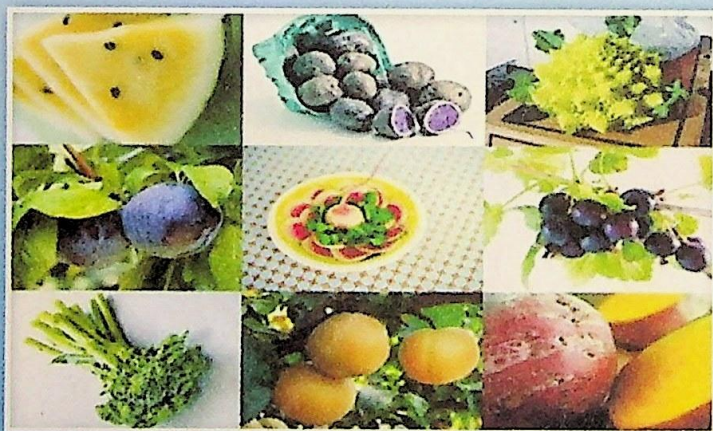


M.A.ZUPAROV, M.S.MAMIEV, U.X.RAXIMOV,
A.A.XAKIMOV, U.N.RAXMONOV, A.N.ALLAYAROV

Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi

laboratoriya mashg'ulotlarini o'tkazish uchun
o'quv qo'llanma

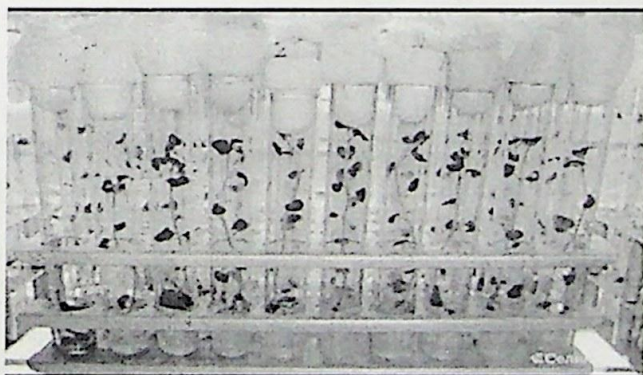


Toshkent – 2016

M.A.Zuparov, M.S.Mamiev, U.X.Raximov,
A.A.Xakimov, U.N.Raxmonov, A.N.Allayarov

Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi

(laboratoriya mashg'ulotlarini o'tkazish uchun o'quv qo'llanma)



Toshkent – 2016

Ushbu amaliy mashg'ulotlar bo'yicha qo'llanma "Qishloq xo'jaligi biotexnologiyasi" fani bo'yicha o'tiladigan laboratoriya mashg'ulotlarning mavzusi, uni o'tkazish uchun dastur, material va jihozlar, topshiriqlarning qisqacha mazmuni, topshiriqlarni bajarish usuli va tartibi hamda olingan natijalarni muhokama qilish bo'yicha tushuncha berilgan.

Ushbu o'quv qo'llanma

Bilim sohasi: 400000 – Qishloq va suv xo'jaligi

Ta'lim sohasi: 410000 – Qishloq, o'rmon va baliq xo'jaligi

Ta'lim yo'nalishlari:

5111000 – Kasb ta'limi (5410200 – Agronomiya (dehqonchilik mahsulotlari bo'yicha)

5410200 – Agronomiya (dehqonchilik mahsulotlari bo'yicha)

5410300 – O'simliklar himoyasi va karantini

5410400 – Qishloq xo'jaligi ekinlari seleksiyasi va urug'chiligi

5410500 – Qishloq xo'jalik mahsulotlarini saqlash va dastlabki qayta ishlash texnologiyasi

5411000 – Meva-sabzavotchilik va uzumchilik

5420100 – Qishloq xo'jaligida menejment mutaxassisliklari uchun mo'ljallangan

Tuzuvchilar: M.A.Zuparov
M.S.Mamiev
U.X.Raximov
A.A.Xakimov
U.N.Raxmonov
A.N.Allayarov

Taqrizchilar:

F.M.Boyjigitov O'zbekiston O'simliklarni himoya qilish ilmiy tadqiqot instituti katta ilmiy xodimi, qishloq xo'jalik fanlari nomzodi

B.Muxammadiev ToshDAU O'simliklarni himoya qilish kafedrasida dotsenti

O'quv qo'llanma Botanika va agrobixnologiya kafedrasida yig'ilishida (2016 yil 9 sentyabrdagi 2-sonli bayonnoma), Seleksiya, urug'chilik va o'simliklarni himoya qilish fakulteti o'quv uslubiy Kengashining 2016 yil 20 sentyabrdagi 2-sonli yig'ilishida hamda ToshDAU o'quv uslubiy Kengashining 2016 yil 28-noyabr 2-sonli yig'ilishida ko'rib chiqilib, chop etishga ruxsat etildi.

KIRISH

Qadim davrdanoq biotexnologiya, undagi jarayonlar kishilarning kundalik ehtiyojlarini qondirish maqsadida foydalanib kelingan bo'lsada, amaliy fan sifatida XX asrda shakllandi. U hozirgi vaqtda insoniyatning eng asosiy dolzarb muammolaridan biri hisoblanmish - oziq-ovqat, energetik resurs, atrof-muhit ifloslanishining oldini olish bilan bog'liq muammolari echimini topish zaruriyati tufayli yuzaga keldi.

Biotexnologik jarayonlar mikroorganizmlar, o'simlik va hayvon hujayralari, sun'iy oziqa muhitlarida o'stirilayotgan hujayra, to'qima va organlarni biosintetik potensialidan amaliy foydalanishga asoslanadi. Hozirgi vaqtda dunyoning ko'plab mamlakatlarida biotexnologiyaning taraqqiyotiga asosiy e'tibor qaratilmoqda, chunki boshqa texnologiya-larga qaraganda, biotexnologik jarayonlar energiya sarfining kamligi, deyarli chiqindisizligi, ekologik sofliги jihatidan bir qator afzalliklarga ega. Bundan tashqari bu texnologiyalar muayyan asbob-uskuna, texnik qurilma va preparatlardan foydalanishni talab qiladi, Shuningdek, iqlim sharoitlariga qaramasdan kichik hajmni egallaydigan maydonlarda ham tadqiqotlar o'tkazish mumkinligi bilan ajralib turadi.

Mamlakatimizda biotexnologiyani o'rganish va uning yutuqlaridan ilmiy - tadqiqot ishlarida foydalanish, sohada olib borilayotgan iizlanishlarni shakllantirish 70-80-yillardan boshlangan.

Bugungi kunga kelib qishloq ho'jalik biotexnologiyasi sohasidagi ko'plab ishlar, tadqiqotlar bir qator olimlar, mutaxassislarning izlanishlari bilan izchil davom etmoqda.

1 – ish. Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi laboratoriyasining tuzilishi, asbob-uskunalar va laboratoriyada ishlash qoidalari bilan tanishish

Asbob-uskunalar va materiallar. Biotexnologiya laboratoriya-sida foydalaniladigan asosiy asbob-uskunalar: laminar boks, avtoklav, termostat, quritish shkafi, sovutgichlar, sentrifugal, avtomatik mikropipetkalar, elektroforez, Petri likobchasi, probirka hamda boshqa asboblari va idishlar.

Mavzuni tushuntirish. Bu darsda talabalar biotexnologik laboratoriyasini tashkil etish va unda ishlash qoidalari bilan tanishadilar. Biotexnologik laboratoriyasining asosiy asboblari va jihozlaridan foydalanish usullarini o'rganadilar.

Biotexnologiya laboratoriyasi uchun ajratilgan xona yorug', keng, uning tabiiy yoritilganligi 110 lk dan kam bo'lmasligi kerak. Laboratoriya xonasining tagiga oson yuviladigan linoleum to'shalgan, stollarning sirti plastik materiallar bilan qoplangan bo'lishi kerak. Xona devorlarini erdan 170 sm balandlikgacha kafel bilan qoplash yoki moy bo'yoq bilan bo'yash zarur. Biotexnologiya xonasidagi stollar laboratoriya tipida va u erda reaktiv hamda idishlarni qo'yish uchun shkaf va peshtaxtalar bo'lishi kerak. Stollar elektr va gaz tarmog'iga ulangan manbaga ega bo'lishi talab etiladi.

Biotexnologiya laboratoriyasi asosiy xonadan tashqari avtoklav va quritish shkafi qo'yiladigan xona, sterilizatsiya xonasi, boks, idish yuvadigan xona, sovutkich va termostat qo'yiladigan, kulturalarni saqlaydigan xonalardan iborat bo'lishi kerak. Boks-kulturalar ekiladigan unchalik katta bo'lmagan xona bo'lib, u ikkiga ajratilgan bo'lishi zarur. Boksdagi asosiy ishlash xonasiga kichik xona, ya'ni tamburdan eshik orqali kiriladi. Bu holat eshik ochilganda tashqaridagi havo orqali mikroorganizmlarni to'g'ridan-to'g'ri kirib kelishini ma'lum darajada oldini oladi. Boks ichida bakteritsid lampa bo'lishi kerak. Hozirgi vaqtda stolga joylashtiriladigan turli kattalikdagi, ichida steril havosi almashib turadigan laminar bokslar ham keng ishlatilmoqda.

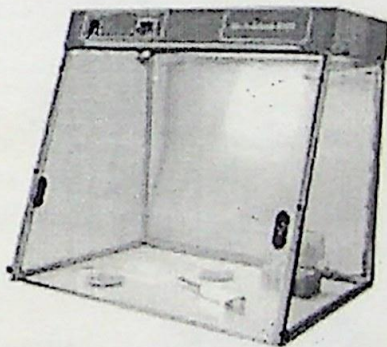
Biotexnologiya laboratoriyalarida o'simlik kulturalari va mikroorganizmlar bilan ish olib boriladi. Qishloq xo'jalik oliy o'quv yurtlarining agronomiya yo'nalishlarida biotexnologik tadqiqotlar asosan o'simliklar va mikroorganizmlar ustida olib boriladi, lekin mikroorganizmlar, orasida insonlarda kasallik qo'zg'atuvchi turlari ham bo'lishi mumkin. Shuning uchun laboratoriyada xodim va talabalar

o'zlariga ayrim kasalliklarni yuqtirmasliklari uchun ichki tartib qoidalariga qat'iy rioya qilishlari zarur. Ular quyidagilardir:

- a) *dastalab birkirilgan joyda ishlash, faqat shu stoldagi asbob va reaktivlardan ishda foydalanish lozim.*
- b) *spirt lampalarni bir-biridan yondirmasdan, faqat gugurt orqali yondirish kerak.*
- v) *rozetkalarga metal va boshqa buyumlar bilan tegish taqiqlanadi.*
- g) *o'qituvchidan yoki laborantdan ruxsatsiz elektr asboblari, uskunalar va boshqa jixozlarni ishga tushirmaslik kerak.*
- d) *kimyoviy va boshqa reaktivlar bilan ishlaganda ehtiyot choralarni ko'rish kerak.*

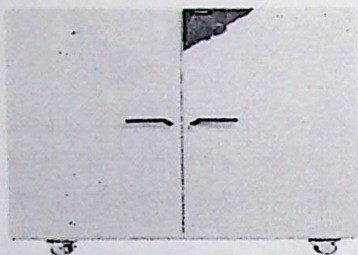
Biotexnologiya laboratoriyasida qo'llaniladigan asboblari:

Laminar-boks. Laminar-boks ajratilgan to'qma, hujayralarni o'stirish va boshqa steril sharoitni talab etuvchi ishlarni bajarish uchun mo'ljallangan. Bu erdagi steril sharoit laminar-boksga o'rnatilgan havo o'tkazadigan bakterial filtrlar yordamida amalga oshiriladi (1-rasm).



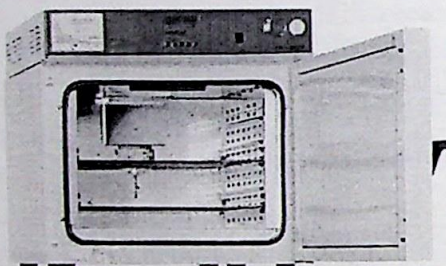
1-rasm. Laminar boks

Termostat. Bu jihozda issiq harorat bir xil darajada saqlanib turiladi. Ko'p mikroorganizmlarning ko'payishi uchun qulay harorat 25-27°S hisoblanadi. Termostatlar quruq, havoli va suvli bo'ladi. Bulardan mikroorganizmlarni o'stirish uchun foydalaniladi (2-rasm).



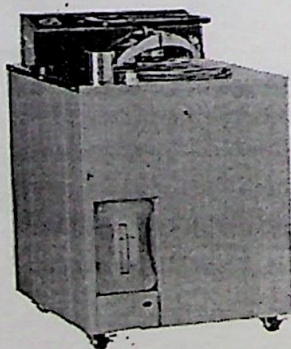
2-rasm. Termostat

Quritish shkafi (Pastor pechi). SHisha, chinni va metaldan yasalgan laboratoriya idishlari sterillash uchun mo'ljallangan (3-rasm).



3-rasm. Quritish shkafi

Avtoklav. Mazkur jihoz bug' va bosim bilan sterillashga mo'ljallangan. Biotexnologik laboratoriyalarda avtoklavlarning turli xillari (gorizontal, vertikal shakldagi, ko'chirib bo'lmaydigan va ko'chirish mumkin bo'lgan turlari) ishlatiladi (4-rasm).



4-rasm. Avtoklav

Sovutkichlar. Oziqa muhitlarini, zardob va boshqa biologik jihatdan faol preparatlarni 4°C atrofida saqlash uchun foydalaniladi. Biopreparatlarni 0°C dan past haroratda saqlash uchun past haroratli sovutkichlardan foydalaniladi. Bularda harorat -20°C va undan ham past bo'lishi mumkin.

Sentrifuga. Markazdan qochuvchi aylanma kuchdan foydalanib suyuqlikdagi turli solishtirma og'irlikka ega moddalarni va qattiq moddalardan suyuq moddalarni ajratishda ishlatiladi (5-rasm). Sentrifugadagi aylanma harakat tufayli solishtirma og'irligi nisbatan yuqori bo'lakchalar chetga va aksincha kichik solishtirma og'irlikdagi bo'lakchalar o'rtadagi o'q atrofida yig'iladi.

