

Ўзбекистон Республикаси қишлоқ ва сув хўжалиги вазирлиги



ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИГИ БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

ИШЧИ ДАФТАР

Тошкент – 2002

Қисқача луғат ва қисқартмалар

2,4-Д – 2,4 дихлор феноксисирка кислотаси

ИСК – индолил сирка кислотаси

НСК – альфа – нафтил сирка кислотаси

ГК – Гибберал кислотаси

Некроз – ҳаётнинг тўхтаганлиги

Стерил – микробиология нуқтаи назаридан тоза ҳолга келтириш

Плазида – хромосомадан ташқаридаги ДНК

ДНК – Дезоксирибонуклеин кислота

РНК – Рибонуклеин кислота

Хлоропласт – қобиғсизланган ўсимлик хўжайраси

Протопласт – қобиғсизланган микроб хўжайраси

Эндонуклеаза – нуклеин кислоталарни парчаловчи фермент

ЭДТА – этилен-диамин-тетрасирка кислота

мкл – микролитр

инактивация – фаоллиги йўқолатилади

1 – иш: Ўсимлик ҳужайрасидан ДНК ажратиш.

Рекомбинат ДНК лар технологиясига асосланган ген муҳандислиги тажрибаларида ажратилган ДНК геном клонларининг банкини яратишда, фойдали генларни аниқлашда, геном банкидаги клонлардан шу генларни топиш учун зондларга эга бўлиш учун зарурдир.

Ген муҳандислигида генларни ажратиб олиш, уларнинг структурасини, экспрессиясини ўрганишда ДНК ни тоза ҳолда ажратиб олиш муҳим аҳамиятга эга

Ўсимлик ДНК сини ажратиш қуйидаги босқичларни ўз ичига олади.

1. Ҳужайра тўқималарини майдалаш, ҳужайра деворини парчалаш (гомогенизация), одатда суюқ азот ёки курук муз ёрдамида амалга оширилади.
2. Ҳужайра мембраналари парчалаиб (ҳужайра лизиси) ДНК нинг экстракция буферига чиқиши учун додецилсульфат натрий (SDS), цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ), саркозил (N- лаурилсаркозинат натрий) каби детергентлардан фойдаланилади. ДНК ни гидролизовчи ферментлар нуклеазалардан ҳимоя қилиш учун ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) қўлланилади.
3. ДНК ни оксиллардан тозалаш (депротеинизация) хлороформ ва фенол ёрдамида экстракция қилиш орқали амалга оширилади. ДНК ни чўктиришда этанолдан фойдаланилади.

Материал ва асбоб ускуналар. 4 г 14 кунлик ғўза барглари, ҳавонча, центрифуга, центрифуга стаканлари, 2 та колба, 2 та стакан, шиша таёкча, рефрактометр, диализ қоғози, магнитли аралаштиргич, спектрофотометр ва музлатгич.

Ишнинг бориши.

1. 4 г барг ҳавончада суюқ азот ёрдамида кукун ҳолига келгунча майдаланади
2. Кукунни 50 мл буфер В билан бирга колбага солинади ва 20 дақиқа давомида аралаштириб турилади.
3. 30 мл фенол қўшилади ва яна аралаштирилади (30 дақ.).
4. К-23 центрифугасида 10^0 С да 5000 айл/дақ. тезликда 1 соат айлантдирилади.
5. Устки қисми тоза колбага олиниб тенг миқдорда фенол-хлороформ аралашмаси солиниб, 10 дақиқа аралаштирилади.
6. 30 дақиқа 10^0 С да 5000 айл/дақ. тезликда центрифугаланади.
7. Устки қисмини олиб тенг миқдорда хлороформ қўшиб, 10 дақиқа аралаштирилади ва яна центрифугалаш йўли билан фазаларга бўлинади.
8. Суюқ қисми 2 миқдор этил спирти солинган стаканга аста секинлик билан аралаштирилиб музлатгичга қўйилади. “Медуза” ҳосил бўлгандан сўнг таёкчага ўраб олиниб 10 мл ДНК эритувчи (ТЕ) буферига стаканда эритилади.
9. ДНК эритмасига этидий бромид 0,2 мг/мл ва 1,55 г/мл цезий хлор солинади (синиш кўрсаткичи 1,3860).

10. Суюклик центрифуга пробиркаларига солинади ва тенглаштириб оғзи маҳкамлангандан сўнг 20 соат 50000 айл/дақ. тезликда (15° С) центрифугаланади.

11. УФ нурлари остида ДНК шприц ёрдамида тортиб олинади.

12. ДНК ни этидий бромидидан изоамил спиртида 5 марта экстракция қилиб тозаланади.

13. ДНК ни цезий хлордан ТЕ буферида 4° С да 24 соат магнитли аралаштиргичда буферни бир неча марта алмаштириб диализ қилиш йўли билан тозаланади.

14. ДНК миқдорини спектрофотометрда 260 нм тўлқин узунлигида кварцли кюветада ўлчанади.

В буфери:

0,2 М NaCl

0,05 М HCl pH 8,0

0,01 М ЭДТА

0,01 М ДДТ

0,2% SDS

Фенол, 0,1 М NaCl; 0,1 М трис HCl; pH 8,0; 0,01 М ЭДТА билан тўйинтирилган.

Хлороформ : изоамил спирти (24:1)

ТЕ буфери 10 mM трис HCl, pH 8,0.

1 mM ЭДТА

4,5 цезий хлориднинг ТЕ буферда эритмаси

Этидий бромид эритмаси 10 мг/мл

Диализ учун буфер: 10 mM трис pH 8,0; 1 mM ЭДТА.

2 – иш: Агарозали гелда ДНК электрофорези.

Материал ва асбоб ускуналар. Электрофорез аппарати, гелда чуқурча ҳосил қилувчи тарокча, доимий ток манбаи, 120 мл 0,8% ли агароза, 0,5 л электрофорез буфери, антконвекцион эритма (намуна миқдоридан 1/4 - 1/5 мг/мл) 300 мл этидий бромидли бўёвчи модда (0,5 мг/мл), резина қўлқоп, химескоп, фотоаппарат, сариқ ёки сабзи рангли фильтр, объектив учун узунлаштирувчи халқа, плёнка, фото бочка, стандарт проявител ва стандарт мустаҳкамловчи.

