қайд қилинган.

Чорвачилик

Чорвачилик соҳасида анча олға силжиган ишлар қаторига уруғланган тухум ҳужайралар ва эмбрионлар трансплантациясини киритиш мумкин. Бундан мақсад, юқори маҳсулдор, қимматли генотипларга эга (она линияси бўйича) ҳайвонларни етиштиришдир. Мазкур усул бугунги кунда йирик шохли қорамоллар қўй, чўчка ва паррандаларнинг юқори маҳсулдор зотларини етиштиришда қўлланилади. Ҳозирги вақтда овуляция жараёнларини стимуллаш технологиялари, зиготаларни шакллантириш ва ажратиб олиш, уларни *in vitro* уруғлантириш, уруғланган тухум ҳужайралар ва эмбрионларни реципиент ҳайвонлар жинсий аъзоларига кўчириб ўтказиш, бир тухумли эгизакларни олиш учун гастролани бўлиш технологиялари пухта ишлаб чиқилган ва амалиётда фойдаланилмоқда. АҚШ, Англия, Германия, Франция, Австралия ва бошқа кўплаб дунёнинг ривожланган мамлакатларининг кўплаб фирма ва илмий ташкилотлари бундай тадқиқотларни нафақат ўз мамлакатларида, балки чорвачиликни ривожлантириш борасидаги илмий лойиҳа ва буюртмаларни бажаришда шартномалар ва битимлар тузиш орқали ривожланиб келаётган мамлакатларда чорвачилик тараққиётига ҳисса қўшмоқдалар.

Ўзбекистонда ҳайвонлар трансплантациясини амалга ошириш билан боғлиқ усуллар Чорвачилик институти ва наслчилик станцияларида амалга

оширилади ва жорий қилинмоқда. Юқори маҳсулдор чорва ҳайвонлари эмбрионлари трансплантацияси борасида амалга оширилаётган ишлар дунёнинг етакчи мамлакатларидаги тадқиқотларига нисбатан анча орқада қолган. Бунинг асосий сабаби сифатида чорвачиликни ривожлантириш борасида олиб борилаётган ишларнинг қониқарли даражада эмаслиги, барча турдаги чорва ҳайвонлари бош сонининг бир неча ҳисса камайиши, чорва ҳайвонларида нобуд бўлиш кетиш сони ортиши, озиқа ишлаб чиқаришнинг камайиши ва сифатининг пасайиши, наслдор зотларни яратиш борасида олиб борилаётган ишларнинг сустлиги, умуман, чорвачилик соҳасидаги деградациянинг тезлашуви деб кўрсатиш мумкин.

Бундай шароитларда қишлоқ хўжалигининг чорвачиликка ихтисослашган якка тартибдаги, хусусий юридик мақомдаги хўжаликларида илмий фаолиятни иқтисодий фаолият билан уйғунликда олиб боришга тўғри келади.

Келажақда чорвачиликда истиқболли, ундаги муаммоларнинг ечимини топишда биотехнолог олимларнинг селекционерлар, ветеринарлар ва бошқа мутахассислар билан ҳамкорликда фаолият юритишлари зарур бўлади. Бундай муаммоларнинг энг асосийлари йирик шохли қорамоллар, қўй, чўчқа, қуён ва паррандаларнинг ҳавфли вируслар ва бошқа инфекцияларга чидамлилиги билан ажралиб турадиган трансген зотларини олишдир. Кейинги муаммолар ечими эса лейкоз, ўпка сили, бруцеллез ва бошқа касалликларга чидамли трансген ҳайвонлар олишга қаратилиши зарур.

Чорвачиликда мутлақо янги йўналиш инсон организмидаги баъзи касалликларни даволашда қўлланиладиган трансген аъзолар – донор аъзо ва тўқималарни олиш ҳисобланади. Бундай мақсадларни амалга ошириш учун бугунги кунда тегишли ген конструкциялари мавжуд бўлиб, инсон организми учун трансплантация қилишда фойдаланиладиган аъзоларини олиш учун трансген чўчқаларни олиш бўйича изланишлар олиб борилмоқда. Қишлоқ хўжалик ҳайвонлари геномига кўчириб ўтказиш (интеграция) қилиш мақсадида эритропоеэтин, инсулинсимон омил, одам инсулини ва ҳоказо генларнинг конструкцияси тузилган ва такомиллаштирилмоқда.

2007 йилда одам инсулини гени киритилган йирик шохли қорамолларининг бузоқларини олишга муваффақ бўлинди. Улар асосида инсулин гомони сақловчи сут соғиб олиш олиш кўзда тутилмоқда.

Масалан, Россияда паррандачиликда биринчи марта турли хил ген конструкцияларига эга трансген товуқ ва беданалар олинган. Шунингдек, товукларнинг саноат миқёсида ва шахсий ишлаб чиқариш шароитларида касалликларга чидамли ва юқори маҳсулдор зот ва янги линияларини яратиш борасида янги имкониятлар очилмоқда.

Чорвачиликда биотехнология ютуқларидан самарали фойдаланишнинг аниқ натижаси сифатида мутлақо янги биостимуляторлар, яъни қорамолнинг рекомбинант ўсиш гормони - соматотропин ва чорва молларининг маҳсулдорлигини оширувчи бошқа хил моддалар шунингдек, йирик шохли моллар, чўчкалар ва мўйнали ҳайвонларга самарали таъсир кўрсатувчи химер оксил препаратлари кенг спектри асосида соматостатинни иммунокоррекция қилувчи моддалар олиш ва ишлаб чиқариш ишланмасини кўрсатиш мумкин.

Амалиётда ҳайвонларни генетик клонлаш, дастлабки даврдаги эмбрионларни хирургик майдалаш йўли билан кўпайтиришнинг асосий принциплари ишлаб чиқилган ва қўлланилмоқда.

Ветеринар тиббиёт

Ветеринар биотехнология ва тиббиётда, микробиологияда ҳайвонларни ветеринар ҳавфсизлигини таъминловчи чорва ҳайвонлари ва қушларни турли хил касалликлардан ҳимоя қилишдаги профилактик ва терапевтик муаммоларни ҳал этишда сезиларли ютуқларга эришилган.

Ветеринария соҳасида мутахассислар билан ҳамкорликда ген муҳандислиги усуллари билан олинган терапевтик таъсирга эга препаратлар ва бир валентли, кўп валентли профилактик зардобларни олиш ва саноат миқёсида ишлаб чиқариш усуллари ишлаб чиқариш ташкил этилган.

Биофабрикаларда вирус ва ҳужайраларни кенг миқёсда ўстириш усуллари ҳам ишлаб чиқилганки, бу ўта ҳавфли вирусли инфекциялар - қутуриш, инфекцион ринотрахеит вируси, ўлат, шунингдек, бактериялар ва замбуруғлар чақирадиган бошқа касалликларга қарши 40 турдан ортиқ вакциналарни ишлаб чиқариш имконини беради.

Амалиётга ИФТ (иммуно фермент таҳлили), ДНК –зондлар, ПЗР – полимер занжир реакцияси (ПЗР) усуллари жорий этиш асосида юқори сезувчан диагностика препаратлари яратилган ва қўлланилмоқда. Гибридома технологиялари усуллари асосида олинган моноклонал антитаналардан фойдаланилмоқда. асРНК генини тутувчи, лейкозга чидамли генетик трансформация қилинган, шунингдек интерферонининг альфа-2 гени кўчириб ўтказилган қуёнларнинг трансген шакллари олинган. Чечак вектори асосида йирик шохли молларнинг лейкоз касаллигига қарши рекомбинант вакцина ишлаб чиқилган. Ҳужайралар културасида антиген олинмоқда ва йирик шохли молларнинг лейкоз касаллигига ташхис қўйиш амалга оширилмоқда.

Бугунги кунда дунёнинг кўплаб мамлакатларида етиштириладиган чорва молларини эмлаш учун зарур миқдорда оксим ва сибир яраси касалликларига қарши ген муҳандислиги усулида олинган вакциналарни ишлаб чиқариш йўлга қўйилган.