Ultratsentrifuga biotexnologiya laboratoriya amaliyotida keyingi tadqiqotlar uchun hujayra fraksiyalari, membrana, oqsil, nuklein kislotalar va boshqa makromolekulalarni ajratishda ishlatiladi. Ultratsentrifuganing rotorani aylanishi bir daqiqada 80 ming va tezligi 106 q ga teng. Ultratsentrifugani birinchi bo'lib 1923 yili T.Svedberg kashf qilgan.



5-rasm. Sentrifuga

Avtomatik mikropipetkalar. Kichik hajmdagi [1-1000 mkl (μl)] suyuqliklarni aniq va sifatli o'lchash uchun ishlatiladigan asboblardir. Ular biologik va kimyoviy tadqiqotlarda keng qo'llaniladi (6-rasm).

Mikropipetkalar konsentrlangan kislotalar yoki emiruvchi eritmalarini o'lchash uchun ishlatilgandan so'ng ularning bo'laklari distillangan suv bilan yaxshilab yuvilishi va quritilishi kerak. To'liq quritilgan mikropipetka bo'laklari yana o'z xolidek qilib yig'ib qo'yiladi. Emiruvchi eritmalarining parlarini uzoq ta'sirida mikropipetka bo'laklari ishdan chiqishi mumkin. Bu esa ularda suyuqliklarni hajmini noto'g'ri o'lchashga sababchi bo'ladi.

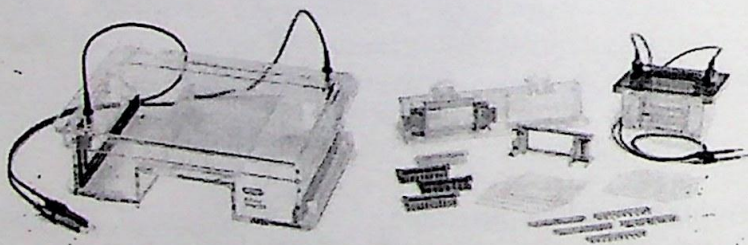


6-rasm. Avtomatik mikropipetkalar

Elektroforez (yunoncha soʻz boʻlib, “koʻchirib oʻtkazaman” degan maʼnoni bildiradigan elektrokinetik xodisa boʻlib, elektro-maydonning tashqi taʼsirida suyuq yoki gazli muhitda dispers faza (kolloid yoki oqsil eritmalarining) boʻlaklarini koʻchishidir (7-rasm). Uni birinchi boʻlib Moskva universitetining professorlari P.I.Straxov va F.F.Reyslar 1809 yilda kashf qilishgan.

Elektroforez yordamida sirtning chuqur qismigacha kirib boradigan mayda boʻlakchalar yordamida yuzani qoplash mumkin.

Elektroforez fizioterapiyada, kimyo sanoatida tutun va tumanlarni tarqatishda hamda eritmalar tarkibini oʻrganishda tatbiq etiladi. Kimyo, biokimyo va molekulyar biologiyada elektroforez moddalarni ajratishda va ularning komponentlarini taxlil qilishda eng muhim usullardan biri hisoblanadi.



7-rasm. Elektroforez



8-rasm. Biotexnologiya laboratoriyasining asosiy uskunalari

Petri likobchasi. Ikkita bir-biriga qopqoq bo'lib yopiladigan yassi, diametri 8-10 sm bo'lgan yumaloq idish (9-rasm). Petri likobchasi shisha yoki tiniq plastmassadan tayyorlanadi va unda agarli oziqa muhitida mikroorganizmlar yoki o'simlik to'qimasi o'stiriladi. Petri likobchasi nemis olimi R.Koxning shogirdi Yu.R.Petri tomonidan birinchi bor 1887 yili mikroorganizmlarni o'stirish uchun ishlatilgan.



9-rasm. Petri likobchasi

Nazorat savollari:

1. Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi laboratoriyasi qanday talablarga javob berish kerak?
2. Asbob uskunalar bilan ishlashda nimalarga e'tibor beriladi?
3. Sterillash jixozlariga ta'rif berib o'ting.

2 – ish: O'simlik xujayrasidan DNK ajratish

Asbob-uskunalar va materiallar. 4 g 14 kunlik g'o'za barglari, havoncha, sentrifuga, sentrifuga stakanlari, 2 ta kolba, 2 ta stakan, shisha tayoqcha, refraktometr, dializ qog'ozi, magnitli aralashtirgich, spektrofotometr va muzlatgich.

Mavzuni tushuntirish. Transgen hujayradan sun'iy ravishda etuk organizm o'stiriladi. Ushbu usuldan foydalanib o'simlik, hayvon va mikroorganizmlar hujayralaridan transgen shakllar olish mumkin. Biotexnologiyaning bu sohasiga dastlabki qadamlar 1973 yil birinchi gen klonlangan vaqtdan boshlab qo'yilgan edi (1-jadval).

Tirik organizmda oldindan mavjud qolip asosida yangi DNK molekulasining yaratilishi nuklein kislotalarining sintezlanish yo'lidir. Mavjud DNK molekulasidan nusxa olish **replikatsiya** deb ataladi.

Replikatsiya jarayoni DNK-polimeraza I, II, III, DNK-ligaza va revertaza fermentlari yordamida amalga oshadi. rep-oqsil yordamida DNK qo'sh zanjiri ajraladi va DNKga bog'lanadigan oqsil molekulalari yordamida DNK ning ajralgan zanjirlari turg'un holatda saqlanib turiladi. DNK-polimeraza III fermenti DNK ning 3' uchidan 5' uchigacha DNK ning bitta zanjirini to'la sintez qilish qobiliyatiga ega. DNK sintezi faqat DNK ning 3' uchidan 5' uchiga qarab borishi tufayli DNK ning ikkinchi zanjiri praymaza, DNK-polimeraza I va DNK-ligaza fermentlari yordamida amalga oshadi.

Praymaza (revertaza) fermenti yordamida DNK ning ikkinchi zanjiri sintezi uchun praymer sintez qilinadi va DNK-polimeraza III fermenti yordamida praymer nukleotidlar ketma-ketligidan DNK sintezi boshlanadi va DNK-polimeraza I fermenti yordamida bu nukleotidlar ketma-ketligi bir oz uzaytiriladi. Ko'plab hosil bo'lgan DNK fragmentlari DNK-ligaza fermenti yordamida ulanadi. Bu jarayon DNK ning ikkinchi zanjiri to'la sintez bo'lguncha davom etadi. Yangi DNK zanjiri tayyor DNKning nusxasiga, matritsasiga qarab tuziladi. Bu jarayonda matritsa vazifasini DNK qo'sh zanjirining bir ipi bajaradi.

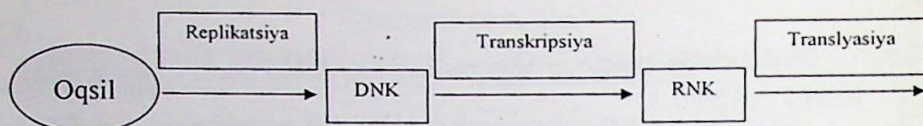
Zamonaviy biotexnologiyaning dastlabki asosiy bosqichlari

Kashf etilgan vaqti	Bajarilgan ishlar
1973 yil	Birinchi gen klonlangan
1974 yil	Birinchi bakteriya genlarini klonlash ekspressiyasi amalga oshirildi
1975 yil	Birinchi gibridoma yaratilgan
1976 yil	Rekombinant DNK texnologiyasidan ishlab chiqarishda foydalanish boshlangan
1980 yil	Gen muxandisli usullari yordamida olingan mikroorganizm shtammlarini patentlash haqidagi qaror qabul qilingan
1981 yil	Monoklonal antitella to'plamlaridan foydalanish mumkinligi to'g'risidagi qaror qabul qilingan. Birinchi marta genlarni avtomatik sintezatori sotuvga chiqarildi
1982 yil	Tibbiyotda rekombinant DNK - insulini va hayvonlar uchun birinchi rekombinant DNK dan foydalanishga ruxsat berildi
1983 yil	Birinchi marotoba gen ekspressiyasidan bir o'simlikdan boshqa turida foydalanish mumkinligi isbotlandi

RNK sintezi jarayoni transkripsiya deb ataladi. Har uchala tipdagi RNK sintezi turli tipdagi RNK-polimraza (RNK-polimeraza I,II,III) fermentlari yordamida amalga oshiriladi. rRNK sintezi RNK-polimeraza I fermenti, iRNK RNK-polimeraza II fermenti va tRNK hamda kichik o'lchamli yadro RNK si molekulari RNK-polimeraza III fermenti yordamida amalga oshiriladi. Hamma RNK molekulari sintezi uchun DNK ning bitta ipi matritsa vazifasini o'taydi.

Oqsil sintezi ribosomalarda o'tadi. Ribosoma hujayra metabolizmi uchun zarur bo'lgan oqsillar sintezini DNK dan olingan inshaklsiya asosida kodlash mexanizmiga muvofiq amalga oshiradi (10-rasm).

DNK zanjiridan olingan iRNK nukleotidlar tartibi shaklidagi inshaklsiya ribosoma yordamida oqsil molekulasidagi aminokislotalar tartibiga ko'chiriladi.



10-rasm. Biologiyaning asosiy qonuniyati

Oqsil sintezi jarayoni translyasiya deb ataladi. Nuklein kislotalarda har bir aminokislotalarni taniydigan va tanlab biriktirib olib tashishda vositachilik qiladigan birin-ketin uchta nukleotidlar kombinatsiyasi mavjudki, bu o'z navbatida aminokislota kodi, oqsil kodi, kodon, keng ma'noda **genetik kod** deb yuritiladi.

Oqsil molekulasiga kiradigan aminokislotalar 20 ta bo'lganligi uchun kodonlar soni ham 20 dan kam bo'lishi mumkin emas.

Bunda hosil nobud bo'ladigan kombinatsiyalar soni 64^{43} , kodlanadigan aminokislotalar sonidan ancha ko'p. Nima uchun degan savol tug'iladi? Ma'lum bo'lishicha, 20 ta aminokislotalardan 18 tasi bittadan ortiq, ya'ni 2 ta, 3 ta, 4 ta va 6 ta kodon bilan kodlana olar ekan. Bundan tashqari, uchta kodon UAA, UAG, UGA aminokislotalarni kodlay olmaydigan va ularni paydo bo'lishi polipeptid zanjirining tugaganidan darak beradi. Shuning uchun ham ular terminatorlar **"tugatuvchilar"** deb ataladi.

Poliribosomalarda oqsil sintezi iRNKning 5' oxiridan boshlanib 3' oxirida tugaydi. Oqsil sintezi tugagach iRNK ribosomadan ajralib chiqadi va ribosoma ikkita subparchalarga dissotsiatsiyanadi.

DNK molekulasi strukturasi tashqi nomuqobil omillar ta'sirida o'zgarishi mutatsiya deyiladi.

Mutatsiyaga uchragan DNK molekulasida irsiy axborot o'zgaradi va organizmning mo'tadil holatda yashashiga keskin ta'sir ko'rsatadi. Tirik organizmning mutant shakllari vujudga keladi. Boshqa organizmlardan farqli o'laroq o'simlik va mikroorganizmlarning xo'jalik ahamiyati yuqori bo'lgan mutant shakllaridan xalq xo'jaligida keng ko'lamda foydalaniladi (2-jadval).

Inson organizmidagi mutatsion o'zgarishlar og'ir kasalliklarni kelib chiqishiga sabab nobud bo'ladi (oq qon kasalligi).

Auksotrof mutantlar yordamida L-aminokislotalarining birlamchi
metabolitlarini olinishi

Amino-kislota	Produtsent	Tansiq modda	Substrat	Kultural suyuqlikda aminokislotalar miqdori, g/l
L-lizin	<i>Breviobacterium flavum</i>	Treonin, metionin yoki gomoserin	Glyukoza saxaroza	60-100
L-trionin	<i>Escherichia coli</i>	Lizin, metionin, izoleysin	Glyukoza	20
L-ornitin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Arginin	Glyukoza	26
L-fenil-alanin	<i>Arthrobacter parafineus</i>	Tirozin	n-alkanlar	15
L-tirozin	<i>Corynebacterium sp.</i>	Fenilalanin	n-alkanlar	19
L-valin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Izoleysin	Glyukoza	11

Mutatsiyaga uchragan DNK molekulasini asl holatiga qaytish jarayoni - **DNK reparatsiyasi** deyiladi.

Reparatsiya jarayoni DNKaza, DNK-polimeraza II va DNK-ligaza fermentlari ishtirokida amalga oshiriladi. Bu fermentlar tizimi yordamida DNK strukturasi dastlabki mo'qadil holatiga qaytadi.

Ishning borishi.

1. 4 g barg havonchada suyuq azot yordamida kukun holiga kelguncha maydalanadi.
2. Kukunni 50 ml bufer B bilan birga kolbaga solinadi va 20 daqiqa davomida aralashtirib turiladi.
3. 30 ml fenol qo'shiladi va yana aralashtiriladi (30 daq.).
4. K-23 sentrifugasida 10°C da 5000 ayl/daq. tezlikda 1 soat aylantiriladi.
5. Ustki qismi toza kolbaga olinib teng miqdorda fenol-xloroform aralashmasi solinib, 10 daqiqa aralashtiriladi.
6. 30 daqiqa 10° S da 5000 ayl/daq. tezlikda sentrifugalanadi.

7. Ustki qismini olib teng miqdorda xloroform qo'shib, 10 daqiqa aralashtiriladi va yana sentrifugalash yo'li bilan fazalarga bo'linadi (11-rasm).
8. Suyuq qismi 2 miqdor etil spirti solingan stakanga asta sekinlik bilan aralashtirilib muzlatgichga qo'yiladi. "Meduza" hosil bo'lgandan so'ng tayoqchaga o'rab olinib 10 ml DNK erituvchi (TE) buferida stakanda eritiladi.
9. DNK eritmasiga etidiy bromid 0,2 mg/ml va 1,55 g/ml seziy xlor solinadi (sinish ko'rsatkichi 1,3860).
10. Suyuqlik sentrifuga probirkalariga solinadi va tenglashtirib og'zi mahkamlangandan so'ng 20 soat 50000 ayl/daq. tezlikda (15°C) sentrifugalanadi.
11. UF nurlari ostida DNK shprints yordamida tortib olinadi.
12. DNK ni etidiy bromididdan izoamil spirtida 5 marta ekstraksiya qilib tozalanadi.
13. DNK ni seziy xlordan TE buferida 10°C da 24 soat magnitli aralashtirgichda buferni bir necha marta almashtirib dializ qilish yo'li bilan tozalanadi.
14. DNK miqdorini spektrofotometrda 260 nm to'lqin uzunligida kvarsli kyuvetada o'lchanadi.