Тушунтириш. ДНК агарозали гел электрофорезида молекулаларининг ўлчамига ва конформацион ҳолатига қараб бўлинади. ДНК молекулаларининг гелдаги юриш тезлиги унинг ўлчами логарифмига тескари пропорционалдир, демак уларнинг молекуляр оғирлигига ҳам берилган катталиқдаги ДНК молекулаларининг гелда юриш тезлиги -гелдаги агароза миқдorigа ҳам боғлиқ. Молекулаларнинг самарали бўлиниши учун

агароза миқдорини тўғри танлаш лозим. Буни 1 жадвал бўйича амалга ошириш мумкин.

Турли ўлчамдаги ДНК молекулаларининг (тўғри шаклли, ковалент-туташган халқали) самарали бўлиниши учун ишлатиладиган гелдаги агарозанинг (%) миқдори.

1-жадвал

Агарозанинг миқдори (%)	ДНК молекулаларининг ўлчами м.ж.н. да
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Бир хил катталиқдаги лекин турли конформацион ҳолатдаги ДНК молекулалари (буралган ёпиқ халқали, очик халқали ва линияли шакллари) агароза гелида турли тезликда юради. Уларнинг қиёси электрофоретик ҳаракати маълум даражада электрофорез қўйиш шароитларига буфернинг ион кучига, ток кучига ва агарозанинг миқдорига боғлиқ. Махсус услуллар ёрдамида ДНК молекулаларининг конформацион ҳолати билан уларнинг гелдаги жойлашган жойи орасидаги мосликни аниқлаш мумкин. Ушбу амалиётда ишлатиладиган электрофорезнинг стандарт шароитида ДНК нинг кичик молекуляр оғирлиқдаги ($30 \cdot 10^6$ дальтонгача бўлган) буралган халқасимон шакли катта бўлмаган тезликда хромосома ДНК сидан олдинда юради, катта молекуляр оғирлиқга ($30 \cdot 10^6$ дальтондан юқори бўлган) эга бўлган молекулалари эса камроқ тезликда юради ва гелда хромосома ДНК сидан юқорида жойлашади.

Ишнинг бориши. Электрофорез аппаратини йиғиш.

Агарозали гел электрофорез горизонтал ва вертикал қурилмалар ёрдамида олиб бориш мумкин. Аниқ натижалар олиш учун горизонтал қурилмалар оддий тузилишга эга бўлиб ва ишлаш учун жуда қулайдир. Қурилма органик шишадан ясалган тўртбурчак идиш (кювета) бўлиб, икки четида доимий ток манбаига уландиган платинали электродлар жойлашган бўлади. Кювета тагига аппаратга қўйиладиган буфернинг ҳажмини қўпайтириш учун ва гел билан ишлашга қулайлиги учун органик шиша пластинка-таглик қўйилади.

Агарозали гел тайёрлаш. Керакли микдорда агароза тортиб олинади ва керакли микдорда буфер эритма солинади ва агар эригунча (сув ҳаммомида) қайнатилади. Агароза батамом эриб кетганидан сўнг 50-55° С гача совитилади, тезда пластинка тагликка қўйилади ва чуқурчалар ҳосил қилиш учун тароқча (гребенка) қўйилади. Тароқчани шундай қўйиш керакки тароқ тишлари гел қўйилган билан пластинка тагига 0,5-1 мм оралиқ қолсин. Гел қотганидан сўнг (30-40 дақ. хона ҳароратида) тароқча гелдан секин олинади ва электрофорез аппаратида жойлаб электрофорез буфери гелдан 2-3 мм юқоригача тўлдирилади.

ДНК намуналарини гелга солиш. ДНК намуналари антиконвекцион эритма билан аралаштирилади, автомат пипеткалар (20-200 мкл) ёрдамида гелга эҳтиёткорлик билан солинади. Антиконвекцион эритма таркибида бўёвчи модда (бромидфенолкўк-0,0025%) тутиб, унинг юришига қараб электрофорез жараёнининг боришини кузатиш мумкин. Бундан ташқари яна сахароза (40%) бўлиб у ДНК намунасининг электрофорез буфери билан аралашиб кетмаслигини таъминлайди. Одатда намуна микдорининг 1/4 - 1/5 микдорича антиконвекцион эритма солинади.

Намуна солингандан сўнг аппаратнинг қопқоғи ёпилади, доимий ток манбаи ёқилади ва керакли кучланиш қўйилади (ДНК гелга киргунча 20 В сўнгра 100-120 В).

Электрофорез одатда кўк бўёқ гел охирига (1-2 см қолгунича) етгунича олиб борилади. 0,5-0,7 % ли агарозали гел электрофорезида кучланиш 100-120 В бўлганда 2 соат давом этади.

Гелни бўяш. Электрофорез тамом бўлганидан сўнг қурилма ток тармоғидан узилади, гелли идишча фотография кюветасига олинади ва бромид этидий (0,5 мкг/мл дистилланган сувда) солинади ва 40-60 дақиқа давомида бўялади. Сўнг бўёғи тўкилади (албатта резина кўлқоп билан ишлаш керак), гел дистилланган сувда чайилади ва (шиша кўзойнак билан) трансиллюминаторда кўрилади.

Гелни расмга олиш. Зарур бўлган ҳолларда гел расмга олинади. Бунинг учун очик диафрагмада сариқ ёки сабзи рангли филтрларида расмга олинади. Экспозиция эмпирик танланади (одатда 5-10 дақ.). Гел аксланувчи ёки ўтувчи ультрабинафша нурларида (254 нм) ультрабинафша нури манбаи тизимида боғлиқ равишда ёритилади.

Адабиёт

1. В.М.Глазер, В.В.Зинченко, С.В.Каменева, С.В.Шестаков. Большой практикум по генетике микроорганизмов. Москва Университети нашриёти. 1985 йил.

3 – иш: Бактерия ҳужайраларидан плазмид ДНК ни ажратиш.

Бактерияларда ҳужайра хромосома ДНК сидан ташқари халқасимон тузилишга эга бўлган ДНК молекулалари бўлиб улар плазмидлар дейилади. Плазмидлар таркибида захарли моддаларга, антибиотикларга чидамлилики гени мавжуд. Улар мустақил равишда репликациялана олади. Шу хусусияти туфайли плазмидлардан ген муҳандислигида вектор сифатида фойдаланиш мумкин. Плазмидларни ажратиш асосан 3 та босқичдан иборат.