Қишлоқ хўжалик микробиологияси

Фаннинг бу соҳасида ва биотехнология, биомухандислик амалиётида бугунги кунда қуйидаги тўртта асосий йўналиш шаклланган:

1. Тупроқда азотни ўзлаштирувчи эркин ва симбиоз яшовчи микроорганизмлардан фойдаланишнинг самарасини оширишнинг генетик асосларини ўрганиш.

2. Ўсимлик ва ҳайвонларни ҳимоя қилишда юқори самарадор ва экологик ҳавфсиз янги микробиологик препаратларни яратиш.

3. Ген муҳандислиги усуллари асосида янги ветеринар препаратларни яратиш.

4. Ҳайвонлар ичак тизимида яшаб иммуномодуляция қилувчи моддалар, биологик фаол моддалар, оксил синтезловчи ва азот тутувчи янги штаммаларни олиш.

Ўзбекистонда Россия қишлоқ хўжалик академияси қишлоқ хўжалик микробиологияси институти билан ҳамкорликда ризобиал бактерияларнинг коллекцияси тўпланган. Соя, беда, мош каби ўсимликлар ҳосилдорлигини оширувчи, тупроқ унумдорлигини оширувчи микробли ўғитлар олиш ишланмаси яратилган ва амалиётда синов ишлари олиб борилмоқда. Бугдой, ғўза ва бошқа ўсимликлар ҳосилдорлигини оширишда ЎЗР ФА Микробиология институти олимлари томонидан азотни эркин ўзлаштирувчи микроорганизмларни тадқиқ этиш борасида ҳам бир қатор изланишлар олиб борилмоқда. Азот тўпловчи микроорганизмлар асосида 1999 йилда «Ер малҳами» препарати яратилиб, Давлат Кимё комиссияси рўйхатидан ўтиб, қишлоқ хўжалик амалиётида фойдаланиб келинмоқда.

Қишлоқ хўжалик маҳсулотларини сақлаш ва қайта ишлаш

Биотехнологик усуллар ва ёндошишлар маҳсулотларнинг таъм ва бошқа хил сифат хусусиятларини сақлаш ва яхшилашга қаратилган бўлиб, улар ўсимликлардан олинган ёки синтетик бирикмалардан олинган биологик компонент қўшимчалар – консервант ва таъм берувчи бирикмалардан фойдаланишга, шунингдек маҳсулотларни узоқ вақт, ишончли сақлаш имконини берадиган трансген микроорганизмлар мембрана технологияларини қўллашга асосланади. Витаминлар, аминокислоталар, озиқа ва озиқ-овқат қўшимчаларини ишлаб чиқариш замонавий саноат биотехнологиясининг энг сўнгги ютуқларини ўз ичига олган усулларига асосланади. Бугунги кунда уларни ишлаб чиқариш ҳажми ҳаридор корхоналар ва соҳаларнинг эҳтиёжини тўла қондира олмаяпти.

Умуман, бугунги кунда қайта ишлаш саноати муаммоли вазиятда турибдики, бу қишлоқ хўжалик маҳсулотлари хом ашёси келиб тушишини

икки марта камайтириш имконини берадиган технологик асбоб ускуларни ўз вақтида янгиланмаётганлиги билан изоҳланади.

Ҳозирги вақтда ўсимлик ва ҳайвон маҳсулотларини қайта ишловчи корхоналар, заводларни тиклаш ва ривожлантириш билан боғлиқ катта вазифалар турибди, бу эса уларда энг янги биотехнологик усулларни қўллаш имконини берган бўлар эди.

Биоконверсия ва биоэнергетика

Ўсимлик маҳсулотлари етиштиришда ялпи маҳсулотнинг қарийб ярми-қишлоқ хўжалик экинлари сомони ва пояларига тўғри келса, қишлоқ хўжалик ишлаб чиқаришидаги органик чиқиндиларнинг 300 млн. т га яқинини гўнг ташкил этади. Сомоннинг ярми ва поя (палак)ларнинг 30% қисмигина чорва моллари озукаси сифатида фойдаланилади. Сомон ва палак поянинг қолган қисми деярли ишлатилмасдан, ёқиб юборилади ёки дала, вақтинчалик сақлаш жойларида чириб кетади.

Гўнгнинг қарийб ярми маҳаллий ўғитлар сифатида ишлатилса, қолган қисми сув ҳавзалари, аҳоли яшаш жойлари ва ҳоказоларга ташланиб, атроф муҳитни ифлосланишига сабаб бўлади. Органик чиқиндилардан фойдаланишдаги асосий вазифа уларни тупроққа киритиб, тупроқ унумдорлигини оширишга қаратилади.

Биотехнологлар ва биомуҳандислар уни биоконверсия қилиш – биогазга айлантириш усулларини тавсия этишади. Бир тонна курук гўнгдан махсус конверсион ускуналарда 400 м³ гача метан газини олиш мумкин.

Метаннинг ҳар бир кубометри ёқилганда 8 минг мЖ энергия беради. Гўнгни биоконверсияси натижасида қолган органик чиқиндилар таркибида углерод, фосфор, калий, кальций, микроэлементлар сақланганлиги боис уларни органик ўғитлар сифатида қўллаш мумкин. Гўнг ва бошқа органик чиқиндилар биоконверсияси тиклаб туриладиган доимий энергия манбаи бўлиб, қишлоқ хўжалигида истеъмол қилинадиган умумий энергиянинг 5 % га яқинини бера олади. Мамлакатимизда биоконверсия ускуналари баъзи фермер хўжаликлари ва хусусий корхоналардагина синовдан ўтмоқда.

Кичик биоконверсион ускуналарда гўнг ва бошқа хилдаги органик чиқиндилардан биогаз ишлаб чиқариш Хитойнинг кооператив ва шахсий қишлоқ хўжалик корхоналарида анча оммалашган. Олинган биогаз (метан) маиший ва саноат эҳтиёжлари учун ишлатилади. Ўзбекистонда бу усулда биогаз ишлаб чиқариш деярли йўлга қўйилмаган.

Биотехнологлар ва ўсимликшунос мутахассислар қишлоқ хўжалигида олинадиган маҳсулотлар, технологиялар навларни энергетик самарадорлик кўрсаткичларига кўра баҳолашни тавсия этадилар.

Энергия сарфини ҳисоблаш асосида ишлаб чиқарилган маҳсулот бирлиги ва ҳақиқий олинган ҳосил бирлигидаги энергия миқдори нисбатига кўра баҳолаш усуллари ишлаб чиқилган.

Энергетик самарадорликни нисбий birlikларда қуйидаги тенгламага мувофиқ ифодаланади:

$$K_{\Phi} = \frac{E_c}{E_z}$$

K_{Φ} – энергетик самарадорлик коэффициенти;

E_c – ишлаб чиқилган маҳсулот бирлигидаги энергия миқдори;

E_z – ишлаб чиқилган маҳсулот бирлигига нисбатан сарф бўлган энергия миқдори.

Агар K_{Φ} 2-3 ва ундан ортиқ бўлса, бундай нав технологиялар, ишлаб чиқариш тизимлари самарадор ҳисобланади.

$K_{\Phi} < 1$ бўлганда, нав, технологиялар, ишлаб чиқариш тизимлари қониқарсиз бўлиб, синовдан ўта олмайди, чунки бунда маҳсулот бирлигини ишлаб чиқиш учун сарф қилинган энергия олинган маҳсулот бирлигига нисбатан юқори бўлади.

Илмий асосланган оптимал технологиялар асосида барча заҳиралар ва қишлоқ хўжалик экинлари гибрид-навлари, парранда ва ҳайвон зотларидан оқилона фойдаланиш ўсимликшуносликда қуёш энергиясидан фойдаланиш коэффициентининг ортиши (3% гача) ҳамда чорвачиликда озиқа конверсияси ортиши, пировард натижада қишлоқ хўжалик маҳсулоти ишлаб чиқаришнинг энергетик самарадорлиги коэффициенти юқори бўлишини таъминлайди.