B buferi:

0,2 M NaCl

0,05 M HCl pH 8,0

0,01 M EDTA

0.01 M DDT

0,2% SDS

Fenol, 0,1 M NaCl; 0,1 M tris HCl; pH 8,0; 0,01 M EDTA bilan to'yintirilgan.

Xloroform: izoamil spirti (24:1)

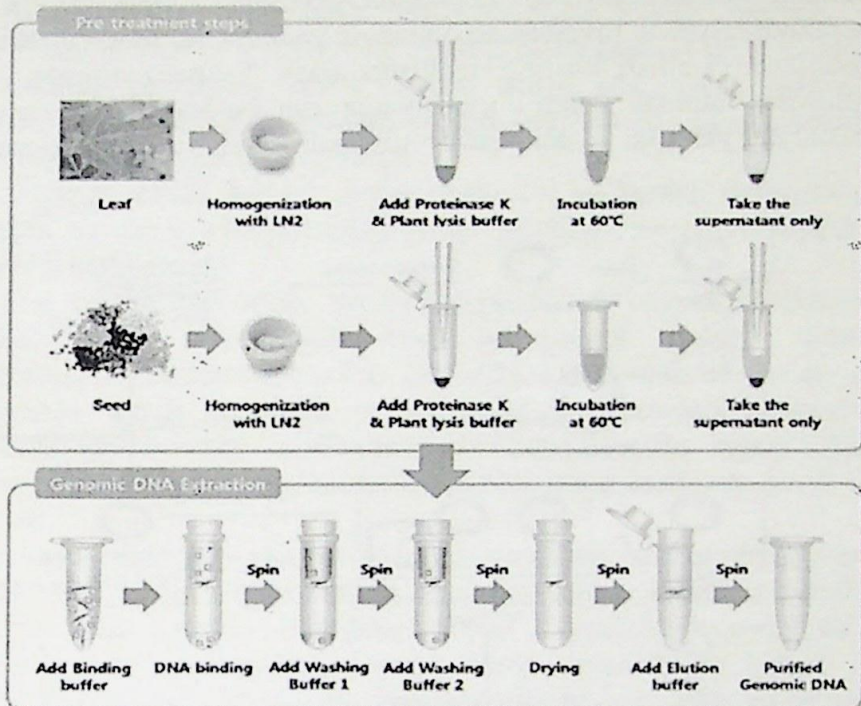
TE buferi 10 mM tris HCl, pH 8,0.

1 mM EDTA

4,5 seziy xloridning TE buferda eritmasi

Etidiy bromid eritmasi 10 mg/ml

Dializ uchun bufer: 10 mM tris pH 8,0; 1 mM EDTA.



11-raşm. O'simlik xujayrasidan DNK ajratish

Nazorat savollari:

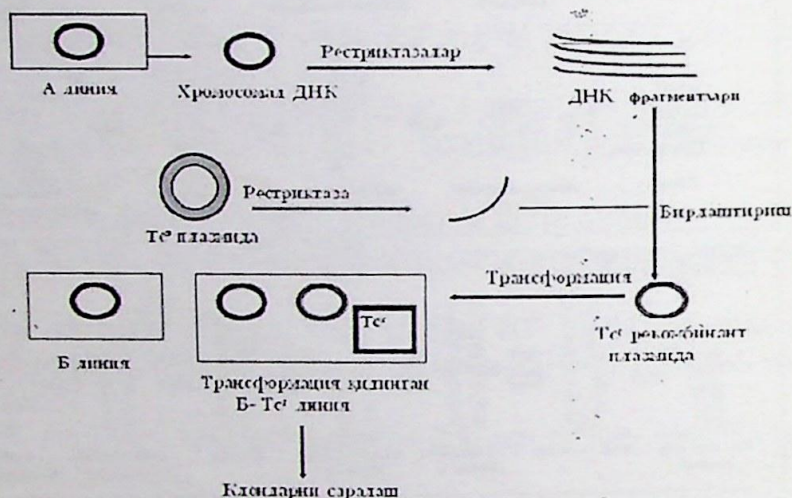
1. DNK molekulasidan nusxa olish nima deb ataladi?
2. Mutatsiyaga uchragan DNK molekulasini asl holatiga qaytishi qanday jarayo deyiladi?
3. DNK ajratib olish bosqichlarini sanab o'ting.

3 – ish. Bakteriya hujayrasidan plazmid DNK sini ajratish

Asbob-uskunalar va materiallar. Avtomatik mikropipetkalar, shtativga joylashtirilgan pipetka poynaklar (nakonechniklari), mikrotsentrifuga, mikrotsentrifuga probirkalari, maydalangan muz bo'laklari, suvli hammom, muzlatgich (-20°C va 80°C), sovutgich, elektron taroz, magnitli aralashtirgich, mikser, shpatel, pinsetlar, skalpel, qaychi, bakterial sirtmoq va spirt lampasi.

Mavzuni tushuntirish. O'tgan asrning 70-yillarida biotexnologiyada yangi tajriba texnologiyasi-genetik (gen) muxandislik yaratildi. Bu

usulning asosida hujayradan tashqarida rekombinant DNK yaratish yotadi. Bu texnologiyadan foydalanish oqibatida genlarni sof holda ajratish, ularni modifikatsiya qilish, birini ikkinchisiga ulash, "genlar majmuasi" yaratish, oqibatida butunlay yangi xususiyatga ega bo'lgan oqsil sintez qilish imkoniyati yaratildi va uni oqsillar muhandisligi deb ataldi (12-rasm).



12-rasm. Plazmida DNK si va bakteriya hujayrasidan foydalanib genni klonlash chizmasi

Bakteriyalarda xujayra xromosoma DNK sidan tashqari xalqasimon tuzilishga ega bo'lgan DNK molekulari bo'lib, ular plazmidlar deyiladi. Plazmidlar tarkibida zaharlli moddalarga, antibiotiklarga chidamlilik geni mavjud. Ular mustaqil ravishda replikasiyalana oladi. Shu xususiyati tufayli plazmidlardan gen muxandisligida vektor sifatida foydalanish mumkin. **Plazmidlarni ajratish asosan 3 ta bosqichdan iborat.**

1. Bakteriya xujayralarni parchalash (lisis) qilish.
2. Plazmid DNK sini xromosoma DNK sidan ajratish.
3. Plazmid DNK sini xujayra RNK sidan va oqsillardan tozalash.

Vektor gen bilan ligaza fermenti yordamida birikkandan keyin rekombinant DNK hosil nobud bo'ladi. Keyin, bu birikma (vektor gen) mikroorganizm hujayrasiga yuboriladi (transformasiya) va u erda amplifikatsiya (ko'payish) amalga oshadi.

Natijada bir genning bir necha nusxasi – klon paydo nobud bo'ladi. Shuning uchun ham bu yo'lni **klonlash** deb ataladi.

Bu usulda bakteriyalarga klonlashtirilgan inson, hayvon yoki o'simliklar genlari to'g'ridan-to'g'ri bakteriyada faoliyat ko'rsata olmaydi.

Bunday genlarning ishlab ketishi uchun esa, ularni bakteriyadan ajratish, bakteriya genini boshqaruvchisi (regulyatori) bilan jihozlash va qaytadan bakteriyaga kiritish zarur.

Bugungi kunda har xil genlar saqllovchi va kerakli mahsulot sintez qiluvchi bir qator transgen bakteriyalar yaratilgan va muvaffaqiyat bilan ishlatilib kelinmoqda.

Shu sababli ham tabiiy shtammlar yordamida olinadigan mahsulotlar (birinchi, avlod mahsulotlari) bilan bir qatorda transgen shtammlar yordamida rekombinant oqsillar (ikkinchi avlod mahsulotlari)ni sanoat miqyosida ishlab chiqarish yo'lga qo'yilgan. Biologik mahsulotlarni uchinchi avlodi-tabiiy oqsillarning vazifalarini to'liq bajara oladigan, ammo tabiiy bo'lmagan mahsulotlarni sintez qilish natijasida paydo nobud bo'ladi.

Gen muxandisligi usullari (rekombinant DNK texnologiyasi) tibbiyot uchun zarur bo'lgan qimmatbaho oqsil moddalari ishlab chiqarish yoki ko'p tonnalik oqsil moddalari ishlab chiqarish jarayonlarida keng qo'llanib kelinmoqda. Eng avvalo, inson organizmida sintez nobud bo'ladigan va dorivor modda sifatida ishlatiladigan oqsil va peptidlarni sintez qilishni yo'lga qo'yish katta ahamiyat kasb etadi.

Gen muxandisligi muammolari bilan shug'ullanadigan omillarni asosiy vazifalaridan biri ham shunday birikmalarni etarlicha sintez qila oladigan bakteriyalar shtammlarini yaratishga bag'ishlangan. Bu jarayonning asosiy qiyinchiliklari, shtamm yaratish bilan bog'liq emas, balki, yaratilgan shtammda sintez qilingan oqsil moddalarini kerakli me'yorda ushlab turish, ularni modifikatsiyaga uchrab, mikroorganizm hujayrasida parchalanib ketmasligi uchun sharoit yaratish bilan ham uzviy bog'liqdir.

Ishning borishi.

1. Oziqa muhiti quyilgan steril Petri likobchalariga o'zida rekombinant plazmida saqlagan *Escherichia coli* bakteriyasi ekiladi va kachalkada kechasi 37° S haroratda o'stiriladi.
2. O'stirilgan bakteriya kulturasi suspenziyasini 1,5 ml dan mikrotsentrifuga probirkalariga quyiladi va 2 daqiqa davomida 12000 aylana/daqiqa tezlikda sentrifugalanib, hujayra ajratiladi.
3. Supernatant yo'qotiladi va 100 mkl (mikrolitr) lizislaydigan eritmada hujayralar resuspendirlanadi hamda 5 daqiqa muzda qoldiriladi.

4. 2000 mkl DSN ishqor quyiladi va ehtiyotlik bilan suspenziya tiniq hamda yopishqoq xolga keluncha aralashtiriladi va 5 daqiqa muzda qoldiriladi.
5. 150 mkl 3 M natriy atsetat (pH 4,8) dan qo'shib probirka DNK to'plami hosil bo'lguncha bir necha marta to'ntariladi va muzda 10 daqiqa qoldiriladi.
6. Mikrotsentrifugada 10 daqiqa davomida sentrifugalanadi (natijada cho'kma ustida tiniq suyuqlik yuzaga keladi) va supernatant yangi probirkaga solinadi.
7. Supernatantga 1 ml sovuq (-20°C) etanol qo'shib, yaxshilab aralashtiriladi va quruq muzli etanol bor hammomiga 15 daqiqaga joylashtiriladi.
8. 12000 aylana daqiqa tezlikda 10 daqiqa sentrifugalanib pretsipitat yig'iladi.
9. Supernatant ehtiyotlik bilan ag'darib olinadi va cho'kma 100 mkl TE – buferda eritiladi.
10. Fenol/xloroform aralashmasidan 100mkl qo'shib, yaxshilab aralashtiriladi va 12000 aylana/daqiqa tezlikda 10 daqiqa sentrifugalanib fenol hamda suvli fazalari ajratiladi.
11. Yuqoridagi suvli fazani toza probirkaga ajratib olinadi, 100 mkl xloroform qo'shiladi, aralashtirib, 12000 aylana/daqiqa tezlikda 2 daqiqa davomida sentrifugalanib, ikkita faza ajratib olinadi.
12. Tarkibida xloroform bo'lgan pastki faza olib tashlanadi va supernatantning qolgan qismiga 2 M natriy atsetat (pH 5,6) dan 10 mkl qo'shiladi.
13. Sovuq etanol (-20°C) dan 1 ml qo'shib, aralashtiriladi va quruq muzli etanol bo'lgan hammomga 15 daqiqa inkubatsiyaga qo'yiladi.
14. 12000 aylana/daqiqa tezlikda 10 daqiqa sentrifugalanib pretsipitat yig'iladi va supernatant yo'qotiladi. 70% etanoldan 1 ml qo'shib va yana 5 daqiqa sentrifugalanadi.
15. Cho'kma ustidagi suyuqlik to'kib tashlanib, vakuum ostida DNK quritiladi va H_2O dan 50 mkl solib eritiladi.

Nazorat savollari:

1. Plazmid DNK qanday tuzilishga ega?
2. Plazmid DNK qancha genni o'zida saqlaydi?
3. Plazmidlarni ajratish necha bosqichdan iborat?

4 – ish: Agarozali gelda DNK elektroforezi

Asbob-uskunalar va materiallar. Elektroforez apparati, gelda chuqurcha hosil qiluvchi taroqcha, doimiy tok manbai, 120 ml 0,8% li agaroz, 0,5 l elektroforez buferi, antikonveksion eritma (namuna miqdoridan 1/4 - 1/5 mg/ml) 300 ml etidiy bromidli bo'yovchi modda (0,5 mg/ml), rezina qo'lqop, ximeskop, fotoapparat, sariq yoki sabzi rangli filtr, ob'ektiv uchun uzunlashtiruvchi xalqa, plyonka, foto bochka, standart proyavitel va standart mustahkamlovchi (13-rasm).

Mavzuni tushuntirish. DNK agarozali gel elektroforezida molekulalarining o'lchamiga va konformatsion holatiga qarab bo'linadi. DNK molekulalarining geldagi yurish tezligi uning o'lchami logarifimiga teskari proporsionaldir, demak ularning molekulyar og'irligiga ham berilgan kattalikdagi DNK molekulalarining gelda yurish tezligi-geldagi agaroz miqdoriga ham bog'liq. Molekulalarning samarali bo'linishi uchun agaroz miqdorini to'g'ri tanlash lozim. Buni 3-jadval bo'yicha amalga oshirish mumkin.