1. Бактерия ҳужайраларини парчалаш (лизис қилиш)
2. Плазмид ДНК сини хромосома ДНК сидан ажратиш
3. Плазмид ДНК сини ҳужайра РНК сидан ва оқсиллардан тозалаш

Материал ва асбоб ускуналар. *Escherichia coli* бактерияси клони, ЛВ озиқа муҳити, I-эритма (50 mM сахароза, 25 mM трис-HCl, 10 mM ЭДТА, pH 8,0), II-эритма (0,2 NaOH, 1% SDS), 5 M калий ацетат pH 4,8 (60 мл 5 M калий калий ацетат тайёрлаш учун 11,5 мл сирка кислотаси, 28,5 мл дистилланган сув), 1 мл 96% ли этил спирти, ТЕ-буфер музлатгич, стол центрифугаси, 4 та эппендорф пробиркалари, стерилл шиша таёқча, парафильм, фильтр қоғози ва 1 мл ли автомат пипетка.

Ишнинг бориши.

1. Танланган колонияни микробиологик сиртмоқ ёрдамида 3 мл ЛВ озиқа муҳити ва антибиотикли пробиркага солинади ва кеча давомида 37° C температурада ўстирилади (бу тунги культура дейилади).
2. 1,5 мл тунги культуранинг эппендорф пробиркасига солинади ва стол центрифугасида 15 дақиқа 5000 айл/дақ. айлантирилади.
3. Чўкмага 100 мкл (микролитр) I-эритма солинади ва аралаштирилади.
4. Тезда 200 мкл II-эритма солинади ва 5 дақиқа яхшилаб аралаштирилгандан сўнг муз хаммомида 15 дақиқа сақланади. Бунда суспензиянинг ранги оқариб шилимшиқ ҳолига келиши керак.
5. Устига совитилган 150 мкл 3 M натрий ацетат (pH 4,8-5,0) солинади ва яхшилаб аралаштирилади, бунда оқ чўкма туша бошлайди (оқсил ва хромосома ДНК си). 5 дақиқа 5000 айл/дақ. центрифугаланади.
6. Чўкма стерил шиша таёқча ёрдамида олиб ташланади ва суюқ қисмига 1 мл 96% ли этил спирти солинади ва плазмид ДНК си чўкмага яхши тушиши учун совутгичга қўйилади.
7. 2 соатдан сўнг 3 мин. давомида 3000 айл/дақ. центрифугаланади. Чўкма хона ҳароратида қуритилиб 150 мкл ТЕ буферида эритилади ва плазмид ДНК си электрофорез ёрдамида текширилади.

4 – иш. Ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини ўстириш учун озиқа муҳитини тайёрлаш ва стериллаш усуллари

Керакли асбоб-ускуналар. 1 литрли кимёвий стаканлар (4 та), бошланғич эритмаларни сақлаш учун оғзи зич ёпиладиган шиша идишлар (1 литрли 3 дона, 100 мл ли 1 дона), пенициллин идишлари (10 дона), 1 – 10 мл ли пипеткалар, техник ва аналитик тарозилар, электроиситгич, турли хил кимёвий моддалар (3 – 4 жадвалларга қаралсин).

Тушунтириш. Ўсимликдан ажратилган ҳужайра ва тўқималар ўстириладиган озиқа муҳитда ўсимликларга керакли ҳамма макроэлементлар: азот, фосфор, калий, калций, олтингугурт, магний, темир ва микроэлементлар: бор, рух, мис, кобальт, марганец, йод, молибден, шунингдек витаминлар, углеводлар, карбон сувлар, фитогормонлар бўлиши керак. Баъзи бир озиқа муҳитлари таркибида эса казеин гидролизати ва айрим аминокислоталар бўлиши керак. Бундан ташқари, озиқа муҳити таркибига, ҳужайраларнинг темирга бўлган эҳтиёжини турли рН кўрсаткичларда қондириш учун ЭДТА (этилен-диамин-тетрасирка кислотаси) ёки унинг натрийли тузи киритилиши керак. Ажратилган ҳужайра ва тўқималар ўстириладиган озиқа муҳитининг асосий таркибий қисмини углеводлар ташкил қилади, углевод манбаи сифатида сахароза ёки глюкозанинг 20-40 г/л миқдори қўлланилади. Углеводли озиқа манбаи сифатида полисахаридлар ишлатилмайди, чунки баъзи тўқималар, асосан ўсмалар фаол гидролитик ферментларга (амилаза ва бошқалар) эга бўлиб, крахмал эритмаси бор озиқа муҳитларида ўсиши мумкин. Ўсиш регуляторлари ҳужайралар дедефференцировкаси ва ҳужайра тўқималари индукцияси учун зарурдир. Шунинг учун каллусли тўқималар олишда озиқа муҳитлари таркибига ауксин (ҳужайра дедифференцировкасини юзага келтирувчилар) ва цитокинин (дедифференцияланган ҳужайраларнинг бўлинишини индукцияловчи) киритиш керак. Ауксин манбаи сифатида озиқа муҳитларда 2,4 дихлор феноксисирка кислотаси (2,4-Д) 1-10 мг/мл; индолил сирка кислотаси (ИСК) 1-30 мг/л; α- нафтил сирка кислотаси (НСК) – 0,1-2 мг/л кабилар ишлатилади. Сунъий озиқа муҳитларида цитокинин манбаи сифатида кинетин, 6-бензиламинопури (6-БАП) ва зеатин (0,001-10 мг/л) қўлланилади. Қаттиқ озиқа муҳитни тайёрлашда 5-7% агардан фойдаланилади. Макро-, микротузлар ва витаминларнинг эритмалари юқори миқдордаги бошланғич эритма ҳолда тайёрланиб, уларни кўп марта суюлтириб ишлатиш мумкин. Ҳар хил турларга мансуб ўсимликлар ҳужайралари, тўқималари ва органларини ўстиришда турли таркибдаги озиқа муҳитларидан фойдаланилади. Кўпинча Мурасиге-Скуга, Уайт, Гамборга (В-

5) озиқа муҳитлари ишлатилади. Мурасиге-Скуга озиқа муҳитларидан турлича модификациялар билан апикал меристемалар ўстиришда ва ўсимликларни микроўпайтиришда фойдаланиш мумкин.

Ишнинг бориши. Картошка ва кулупнайнинг апикал меристемаларини ўстириш учун мослаштирилган (модификацияланган) Мурасиге-Скуга озиқа муҳитларини тайёрлаш. Озиқа муҳитлари таркиби 2-3 жадвалларга берилган. Аввало макро-, микротузлар ва витаминларнинг бошланғич эритмаларини тайёрлаш керак. Одатда, Мурасиге ва Скуга озиқа муҳитлари куйидаги бирикмалардан тайёрланади.