Қишлоқ хўжалик ишлаб чиқаришида барча заҳиралардан оқилона фойдаланишнинг энергетик самарадорлигини баҳолашнинг биотехнологик усулларида фойдаланиш мамлакатда кичик ишлаб чиқарувчи цехларни шакллантиришдаги асосий вазифадир.

ХУЛОСА

Бугунги кунда биотехнология фан ва ишлаб чиқариш соҳасининг тармоғи сифатида дунёда тез тараққий этиб бормокда. Биотехнологиянинг XXI асрдаги тараққиётини одамларнинг ҳаётий зарур эҳтиёжларини қондириш ва ҳавфсизлигини таъминлаш билан боғлиқ глобал муаммоларни ҳал этишга қаратилган деб изоҳлаш мумкин. XXI асрда Ер шарни аҳолисининг асосий ресурсларга бўлган эҳтиёжларини қондиришда турли хил усул ва ёндошишлар мавжуд. Асосий ресурсларнинг ўсишини умумий ҳолда қуйидагича жадвал кўринишида изоҳлаб, таҳлил қилиш мумкин (7.6. жадвал).

**XXI асрда ишлаб чиқарилиши ва сарф қилиниши лозим бўлган
эҳтиёжларнинг тахмин қилинадиган ҳажми**

Озиқ-овқат	2-3 марта ортиши
Энергия билан таъминлаш	5-6 марта ортиши
Чучук сув	5-6 марта ортиши
Экология учун сарф ҳаражатлар	10 марта ортиши
Иқлимни мувозанатлаш учун зарур ҳаражатлар	20 марта ортиши
Аҳоли саломатлигини сақлаш учун зарур ҳаражатлар	20 марта ортиши
Тупроқ унумдорлигини тиклаш учун зарур ҳаражатлар	10 марта ортиши
Ўрмон, яйлов ва ўтлоқларни тиклаш учун зарур ҳаражатлар	20 марта ортиши
Фауна (ҳайвонот оламини) тиклаш учун зарур ҳаражатлар	10 марта ортиши
Космосни ўзлаштириш учун зарур ҳаражатлар	20 марта ортиши
Техноген офатларни бартараф этиш учун зарур ҳаражатлар	20 марта ортиши

13.6. жадвалда келтирилган заҳиралар минимал даражада бўлса, биринчи ва асосийларидан ҳисобланиши мумкин. Заҳираларнинг асосийлиги улар олинадиган манбаларнинг тиклана олиш хусусияти уларни такрор ишлаб чиқаришни кенгайтиришдаги ташкилий - техник ва технологик имкониятлар, мамлакат тараққиёти ёки умуман цивилизациясида ҳавфсизликни таъминлаш билан белгиланади.

Инсоният ҳаётий эҳтиёжларининг ресурсларга боғлиқ ҳолатни инобатга олиб, шунингдек уларнинг сифат ва миқдорий кўрсаткичлари ўзгаришларини башоратига кўра, биринчи ўриндаги глобал муаммолар қаторига бу юз йилликда истеъмол қилинадиган энергиянинг 5-6 марта, озиқ-овқат 2-3 марта, экологик ҳавфсизликни таъминлашга кетадиган сарф-ҳаражатларни 10 мартадан кўп ортиши кабиларни киритиш мумкин. XX асрнинг охири XXI асрнинг бошларидаги кўрсаткичлар ҳажмига нисбатан, биотехнологиянинг иқтисодий аҳамияти ва бугунги, эртанги кун истиқболларини инобатга олиб дунёнинг кўплаб мамлакатлари биотехнологияни, биринчи навбатда биомухандисликни ривожлантиришга оид миллий дастурларини тасдиқлаган, соҳани ривожини таъминлашни давлат аҳамиятига олиб чиқилган, молиялаштириш ишлари эса албатта, бюджет ҳисобига амалга оширилмоқда.

7-боб учун назорат саволлари:

1. Дунё аҳолисини озиқ-овқат маҳсулотлари билан таъминлашда генетик модификация қилинган ўсимликлардан фойдаланиш бўйича эришилган ютуқлар ва истикболлар.
2. Ўсимликшуносликда экинлар ва экиш материалларини биотехнологик усуллар билан соғломлаштиришнинг ҳолати ва бу усулдан фойдаланишнинг истикболлари.
3. Ўсимликлар селекциясида ташқи муҳитнинг биотик ва абиотик омилларига чидамли ўсимликлар олишда борасида биотехнология ва биомухандислик усулларининг қўлланилиши.
4. Ветеринар тиббиётда биотехнология ва биомухандислик ютуқлари. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларининг ҳавфли касалликларига чидамлилигини ошириш муаммосини ҳал этишдаги истикболлари.
5. Чорвачиликда эмбрионлар трансплантацияси. Мазкур усулдан фойдаланиш борасида эришилган ютуқлар ва истикболлар.
6. Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини клонлаш. Ушбу усулдан фойдаланиш бўйича эришилган натижалар, муаммолар ва истикболлар.
7. Трансген ҳайвонларни олиш – трансгенез усулини қўллаш орқали олинган натижалар, ҳал этилиши лозим бўлган муаммолар, трансгенез усулини қўллашнинг истикболлари.
8. Микроорганизмлар селекциясида нитратредуктаза фаоллигини ошириш (биологик азот ўзлаштирилишини интенсивлаш) борасида биомухандисликдан фойдаланиш орқали олинган натижалар ва истикболлар.
9. Қишлоқ хўжалик маҳсулотларини сақлаш ва қайта ишлашда биотехнологик усуллардан фойдаланиш орқали эришилган натижалар.
10. Қишлоқ хўжалик чиқиндилари биоконверсиялашда биотехнологик усулларнинг қўлланилиши. Фаолият юритувчи биогаз ускуналари схемаси ва типлари, конструкциясини ишлаб чиқилиши.
11. Қишлоқ хўжалик технологияларининг энергетик самарадорлиги, қишлоқ хўжалигида фаол қайта тикланувчи энергия оқими - қуёш энергияси.
12. Инсониятнинг мўътадил тараққиётини таъминлаш учун захираларининг ўсишига нисбатан зарурий эҳтиёжлар.

Адабиётлар:

1. С/х биотехнология. Под ред. В.С.Шевелухи. М.: «Высшая школа», 1998г.
2. Биотехнология. Сборник тезисов, Пушкино-2001г.
3. С/х биотехнология. Избранные работы. В 2-х т. Под ред. В.С.Шевелухи. М.: «Воскресенье», 2000г.
4. Эрнст Л.К., Прокофьев М.И. Биотехнология с/х животных. М.: «Колос», 1995г.
5. Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии. Материалы Всесоюзной конференции. Москва, 1986г., июнь. Ленинград-1986г.
6. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихонович Т.И. и др. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990г.
7. Изучение генома и генетическая трансформация растений. Под ред. Р.К.Салаяева. Материалы Всероссийского симпозиума. 1999г., 23-27 августа. Иркутск, М.-2001г.

АСОСИЙ БИОТЕХНОЛОГИК ТЕРМИНЛАР ЛУҒАТИ

Агар-агар-баъзи денгиз ўсимликларидан олинадиган маҳсулот; унинг энг муҳим таркибий қисми углеводлар қаторига киради, у совуқ сувга солинганида бўкади, қайноқ сувда батамом эрийди, эритмаси совиғанда таъмсиз ва ҳидсиз, тиниқ, ивиқ чўкма ҳосил бўлади. Бу маҳсулот микроорганизмларга қаттиқ озиқа муҳити тайёрлашда, қандолатчиликда ширинликлар тайёрлашда ишлатилади. Турлари: ўт (сафро) суюқлиги ва бинафша ранг агар; жўхори уни қайнатмасидаги агар; пиво аталасидаги агар; ачитки замбуруғли экстрактли агар; сув пептонли агар; глицеринли агар; узум шакарли агар; дезоксихолли агар; лактозали дезоксихолли агар; декстрозали агар; желатинали агар; сафроли агар; картошка ва қонли агар; крахмалли агар; қонли агар; лактоза-лакмусли агар маннитли агар; сут-пептонли агар; сийдикли агар; юмшоқ агар-микробларни икки қатламли озуқа муҳитида ундиришга ишлатиладиган агарнинг устки қатлами; гўшт-пептонли агар; озуқали агар; ярим суюқ агар; оддий агар; балиқ-желатинали агар; шакарли агар; қўрғошин-сиркали агар; қийшайтирилган агар; пиво аталали агар; зардобли агар; фенолфталейнли агар; фуксинли агар; тухум оксилидаги агар; тухум сариғидаги агар.