3-jadval

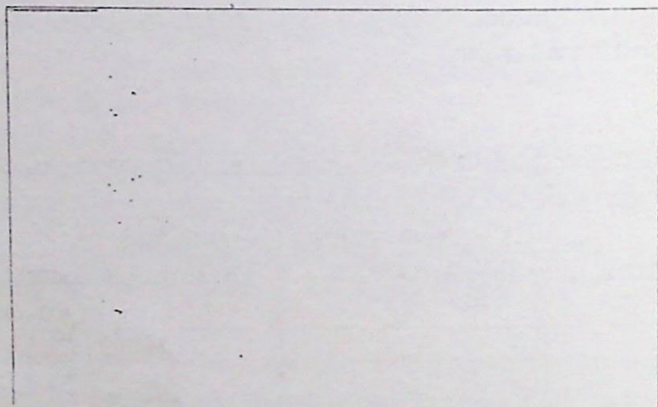
Turli o'lchamdagi DNK molekulalarining (to'g'ri shaklli, kovalent-tutashgan xalqali) samarali bo'linishi uchun ishlatiladigan geldagi agarozaning (%) miqdori

Agarozaning miqdori (%)	DNK molekulalarining o'lchami m.j.n. da
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

Bir xil kattalikdagi lekin turli konformatsion holatdagi DNK molekulalari, (buralgan yopiq halqali, ochiq halqali va liniyal shakllari) agaroz gelida turli tezlikda yuradi. Ulrning qiyosi elektroforetik harakati ma'lum darajada elektroforez qo'yish sharoitlariga buferning ion kuchiga, tok kuchiga va agarozaning miqdoriga bog'liq. Maxsus usullar yordamida DNK molekulalarining konformatsion holati bilan ularning geldagi joylashgan joyi orasidagi moslikni aniqlash mumkin. Ushbu amaliyotda ishlatiladigan elektroforezning standart sharoitida DNK ning kichik

molekulyar og'irlikdagi ($30 \cdot 10^6$ daltongacha bo'lgan) buralgan xalqasimon shakli katta bo'lmagan tezlikda xromosoma DNK sidan oldinda yuradi, katta molekulyar og'irlikga ($30 \cdot 10^6$ daltondan yuqori bo'lgan) ega bo'lgan molekulalari esa kamroq tezlikda yuradi va gelda xromosoma DNK sidan yuqorida joylashadi.

Ishning borishi. Eletroforez apparatini yig'ish. Agarozali gel elektroforez gorizontfal va vertikal qurilmalar yordamida olib borish mumkin. Aniq natijalar olish uchun gorizontaf qurilmalar oddiy tuzilishga ega bo'lib va ishlash uchun juda qulaydir. Qurilma organik shishadan yasalgan to'rtburchak idish (kyuveta) bo'lib, ikki chetida doimiy tok manbaiga ulanadigan platinali elektrodlar joylashgan nobud bo'ladi. Kyuveta tagiga apparatga quyiladigan buferning hajmini ko'paytirish uchun va gel bilan ishlashga qulayligi uchun organik shisha plastinka-taglik qo'yiladi.



13-rasm. Elektroforez

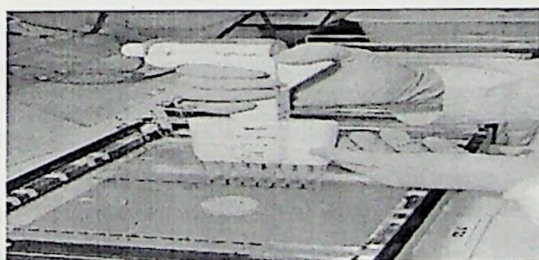
Agarozali gel tayyorlash. Kerakli miqdorda agaroz to'rtib olinadi va kerakli miqdorda bufer eritma solinadi va agar eriguncha (suv hammomida) qaynatiladi. Agaroz batamom erib ketganidan so'ng $50-55^{\circ}\text{C}$ gacha sovitiladi, tezda plastinka taglikka quyiladi va chuqurchalar hosil qilish uchun taroqcha (grebenka) qo'yiladi. Taroqchani shunday qo'yish kerakki taroq tishlari gel quyilgan bilan plastinka tagiga 0,5-1 mm oraliq qolsin. Gel qotganidan so'ng (30-40 daq. xona haroratida) taroqcha geldan sekin olinadi va elektroforez apparatiga joylab elektroforez buferi geldan 2-3 mm yuqorigacha to'ldiriladi.

DNK namunalarini gelga solish. DNK namunalari antikonveksion eritma bilan aralashtiriladi, avtomat pipetkalar (20-200 mkl) yordamida gelga ehtiyotkorlik bilan solinadi. Antikonveksion eritma tarkibida bo'yovchi modda (bromid fenol ko'k-0,0025%) tutib, uning yurishiga qarab elektroforez jarayonining borishini kuzatish mumkin. Bundan tashqari yana saxaroza (40%) bo'lib u DNK namunasining elektroforez buferi bilan aralashib ketmasligini ta'minlaydi. Odatda namuna miqdorining 1/4 - 1/5 miqdoricha antikonveksion eritma solinadi.

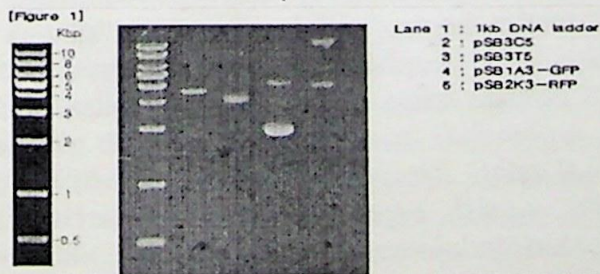
Namuna solingandan so'ng apparatning qopqog'i yopiladi, doimiy tok manbai yoqiladi va kerakli kuchlanish qo'yiladi (DNK gelga kirguncha 20 V so'ngra 100-120 V).

Elektroforez odatda ko'k bo'yoq gel oxiriga (1-2 sm qolgunicha) etgunicha olib boriladi. 0,5-0,7 % li agarozali gel elektroforezida kuchlanish 100-120 V bo'lganda 2 soat davom etadi.

Gelni bo'yash. Elektroforez tamom bo'lganidan so'ng qurilma tok tarmog'idan uziladi, gelli idishcha fotografiya kyuvetasiga olinadi va bromid etidiy (0,5 mkg/ml distillangan suvda) solinadi va 40-60 daqiqa davomida bo'yaladi. So'ng bo'yog'i to'kiladi (albatta rezina qo'lqop bilan ishlash kerak), gel distillangan suvda chayiladi va (shisha ko'zoynak taqqan holda) transilluminatorida ko'riladi (14, 15-rasmlar).



14-rasm. Gelni bo'yash



15-rasm. Rasmi olingan gel

Zarur bo'lgan hollarda gel rasmga olinadi. Buning uchun ochiq diafragma sariq yoki sabzi rang filtrlarida rasmga olinadi. Ekspozitsiya empirik tanlanadi (odatda 5-10 daq.). Gel akslanuvchi yoki o'tuvchi ultrabinafsha nurlarida (254 nm) ultrabinafsha nuri manbai tizimiga bog'liq ravishda yoritiladi.

Nazorat savollari:

1. Elektroforez apparatini yig'ish usularini sanab o'ting?
2. Gel qanday ranglarda bo'yaladi?
3. Nima maqsadda elektroforez qilinadi?

5 – ish. O'simlik hujayra va to'qmalarini o'stirish uchun oziqa muhitlarini tayyorlash

Asbob-uskunalar va materiallar. 1 litrli kimyoviy stakanlar (4 ta), boshlang'ich eritmalarni saqlash uchun og'zi zich yopiladigan shisha idishlar (1 litrli 3 dona, 100 ml li 1 dona), og'zi berkitiladigan kichik hajmdagi shisha idishlar (10 dona), 1 – 10 ml li pipetkalar, texnik va analitik tarozilar, elektroisitgich, turli xil kimyoviy moddalar (16-rasm).

Mayzuni tushuntirish. O'simlikdan ajratilgan hujayra va to'qmalar o'stiriladigan oziqa muhitda o'simliklarga kerakli hamma makroelementlar: azot, fosfor, kaliy, kalsiy, oltingugurt, magniy, temir va mikroelementlar: bor, rux, mis, kobalt, marganets, yod, molibden, Shuningdek vitaminlar, uglevodlar, karbon suvlar, fitogormonlar bo'lishi kerak. Ba'zi bir oziqa muhitlari tarkibida esa kazein gidrolizati va ayrim aminokislotalar bo'lishi kerak. Bundan tashqari, oziqa muhiti tarkibiga, hujayralarning temirga bo'lgan ehtiyojini turli pH ko'rsatgichlarda qondirish uchun EDTA (etilendiamin-tetrasirka kislota) yoki uning natriyli tuzi kiritilishi kerak. Ajratilgan hujayra va to'qmalar o'stiriladigan oziqa muhitning asosiy tarkibiy qismini uglevodlar tashkil qiladi, chunki hujayra va to'qmalar avtotrof oziqlanish qobiliyatiga ega emas. Ko'pgacha uglevod manbai sifatida saharoza yoki glyukozaning 20-40 g/l eritmasi qo'llaniladi. Uglevodli oziqa manbai sifatida polisaharidlar ishlatilmaydi, chunki ba'zi to'qmalar, asosan o'simlik faol gidrolitik fermentlarga (amilaza va boshqalar) ega bo'lib, kraxmal eritmasi bor oziqa muhitlarida o'sishi mumkin. O'simlik regulyatorlari hujayralar dedifferensirovkasi va hujayra to'qmalari induksiyasi uchun zarurdir. Shuning uchun kallusli to'qmalar olishda oziqa muhitlari tarkibiga auksin (hujayra dedifferensirovkasini yuzaga keltiruvchilar) va sitokinin

(dedifferensiyalangan hujayralarning bo'linishini induksiya qiluvchi) kiritish kerak. Poya morfogenizi induksiyasida oziqa muhiti tarkibida auksinning miqdori kamroq bo'lishi yoki umuman bo'lmasligi mumkin. Ikkala gormonlarga yoki ularning bittasiga nisbatan avtonomlik shu hujayralarning gormon ishlab chiqarish qobiliyatiga bog'liq. Auksin manbai sifatida oziqa muhitlarda 2,4-dixlor fenoksisirka kislotasi (2,4-D) 1-10 mg/ml; indolil sirka kislotasi (ISK) 1-30 mg/l; α -naftil sirka kislotasi (NSK) – 0,1-2 mg/l kabilar ishlatiladi. Ko'pincha 2,4-D ishlatiladi. ISK 2,4-D ga nisbatan 30 marta kam faollikka egadir. Kallusning rivojlanishi uchun ko'pincha auksinning yuqori miqdori ishlatiladi, to'qma keyingi qayta ekilganda auksinning miqdori bir necha marta kam bo'lganda ham o'sishda davom etaveradi. Sun'iy oziqa muhitlarida sitokinin manbai sifatida kinetin, 6-benzilaminopurin (6-BAP) va zeatin (0,001-10 mg/l) qo'llaniladi. To'qmalarning o'sishida va organogenez induksiyasida 6-BAP kinetinga nisbatan yuqori faollikni namoyon qiladi. Ba'zi oziqa muhitlari tarkibiga adenin kiradi.

Auksin va sitokininlardan tashqari ba'zi oziqa muhitlari tarkibiga gibberal kislotasi (GK) qo'shiladi. Oziqa muhitida GKning bo'lishi shart bo'lmasa ham, ba'zi hollarda u izolyasiyalangan to'qmalarning o'sishini tezlashtiradi. Birlamchi kallus induksiyasini va uning o'sish faoliyatini tezlashtirish uchun oziqa muhitiga o'simlik ekstraktlari yoki sharbatlari qo'shiladi. Kokos suti – kokos yong'ogi suyuq endospermi o'sish tezligini oshirish xususiyatiga ega. Qattiq oziqa muhitni tayyorlashda dengiz suv o'tlaridan olinadigan polisaharid, agar-agardan foydalaniladi. "*Bacto agar*" nomli bakterial agarda keraksiz qo'shimchalarning miqdori kamroq nobud bo'ladi. Bunday agarlarni qattiq oziqa muhit tayyorlashda tozalamasdan ishlatish mumkin. Odatda qattiq oziqa muhiti tayyorlashda 5-7% agardan foydalaniladi. Vaqtdan unumli foydalanish uchun makro-, mikrotuzlar va vitaminlarning eritmaları yuqori miqdorda boshlang'ich eritma holda tayyorlanib, ularni ko'p marta suyultirib ishlatish mumkin. Konsentrlangan eritmalar muzlatgichda saqlanadi, vitaminli eritmalar minusli haroratda saqlanadi. Makrotuzlar eritmaları 10-20 marta ko'p miqdorda, mikrotuzlar eritmaları 100-1000 marta ko'p miqdorda, vitaminlar eritmaları esa 1000 marta ko'p darajali miqdorda tayyorlanadi. Har xil turlarga mansub o'simliklar hujayralari, to'qmalari va organlarini o'stirishda turli tarkibdagi oziqa muhitlaridan foydalaniladi. Ko'pincha Murasige-Skuga (4-jadval), Uayt, Gamborga (B-5) oziqa muhitlari ishlatiladi. Murasige-Skuga oziqa muhitlaridan turli modifikatsiyalar bilan

apikal meristemalar o'stirishda va o'simliklarni mikroko'paytirishda foydalanish mumkin.

Ishning borishi. Kartoshka va qulupnayning apikal meristemalarini o'stirish uchun moslashtirilgan (modifikatsiyalangan) Murasige-Skuga oziqa muhitlarini tayyorlash. Oziqa muhitlari tarkibi 4-5 jadvallarga berilgan. Avvalo makro, mikrotuzlar va vitaminlarning boshlang'ich eritmalarini tayyorlash kerak. Odatda, Murasige va Skuga oziqa muhitlari quyidagi birikmalardan tayyorlanadi.

1. NH_4NO_3 , KNO_3 , KN_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MgSO_4 ni cho'kmaga tushishini oldini olish uchun, qizdirmasdan oxirida solinadi);
2. CaCl_2 eritmasi;
3. Temir xelati eritmasi (FeSO_4 va Na_2EDTA eritmasi birgalikda qaynagunga qadar qizdirilganda temir xelati hosil nobud bo'ladi);
4. Mikro elementlar eritmasi.

Boshlang'ich eritmalar uchun kerakli tuzlar miqdori va boshlang'ich eritmalarining oziqa muhit uchun kerakli miqdorlari 4-jadvalda keltirilgan.