1. NH_4NO_3 , KNO_3 , KN_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MgSO_4 ни чўкмага тушишини олдини олиш учун, қиздирмасдан охирида солинади);
2. CaCl_2 эритмаси;
3. Темир хелати эритмаси (FeSO_4 ва $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ эритмаси биргаликда қайнагунга қадар қиздирилганда темир хелати ҳосил бўлади);
4. Микро элементлар эритмаси.

Бошланғич эритмалар учун керакли тузлар миқдори ва бошланғич эритмаларнинг озиқа муҳит учун керакли миқдорлари 2-жадвалда келтирилган.

Мурасиге-Скуга бўйича бошланғич эритмалар тайёрлаш

2-жадвал

Озиқа муҳитнинг таркибий қисми			Қўшимчалар
Макротузлар	бошланғич	г/л	1 литр озиқа муҳит учун 50 мл бошланғич эритма олинади
эритма учун			
NH_4NO_3		33	
KNO_3		33	
CaCl_2 (сувсиз)		8,8	
ёки $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		13,8	
KN_2PO_4		3,6	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ёки сувсиз	7,4	
Микротузлар,	100 мл	мг/л	1 литр озиқа муҳит учун 1 мл бошланғич эритма олинади
бошланғич эритма учун			
H_3BO_3		620	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		2230	
ZnSO_4		860	
KI		83	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		25	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		25	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		25	
100 мл бошланғич эритма учун		мг	1 литр озиқа муҳит учун 5 мл бошланғич эритма олинади
Fe-хелат		557	
ЭДТА		745	

Картошка апикал меристемасини ўстириш учун модификацияланган
Мурасиге ва Скуга (МС) озиқа муҳити

3-жадвал

Озиқа муҳитнинг таркибий қисмилари, мг/л			
Минерал элементлар	МС	Никотин кислотаси	2
Сахароза	20000	Фолин кислотаси	0,5
Глюкоза	20000	Кинетин	0,5
Казин гидролизати	1000	Са пантотенат	10
Мезо-инозит	1	Рибофлавин	0,5
Тиамин	1	Биотин	1
Придоксин	1	Активланган кўмир	10000
Аденин	40	Агар-аргар	7000
Витамин В-12	0,015	рН 5,7 – 5,8 МС-Мурасиге-	
ГК		Скугада берилиши бўйича	

Тайёрланган эритмаларни оғзи зич ёпиладиган идишларга солиб, қоғоз ёрлик ёпиштириб, музлатгичда сақлаш лозим. Темир хелати тўқ рангли шиша идишда сақланади. Витаминларнинг ўта тўйинган эритмалари аолҳида-алоҳида тайёрланади ва пенциллин идишларида сақланади. Эритмалар тайёрлаш учун витаминлар ўн марталик оғирликда ўлчаниб 10 мл сувда эритилади. Шу эритманинг 1 мл миқдори 1 литр Мурасиге-Скуга эритмасини тайёрлаш учун етарлидир. Энди бошланғич эритмалардан фойдаланган ҳолда кейинги дарсларда картошка ва кулупнай апикал меристемаларини ўстириш учун озиқа муҳитлари тайёрлаш керак. Ўлчами 1 литрли кимёвий стаканга сахароза солиб идишнинг ярмигача дистилланган сув қуйиб иситилади, сахароза эригандан сўнг, хона ҳароратигача совитилади ва унга макро-, микротузларнинг бошланғич эритмалари ва витаминлар керакли миқдорда солинади (2 жадвал). Картошка апикал меристемасини ўстириш учун озиқа муҳитга активланган кўмир (3-жадвал) ва регуляторлар: ГК, кинетин ва аденин солинади. Гибберал кислотаси бир неча томчи спиртга эритилиб, озгина сув қўшилади ва озиқа муҳитга солинади. Цитокининлар сувда яхши эримайди, балки ишқор, кислота, этил спирти ва этил эфири эритмаларида яхши эрийди. Цитокинин эритмалари тайёрлаш учун гормонларга озгина (3-5 мл) дистилланган сув, 0,5-1 мл 0,1 Н КОН қўшиб аралаштирилади ва эригунча иситилиб, сўнгга озиқа муҳитга солинади. Сўнг албатта эритманинг рН и ўлчанади, рН кўрсаткичи 5,5-5,6 атрофида бўлиши керак. Эритма рН нормага тўғри келмаган ҳолларда озиқа муҳитга 0,1 М НСl эритмасидан қўшилади. Бир вақтнинг ўзида бошқа стаканга агар-агар эритилади. Бунинг учун сувда ивитилган агар (7 г) электроиситгичда тўлиқ эригунга қадар қиздирилади ва ҳарорат 50⁰ С га тушгунча сақлаб турилади.

Сўнг агарни тузлар, витаминлар ва сахароза билан бирга идишга солиб, эритманинг ҳажмини сув билан 1 литрга етказиш керак. Озиқа муҳитини пробиркаларга солиб (тахминан 1/3 ҳажмда), пробиркалар оғзи пахта тиқинлар билан ёпилади. Озиқа муҳитлари автоклавда стерилланиши керак.

**Ажратилган ўсимлик ҳужайралари ва тўқималари тўпламлари
билан ишлаш жараёнида стериллаш усуллари.**

Ажратилган, тўқималар, ҳужайра ва протопластларни ўстиришда стерилликка катта аҳамият бериш керак. Стерилликни аҳамияти шундан иборатки, ажратилган органлар, тўқималар, ҳужайра ва протопластларни ўстириш учун тайёрланган сунъий озиқа муҳитларида микроорганизмлар ҳам жуда яхши ўсади. Микроорганизмларнинг ривожланиши ўстирилаётган ҳужайра ва тўқималар учун икки ёқлама ҳавф туғтиради. Биринчидан, микроорганизмларнинг яшаш фаолияти даврида озиқа муҳитларининг таркиби сезиларли даражада ўзгариб, белгиланган турғун шароитда ҳужайранинг ўсишини тўхтатади. Иккинчидан, ўсимликдан ажратилган тўқима, ҳужайра ва айниқса протопластларни микроорганизмлар осонгина зарарлайди. Шунинг учун ажратилган орган, тўқима, ҳужайра ва протопластлар билан олиб бориладиган тажрибалар стерил хоналар, бокслар ёки ламинар-боксларда олиб борилади. Бокслар, асбоблар, идишлар, ўсимликлар, озиқа муҳитлари, пахта тиқинлар ва бошқа ишга керакли ҳамма нарса стерилланади.