Агароза-денгиз сувўтларидан олинадиган полисахарид; электрофорез ва хроматографияда гелли муҳит сифатида фойдаланилади.

Агрегация-айрим организм ёки хужайраларнинг тўпланиши, ғуж бўлиб қолиши.

Агробиоценоз-экин экиладиган ерларда яшайдиган организмлар йиғиндиси.

Адаптация-мослашиш-организмларнинг эволюция жараёнида юзага келган яшаш шароитига мослашуви.

Адвентив куртаклар-ўсимликлардаги куртаклар, улар одатда пайдо қилмайдиган хужайра ва тўқималардан ҳосил бўлади.

Аденилланиш- йўли билан ферментлар фаоллиги ўзгаришининг бир тури.

Аденин - (аминопурин)-азотли органик бирикма бўлиб, аденин нуклеотиди таркибига киради.

Азотобактерин- ушбу турга кирадиган бактериялардан ташкил топган бактериал ўғит.

Азотобактер-эркин ҳолда яшаб, ҳаводан азот тўпловчи бактериялар тури.

Акропетал транспорт-ўсимликда моддаларнинг поя апикал меристемаси йўналиши бўйича ташилиши.

Амплификация-хромосома ДНК кетма-кетлигининг қўшимча нусхасининг ҳосил бўлиши.

Анаэроблар-кислородсиз муҳитда модда алмашилиши ва кўпайишини давом эттира оладиган микроорганизмлар; фақат анаэроб шароитда ўсадиган микроорганизмлар; факультатив анаэроблар кислородли ёки кислородсиз шароитда ўса оладиган микроорганизмлар.

Андрогенез-микроспора ёки чанг доначаларидан соматик эмбриогенез ёки каллус ҳосил қилиш орқали ўсимлик ёки унинг органларининг ҳосил бўлиш жараёни.

Антагонист-рақиб-микроорганизмлар ҳаётини тўхтатувчи ёки бутунлай барбод қилувчи бошқа бир микроорганизм.

Антибиотиклар-микроорганизмлар ҳаёт фаолияти давомида ҳосил бўладиган кимёвий моддалар; жуда оз миқдори ҳам бошқа микроорганизмларга захарли таъсир этади. Антибиотиклар сони ҳозирда 2000 дан ортиб кетган бўлиб, уларнинг синтезланишида замбуруғлар (аспергиллар), шўъласимон замбуруғлар ва бошқа микроорганизмлар хизмат қилади; антибиотиклар ишлаб чиқаришнинг *Penicillium*, *Cephalosporium* ва *Streptomyces* авлодларига мансуб турларида ишлаб чиқариладиган пенициллинлар-асосий тижорат антибиотиклар ҳисобланади;

Антигенлар-иммун тизимда антителалар ҳосил бўлишини индуцирловчи, антитела пайдо бўлишига таъсир этувчи специфик ҳамкорлик қилувчи оксиллар.

Антитела-иммун тизим томонида ёки патоген агентлар; оксилларни (антигенлар) йўқотувчи таъсирга эга оксиллар.

Апикал доминантлик-апикал меристемадаги гормонлар ёрдамида ён навдаларнинг юқори меристемаси куртаклари ўсишини тўхтатилиши.

Аттрагирлаш хусусияти-стимулятор фитогормонларнинг озика моддаларни ўсувчи органга катта миқдорда ташилишини фаоллаш хусусияти.

Ауксотроф мутантлар-жинсий бўлмаган хромосомалар тўплами (1, 2, 3, ва ҳоказо сонлар билан белгиланади).

Базал-асосий, асосгатегишли; асосида ёки унинг тагида жойлашган-базал таначалар-эукариотик жониворлар (оддий жониворлар, сувўтлар) хивчинларини цитоплазманинг ташқи қаватига ёпишиб туришига ёрдам берадиган тузилма.

Базипетал транспорт-ўсимликдаги моддаларнинг илдизнинг апикал меристемасига транспорти.

Бактериофаглар-бактерияларни инфекцияловчи вируслар.

Бинар-икки қисмдан иборат; бинарли номенклатура-микроорганизмларда авлод ва тур номи билан аталиши; бинарли бўлиниш-хужайраларнинг кўпайиш вақтида иккига бўлиниши.

Биогенез-тирик организмлар томонидан органик бирикмаларнинг ҳосил бўлиши.

Биомасса-микроорганизмларни ўстирилганида хужайралари массаси ёки тирик организм массаси; фаол биомасса-биологик фаоллик кўрсатувчи масса; қуруқ биомасса-организмларнинг қуруқ биомассаси. У ҳўл биомассанинг 15-30% ини ташкил этади; ҳўл биомасса-сузиш ёки айлантириш, чўктириш натижасида суяқ озуқа муҳитидан ажратиб олинган хужайра массаси.

Биореактор-биологик реакцияларни амалга оширишга мўлжалланган сиғим. Бу атама аэроб ва анаэроб организм хужайраларини ўстириш учун зарур бўлган сиғимларда ҳамда хужайра ва ферментларни тўплашда фойдаланадиган найчаларга нисбатан ишлатилади.

Биосинтез-ферментлар таъсирида тирик организмларда оддий бирикмалардан мураккаб органик моддаларнинг ҳосил бўлиши.

Биотехнология-тирик организмлар ёки биологик қонуният ва хусусиятларнинг саноат миқёсида ишлатилиши ҳақидаги фан йўналиши.

Вектор-генларни клонлашда фойдаланиладиган репликон. Табиий векторлар-кичик плазмидалар, вируслар ва бактериофаглар. Сунъий векторлар эса ДНК-лигаза ёрдамида ҳар хил манбалардан олинган ДНКни бирлаштириш асосида тузилади; ўрнини олиш вектори-клонлаштирувчи вектор; ўсимликларда клонлаш вектори-ўсимлик хужайрасига бегона ДНКни ўтказиш ва жойлаштириш билан шуғулланадиган ген муҳандислигида ишлатиладиган вектор; плазмида вектори-бегона, ёт ДНКдаги ген ёки бир неча генларни бу хилдаги генлари бўлмаган организмга ўтказиб қўйишида қатнашадиган плазмида.

Вируслар-бирорта тирик организмда ривожланиш қобилятига эга бўлган, таркибида нуклеин кислоталар, оксиллар, айримҳолларда липидлар бўлган заррачалар. Вируслар заррачалардан ташкил топган бўлиб, улар нуклеин кислоталар ва оксиллар пўстлоқли ҳолда бўлади. Вируслар 1892 йилда Д. И. Ивановский томонидан очилган бўлиб, 1889 йилда “вирус” атамаси М. Бейеринк томонидан таклиф этилган. Вирус ҳамма тирик организмларда касаллик кўзгатади ва ҳамма ерда тарқалган.

Гаплоид-бир организм турига хос бўлган бутун тўпламнинг ярми, хромосомалар тўпламининг билан характерланувчи ядро, хужайра, организм.

Ген – генетик ахборотларнинг ягона структураси муайян регулятор функция, бир ёки бир неча полипептид занжирлар, ёки РНК молекуласи структурасини кодирловчи хромосома қисми (ДНК молекуласи).

Ген муҳандислиги – усуллар ва технологиялар; рекомбинант рибонуклеин ва дезоксирибонуклеин кислоталар олиш технологияси, организмлардан генларни ажратиш, улар билан турли манипуляциялар ўтказиш ва уларни бошқа организмларга киритиш технологиялари.