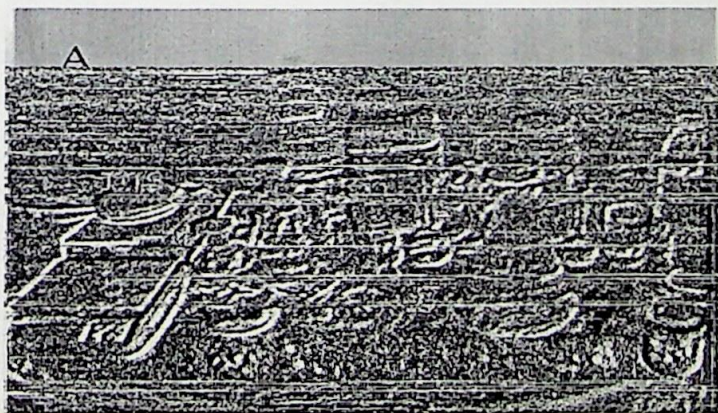
Tayyorlangan eritmalarini og'zi zich yopiladigan idishlarga solib, qog'oz yorliq yopishtirib, muzlatgichda saqlash lozim. Temir xelati to'q rangli shisha idishda saqlanadi. Vitaminlarning o'ta to'yingan eritmaları alohida-alohida tayyorlanadi va pensillin idishlarida saqlanadi (17-rasm). Eritmalar tayyorlash uchun vitaminlar o'n martalik og'irlikda o'lchanib 10 ml suvda eritiladi. Shu eritmaning 1 ml miqdori 1 litr Murasige-Skuga eritmasini tayyorlash uchun etarlidir. Endi boshlang'ich eritmalaridan foydalangan holda keyingi darslarda kartoshka va qulupnay apikal meristemalarini o'stirish uchun oziqa muhitlari tayyorlash kerak. O'lchami 1 litrli kimyoviy stakanga saharoza solib idishning yarmigacha distillangan suv quyib isitiladi, saharoza erigandan so'ng, xona haroratigacha sovutiladi va unga makro, mikrotuzlarning boshlang'ich eritmaları va vitaminlar kerakli miqdorda solinadi (4 jadval).

4-jadval

O'simlikning ajratilgan to'qimalarini kulturalash uchun oziqa muhitlar tarkibi

Oziqa muhiti komponentlari	Konsentratsiyasi mg/l			
	Murasiga- skuga	Gamborga	SHenka- xildebrandt	Gressxoff- dou
NH_4NO_3	1650	2500	2500	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	300	—
KNO_3	1900	2500	—	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
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	—	134	—	—
KH_2PO_4	170	—	—	—
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	28,0	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150	—	90,0
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
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Glitsin	2,0	—	—	2,0
Mezoinozit	100	100	1000	10
Nikotin kislotasi	0,5	1,0	5,0	1,0
Piridoksin –HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Tiamin-HCl	0,1	10,0	5,0	—
2,4-dixlorfenok-sirka kislotasi (2,4-D)	—	2,0	—	—
Kinetin	—	—	0,1	—
Glutamin	—	—	—	2,0
Saxaroza	30 000	20 000	30 000	20 000



16-rasm. Oziqa muhiti tayyorlashda ishlatiladigan asbob va idishlar



17-rasm. Oziqa muhiti tayyorlashda ishlatiladigan preparatlar

Kartoshka apikal meristemasini o'stirish uchun oziqa muhitga aktivlangan ko'mir va regulyatorlar: GK, kinetin, adenin solinadi. Gibberal kislotasi bir necha tomchi spirtga eritilib, ozgina suv qo'shiladi va oziqa muhitga solinadi. Sitokininlar suvda yaxshi erimaydi, balki ishqor, kislota, etil spirti va etil efiri eritmalarida yaxshi eriydi. Sitokinin eritmaları tayyorlash uchun gormonlarga ozgina (3-5 ml) distillangan suv, 0,5-1 ml 0,1 N KOH qo'shib aralashtiriladi va eriguncha isitilib, so'ngra oziqa muhitga solinadi. So'ng albatta eritmaning pH i o'lchanadi, pH ko'rsatgichi 5,5-5,6 atrofida bo'lishi kerak. Eritma pH normaga to'g'ri kelmagan hollarda oziqa muhitga 0,1 M HCl eritmasidan qo'shiladi. Bir vaqtning o'zida boshqa stakanga agar-agar eritiladi. Buning uchun suvda ivitilgan agar (7 g) elektroisitgichda to'liq erigunga qadar qizdiriladi va harorat 50° C ga tushguncha saqlab turiladi. So'ng agarni, tuzlar, vitaminlar va saxaroza bilan birga idishga solib, eritmaning hajmini suv bilan 1 litrga etkazish kerak. Oziqa muhitini probirkalarga solib (taxminan 1/3 hajmda), probirkalar og'zi paxta probkalar bilan yopiladi. Oziqa muhitlari avtoklavda sterillanishi kerak.

Nazorat savollari:

1. O'simlik xujayra to'qimalarini o'stirish uchun qanday oziqa muhitlari ishlatiladi?
2. Termoterapeya va xemoterapiya usuli nima?
3. O'simlik xujayra va to'qimalarini o'stirish uchun qaysi mikro va makro elementlardan foydalaniladi?

6 – ish. Biotexnologiyada streillash usullari

Asbob-uskunalar va materiallar. Petri likopchalari (3 dona, bittasi filtr qog‘ozi), 300-500 ml kimyoviy stakanlar (2 dona), 1 l distillangan suv solingan kolba, Murasige-Skuga oziqa solingan, gormon qo‘shilmagan va gormon qo‘shilgan (2,4-D-2, kinetin-0,2 mg/l), oziqa muhitlari, pensitlar, skalpellar (2 dona), kraft qog‘oz, selofan, yo‘g‘on ip, qaychi va filtr qog‘oz.

Mavzuni tushuntirish. Ajratib olingan to‘qimalar bilan ishlashni asosiy sharti – sterillikka qat’iy rioya qilishdir. Tarkibi boy bo‘lgan oziqa muhiti mikroorganizmlarni rivojlanishi uchun ham juda yaxshi substrat hisoblanadi, o‘simliklardan ajratib olingan fragmentlar (eksplantlar) oziqa muhiti bilan aralashtirilganda mikroorganizmlar ta’siriga tez uchraydilar. Shuning uchun ham eksplantni ham, oziqa muhitini ham sterillash kerak.

Ajratilgan hujayralar va to‘qimalar bilan qilinadigan barcha nozik ishlar (manipulyasiya) aseptik sharoitda (laminar-bokslarda) sterillangan uskunar yordamida bajariladi. Ajratilgan to‘qimalarni o‘stirish davrida ham sterillikni saqlash kerak, ayniqsa harorat va namlik o‘zgarganda, chunki probirkalarni paxta-bintdan tayyorlangan tiqinchalari nam-lanadi va undan mikroorganizmlar oson o‘tadi.

Eksplantni sterillanishi, Shuningdek urug‘lar 5-20 daqiqa davomida sterillovchi eritmada ushlab turib, keyin esa steril suv bilan yuvib tashlash orqali amalga oshiriladi. Sterillanish davri eksplantni harakteriga hamda eritmani sterilizatsiya qilish xususiyatiga bog‘liq. Odatda urug‘ 10-20 daqiqa, vegetativ qismlar esa 5-10 daqiqa davomida sterillanadi. Sterillovchi eritmalar 5-jadvalda ko‘rsatilgan.

Eksplant olinmoqchi bo‘lgan o‘simlik organi, dastlab sovunli suv bilan shetkalar yordamida yaxshilab yuviladi va distillangan suv bilan chayib tashlanadi, keyin esa bir necha sekund davomida 70 % li etanolga botirib olinadi. Urug‘lar spirtida 1-2 daqiqa ushlab turiladi. To‘qimalarga spirt bilan ishlov berish, uni sterillash xossasidan tashqari, asosiy sterillovchi eritmani ta’sirini kuchaytirishi bilan ham bog‘liq.

Sterillashdan keyin o‘simlik ob’ektlari sterillangan suv bilan tozalab yuvib tashlanishi kerak. Sirtqi sterillash eksplantni faqat tashqi infeksiyadan ozod qiladi. Agar eksplant to‘qimalari ichki infeksiyaga ega bo‘lsalar, ularga antibiotiklar bilan ishlov berishga to‘g‘ri keladi. Ayniqsa, ichki infeksiyaga yirik tomirli tropik va subtropik o‘simliklar boy bo‘lishadi. Kulturalarni zamburug‘lar yoki bakteriyalar bilan ifloslanishi ekilgandan 1-14 kun o‘tganda ko‘zga tashlanadi. Yorug‘lik xonasidagi

havoni ifloslanishdan saqlash uchun ifloslangan kulturani darhol yo'qotish kerak.

5-jadval

Dastlabki o'simlik materiallarini sterillash
(R.G.Butenka, 1990 yil)

Manba	Sterilizatsiya vaqti, daqiqa			
	0,1% li diatsid	0,1% li kumush xlorid (AgCl_2)	5-9% li gipoxloritlar (Na, Ca)	10-12% li vodorod peroksidi (H_2O_2)
Urug'lar				
quruq	15-2	10-15	15-20	12-15
namlangan	6-10	6-8	10-15	6-8
To'qimalar				
sutli ildiz, ildizmeva	20-3	15-25	15-20	-
daraxtlangan poya	20-4	20-25	20-25	-
barglar	1-3	1-3	3-6	3-5
apekslar	1-10	1-7	3-15	2-7

Oziqa muhitlarini avtoklavda 120°C da 0.75 – 1,0 atm. bosimda 20 daqiqa davomida sterilizatsiya qilinadi. Agar oziqa muhiti tarkibiga yuqori haroratda parchalanadigan moddalar kirsa, ular alohida sovuq sterillanadi. Ularni teshiklar diametri 0,22–0,45 mkm bo'lgan bakterial filtrlardan o'tkaziladi va avtoklavdan chiqqan oziqa muhitini 40°C gacha sovutib, keyin ularni aralashtiriladi. Oldindan folgaga (alyumin qog'oi) yoki o'raydigan qog'ozga o'ralgan idishlarni quruq issiq bilan quritgich shkaflarida 160°C da ikki soat davomida sterillanadi.

Laminar-boksni sterillash. Laminar-boks ajratilgan to'qma, hujayralarni o'stirish va boshqa steril sharoitni talab etuvchi ishlarni bajarish uchun mo'ljallangan. Bu erdan steril sharoit laminar-boksga o'rnatilgan havo o'tkazadigan bakterial filtrlar yordamida amalga oshiriladi. Ish boshlanishidan 2 soat oldin laminar-boksdagi ultrabinafsha nurli bakteritsid lampasi yoqib qo'yiladi. Laminar-boksga lampa yoqmasdan spirt lampasini, gugurtni, 96% li spirt solingan chinni shkan, steril suv, binokulyar lupa kiritib qo'yiladi. Laminarni ichini, lupani, spirt lampasini, oziqa solingan probirka spirtini 70% li spirt bilan aritiladi.

Ishlaydigan odam qo'lini sovun bilan yuvib, spirt bilan artadi, boshga sochni yopib turadigan selofan paket va steril xalat kiyishi kerak.

Idishlarni sterillash. Idishlar avval sovunli poroshok va xrompik (kaliy xromli sulfat kislotasi) eritmasi bilan yaxshilab yuviladi. Yuvilgan idishlar distillangan suvda chayilgandan so'ng quritish shkafiga quritiladi. Sterillangan idishlarni qayta ifloslanishiga yo'l qo'ymaslik uchun idishlar qog'ozga o'raladi.

So'ngra idishlar quritish shakafiga joylashtirilib 2 soat davomida 160° C haroratda saqlanadi. Bu davr ichida faqat bakteriyalar emas balki ularning sporalari ham nobud bo'ladi. Harorat 175° C dan yuqori bo'lmasligi kerak, chunki paxtadan yasalgan probkalar kuyib qo'ng'ir tusga kiradi, idishlar o'ralgan qog'oz esa kuyib maydalanib ketadi. Sterillash uchun avtoklavdan foydalanish bu jarayonni yanada sifatli amalga oshirishga imkon beradi, chunki yuqori haroratli par ta'sirida mikroorganizmlar ham ularning sporalari ham nobud bo'ladi. Idishlar folgaga yoki qog'ozga (qog'oz ustidan selofan) o'raladi. Pipetkálarni tepadagi teshigiga paxta tiqilib qog'ozga o'raladi va bu idishlar 2 atmosfera bosimda 25-30 daqiqa davomida avtoklavda sterillanadi.

Asbob uskunalarini sterillash. Uskunalarini (skalpel-larni, pinsetlarni, ignalarni va boshqalarni) oldindan sterillash 140° C haroratda quritish shkaflarida 2 soat davomida quruq par yordamida amalga oshiriladi shpirlar va qaychilarni qaynatish qulay. Metal uskunalarini avtoklavda sterillash tavsiya etilmaydi, chunki ular zanglashi va o'tmaslanib qolishi mumkin. Ish boshlanishidan oldin uskunalarini (skalpellarni, pinsetlarni, ignalarni) laminarda chinni idishdagi 96% spirtga botirib spirt lampasi alangasida yana bir bor sterillanadi. So'ngra uskunalar oldindan sterillanib qo'yilgan qog'oz varaqlari orasiga joylashtirilib qo'yiladi. Bu steril uskunalar bir marta ishlatilishi lozim. Ikkinchi bor ishlatiladigan bo'lsa, u holda uskunalarini yana spirt yordamida kuydiriladi. Juda ingichka uskunalar (igna, lezviylar) kuydirilganda o'z xususiyatini yo'qotganligi sababli ular faqat spirtga solish yo'li bilan sterillanadi.

Materillarni sterillash. Paxta, doka, paxtadan yasalgan probkalar, filtr qog'ozlar, xalatlar, rumollar, avtoklavda 2 atmosfera bosim ostida 25-30 daqiqa davomida sterillanadi.

O'simlik materiallarini sterillash. Urug'larni, o'simlikni turli a'zolaridan olingan uchki meristema va o'simlik to'qmalarini sterillash uchun quyidagi eritmalar ishlatiladi: 0,1% li sulema, 0,1% li diatsid, 13-20% li perigidrol, 3-6 li xloramin, 10% li natriy yoki kalsiy gipoxlorid ishlatiladi.

Diatsidni tayyorlash uchun 300 ml issiq suvda 330 mg etanolmerkursorid va 660 mg setilpiridin xloridni har birini alohida eritib olinadi hamda ularni qo'shib suyuqlik hajmi 1 l ga etkaziladi, so'ngra bir necha tomchi detergent sifatida tvin-80 qo'shib, mahkam yopilgan kolbada qorong'i joyda saqlanadi.