Асбоб ускунала ва материаллар. 500-700 мл ли кимёвий стаканлар (2 та), дистилланган сув учун бир литрли колба. Петри ликобчалари, буюм ойналар, скалпел, пинцет, игна, дока халтачалар (2 та), стерилизатор, натрий бикарбонатнинг 1% ли эритмаси, Мурасиге-Скуга озиқа муҳитли пробиркалар, автоклав, қуриштиш шкафи, совуқ стериллаш учун 0,15-0,45 мкм тешикли филтрлар.

Ламинар-бокс стерилизацияси. Ламинарнинг иш олиб бориладиган ички юзаси 70% ли спирт билан аритилади. Сўнг ламинарга спиртовка, гугурт, 96% спиртли стакан, стерилланган идишлар, асбоблар ва стерилланган сувли колба жойланади. Меристемалар ажратишда ламинарга бинокуляр лупа ҳам қўйилади. Ишлашдан олдин 2 соат давомида ламинар бокс бактериоцид ультрабинафша лампаси билан нурлантиради. Ишлашдан икки соат олдин ламинарнинг ички юзаси 70% ли спирт билан яна аритилади.

Иш бошлашдан аввал қўлларни яхшилаб совун билан ювиб, спирт билан аритиб, стерил оқ халат кийиб ва оғзига стерил никоб тутилади.

Идишларни стериллаш. Идишлар қуриштиш шкафларида қуруқ иссиқда ёки нам бўғда автоклавда стерилланади. Стериллашдан олдин идишларни

яхшилаб ювиб қуритиш керак. Идиш ювиш учун турли идиш ювиш воситалари ва хромли (калий бихроматнинг сульфат кислота эритмаси) ишлатилади. Ювилган идишларни дистирланган сувда чайиб, қуритиш шкафида қуритилади. Стериллашдан аввал ҳаводан инфекция тушишининг олдини олиш учун пробиркалар, колбалар оғзи пахта тиқинлар билан ёпилади ва қоғозга ўралади. Сўнгра идишларни қуритиш шкафларига жойлаб 2 соат 160° С да қиздирилади. Бундай қиздиришда бактерияларгина эмас, балки уларнинг споралари ҳам ўлади. Қуритиш шкафидаги ҳароратни 175° С дан ошириш мумкин эмас, чунки пахта тиқинлар сарғайиб кетади, идишлар ўралган қоғоз эса синувчан ҳолга келиб қолади. Автоклавда босим остида бундан ҳам яхшироқ стериллашга эришиш мумкин, чунки намли иссиқликда қиздирилганда микроорганизмлар ва уларнинг споралари яна ҳам яхши ўлади. Турли хил стаканлар, Петри ликобчалари, пипеткалар, дистилланган сувли колбалар автоклав қилинади. Идишлар фольга ёки ўраш қоғозларига ўралган ҳолда 25-30 дақиқа 2 атмосферада автолав қилинади. Пипеткаларни автоклав қилишда уларнинг юқори қисмига пахта тиқиб, алоҳида-алоҳида қилиб ўралади.

Асбоб ускуналарни стериллаш. Асбоб ускуналар, скалпел пинцет, игналар ва ҳақозалар қуритиш шкафида 12 соат давомида 140°С қурук иссиқликда ёки сувда қайнатиб стерилланади. Темирдан ясалган асбоблар автоклав қилинмайди, чунки нам буғ таъсирида улар занглайди ва ўтмас бўлиб қолади. Иш бошлашдан аввал ва иш давомида асбоблар чинни стаканларга солиниб, 96% ли этил спиртида стерилланади ва спиртовка алангасида қиздириб олинади. Спиртовка алангасида ланцетлар, пинцетлар ва микробиологик илмоқлар қиздирилади ва стерил қоғозлар орасида сақланади. Стерилланган асбоблар фақт бир марта ишлатилади, қайта ишлатилганда улар яна спиртда стерилланади ва алангада қиздирилади. Игна ва паккилар спиртга солиб стерилланади.

Материлларни стериллаш. Тажрибада ишлатиладиган пахта, дока, пахта тиқинлар фильтр қоғозлар, халатлар ва рўмоллар автоклавда 2 атмосферада 25-30 дақиқа стерилланади.

Ўсимлик материлларини стериллаш. Уруғлар, юқори меристемалар, ўсимликнинг турли қисмларидан олинган тўқима бўлақларини стериллаш учун турли стерилловчи эритмалардан: сулеманинг 0,1% ли эритмаси, 1% ли бром эритмаси, 13% ли пергидроль, 3-6% ли хлорамин, диоцид, 10% ли натрий гипохлориднинг сувдаги эритмаларидан фойдаланилади. Илдиз мевалар, туганаклар, ўсимликларнинг йўғон поялари совун ва ишқалагич билан оқар сувда яхшилаб ювилади, пўстлоғи шилинади, (илдизлар ва илдиз мевалар), дистилланган сувда чайилади ва абсолют спиртга бир неча

секундга солиб олинади. Ўсимлик объектлари стериллангандан сўнг, стерилловчи моддалардан тозалаш учун дистилланган сувда кўп марта чайилиши керак. Айниқса бромидли сув билан ишлов берилган ўсимлик материалларини диққат билан ювиш керак чунки бромиднинг энг кам миқдори ҳам уруғларнинг ўсишини тўхтатиб қўяди. Бром буғи заҳарли бўлганлиги учун, бром билан стериллашда албатта тяга шкафларидан фойдаланиш керак. Бром эритмасида фақат макка уруғларини стериллашда фойдаланиш тавсия этилади, ловия, қовоқ ва бошқалар учун – сулема ишлатилади. Бром ва сулема билан стериллаш вақти 10-15 дақиқани, пергидрол билан 30 дақиқани ташкил қилади. Меристемалар ва ўсимликларнинг ҳар хил қисмларидан олинган бўлаклари икки марта тезроқ стерилланади. Тукли уруғлар (чигит) юқори концентрацияли сульфат кислотасига 5 дақиқа солинса яхши стерилланади. Пергидролдан уруғлар осонроқ ювилади (стерил сув 5-7 марта ўзгартирилади). Сулемадан сўнг сув 5-6 марта ўзгартирилади. Бромдан сўнг сув 12 соат давомида, ювишнинг бошида ҳар 30 дақиқада, сўнггра эса ҳар 3 соат давомида алмаштирилиб турилади. Антисептиклар билан ишлов бермасдан, помидор, олма, қовоқ, тамаки ва дуккаклилардан стерил уруғлар олиш мумкин. Етилиш даврида бу ўсимлик уруғлари гўшти, ёғочли ёки данакли қатламлар орасида жойлашган бўлади. Соғ ва зарарланмаган бу мевалар совунли сувда ва спиртда бир неча марта ювилади. Сўнг асептик шароитда бўлакларга бўлинади, стерил скампел билан унинг ичидан уруғлар олинади ва стерил филтёр қоғози солинган Петри ликобчаларига солинади.