Генетик код (ГК) – нуклеин кислоталар изчиллиги кўринишидаги нуклеин кислоталари молекулаларида наслий ахборотнинг ёзма тизими. ГК бирлиги бўлиб кодон ёки триплет хизмат қилади. ГК синтезланаётган полипептид занжирига аминокислоталарнинг бирикиш тартибини аниқлайди.

Нуклеин кислоталари молекулаларида кетма-кетлик кўринишида “ёзилган” ирсий ахборотнинг тирик организмларга хос ягона тизими. Генетик коднинг бирлиги кодондир.

Генетик модификацияланган трансген организмлар (ГМО) – ген – муҳандислиги усуллари ёрдамида геномига бегона генларни киритилиши орқали ирсияти ўзгарган ўсимлик, ҳайвон, микроорганизм ва вируслар.

Генетик хавф-инсонлар ҳаёти ва соғлиги, атроф-муҳит учун хавфли бўлган кутилмаган ирсий ўзгаришларнинг геномда пайдо бўлиши ва организмлар сифатининг ўзгариши.

Генлар библиотекаси-бутун геномни тутувчи клонланган ДНК фрагментлари тўплами.

Генлар экспрессияси – генда рибонуклеин кислота, оксил ва фенотипик хусусиятлар шаклида ёзилган генетик ахборотларнинг юзага чиқиши.

Геном-мазкур организм протоплазмаси органеллаларида жойлашган хромосомалардан ташқари генларини тутувчи генлар йиғиндиси. Диплоид

ҳолатдаги турлар гаметасида биттадан, соматик ҳужайраларда эса иккитадан геном бўлади.

Генотерапия-реципиент геномига бегона генларни киритиш ёки биологик объект тўқималарида генетик соғлом соматик ҳужайраларни олиш ёрдамида наслий касалликларини даволаш.

Генотип-асос генларининг тўплами. Ирсий асос–организмларнинг генетик (ирсий) конституциясининг ва унинг барча генларининг мажмуи.

Генофонд-организм турлари ёки популяциясидаги ҳар хил генлар турларининг сони ва тарихи.

Гетерозис – бир-биридан қатор хусусиятлар ва белгилари билан фарқланувчи бошланғич шакллари чатиштириш натижасида пайдо бўлган биринчи авлод дурагайлариининг яшаш қобилиятининг ошиши.

Гибрид-дурагай-генетик жихатдан ҳар хил бўлган турларни чатиштириш натижасида ҳосил бўлган гетерозигота жинси. Ота-она ирсий белгиларини ўзида мужассамлаштирган организм.

Гиногенез – муртак халтаси ҳужайраларидан ўсимлик пайдо бўлиш жараёни.

Гифлар-ипчалар-замбуруғ танасини ташкил этувчи бир ёки бир неча ҳужайрадан ҳосил бўлган, микроскопда аранг кўриш мумкин бўлган иплар.

Гормон рецептор комплекс-гормон ва оксил рецепторининг бирикиши, гормон таъсири амалга ошишининг биринчи босқичи.

Гормон статуси – онтогенезда ўсимлик ва ҳайвон гормон тизимининг умумий ҳолати, эндоген ва экзоген таъсирларга нисбатан ҳосил бўлиш жараёнларида гормонлар миқдори ва улар орасидаги нисбати, ҳаракати, фойдаланилиш ва инактивацияси.

Деструкция – моддаларнинг парчаланиш орқали физиологик фаоллигини йўқотиши.

Дидифференция - ихтисослашган, бўлинмайдиган ҳужайраларнинг дифференцияланмасдан бўлинаётган каллус ҳужайраларига айланиш.

Диплоид – мазкур турга хос сонларни кўрсатувчи гомологик хромосомаларнинг иккита тўплами билан характерланувчи ядро, ҳужайра ва организм.

Диплоидлаш – хромосома тўпламини икки марта кўпайтирувчи модель. Хромосомаларнинг диплоид тўплами (автодигаплоид) ота ёки она хромосомаларини тутувчи иккита гаплоид хромосомалар тўплами.

Дифференциялаш – асосий ва янги ҳосил бўлган ҳужайралар орасида, шунингдек янги ҳосил бўлган ҳужайралар орасида фарқ юзага келтирувчи жараёнлар комплекси.

ДНК – дезоксирибонуклеин кислоталар молекуласи, нуклеотидлар (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибоза ва фосфор кислота қолдиқларидан ташкил топган.

ДНК бўшлиғи-ДНК занжирида битта ёки бир нечта нуклеотидларнинг етишмаслиги.

ДНК дуплексидаги узилиш – икки занжирли ДНКнинг занжирларининг биттасида ёнма-ён иккита нуклеотидлар орасидаги фосфодиэфир боғининг йўқлиги.

ДНК репликацияси – ферментлар тўплами (ДНК полимераза, лигаза ва бошқалар) ёрдамида ДНК нусхасини ҳосил қилиш орқали унинг молекулаларини иккиланиши (икки марта кўпайиши).

Ёпиқ тизим – ташқи муҳит билан фақат энергия орқали алмашинувчи тизим.

Ёпишқоқ учлар-комплементлар ҳолдаги ДНК молекуласининг битта ипли учи бўлиб, эндонуклеазалар ёрдамида кесиб олинади.

Жинсий жараён – эркак (спермия) ва урғочи (тухум ҳужайра) жинсий ҳужайраларининг қўшилиш, натижада диплоид ҳужайра (зигота) ҳосил бўлади ва асоснинг жинси белгиланади.

Жинсий хромосомалар – асоснинг жинсини белгиловчи хромосомалар (X, Y, W, Z ва бошқа ҳарфлар билан белгиланади).

Затравка – ДНКнинг битта занжири билан комплементар ҳамкорлик қилувчи қисқа изчиллик (кўпинча РНК); эркин 3 – ОН – уч ҳосил қилиб, у асосида ДНК-полимераза дезоксирибонуклеотид занжир синтез қила бошлайди.

Идентификация-айнан ўхшатиш, тенглаштириш-моддаёки микроорганизмлар тури ва хилларини аниқлашга қаратилган тадқиқотлар тури.

Иммобилизация (тўплаш) – мембраналарда ҳужайра, ферментларни тўплашда фойдаланиладиган физик ва кимёвий жараён.

Инвертирланган такрорий изчилликлар – Бир молекула таркибидаги бир-бирига қарама –қарши томонларда жойлашган бир хил изчилликнинг иккита нусхаси. Бир-бирларига ёнма-ён жойлашган инвертирланган такрорий изчилликлар палиндром ҳосил қилади.

Ингибитор-тўхтатувчи-ферментлар, фаоллигини тўхтатувчи табиий ёки синтетик модда (сунъий олинган).

Индуктор-репрессор билан қўшилиб, уни оператор билан қўшилиш хусусиятини йўқотадиган, нофаол ҳолатга ўтказадиган паст молекулали модда.

Индукция-фермент синтези, фаглар ривожланиши ва мутацияга ўхшаган биологик жараёни ҳаракатга тушириш.

Инициация-молекуляр биологиядаги трансляция жараёнининг биринчи босқичи.

Инкубация-ўстириш-маълум шароитда, ҳароратда микробларни ушлаб туриш, ўстириш.

Инокулят-кўпайтириш усули-тирик организмлар, масалан, микроорганизмлар суспензияси озуқа муҳитга ўтказилгандан кейин янги авлод беради.

Интрон – геннинг транскрибцияланаётган “сукунат сакловчи” процессинг жараёнида РНК молекулалари ажралиб чиқаётган ва кодонлар мавжуд бўлмаган қисми.

Иссиқлик шоки оқсиллари (ИШО) - ҳароратнинг нормадан ошишига организм томонидан ҳосил бўладиган оқсиллар.

Клон – битта хужайра ёки молекуладан олинган хужайра ва молекулалар йиғиндиси.

Клонлаш – популяцияларнинг органлари билан генетик бир хил хужайралар олиш.