O'simlik to'qmasi sterillashdan oldin tozalanadi. Ildiz-mevalar, tuganaklar, o'simlikning seret poyalari oqib turgan iliq suvda uetka yordamida sovunlab yaxshilab yuviladi. Ildiz va ildizmevalarning po'sti archiladi. Barglarning po'sti distillangan suv bilan yuvilib, bir necha sekundga (urug'lar 1-2 daqiqaga) 70% li spirtga botirib olinadi. To'qmalarga spirt bilan ishlov berish sterillashni samarasini oshiradi. So'ngra o'simli ob'ekti ko'p marta steril suv bilan yuvib tashlanadi. Pergidrolni fasol, lyupin, kungaboqar (po'sti olingan) ni sterillash uchun, sulemani esa pomidor, qovoq va boshqalar uchun tavsiya etiladi. Sulemada urug'lar 10-15 daqiqa, pergidrol 30 daqiqa ushlab turilishi kerak.

Meristema va to'qma bo'laklarini sterillash uchun esa ikki barobar kam vaqt talab etiladi. Tukli g'o'za chigitini sulfat kislotasiga 5 daqiqa botirib turishi kerak. Perigidrol bilan ishlov berilganda urug'larni yuvish osonroq. Sulema va diatsid bilan sterillangan urug'lar 5-6 marta steril suv bilan yuvib tashlanadi.

Pomidor, olma, qovoq, dukaklilar va tamaki urug'lari etli, yog'ochli va qattiq po'st bilan qoplanganligi sababli ular sovunli suv va bir necha marta spirt bilan yaxshilab yuvib tashlanadi. So'ngra steril sharoitda mevalar qirg'iladi. Steril pinset bilan urug'lar steril Petri likobchalariga undirish uchun joylashtiriladi.

Oziqa muhitlarini sterillash. Oziqa muhiti quyilgan probirkalarning og'zi probka bilan maxkam berkitiladi va ustidan selofan bilan yopiladi hamda 120°C haroratda 1 atmosfera bosim ostida 20 daqiqa davomida sterillanadi.

Sovuq sterillash. Yuqori haroratga chidamsiz bo'lgan organik suyuqliklarni bakteriyalardan xalos qilish ularni teshikchalarning diametri 0,45 mkm bo'lgan bakterial filtrlardan o'tkaziladi.

Ishning borishi. Steril o'simta va kallus to'qmalarini olish bo'yicha qilinadigan ishlarni amalga oshirish uchun asbob-uskuna, idish va oziqa muhitlarni sterillash zarur.

1. Petri likobchalari (2 dona), 300-500 ml li kimyoviy stakanlar (2 dona), qalin qog'ozga o'ralib, quritish shkafida 160°C haroratda 2 soat davomida sterillanadi.

2. Skalpel va pinsetlarni qalin qog'ozga o'rab yuqoridagi sharoitda quritish shkafida sterillanadi.

3. Qog'ozdan qilingan matraschalar va distillangan suv solingan kolba avtoklavda sterillanadi. Buning uchun matraschalar qalin qog'ozga va sirtidan selofanga o'raladi. Kolbani esa og'zi probka bilan berkitilib, ustidan qog'oz va selofan bilan o'raladi. Bular 2 atmosfera bosimda 30 daqiqa davomida avtoklavda sterillanadi.

4. Og'zi probka bilan berkitilgan oziqa muhit solingan probirkalar 1 atmosfera bosimda 20 daqiqa davomida avtoklavda sterillanadi.

Nazorat savollari:

1. O'simlik namunalarini sterillash usullarini sanab o'ting?
2. Oziqa muxitlarni qancha haroratda sterillanadi?
3. Sovuq sterillash qanday amalga oshiriladi?

7-ish. *In vitro* sharoitida o'simliklarni klonli mikroko'paytirish

Urug'li o'simliklar ikki xil yo'l bilan: urug'dan va vegetativ yo'l bilan ko'payadi. Bu ikkala yo'lni ustivorligi ham kamchiligi ham bor. Urug'dan ko'payishning kamchiligiga eng avvalo, olingan ko'chatlarni genetik xilma-xilligi va yuvenil (urug'dan chiqqan maysadan yoki vegetativ kurtakdan reproduktiv organlar hosil qilish) davrining uzunligini ko'rsatish mumkin.

Vegetativ ko'payishda ona o'simlikni genotipi saqlanib qoladi va yuvenil davr qisqaroq bo'ladi. Ammo ko'pchilik turlar (eng avvalo yog'och hosil qiladiganlar) uchun vegetativ ko'payish muammosi oxirigacha o'z echimini topgani yo'q. Bunga asosiy sabablar quyidagilar:

Birinchidan, ko'pchilik turlar (navlar) hattoki, yuvenil bosqichda ham vegetativ usulda kerakli samara bilan ko'payavermaydi (eman, tilog'och, yong'oqdoshlar va boshqalar);

ikkinchidan, ko'pchilik daraxtli o'simliklarni 10-15 yoshdan keyin, qalamcha yordamida ko'paytirish mumkin emas;

uchinchidan, har doim ham standart ekish materiali olish mumkin emas (yuqumli kasalliklar to'planishi va o'tishi mumkin);

to'rtinchidan, payvand qilish orqali katta yoshli (yog'ochli) o'simliklarni ko'paytirish juda ham qiyin va murakkab;

beshinchidan, yil davomida bir xil genetik materialni olish uchun ishlab chiqilgan texnologiyalar samaradorligining o'ta pastligidir.

Hujayra va to'qimalar kulturalari sohasida erishilgan yutuqlar vegetativ ko'payishni tubdan yangi bo'lgan usuli klonal mikroko'paytirish (*in vitro* sharoitida (probirkada), jinsiy bo'lmagan yo'l bilan, o'simliklarni dastlabki nusxasi bilan genetik bir xil bo'lgan navini yaratish) usulining yaratilishiga olib keldi.

Bu usul asosida o'simlik hujayralarigagina xos bo'lgan noyob xususiyat, totipotentlik xususiyati, ya'ni tashqaridan keladigan ta'sir orqali butun o'simlik organizmi hosil bo'lishiga turtki bo'lishi yotadi. Albatta, bu usulni boshqa an'anaviy usullardan ustunlik tomonlari juda ham ko'p: eng avvalo bu ustunliklar quyidagicha izohlanishi mumkin:

- *genetik bir xil ekuv materialining olinishi;*
- *meristema to'qimalari kulturalari ishlatilishi hisobiga o'simliklarni virusli va boshqa yuqumli kasalliklardan holi bo'lishi;*
- *ko'payish koeffitsientining yuqoriligi (o'tchil va gulli o'simliklar uchun 10^4 - 10^5 ; ninabargli o'simliklar uchun -10^4);*
- *seleksiya davrining qisqarishi;*
- *o'simlik rivojlanishshini yuvenil davrdan reproduktiv fazaga o'tishini tezlashishi;*
- *an'anaviy yo'llar bilan qiyin ko'payadigan o'simliklarni ko'paytirish;*
- *ishni yil davomida tashkil etish imkoniyatlarining mavjudligi va ko'chat materiallari o'stirish uchun kerak bo'lgan maydonni tejash;*
- *o'stirish jarayonini avtomatlashtirish imkoniyatlari va h.k.*

Klonal mikroko'paytirishni dastlabki muvaffaqiyatlari o'tgan asrning 50-yillari oxirida fransuz olimi Jorj Morel orxideya o'simligining regenerantini yaratganda erishilgan edi. Bu muvaffaqiyatga o'sha vaqtlarda yaratilgan, *in vitro* sharoitida o'simliklarni apikal meristemalarini ko'paytirish texnikasi o'z hissasini qo'shgan. Odatda olimlar birlamchi eksplant sifatida o'tchil o'simliklarni ustki meristemalaridan foydalanadilar, va oziqa muhiti tarkibini o'simlikni regeneratsiya va paydo bo'lish jarayonlariga ta'sirini o'rganadilar. Xuddi shu maqsadda chinnigul, xrizantema, kungaboqar, no'xat, makkajo'xori, qoqio't va boshqa o'simliklar o'rganib chiqilgan edi.

J.Morel o'z tajribalarida xuddi shunday qilib, simbidium (orhideyalar oilasiga mansub o'simlik)ni uchki qismini ishlatgan. U o'sib kelayotgan konussimon ko'rinishdagi va ikki-uch barg oldi elementlaridan iborat bo'lgan va undan ma'lum sharoitda qubballi, yumaloq-prokorimlar paydo bo'lishini kuzatgan edi.

Hosil bo'lgan (etilgan) protokormlarni bo'lish va ularni keyin alohida mustaqil ravishda, yangi tayyorlangan oziqa muhitida barg va ildiz paydo bo'lguncha o'stirishga erishilgan edi. Natijada J.Morel bu jarayonni chegarasiz ekanligini va shu yo'l bilan yuqori sifatli genetik bir xil, virussiz ekuv materialini juda ham ko'p miqdorda tayyorlash mumkinligini kuzatgan edi.

Rossiyada klonal mikroko'paytirish professor R.G.Butenko nomi bilan bog'liq. K.A.Temiryazev nomidagi o'simliklar fiziologiyasi institutida bu olimo o'z shogirdlari bilan, kartoshka, qand lavlagi, chinnigul va boshqa gullarni klonal ko'paytirish sharoitlarini ishlab chiqqan.

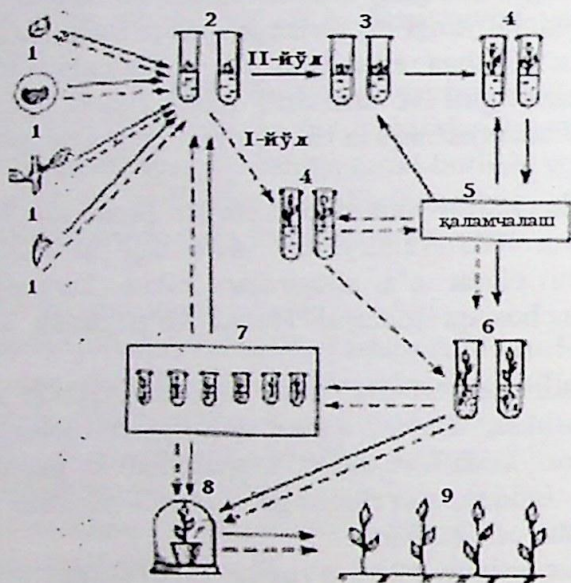
Mamlakatimizda bu usul ilmiy laboratoriyalarda sinab ko'rilmogda. Xususan, Toshkent Davlat Agrar universiteti biotexnologiya kafedراسi ilmiy laboratoriyasida kartoshkani klonal mikroko'paytirish usullari orqali kasalliklarga, issiqqa, sho'rlanishga chidamli navlarini yaratish bo'yicha ilmiy izlanishlar olib borilgan.

Shuni ham eslatib o'tish o'rinliki, mikroko'paytirishdan foydalanish doirasi juda keng bo'lib, kundan - kunga yanada oshib bormogda. Eng avvalo bu *in vitro* sharoitida o'simliklarni yog'ochli turlarini, nina bargli va ayniqsa, yo'qolib ketayotgan o'simliklar hamda dorivor o'simliklarni ko'paytirish maqsadida bu usuldan foydalanish katta samara berishi isbotlangan.

Klonal mikroko'paytirish jarayonini to'rt bosqichga bo'lish mumkin:

- birinchi – *donor o'simlikni tanlash, eksplantlarni ajratish va yaxshi o'sadigan steril kultura olish;*
- ikkinchi – *mikroko'paytirishni o'zi, meriklonlarni eng ko'p (maksimal) miqdorini olishga erishilgan davrni va sharoitni tanlash;*
- uchinchi – *ko'paytirilgan navdani ildiz olishi va ularni tuproq sharoitiga moslashtirish, kerak bo'lganda regenerant – o'simliklarni sovuq haroratda ($+2^0$, $+10^0$) saqlash;*
- to'rtinchi – *o'simlikni issiqxona sharoitida o'stirish va ularni maydonga chiqarib ekish yoki sotishga tayyorlash (18-rasm).*

Klonal mikroko'paytirishni ko'p usullari ma'lum. Ko'plab mualliflar eksplantlarni o'stirishga sharoitni morfogenez jarayoniga ta'sirini o'rgana borib, o'stirish sharoitini o'zgarishiga har xil morfogenetik reaksiya bo'lishini kuzatganlar, bu esa klonal mikroko'paytirish metodlarini yangi klassifikasiyasini yaratilishiga olib keldi.



18-rasm. O'simliklarni klonal mikroko'paytirish

1-yo'l – bor meristemalarni rivojlanishini faollashtirish usuli;

2-yo'l- eksplantida adventiv kurtaklar hosil bo'lishini induksiya qilish.

1-dastlabki eksplant tanlash; 2-steril kultura olish; 3-birlamchi eksplantida, to'g'ridan – to'g'ri adventiv kurtaklar hosil bo'lishi; 4- kurtaklarni o'sishi va mikronavdalarni hosil bo'lishi; 5-mikronavdalarni ko'paytirish (qalamcha); 6-mikronavdalarni ildiz olishi; 7-regenerant o'simlikni past haroratda saqlash; 8-o'simliklarni issiqxona sharoitiga o'tkazish; 9- regenerant o'simliklarni dalaga ekish.

Ilmiy adabiyotlardan ma'lum bo'lgan, o'simliklarni mikroko'paytirish usullari asosida, bu jarayonni quyidagi yo'llar bilan amalga oshirish mumkin:

- o'simlikda bor bo'lgan meristemalarni rivojlanishini jadallashtirish; (poya apeksi, poyani kurtaklari);

- eksplantlar to'qimalarida to'g'ridan - to'g'ri adventiv kurtaklar hosil bo'lishini induksiya qilish;
- somatik embriogenezni induksiya qilish;
- birlamchi va ko'chat oluvchi kallusli to'qimalarda adventiv kurtaklarni tabaqalashtirish.

Fitogormonlar tutuvchi oziqa muhitga o'tkazilgan kartoshka poyasi parenxima to'qimalari zararlangandan so'ng, hujayralar de-differensiyaga uchraydi va bo'linishga o'tib nodifferensiyalangan to'qima, ya'ni kallus hosil qiladi. Kallusni q'simlikning turli organlaridan, xususan kartoshkaning poya to'qimalaridan, bargidan, tuganagidan, ildizidan, changdonidan olish mumkin.