Озиқа муҳитларини стериллаш. Озиқа муҳитлари босим остида (автоклавда) буғ билан стерилланади. Озиқа муҳитлари солинган пробиркалар оғзи пахта тиқинлар билан ёпилиб стаканларга солиниб, ўраш қоғозига ўралади ва 1 атмосфера босимда 120°C да 20 дақиқа давомида автоклав қилинади.

Совуқ стериллаш. Иссиқликка чидамсиз органик суюқликлар, бактериялардан майда тешикли (диаметри 0,15-0,45 мкм тешикли) бактериал филтёрлардан ўтказиш орқали тозаланади.

Ишнинг бориши. Картошка ва кулупнай апикал меристемаларини ажратиш ва ўстириш учун керакли бўлган асбоблар, идишлар, озиқа муҳитлари стерилланиб олинган бўлиши шарт.

1. Петри ликобчалари (2 та), 500-700 мл ли кимёвий стаканлар (2 та) ва буюм ойначалар пишиқ қоғозга ўралган ҳолда 160°C да 2 соат давомида қуришти шкафларида стерилланади.

2. Скалпел, ажратиш ниналари, пинцетлар қуритиш шкафида 140⁰ С да 1 соат давомида стерилланади ва тайёрланган асбоблар ламинардаги қоғоз варақлари орасига жойланади.

3. Оғзи пахта тиқинлар билан ёпилган пробиркалардаги озиқа муҳитлари 1 атмосфера босимда 20 дақиқа давомида стерилланади. Озиқа муҳитли пробиркалар 10-20 тадан стаканга солинган бўлиши керак. Бир вақтнинг ўзида ўсимлик материаллари учун дока халтачаларни қоғозга ўраб автоклав қилинади.

5 – иш. Картошканинг апикал меристемасини ажратиш ва ўстириш.

Материал ва асбоб ускуналар. Картошка туганаги, бинокуляр лупа, скалпеллар, ажратиш ниналари, пакки, ушлагичли қисқичлар, стерил озиқа муҳитли пробиркалар (3-жадвалга қаралсин).

Тушунтириш. Изоляцияланган апикал меристемалар культураси, ўсимликларни микроклонал кўпайтириш учун экиладиган вируссиз материаллар олишда фойдаланилади. Вируссиз материал олиш услуги касал ўсимликнинг ўсиш нуқтасига йўналиши билан вирусларнинг миқдори камайишига асосланган.

Одатда апикал меристема вируслардан умуман ҳолидир. Хусусан вируслардан ҳоли апикал меристема фаол бўлинувчан, узунлиги 0,1 мм, эни 0,25 мм бўлган конус шаклидаги ҳужайралардан иборатдир. Асосан меристемани жароҳатларсиз бўлақларга ажратиш қийин бўлганлиги сабабли, уни 1-2 барг примордийлар (ўлчами 100-250 мкм апекслар) билан ажратиб олинади. Картошканинг фаол соғломланишини ошириш учун юқори меристемалар услуги термотерапея ва кимётерапея билан биргаликда олиб борилади. Термотерапия усули картошка туганакларига вирусларни инфаактивацияга учратувчи иссиқлик билан ишлов беришга асосланган. Юқори меристемалар усулини кимётерапея билан биргаликда олиб бориш озиқа муҳитларига вирусларни ингибирловчи моддалар қўшилишига асосланган. Апикал меристемалардан озиқа муҳитда апикал картошканинг вируссиз ўсимликлари олинади, улар кўпайитирилиб, иссиқхоналарга қайта экилади ва вируссиз туганаклар олинади. Соғломлаштирилган материални тез кўпайтириш учун *in vitro* олинган туганаклардан ҳам фойдаланиш мумкин.

Ишнинг бориши. Картошка туганаклари 4-8⁰ С да сақланади, сўнг қоронғуликда 20-22⁰ С да ўстирилади. Меристемаларни бўлақларга ажратиш ишлари бактериоцид лампалар билан стерилланган ламинар боксларда амалга оширилади. Иш бошлашдан аввал иш жойлари, стол, бинокуляр

лупалар ва пробиркали штативлар спирт билан аритиб чиқилади. Бўлақларга ажратиш учун ишлатиладиган асбоблар (пинцетлар, скалпел ва игналар) ҳар бир ажратишдан сўнг стерилланади, бунинг учун асбоблар спиртга солиниб, спиртовка алангасига тутилади. Ниҳоллар меристемаларга ажратишдан олдин 3-5 дақиқа давомида 0,1% ли диоцид эритмасида стерилланади. Бунинг учун ниҳоллар кимёвий стаканга солиниб устидан диоцид эритмаси қуйилади. Кейин уч марта стерил сувда чайилади. Шунингдек 1-6% ли кальций ёки натрий гипохлорид эритмасида ёки 0,1% ли сулема эритмасида ҳам стериллаш мумкин. Стерилланган ниҳоллар Петри ликобчасига жойланади ва қуриб қолмаслиги учун бир неча томчи стерилланган сув солинади. Ниҳолни бўлақларга ажратишдан олдин, баргни юқори ва ён меристемаларни аста-секинлик билан яланғочлаган ҳолда унинг учидан ёпқич барглар олиб ташланади. Бу ишни бинокуляр микроскоп остида ажратиш игнаси ёрдамида бажариш мумкин. 100-250 мк катталиқдаги бошланғич баргсиз меристема ушлагичга қистирилган оддий ингичка нина билан бўлақларга бўлинади. Ўсиш нуқтасининг ён ва юқори меристемалари бўлақларга ажратилади. Ҳар бир баргни юлишда алоҳида стерилланган асбобдан фойдаланиш керак.