Клонли микроқўпайтириш – *in vitro* жинссиз усул ёрдамида бошланғич ўсимлик билан генетик бир хил ўсимликлар

Кодон – муайян аминокислоталар ёки комплементар терминацияловчи сигнални кодирловчи нуклеотидлар триплетти.

Компетенция – хужайра, тўқима, орган ва организмнинг индуцирловчи таъсирларни қабул қилиши ва унга ривожланишини ўзгартириш орқали специфик таъсирланиш.

Комплементар занжир – РНК ва унга ҳамкорлик учун мос келадиган нуклеотидларни синтезлан учун фойдаланиладиган ДНК занжирларидан бири.

Лигаза-ДНК занжиридаги узилган қисмни фосфодиэфирбоғ ҳосил қилиш ёрдамида бирлаштирувчи фермент.

Лигирлаш – ДНКнинг бир занжирдаги узилиш орқали ажралган асослар орасидаги фосфодиэфир боғларининг ҳосил бўлиши. Бу ибора тўмтоқ учларни бириктириш ҳолларида ва РНК боғлар ҳосил бўлишида ҳам қўлланилади.

Лизис-эриб кетиш, парчаланиш-ферментлар, кислоталар ва ишқорлар таъсирида хужайраларнинг парчаланиши; бактерия хужайрасида бактериофагларнинг қўпайиши натижасида унинг эриб кетиши.

Маркер (ДНК) –электрофорез гелида фрагментлар ўлчамини аниқлашда фойдаланиладиган маълум ўлчамдаги ДНК фрагменти.

Маркер ген – жойлашган жойи аниқланган ва аниқ фенотипик кўринишга эга ген.

Матрица. 1) маълум бир тана (шакл) бўлиб, унга қараб янги шаклнинг ҳосил бўлиши; 2) (молекулали биологияда) ДНК ва РНК ипларини комплементлар синтезланиши учун асос сифатида хизмат қиладиган ва нуклеин кислоталардаги азот асосларининг кетлиги.

Маҳсулдорлик жараёни – моддалар ҳосил бўлиши ва метаболизмнинг ўсимликда бир вақтда кечаётган физиологик, биокимёвий, биофизик ва бошқа жараёнларнинг йиғиндиси, донор-акцептор муносабатлар ва генетик назорат асосида ўсимликларнинг ҳўжалик аҳамияти қимматли органларининг шаклланиши, иккиламчи алмашинишни таъминланиши.

Мейоз – хромосомалар сонини редукциясига ва генлар рекомбинациясига олиб келувчи жинсий хужайраларнинг бўлиниш жараёни.

Меристема – фаол бўлинаётган дифференцияланмаган хужайралардан иборат тўқималар.

Метаболизм- оралиқ алмашиниш, яъни моддаларнинг хужайра ичига тушган вақтидан охириги маҳсулотлар ҳосил бўлгунга қадар айланиши; катаболизм ва анаболизм жараёни йиғиндиси; қоронғуликда кечадиган метаболизм-микроорганизмларнинг (қирмизи бактериялар *Rhodospirillum*) қоронғида аэроб ҳолда ўсиш хусусияти. Бу хусусият бактерияларда нафас олиш занжирининг керакли қисмлари борлигидан далолат беради.

Метаболитлар-метаболизм жараёнида ҳосил бўладиган моддалар.

Микориза-юқори ўсимликлар илдизи билан замбуруғ ипчаларининг бирга яшаши.

Микроорганизмлар уюшмаси-ҳар доим бирга учрайдиган ва бир-бири билан боғлиқ ҳолда яшайдиган микроорганизмлар бирлашмаси.

Микрофлора-ҳар хил турдаги микроорганизмларнинг маълум яшаш муҳитидаги тўплами; автохтон микрофлораси; сув микрофлораси; ҳаво микрофлораси; балчиқ микрофлораси; одатдаги микрофлора; организм микрофлораси; қўшимча микрофлора; тупроқ микрофлораси; ризосфера микрофлораси.

Митоз – эукариот соматик ҳужайраларнинг бўлиниш жараёни.

Мицеллий-замбуруғ тана-замбуруғ, жумладан шўъласимон замбуруғларнинг ўсадиган танаси бўлиб, бир ва кўп ҳужайрали ипчалар (гиф)дан иборат.

Модификация-микроорганизмларнинг фенотипик ўзгариши, яъни ҳужайранинг генетик аппаратларига алоқадор бўлмаган ўзгаришлар.

Морфогенез – орган (органогенез), тўқима(гистогенез) ва ҳужайраларнинг (цитогенез ёки ҳужайраларнинг дифференцияланиши) шаклланиш жараёни. Организмларнинг ривожланиши жараёнида тизимларнинг табақаланиши.

Мутагенез-мутагенез ўзгаришнинг (мутагенезнинг) рўй бериши-организмда ирсий ўзгаришлар-мутацияларнинг вужудга келиш жараёни. Бу жараён асосида ирсий ахборотни сақловчи ва наслга ўтказувчи нуклеин кислоталар молекуласининг ўзгариши ётади.

Мутагенлар – ДНК молекуласида мутацияларнинг пайдо бўлиш частоталарини оширувчи омил. Ирсиятни ўзгартирувчилар-мутациялар ҳосил қилувчи физикавий ва кимёвий омиллар;

Мутация – ген, хромосомадаги нуклеотид изчиллик, геномнинг бирорта белгининг ўзгаришига ва уларнинг авлодларда сақланишига олиб келувчи спонтан ва индуцирланган ўзгариши.

Нишон - **ҳужайра**– у ёки бу фитогармон рецепторини тутувчи ва фитогармоннинг концентрацияси ўзгарганда метаболизмни ўзгартирувчи ҳужайра.

Нозерн-блот-РНК бўлакчаларини геллардан элюция қилишда ишлатилади.

Нуклеин кислоталар – турли нуклеотидлар қолдиқларидан ташкил топган юқори молекуляр табиий бирикмалар (полимерлар). Ҳужайра мағзининг асосини ташкил қилади. Нуклеин кислоталарнинг икки тури: РНК, ДНК ҳужайраларнинг доимий компонентларидир.

Оперон – генетик регулятор структуранинг бирлиги, таркибида битта ёки бир нечта ўзаро бириккан структура, оперон ва регулятор қисмлар генларини тутди.

Органогенез – уюшмасдан ўсаётган каллус ҳужайраларида органлар (илдиз, бошланғич барглари ва ниҳоллар) ҳосил бўлиш жараёни.

Очиқ тизим – ташқи муҳит билан энергия ва моддалар билан алмашинадиган тизим.

Партеногенез – асоснинг фақат она ҳужайра генлари иштирокида ривожланиши.

Плазида – автоном репликацияланишга кодир, таркибида реципиентларнинг бегона генларини ва бошқа ДНК изчиллигини тутиш ва геномга киритиш хусусиятига эга, икки занжирли ҳалқасимон ДНК плазмид вектори асоси.

Полиадениллаш – полиаденил кислота изчиллигининг эукариот РНК 3-учига унинг синтези тугаганидан сўнг бирикиши.

Полиплоидия – организм гаплоид хромосомалар йиғиндисининг каррали ортиши билан боғлиқ бўлган ирсий ўзгарувчанлик.

Пролиферация – ҳужайра ва тўқималарнинг кўпайиш йўли билан ҳосил бўлиши.

Промотор– геннинг транскрипцияси бошланиши учун жавобгар қисми.

Пронуклеус – уруғланган тухум ҳужайра ядроси.

Протон помпаси – махсус оксиллар ёрдамида протонларнинг ҳужайра мембранаси орқали ўтиш жараёни.

Протопласт – механик йўл билан ёки ферментлар ёрдамида ҳужайралар қобиғидан маҳрум қилинган, мембрана ёрдамида шаклини ушлаб турувчи ўсимлик ҳужайраси.

Профаг – бактерия хромосомасига ўрнашган фаг геноми. Лизоген бактериялардан яширинган, юқмайдиган шаклдаги мўътадил бактериофаг.