Nazorat savollari:

1. *In vitro* deganda nimani tushunasiz?
2. O'simliklarni mikroko'paytirish usularini sanab bering?
3. Klonal mikroko'paytirish usuli nechki bosqichda amalga oshiriladi?

7.1 – ish. Steril o'simtalar o'stirish

Asbob-uskunalar va materiallar. Kartoshkaning probirkada o'stirilgan o'simligi, modifikatsiyalangan Murasige-Skuga oziqa muhiti solingan probirkalar, steril skalpellar va Petri likobchalari.

Mavzuni tushuntirish. O'simliklardan ajratib olingan hujayralar va to'qimalarni yaxshi o'stirish uchun o'stirishning ma'lum shartlariga rioya qilish kerak. Ko'pchilik kallus to'qimalari yorug'likka ehtiyoji yo'q, chunki ularni xloroplastlari bo'lmasdan, geterotrof oziqlanadilar. Ba'zi – bir yashil rangdagi kallus to'qimalar bundan mustasno. Ba'zi bir holatlarda kallus to'qimalar avtotrof oziqlanishiga qobiliyatli emas, ularni doimiy Yorug'lik sharoitida o'stiriladi, bu esa muvaffaqiyatli morfogeneza uchun majburiy sharoitdir ko'proq kallus to'qimalar qorong'ilikda saqlanadi.

Morfogeneza aniqlangan to'qimalar yorug'likga o'tkazilib, keyin 1000-4000 lk yorug'likda o'stiriladi. Ajratib olingan meristemalar va ularni mikroko'paytirish ham yorug'likda o'tadi. Bunda Yorug'lik 1000–10000 lk bo'lishi kerak va yorug'likni kuchi o'simlikni xususiyatlariga bog'liq. O'stiriladigan ob'ektni foto davrini ham hisobga olish kerak.

O'stiriladigan xonada namlik 60-70% bo'lishi kerak. Undan quruqroq havo oziqa muhitini quritib yuboradi, agar probirka paxtali tiqin bilan

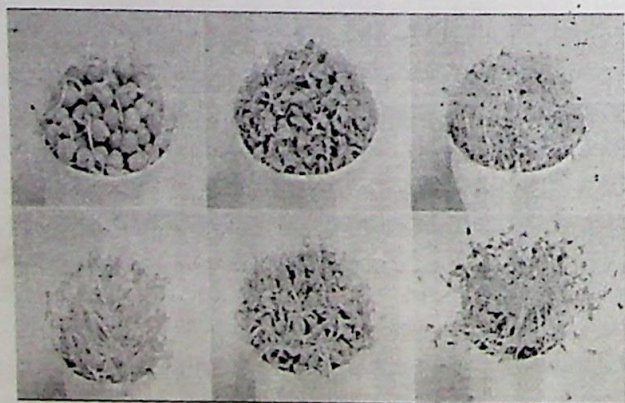
berkitilgan bo'lsa, oziqa moddalarini konsentratsiyasi o'zgarib, o'stirish sharoiti buziladi.

Ko'pchilik to'qimalarni o'stirish uchun mo'tadil harorat $25-26^{\circ}\text{C}$. Agar tropik o'simliklarni to'qimalari bo'lsa $29-30^{\circ}\text{C}$ da o'stiriladi. Morfogenez induksiya qilinganda harorat $18-20^{\circ}\text{C}$ gacha tushiriladi. Odatda klimatik kameralardan foydalaniladi.

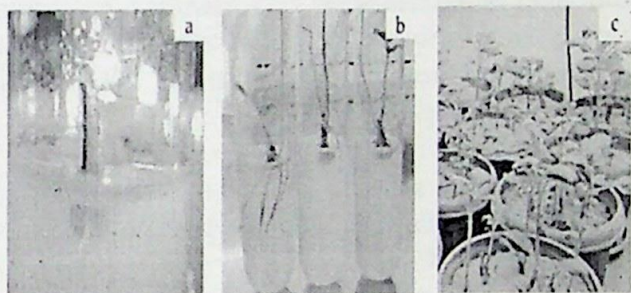
Steril o'simtalarni ko'paytirishning keng tarqalgan usul-laridan biri probirkada qalamchalab ko'paytirish hisoblanadi (19-rasm). Buning uchun o'simlik bo'laklarga bo'linadi. Qalamchalar Murasige-Skuga oziqa muhiti solingan probirkalarga ko'chirib ekiladi. Qalamchalar orqali ko'paytirish apikal meristemani dominantligini qaytarib turishga va uchki poyani olib tashlab, yon meristemalarni faollashtirishga asoslangan. Oziqa muhitga joylashtirilgan bulardan (qalamchalardan) poyalar rivojlanadi.

Qalamchalash 14-21 kun oralatib amalga oshiriladi. 1 ta o'simlikdan 5-8 ta qalamcha olish mumkin. 2-3 oyda bu ko'rsatgich 3-5 mingtani tashkil etadi. 7 oy davomida esa 30-40 mingtaga etadi (20-rasm).

Bundan keyin sog'lomlashtirilgan ekish materialini ko'paytirishning keyingi bosqichiga o'tiladi, bu jarayon issiqxona sharoitida amalga oshiriladi. Probirkadagi o'simlik agarli oziqa muhiti bilan birgalikda tuproq solingan tuvaklarga ekiladi. Ekishdan oldin nam tuproqda probirka yordamida chuqurcha hosil qilinadi. 3-7 kun o'tkach o'simlik Murasige-Skuga bo'yicha mikroelementlar qo'shilgan Knop eritmasi bilan oziqlantiriladi (1 suvga 1×100 konsentratsiyadagi eritmadan 5 ml qo'shiladi). 7-10 kundan so'ng o'simlik issiqxonadagi doimiy joyiga ko'chiriladi. Bu erda dalaga ekish uchun virusdan xoli bo'lgan o'simliklar olinadi.



19-rasm. O'simliklardan olingan steril o'simtalar



20-rasm. In vitro usulida olingan mikronihollar

Ishning borishi. Probirkadagi kartoshka o'simligi laminar ichida olinadi, Petri likobchasiga qo'yib bo'laklarga bo'linadi (har bir bo'lakda barg va qo'ltiq kurtagi bo'lishi kerak), bunda barg ustidagi poya uzunligi, barg ostidagi poya uzunligidan 2-3 marta kalta bo'lishi kerak. Steril sharoitda qat'iy rioya qilish zarur. Qalamchalar Murasige-Skuga oziqasi bor probirkalarga ekiladi. Mikroorganizmlarni probirkaga o'tishini oldini olish uchun ularning og'zi va probkasi spirt lampasi alangasida kuydiriladi. Qalamchali probirkani rasmi chizilgandan so'ng Yorug'lik kamerasiga qo'yiladi. 7 va 10 kunda poyani rivojlanishi kuzatiladi. Qalamchadan o'sib va rivojlanayotgan o'simlikning o'sish bosqichlarini rasmi chizib boriladi.

Nazorat savollari:

1. Qalamchalash nechi kun oralatib amalga oshiriladi?
2. 1 ta o'simlikdan nechta qalamcha olish mumkin?
3. *In vitro* usulida qaysi oziqa muxitlarida kallusli to'qimalar o'stiriladi?

7.2 – ish. Kartoshkaning apikal meristemasini ajratish va o'stirish

Asbob-uskunalar va materiallar. Kartoshka tuganagi, binokulyar lupa, skalpellar, ajratish ninalari, pakki, ushlagichli qisqichlar va steril oziqa muhitli probirkalar.

Mavzuni tushuntirish. O'simliklarni klonal mikroko'paytirishda ishlatiladigan asosiy usul – bu o'simliklarda bor bo'lgan meristemalarni rivojlanishini faollashtirish bo'lib, u apikal ustivorlikni olib tashlashga asoslangan (21-rasm). Bunga ikki yo'l bilan erishish mumkin:

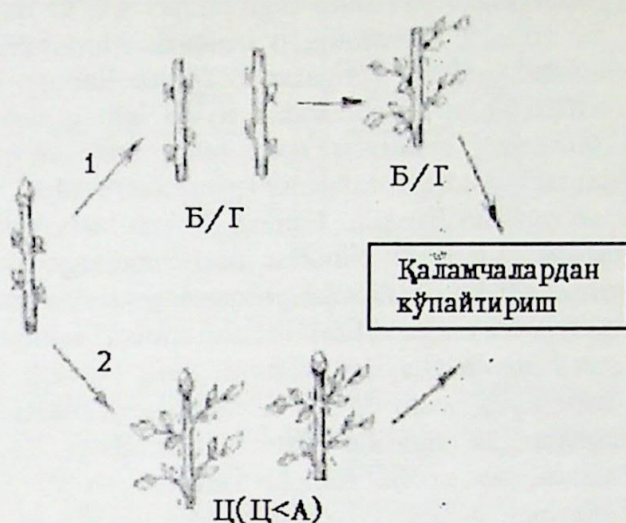
- *poyani tepa meristemasini olib tashlash va keyin navdani in vitro sharoitida gormon saqlamagan muhitda mikroqalamchalash;*
- *oziqa muhitiga sitokinin ta'siriga ega bo'lgan moddalar qo'shish (navdani o'sishini kuchaytirish).*

Odatda, sitokinin sifatida – 6-benzilaminopurin (BAP), 6-furfurilaminopurin (kinetin), hamda 2-izopenteniladenin (2ip) va zeatin ishlatiladi.

Shunday yo'l bilan olingan navdalarni birlamchi ona eksplantidan ajratiladi va qaytadan yangi tayyorlangan oziqa muhitida o'stiriladi. Hozirgi vaqtda bu usul qishloq xo'jalik o'simliklarini virussiz ekuv materiallarini tayyorlashda keng qo'llaniladi. Shu yo'l bilan qand lavlagi, tamaki, topinambur, pomidor, kartoshka, bodring, qalampir, oshqovoq va boshqa o'simliklarni sog'lomlashtirilgan ko'chatlarini tayyorlash yo'lga qo'yilgan.

Kartoshka o'simligini klonal mikroko'paytirish texnologiyasi sanoat darajasiga ko'tarilgan. O'simliklarda bor bo'lgan meristemalarni faollashtirish usulini ishlatilishi bir yilda bir dona kartoshka meristemasidan 10^5 dona o'simlik etishtirish imkonini beradi, bunday texnologiya probirkada mikro tuganaklar - qimmatbaho virussiz urug'lik yaratishni o'z oldiga maqsad qilib qo'ygan.

Izolyasiyalangan apikal meristemalar kulturasini, o'simliklarni mikroklonal ko'paytirish uchun ekiladigan virussiz materiallar olishda foydalaniladi. Virussiz material olish uslubi kasal o'simlikning o'sish nuqtasiga yo'nalishi bilan viruslarning miqdori kamayishiga asoslangan.



21-rasm. O'simliklarni bor meristemalarini faollashtirish usuli bilan ko'paytirish chizmasi:

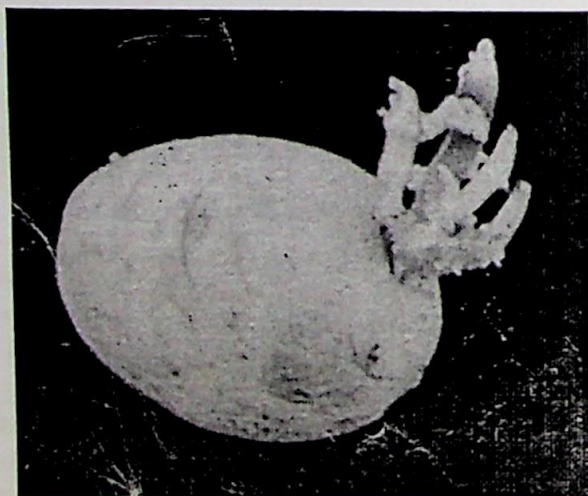
1-*tepa meristemasini yulib tashlash yo'li;*

2-*oziqa muhitiga sitokininlar qo'shish yo'li.*

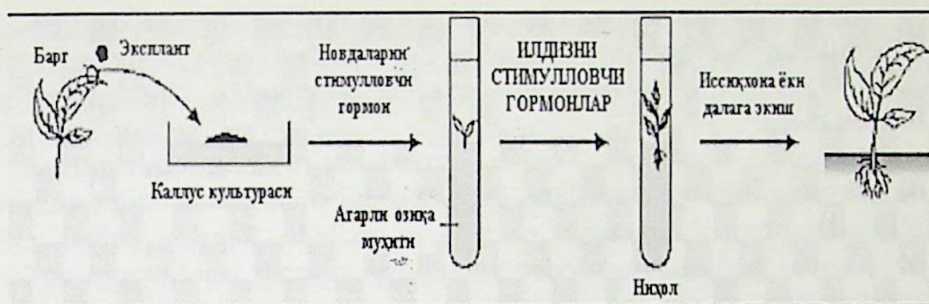
B/G – *gormonsiz muhit; S-sitokininlar, A-auksinlar.*

Odatda apikal meristema viruslardan umuman holidir. Xususan viruslardan holi apikal meristema faol bo'linuvchan, uzunligi 0,1 mm, eni 0,25 mm bo'lgan konus shaklidagi hujayra-lardan iboratdir. Asosan meristemani jarohatlarsiz bo'laklarga ajratish qiyin bo'lganligi sababli, uni 1-2 barg primordiylar (o'lchami 100-250 mkm apekslar) bilan ajratib olinadi. Kartoshkaning faol sog'lomlanishini oshirish uchun yuqori meristemalar uslubi termoterapeya va kimyoterapeya bilan birga-likda olib boriladi. Termoterapiya usuli kartoshka tuganak-lariga viruslarni infaaktivatsiyaga uchratuvchi issiqlik bilan ishlov berishga asoslanga. Yuqori meristemalar usulini kimyoterapeya bilan birgalikda olib borish oziqa muhitlariga viruslarni ingibirlovchi moddalar qo'shilishiga asoslangan. Apikal meristemalardan oziqa muhitda apikal kartoshkaning virussiz o'simliklari olinadi, ular ko'paytirilib, issiqxonalarga qayta ekiladi va virussiz tuganaklar olinadi. Sog'lomlashtirilgan materialni tez ko'paytirish uchun *in vitro* olingan tuganaklardan ham foydalanish mumkin.