Ажратилган меристема нинанинг учидан пробиркадаги озиқа муҳит юзасига жойлаштирилади. Пробирка оғзи ва пахта тикин спиртовка алангасида стерилланиб ёпилади ва штативга жойланади. Штатив пробиркалар билан тўлгандан сўнг озиқа муҳит қуриб қолмаслиги учун целофан қалпоқча билан ёпиб қўйилади. Озиқа муҳити сифатида аввалдан 1 машғулот учун тайёрланиб, автоклавда 20 дақиқа 1 атм. босимда стерилланган Мурасиге-Скуга озиқа муҳити ишлатилади. Орадан 2,3,4 ҳафта ўтгандан сўнг меристемадан ниҳолларнинг ривожланиши кузатилади ва шу жараён босқичлари чизиб олинади.

6 – иш. Қаламчалаш орқали картошкани микрокўпайтириш.

Апикал меристемалардан олинган вируссиз картошка ўсимликлари сунъий озиқа муҳитларида кўпайтирилиши керак. Картошкани кўпайтиришнинг кенг тарқалган усули бу пробиркадаги культурада ўсимликнинг қаламчаланишидир. Бунинг учун ўсимлик пробиркадан олинади, ҳар бирида баргли поя ва қўлтиқ куртак бўлган бўлақларга бўлинади. Ҳар бир қаламча Мурасиге-Скуга озиқа муҳити солинган пробиркаларга ўтказилади. Қаламча ёрдамида кўпайтириш новданинг ўсиш нуқтасини олиб ташлаш йўли билан апикал устунлиқни камайтириб, ён меристемаларнинг фаолланишига асосланган. Қаламчанинг ён куртагини

озиқа муҳитига ўтказилганда ундан новда ўсиб чиқади. Кейинги қаламчалаш ҳар 14-21 кундан сўнг олиб боилади. Битта ўсимликдан 5-8 қаламча олинади. 3 ой мобайнида қаламчалаш йўли билан 3-5 минг ўсимлик, 7 ой ичида эса кўпайиш коэффеценти 1:30-40 мингга етказиш мумкин. Сўнгра соғломлаштириб экиладиган материалларни кўпайтиришнинг кейинги босқичи, яъни иссиқхоналарда олиб бориладиган босқичига ўтилади. Бунда пробиркадаги ўсимликлар агарли озиқа муҳити билан биргаликда тупроқли тувакларга экилади. Ўсимликлар 3-7 куни Кноп эритмаси Мурасиге-Скуга бўйича микроэлементлар билан: 5 мл бошланғич эритманинг 1х10 концентрацияли 1 л сувдаги эритмаси билан озиқлантирилади. 7-10 кундан сўнг ўсимликлар вирусиз туганаклар олиш учун иссиқхоналарга доимий жойига ўтказилади ва олинган ҳосил кейинчалик экилади.

Материал ва асбоб ускуналар. Картошканинг пробиркадаги ўсимлиги, модификацияланган ва стерилланган Мурасиге-Скуга озиқа муҳитли пробиркалар, стерил скалпел, пинцетлар ва Петри ликобчалари.

Ишнинг бориши. Ламинарда пробиркадаги картошка ўсимлиги Петри ликобчасига олинади, ҳар бирида барги ва қўлтиқ куртаги бўлган поя бўлакларига бўлинади. Барг тагидаги поя қисми барг устидаги поя қисмидан 2-3 марта кичик бўлиши керак. Иш давомида стерилликка катта аҳамият берилиши лозим. Қаламчаларни модификацияланган Мурасиге-Скуга озиқа муҳитли пробиркаларга олиб экилади. Бунда микроорганизмлар тушишининг олдини олиш учун пробирка оғзи ва пахта тикинлар спиртовка алангасида стерилланади. Қаламчали пробиркалар расми чизиб олинади ва ёруғлик камерасига қўйилади. Новданинг ривожланиши 7-14 кундан сўнг кузатилади ва ўсимликнинг ривожланиш босқичлари чизиб борилади.

7 – иш. Фиторегуляторлар ёрдамида картошка туганакларнинг тиним ҳолатига ўтиши ва уйғонишини бошқариш.

Ҳозирги пайтда ўсимликларнинг ўсиш жараёнини бошқариш билан бир қаторда ўсимликларнинг физиологик тиним ҳолатини бошқариш имкониятлари ҳам мавжуд. Картошкадан бир йилда икки марта ҳосил олиш учун туганакларнинг ўсишини тезлаштирувчи фитогормонлар билан ишлов берилади.

Материал ва асбоб ускуналар. Картошка туганаклари, гиббереллин, 2-хлорэтилфосфон кислотаси, этил спирти, туганакларни ивитиш учун идишлар, термостат ва полиэтилен халталар.

Ишнинг бориши. Гиббереллин ва 2-хлорэтилфосфон кислотаси эритмалари тайёрланади. Туганаклар шу эритмаларда 10-20 дақиқа

ивитилади сўнг фильтр қоғозлари ёрдамида куритилиб (ҳар бирига ишлов вариантлари ёзилган қоғоз солиб) пакетларга солинади ва 26-29° С ҳароратда термостатга қўйилади. 14 суткадан сўнг куртаклар сони ҳисобланади. Олинган натижаларга қараб картошканинг тиним ҳолатидан чиқишига ва ўсишнинг жадаллаштирувчи эритмаларнинг оптимал миқдори аниқланади.

8 – иш. Туганак бактерияларни ажратиш, кўпайтириш ва препаратлар тайёрлаш.

Ҳаводаги молекуляр азотнинг биологик усулда тупроққа йиғилиши кишлоқ хўжалигида катта аҳамиятга эга. Атмосфера ҳавосининг 70% ни эркин азот ташкил этади. Атмосферадаги азот захирасидан ўсимлик тўлиқ фойдалана олмайди. Ҳаводаги азотни ўзлаштириб, уни ўсимлик озиқланиш ҳолига келтира оладиган алоҳида микроблар бор. Бу микроблар азотфиксаторлар дейилади. Азотфиксаторлар икки биологик гурппага бўлинади.

1. Симбиотик азотфиксаторлар
2. Эркин ҳолда яшовчи азотфиксаторлар

Симбиотик азотфиксаторлар туганак бактериялар бўлиб, дуккакли ўсимликлар билан симбиоз ҳолатда яшайди ва ҳаводаги азотни тупроққа йиғилишига ёрдам беради.

Материал ва асбоб ускуналар. 10 г нўхат ёки ловия, стерил колбалар, 2 г агар-агар, Петри ликобчалари, дуккакли ўсимлик туганаклари, термостат, микроскоп ва Фуксин бўёғи.