Процессинг- етилиш жараёни бўлиб, унда бирламчи РНК- транскрипт модификацияси учрайди ва етилган РНКга айланади.

Регенерация-ҳужайралар тикланиши.

Рекомбинант ген – турли генлар компонентларидан таркиб топган ген.

Рекомбинант ДНК-турли манбалардан олинган ДНК қисмларидан иборат ДНК.

Рекомбинация-кроссинговер натижасида ота-оналар генларининг қайта гуруҳланиши(табақаланиши).

Репарация-ДНКнинг синтези вақтида ҳамда ҳар хил физик ва кимёвий омиллар таъсирида ДНК молекуласи узилиб қолган ёки шикастланган молекулаларни тузатишга бўлган ҳужайраларнинг махсус вазифаси.

Репрессия-ген экспрессиясини ва ёхуд ўшанга тааллуқли фермент синтезини тўхтатиш механизми.

Репрессор-маълум оперонда РНК синтезини тўхтатадиган бошқарувчи оксил.

Рестриктазалар - кесувчи ферментлар, рестрикция ферментлари, ДНКни маълум бир нуклеотидлар қаторида кесадиغان ферментлар. Ген муҳандислигида қўлланиладиган восита.

Ривожланиш детерминацияси – бошқа йўналишлардаги ривожланиш имкониятининг чеклаш билан бир вақтда борадиган организм, орган, тўқима ва ҳужайранинг муайян йўл билан ривожланишга тайёргарлик ҳолати. Детерминация даврида ривожланишнинг янги йўналиши учун ички зарурий шароитлар яратилади.

Ривожланишнинг ювенил фазаси – уруғ ёки вегетатив куртақдан вегетатив органларнинг репродуктив органлар ҳосил қилишга қобилятини намоён бўлишига қадар ўсиши ва ривожланиши.

Ризосфера-илдиз атрофидаги тупроқнинг микрофлораси-микроорганизмларнинг кўплиги билан фаркланадиган 2-3 мм қалинликдаги илдиз атрофида жойлашган тупроқ қатлами.

РНК – таркибига нуклеотидлар (аденин, гуанин, цитозин, урацил), рибоза ва фосфор кислотаси қолдиқлари кирувчи рибонуклеин кислота молекуласи.

РНК блоттинги - РНКни агарозали гелдан нитроцеллюлда филтрига комплементар ДНК билан дурагайлаш учун олиниши.

Сайт-ўрин, жойланиш-генлар харитасидаги нуқтали мутация ўрни.

Саузерн бўйича ДНК блоттинги-денатурланган ДНКни комплементар нуклеотид кетма-кетлик билан дурагайлаш учун агарозали гелдан нитроцеллюлда филтрига олиниши.

Сегмент-карж, бўлак.

Секвенирлаш-кетма-кетликни аниқлаш, секвенирлаш-оксилдаги аминокислота қолдиғини ва нуклеин кислоталардаги нуклеотидларнинг кетма-кетлигини аниқлаш.

Селекция-танлаш-хайвон, ўсимлик ва микроорганизмларнинг янги зотлари, навлари ва штаммларини яратиш усули.

Синергизм – моддалар, жараёнлар ва бошқа омилларнинг ҳамкорликдаги таъсирини оширувчи самара.

Скрининг-битта ҳужайрадан клон олиш йўли билан микроорганизмларнинг аралаш популяциясидан керагини ажратиш.

Сомаклонал вариабеллик – култураланган соматик ҳужайралардан регенерацияланган ўсимликлардаги хусусиятларнинг ўзгариб туриши.

Сомаклонлар – бошланғич шаклларида муайян фарқлар билан фарқланувчи соматик ҳужайралардан олинган регерант ўсимликлар.

Соматик дурагай – соматик ҳужайралар қўшилиши (дурагайланиши) орқали олинган регерант ўсимлик.

Соматик дурагайлаш – жинсий жараёндан ташқарида ядро ва органеллалар генлари ва хромасомаларни генетик рекомбинацияга чақириш жараёни.

Соматик эмбриогенез – ҳужайра ва тўқималар културасида муртаксимон структуралар (эмбрионидлар) ҳосил бўлиш жараёни.

Стимуляторлар -ўсимликларнинг ўсишини кучайтирувчи омил-ўсимликларнинг ўсишини, ҳужайраларнинг бўлинишини тезлаштирадиган, кучайтирувчи моддалар.Улар табиий ёки синтетик ҳолда бўлиши мумкин. Табиийлари ауксинлар, гибберелинлар ва цитокининлар.

Стресс оксиллар – ноқулай шароитларда организм томонидан синтезланувчи ва стресс омилларнинг организмга зарали таъсирини камайтириш имконини берувчи махсус оксиллар.

Суббирлик – оксил молекулаларини ташкил этувчи (тўртламчи структураси) оксил глобулалари.

Субкултуралаш – трансплантларни (инокулумларни) бошқа културал идишга янги озиқа муҳитига ўтказиш.

Субстрат-озуқа муҳит-микроорганизмларнинг ўсиши учун керак бўлган озуқа муҳити.

Термодинамик тизим – энергияни ютиш, қайта ҳосил қилиш, тўплаш ва фойдаланиш хусусиятига эга ўзаро боғлиқ элементлар комплекси.

Тотипотентлик – муайян ўстириш шароитида ўсимликлар соматик ҳужайраларининг ўзининг онтогоник ривожланиши ирсий дастурини тўлиқ амалга ошириш.

Трансгенот – турли векторлар ёрдамида донор, бегонга генларни реципиент ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар ҳужайрасига киритиш жараёни. Трансдукцияга мойил фаглар ёрдамида генетик ахборотни бактерия ҳужайрасидан эукариотлар ҳужайрасига сунъий йўл билан ўтказиш.

Трансдукция-бактериофаглар ёрдамида генетик материални донор ҳужайрадан реципиент ҳужайрага олиб ўтиш.

Транскрипция – РНК полимераза ферменти ёрдамида ДНК матричасида РНК-нуклеиннинг ҳосил бўлиши.

Трансляция – ахборот, транспорт РНКси ва бошқа омиллар иштирокида рибосомаларда оксиллар синтези.

Трансплант (инокулюм) – каллус (супензияли) културасининг бошқа янги озиқ муҳитига кўчириб ўтказишда фойдаланиладиган қисми.

Транспозонлар-ДНКнинг бир бўлаги бўлиб, молекула ичида бир жойдан иккинчи жойга ва бир молекуладан иккинчисига ўтишга қодир.

Трансформация-алоҳида ажратилган ДНК ёрдамида ҳужайрага генетик ахборотни киритиш. Трансформация ёрдамида олинган ҳужайрада ва ундан кейинги авлодларда янги белгилар ДНК ёрдамида олинган манбадагига ўхшаган бўлади.

Урацил-РНК таркибига кирадиган пиримидин асоси.

Ўсимликларни гормон тизими – фитогормонлар, уларнинг рецепторлари ваиккиламчи воситачиларидан иборат регулятор комплекс.

Фаглар-микроорганизмлар ичига кириб, унда кўпайиб, кейин уларни эритиб юборувчи вируслар.

Фаоллаштириш-1) фаолликни кўзғатиш ва кучайтириш; **2)** молекулалар фаоллигини кўзғатиб кимёвий реакцияга киришни тезлатиш.

Фенотип-организмларнинг ривожланиши жараёнида юзага келган ҳамма белги ва хусусиятлар йиғиндиси.

Ферментер-айрим хомашёларни микроорганизмлар ёрдамида бижғитиш учун ишлатиладиган ҳамма томони берк асбоб.

Ферментлар-биологик тезлаткичлар, энзимлар-оксилнинг ўзига хос тури; тирик ҳужайраларда ҳам тезлаткич ролини бажаради.

Фитоалексинлар – ўсимликларнинг касалликларга қарши чидамлик тизимининг патогенлар ривожланишини пасайтирувчи генотипик ва реал компонентлари.

Фитогормонлар биосинтези йўлларининг ажралиши – ташқи шароит комплекси билан аниқланган бир неча фитогормонлар учун асос бўлган ораликдан у ёки бу фитогормоннинг бир неча фитогормонларнинг ферментатив биосинтези йўли.