Ишнинг бориши. Туганак бактерияларнинг тоза культурасини ажратиб олиш учун қуйидаги озиқа муҳитидан фойдаланади. Туганак бактерияларининг ундириш учун нўхат ёки ловиядан тайёрланган бульон озиқа муҳити сифатида олинади. Бульон қуйидаги усулда тайёрланади: 100 мл сувга 10 г нўхат ёки ловия солиниб дуккаклари ёрулгунча (30-40 минут) қайнатилади ва стерилланган колбага филтрдан ўтказиб қуйилади. Филтрланган суюқликни ҳажми кам бўлса, яна 100 мл га етгунча стерилланган сув қўшилади, сўнг рН си аниқланади. Одатда рН нейтрал бўлиши керак. Ҳосил бўлган нўхат бульонига шакар ва 2 г агар-агар қўшилиб эритилади. Тайёрлаган муҳит Петри ликобчаларига қуйилиб қотирилади. Сўнгга дуккакли ўсимликлар туганакларидан сиқиб олинган шира экилади. Ликобчалар бир неча кун давомида 25-30° термостатга қўйилади. Сўнгга озиқа муҳити юзасида униб чиққан колониялардан препарат тайёрланиб

метилен кўки, Фуксин ёки Грамм усулида бўяб микроскопда кўрилади. Муҳит устида униб чиққан тўплалар оқиш, майда ва шилимшиқ бўлади.

9 – иш. Энтомопатоген бактерияларни ажратиш ва улар асосида препаратлар олиш.

Ўсимликларни *Bacillus thuringiensis* турига мансуб спора-кристал ҳосил қилувчи энтомопатоген бактериялар асосида яратилган микроб инсектицид препаратлари 160 турдан ортиқ зараркунандаларга эндомицид таъсир этиш хусусиятига эгадир. Ҳашаротлар организми бу инсектицидларга қарши деярли мослаша олмайди. Шунингдек улар экологик зарарасиз, иссиқ қонли ҳайвонларга, балиқларга ва инсонларга салбий таъсир кўрсатмайди.

Материал ва асбоб ускуналар. Бактерияларни ўстириш учун пептонли озиқа муҳити, *B.thuringiensis* бактериясининг вегетатив культураси, ёруғлик микроскопи, культураларни ўстириш учун тебратгич, тирик ҳужайралар сонини аниқлаш учун Горяева камераси, термостат ва рН-метр.

Ишнинг бориши. Ҳашаротлар организмидан культураларни Скринг усулида ажратиб олинади. Бунда унинг танасининг устки қисми стерилизация қилинади ва унинг ошқозон-ичак системасидан микроорганизмлар қаттиқ озиқа муҳитига экиб олинади. Ўсган колониялар алоҳида экиб олинади. Уларни биокимёвий тестлар орқали идентификация қилинади. *B.thuringiensis* энтомопатоген бактерияси пептонли агар (ПА) озиқа муҳитида 72 соат ўстирилади. Бунда культуралар 750 мл сиғимли колбаларда 100 мл суюқ озиқа муҳити солиб 48-72 соат мобайнида минутига 180 маротаба тебранадиған (180 тез/мин) чайқатгичда, 27-28⁰ С ҳароратли хонада ўстирилади. Тирик ҳужайралар миқдори қаттиқ агарли муҳитда ўсган алоҳида колониялар сонига қараб ҳисобланади. Спора-кристаллар нисбати бўялган мазокда таққослаб ўрганилади. Ҳужайралар сони Горяева камераси ёрдамида санаб ўрганилади. Бактерия культураларининг ривожланиши давомида озиқа муҳитида рН кўрсаткичини ўзгартириши культурал суюқликда ҳар 24, 36, 60 ва 72 соатда текширилади.

B.thuringiensis бактериясининг заракунанда ҳашаротларга энтомапатоген таъсирини ўрганиш учун, культуралар энтомопатоген таъсири қўнғизларда умумий қабул қилинган усул ёрдамида ўрганилади. Қўнғизларнинг ўртача оғирлиги 50 мг бўлиши керак. Культура суспензияси (спора-кристалли аралашмаси, 2,0 х млн. ҳужайра/мл) 3 г миқдордаги қўнғизлар қуруқ озиқага 1 мл қўшилади ва Петри ликобчасига аралаштириб солинади. Ҳар бир Петри ликобчасига 10 тадан қўнғиз солинади. Ҳар бир препарат фаоллиги 30 та

кўнғизда яъни нобуд бўлган кўнғизлар сонининг назорат озиқа муҳитига нисбатан ўзгариши 7 кунгача кузатилади.

B.thuringiensis бактерияси штаммлари морфо-культураль, физиологик ва биокимёвий хусусиятларини ўрганиш учун бактериялар ўлчами, унинг кристалл оксилли йиғиндиси ва споралари ўлчами окуляр микрометрда ўрганилади. Бундан ташқари бактериялар ҳаракатчанлиги уларни ярим суюқ озиқа муҳитига (NaCl -0,5 г, K_2HPO_4 - 0,5 г, MgSO_4 -0,5 г, пептон-10 г, сахароза-2 г, агар-агар 2,5 г, сув -1000 мл) экиш орқали аниқланади. Ушбу озиқа муҳитида ўсган культураларнинг қуйидаги хусусиятлари ўрганилади: парда ҳосил қилиш характери, озиқа муҳитининг рангини ўзгартириши (тиниқсизланиши), қолдиқ характери, унинг ранги ва консистенцияси, ўсиш характери, шакли, юзаси, рельефи, консистенцияси, ацетил-метил-карбонол ҳосил қилиши аниқланади.

Мундарижа

1 – иш: Ўсимлик ҳужайрасидан ДНК ажратиш	
2 – иш: Агарозали гелда ДНК электрофорези	
3 – иш: Бактерия ҳужайраларидан плазмид ДНК ни ажратиш	
4 – иш. Ўсимлик ҳужайра ва тўқималарини ўстириш учун озиқа муҳитини тайёрлаш ва стериллаш усуллари	
Ажратилган ўсимлик ҳужайралари ва тўқималари тўпламлари билан ишлаш жараёнида стериллаш усуллари	
5 – иш. Картошканинг апикал меристемасини ажратиш ва ўстириш	
6 – иш. Қаламчалош орқали картошкани микрокўпайтириш	
7 – иш. Фиторегуляторлар ёрдамида картошка туганакларнинг тиним ҳолатига ўтиши ва уйғонишини бошқариш	
8 – иш. Туганак бактерияларни ажратиш, кўпайтириш ва препаратлар тайёрлаш	
9 – иш. Энтомопатоген бактерияларни ажратиш ва улар асосида препаратлар олиш	