Фиторегуляторлар – ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишига таъсир этувчи, ўғитлар ва гербицидлар таъсирига эга бўлмаган табиий ва сунъий препаратлар.

Фосфобактерин-фосфор органик бирикмаларни парчалаш хусусиятига эга бўлган бактериялардан ташкил топган бактерияли ўғит.

Фотосинтез-ёруғлик энергияси иштирокида ўсимликлар, сувўтлари ва айрим бактериялар ҳужайраларида CO_2 дан органик моддалар ҳосил бўлиш жараёни.

Фрагментлар-парчалар, қисмлар.

Хемосинтез-айрим микроорганизмларга хос бўлган озиқланиш тури. Улар айрим аорганик моддалар (масалан, водород сульфат)ни оксидланиш натижасида ҳосил бўлиб, энергия ҳисобига аорганик моддалардан (масалан, кўмир кислотаси ва сув) органик моддалар ҳосил бўлади.

Хромосомалар – ДНК ва оксиллардан иборат ҳужайра ядросини генетик структура ҳосиласи. Хромосомаларда организмнинг ирсий ахбороти берилган.

Ҳужайралар селекцияси – селектив шароитлар ёрдамида генетик модификацияланган мутант ҳужайралар ва сомоклонал вариантлар ажратиш усули.

Центрифуга-ажраткич, чўктиргич-марказдан қочиш кучига асосланган турли хил аралашмаларни қисмларга ажратувчи асбоб; аналитик (лаборатория) ажраткич; тебранувчи ажраткич; горизонтал ажраткич; буғлантирувчи ажраткич; чўктирувчи ажраткич; тиндирувчи ажраткич; препаратив ажраткич; ўз-ўзини бўшатадиган ажраткич; сузиш йўли билан ишлайдиган ажраткич; кўп бўлимли ажраткич; ўта тез айланадиган ажраткич; табақалаштирувчи, тафовутли ажраткич.

Цитозин-ДНК ва РНК таркибида бўлган пиримидин асоси.

Эксплант – озиқа муҳитида инкубация қилинаётган тўқима ёки орган, ёки каллус тўқимаси олиш учун фойдаланиладиган фрагментлар.

Электропорация – ҳужайра мембранасида қўшимча тешикларни ҳосил қилишга ёрдам берувчи электр токи ёрдамида ҳужайрага генларни киритиш усули.

Электрофорез-электр майдони ёрдамида аралашмаларнинг бир жойдан иккинчи жойга ўтиши, бўлакларга ажратиш.

Эндонуклеазалар-фосфодиэфир боғларининг ўзига хос бўлмаган парчаланиши орқали нуклеин кислоталарини парчаловчи ферментлар. ДНКни пурин ёки пиримидин қисмларидан кесувчи ферментлар.

In vitro – тирик материални пробиркада сунъий озиқа муҳитларда стерил шароитда ўстириш.

In vivo – тирик материални табиий шароитда ўстириш.

МУНДАРИЖА

КИРИШ.....	6
1-боб. Ген муҳандислиги асослари.....	13
Молекуляр генетика ва молекуляр биология ген муҳандислигининг асосий пойдевори.....	13
Ген муҳандислиги ферментлари.....	14
ДНК бўлакларини қирқиш ва рестрикция хариталарни тузиш (физикавий хариталаш).....	18
2-боб. Ўсимликларнинг генетик муҳандислиги	41
Агробактериялар асосида ўсимликлар трансформацияси.....	43
Ўсимлик хужайралари трансформацияси усуллари.....	56
Ўсимлик геномига бегона генларнинг экспрессияси.....	61
Биотехнологияда ген муҳандислиги усуллари ёрдамида ўсимликларнинг сифат кўрсаткичларини яхшилаш ва ҳосилдорлигини ошириш.....	63
Стресс таъсирларга бардошли трансген ўсимликлар олиш.....	68
Зараркунанда ҳашаротларга бардошли трансген ўсимликлар яратиш.....	69
Замбуруғ, бактерия ва вирусли инфекцияларга чидамли трансген ўсимликлар олиш.....	70
Гербицидларга чидамли трансген ўсимликлар олиш.....	72
Ўсимликлар ген муҳандислигининг ҳал этилмаган муаммолари.....	74
3-боб. Ўсимликшунослик ва селекцияда хужайра ҳамда тўқималар биотехнологияси.....	76
Хужайра ва тўқималар култураси.....	76
Ўсимлик хужайра ва тўқималарини in vitro културлаш техникаси.....	79
Каллус тўқималари култураси.....	83
Гормонга боғлиқ бўлмаган ўсимлик тўқималари.....	89
Хужайралар суспензияси култураси.....	93
Якка хужайралар култураси.....	94
Каллусли тўқималарда морфогенез.....	96
Иккиламчи синтез моддаларни олишда каллус хужайралари култураси.....	103
Ўсимликларни клонли микроўпайтириш.....	106
Ўсимликлар селекциясида алоҳида ажратилган хужайра ва тўқималар култураси.....	133
4-боб. Биотехнология ва ўсимликшуносликда фитогормонлар ҳамда ўсимликларни ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи сунъий регуляторлар.	162
Ўсимликларнинг гормон тизими.....	162
Фитогормонлар классификацияси, структураси ва функцияси.....	168
Ўсимликларнинг ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи сунъий регуляторлар.....	178
Биотехнологияда ўсимликларни ўсишини ва ривожланишининг бошқарувчи фитогормон ва сунъий регуляторлар.....	182
Гормон статуси ўзгартирилган трансген ўсимликлар олиш.....	186
Фитогормон ва фиторегуляторларни олишнинг биотехнологик усуллари.....	188

Ўсимликшуносликда фитогормон ва ўсишни бошқарувчи регуляторлар.....	188
Ўсимликшунослик ва биотехнологияда фиторегуляцияни ўрганиш ва қўллашнинг ривожланиш истикболлари.....	200
5-боб. Тупроқ унумдорлигини оширишда биотехнология.....	202
Симбиотик азотни ўзлаштирилишида биотехнологиянинг генетик асослари.....	202
Азотни ўзлаштирувчи тизимларнинг хилма-хиллиги ва ўзига хослиги.....	203
Ўсимликларнинг цианобактериялар билан симбиоз муносабати.....	228
Азотни ўзлаштирувчи симбиотик биотизимлар генетик асослари ва эволюцияси концепцияси.....	231
6-боб. Ўсимликларни химоя қилишда биотехнология.....	237
Ўсимлик касалликларига қарши курашда биотехнологик усуллардан фойдаланиш истикболлари.....	238
Қишлоқ хўжалик экинлари зараркунанда ҳашаротларига қарши кураш усуллари. Бактериал препаратлар.....	245
Вирусли энтомопатоген препаратлар.....	248
Замбуруғлар асосида олинадиган энтомопатоген препаратлар.....	249
Ўсимлик зараркунада ҳашаротларига қарши курашда биологик фаол моддалардан фойдаланиш.....	250
Бегона ўтларга қарши кураш усуллари.....	254
7- боб. Аграр ишлаб чиқаришда биотехнология ва биомухандислик ютуқларидан фойдаланиш.....	258
Селекция ва ўсимликшунослик.....	258
Чорвачилик.....	264
Ветеринар тиббиёт.....	266
Қишлоқ хўжалик микробиологияси.....	267
Қишлоқ хўжалик маҳсулотларини сақлаш ва қайта ишлаш.....	267
Биоконверсия ва биоэнергетика.....	268

Босишга рухсат берилди 10.04.09. Бичими (60x84) 1/16. Шартли босма тобо`и 17,75.
Нашриёт босма тобо`и 17,75. Адади 100 нусха. Бащоси келишилган нархда.

Ўзбекистон Республикаси Давлат матбуот ымитасининг 21-0941 сонли гувощномаси асосида ТошДАУ нашр тащририяти былимининг **РИЗОГРАФ** аппаратада чоп этилди.