Ishning borishi. Kartoshka tuganaklari $4-8^{\circ}\text{C}$ da saqlanadi, so'ng qorong'ulikda $20-22^{\circ}\text{C}$ haroratda o'stiriladi. Meristemalarni bo'laklarga ajratish ishlari bakteriotsid lampalar bilan sterillangan laminar bokslarda amalga oshiriladi. Ishni boshlashdan avval ish joylari, stol, binokulyar lupalar va probirkali shtativlar spirt bilan artib chiqiladi. Bo'laklarga ajratish uchun ishlatiladigan asboblari (pinsetlar, skalpel va ignalar) har bir ajratishdan so'ng sterillanadi, buning uchun asboblari spirtga solinib, spirtovka alangasiga tutiladi. Nihollar meristemalarga ajratishdan oldin 3-5 daqiqa davomida 0,1% li diotsid eritmasida sterillanadi. Buning uchun nihollar kimyoviy stakanga solinib ustidan diotsid eritmasi quyiladi. Keyin uch marta steril suvda chayiladi. Shuningdek 1-6% li kalsiy yoki natriy gipoxlorid eritmasida yoki 0,1% li sulema eritmasida ham sterillash mumkin. Sterillangan nihollar Petri likobchasiga joylanadi va qurib qolmasligi uchun bir necha tomchi sterillangan suv solinadi. Niholni bo'laklarga ajratishdan oldin, bargni yuqori va yon meristemalarni asta-sekinlik bilan yalang'ochlagan holda uning uchidan yopqich barglar olib tashlanadi (22, 23-rasmlar). Bu ishni binokulyar mikroskop ostida ajratish ignasi yordamida bajarish mumkin. 100-250 mk kattalikdagi boshlang'ich bargsiz meristema ushlagichga qistirilgan oddiy ingichka nina bilan bo'laklarga bo'linadi. O'sish nuqtasining yon va yuqori meristemalari bo'laklarga ajratiladi. Har bir bargni yulishda alohida sterillangan asbobdan foydalanish kerak.



22-rasm. Undirilgan kartoshka tuganagi



23- rasm. Nihollarni rivojlanishiga gormonlarning ta'siri

Ajratilgan meristema ninaning uchida probirkadagi oziqa muhit yuzasiga joylashtiriladi. Probirka og'zi paxta tiqini spirtovka alangasida sterillanib yopiladi va shtativga joylanadi. Shtativ probirkalar bilan to'lgandan so'ng oziqa muhit qurib qolmasligi uchun selofan qalpoqcha bilan yopib qo'yiladi. Oziqa muhiti sifatida avvaldan 1 mashg'ulot uchun tayyorlanib, avtoklavda 20 daqiqa 1 atm. bosimda sterillangan Murasige-Skuga oziqa muhiti ishlatiladi. Oradan 2,3,4 hafta o'tgandan so'ng meristemadan nihollarning rivojlanishi kuzatiladi va shu jarayon bosqichlari chizib olinadi.

Nazorat savollari:

1. Apikal meristema nima?
2. Kallus qanday to'qima?
3. Kalus to'qimalarini qarishining belgilari qayday bo'ladi?

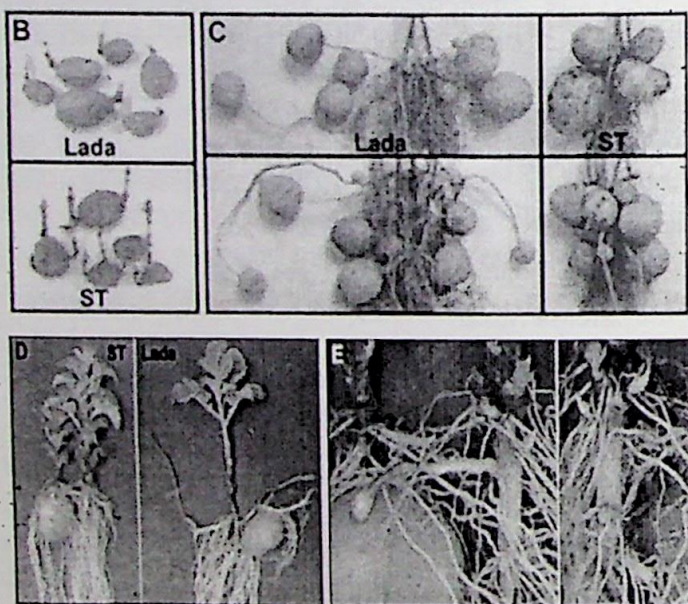
8 – ish. Kartoshkadan mikrotuganaklar olish

Asbob uskunalar va materiallar. Probirkada steril kartoshka o'simligi, steril pinset, skalpel, matrascha yoki Petri likobchasi, spirtovka, stakanda spirt, kartoshka kallusini olish va o'stirish uchun steril oziqa muhitli kolba yoki probirka, parafilm varag'i, qaychi va gugurt.

Mavzuni tushuntirish. Kartoshkani ko'paytirishning eng ko'p tarqalgan usuli uni probirkalardagi oziqa muhitida qalamchalab ko'paytirish usuli hisoblanadi. Buning uchun o'simlik bo'laklarga bo'linib, probirkadagi Murasige-Skuga su'niy oziqa muhitiga ekiladi. Qalamchalab ko'paytirishning bunday usuli apikal meristemalari rivojlanishini to'xtatib, novdaning uchki qismini olib tashlash hisobiga yon meristema to'qimalaridan novdalarni rivojlantirishga asoslanadi.

Qalamchalash jarayoni har 14-21 kun oralatib amalga oshiriladi. Bitta o'simlikdan 5-8 qalamcha olinadi, 2-3 oy davomida bulardan 3-5 ming dona o'simlik, 7 oy davomida esa bu ko'rsatgich 30-40 ming donani tashkil etadi.

Keyingi bosqichda, ekish materiallarini sog'lomlashtirish ishlar issiqxonada amalga oshiriladi. Probirkadagi o'simliklar oziqa muhiti bilan birgalikda tuproq solingan tuvaklarga ekiladi. Buning uchun ekishdan oldin tuvakdagi tuproqda chuqurcha hosil qilinadi va shu erga ekiladi. 3-7 kundan boshlab ekilgan o'simlik Knop eritmasi va Murasige-Skuga oziqa muhitiga qo'shiladigan mikroelementlarni 1x100 konsentratsiyasidan 1 l suvga 5 ml qo'shib oziqlantiriladi. 7-10 kundan so'ng o'simlik issiqxonadagi doimiy o'stiriladigan joyiga ekiladi va shu erda dalaga ekiladigan virusdan xoli tuganaklar olinadi (24 rasm).



24-rasm. Kartoshkadan mikrotuganaklar olish

Ishning borishi. Laminar boks ichida probirkada o'stirilgan kartoshka o'simligini olib, poyani barg va kurtak qismi bor joydan qirqib, bo'laklarga bo'linadi. Bunda poyaning bargdan ustki qismi, bargning ostki qismiga nisbatan 2-3 barobar kalta bo'lishi kerak.

Bu bo'laklar Petri likobchasidagi oziqa muhiti sirtiga terib chiqiladi. Ish jarayonida sterillikka qat'iy rioya qilinishi zarur. Qalamchalar

modifikatsiyalangan Murasige-Skuga oziqa muhiti solingan probirkalarga ekiladi. Mikroorganizmlarni probirkalarga tushmaslik uchun probirka og'zi va probka spirt lampasida kuydirib olinadi. Qalamchalarning o'sishi va rivojlanishi 7 va 14 kunlarda kuzatiladi.

Nazorat savollari:

1. Kartoshka apikal meristemasi qaysi oziqa muxitida o'stiriladi?
2. Nima maqsadda kartoshkadan tuganaklar ajratib olinadi?
3. Qalamchalash avfzaligini sanab o'ting?

9 – ish: Fitoregulyatorlar yordamida kartoshka tuganaklarini tinim holatiga o'tishi va uyg'onishini boshqarish

Asbob-uskunalar va materiallar. Kartoshka tuganaklari, gibberellin, 2-xloretilfosfon kislotasi yoki uning asosidagi preparat, etil spirti, eritma tayyorlaydigan va tuganakni ivitadigan idish, termostat, qog'oz paketlar, eritmalarini o'lchash uchun o'lchov idishlari, lineyka va millimetr qog'ozi.

Mavzuni tushuntirish. Fitogormonlar hujayra membranasi, xususan hujayrani, hujayra devoridan ajratib turuvchi plazmalemma membranasi o'tkazivchanligini o'zgartirishi mumkin. Plazmalemma turli xil ionlarni membrana o'tkazadigan oqsilga ega. Hujayra devorlari petin moddasi va gelitsellyuloza orqali o'zaro birikkan sellyuloza bog'lamidan iborat. Ular hujarayga qatqlik baxsh etadigan karkas vazifasini bajarib, uni cho'zilishidan saqlaydi. SHu vaqtning o'zida fitogomomlar transport oqsilini faoliyatini jadalastirib, hujayra devor-lariga egiluvchanlik beruvchi hujayra protonlarini (N^+) hujara devoriga o'tkazadi. Fitogormonlar – auksin va gibberellin ta'sirida N^+ ionlarini hujayradan chiqishi tezlashsa, abssiz kislotasi va etilen ta'sirida esa bu jarayon sekinlashadi. Bu esa hujayra devorlarida pH muhitini o'zarishiga olib keladi. Protonlarni hujayra devorlari tomoniga chiqarilishi undagi muhitni kislotali bo'lishiga olib keladi, natijada pektin moddasi gidrolizlanadi va sellyulozaning fibrill bog'larini zaiflanishiga sababchi nobud bo'ladi. Bu holat hujayra devorlarini mustahkamliligiga ta'sir etadi, hujayra vakuolalarini turgor bosimi hujayrani cho'zilishiga sababchi nobud bo'ladi.

Respublika sharoitida kartoshkadan mavsum davomida ikki marta hosil olish, ya'ni ertangi va kechki kartoshkani etishtirish, kechki kartoshka uchun urug'likni topish muammosini yuzaga keltiradi. Chunki

oldingi yili tayyorlangan urug'likni kechki kartoshka ekiladigan vaqtgacha sifatini yo'qotmasdan saqlash juda qiyin masala. Ertangi kartoshkadan esa urug'lik uchun ishlatishning iloji yo'q. Bu kartoshka tuganaklari chuqur tinim davrida bo'lganligi sababli ular unib chiqmaydi, ya'ni tuganaklar unishi uchun tinim davrini o'tashlari kerak. Kartoshkani tinim davridan chiqarish uchun tuganaklarga gibberellin bilan ishlov berish zarur. Bu holat tuganaklardagi o'stiruvchi fitogormonlar faoliyatini jadallashtiradi.

Kartoshka tuganaklarini saqlash vaqtida yo'qotilishiga sabab, ko'p hollarda ularni tinim davriadn chiqib ketishidir. Mazkur jarayonda o'sishni ingibitorlovchi fitogormon – abssez kislotasining faoliyatini buzilishi sababachi nobud bo'ladi. Kartoshka tuganaklariga etilen hosilalari bilan ishlov berish abssez kislotasining biosintezini jadallashtiradi, bu esa tuganaklarni uzoqroq saqlanishiga olib keladi.

Ishning borishi. Tegishli konsentratsiyadagi gibberellin va 2-xloretilfosfon kislotasining eritmasi tayyorlanadi. Kartoshka tuganaklari shu eritmalarda 10-20 daqiqa ivitiladi va filtr qog'oz yordamida ajratilib, quritilgandan so'ng qog'oz paketlarga joylashtiriladi hamda paket sirtiga tajriba varianti yozilgandan keyin 26-29⁰ C haroratli termostatga joylashtiriladi. 14 sutka o'tkach unib chiqqan ko'chatlar hisoblanib chiqiladi. Olingan ma'lumotlar asosida preparat-ninig tuganaklarni tinim daridan chiqaradigan va o'sishini jadallashtiradigan optimal konsentratsiyasi aniqlanadi.

Nazorat savollari:

1. Kartoshkani tinim davrini tezlashtirish uchun qaysi fitogormonlar ishlatiladi?
2. Qishloq xo'jaligida ishlatiladigan fitogarmonlarni sanab bering?
3. Nima maqsadda fitogarmonlar ishlatiladi?

10 – ish. Tuganak bakteriyalarni sof kulturasini olish va ular asosida preparatlar tayyorlash

Asbob-uskunalar va materiallar. 10 g no'xat yoki loviya, steril kolbalar, 2 g agar-agar, Petri likobchalari, dukkakli o'simlik tuganaklari, termostat, mikroskop va Fuksin bo'yog'i.

Mavzuni tushuntirish. Havodagi molekulyar azotning biologik usulda tuproqqa yig'ilishi qishloq xo'jaligida katta ahamiyatga ega. Atmosfera havosining 78% ni erkin azot tashkil etadi. Atmosferadagi azot

zahirasidan o'simlik to'liq foydalana olmaydi. Havodagi azotni o'zlashtirib, uni o'simlik oziqlanish holiga keltira oladigan alohida mikroblar bor. Bu mikroblar azotfiksatorlar deyiladi. Azotfiksatorlar ikki biologik gruppaga bo'linadi.

1. *Simbiotik azotfiksatorlar*

2. *Erkin holda yashovchi azotfiksatorlar*

Simbiotik azotfiksatorlar tuganak bakteriyalar bo'lib, dukkakli o'simliklar bilan simbioz holatda yashaydi va havodagi azotni tuproqqa yig'ilishiga yordam beradi.

1886 yilda Germaniyada Nobbe va Giltner dukkakli o'simliklarni 12 turi uchun tuganak bakteriyalar aralashmasidan tijorat preparatini tayyorlashdi. "Nitrogin" nomini olgan bu preparatni qo'llash dukkaklilarni hosildorligini birmuncha oshirdi. Shuning uchun bu butun dunyo tadqiqotchilar e'tiborini tortdi va hozirgi vaqtgacha saqlanib kelmoqda.

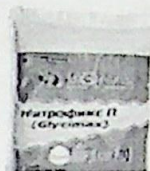
Tuganak bakteriyalar preparatini AQSH da (1886), Vengriyada (1898) va Angliyada (1906) tayyorlay boshlangan. Rossiyada tuganak bakteriyalar preparati bilan tajriba olib borish L.M.Budinov (1907) va keyin I.A.Makrinov (1915) tomonidan boshlangan.

Tuganak bakteriyalarni preparatlarini tayyorlash uchun ularni dukkakli o'simliklar (no'xat doni, loviya va boshqalar) qaynatmasi muhitida o'stiriladi. Qo'shimcha uglevodlar-glyukoza, saxaroza yoki boshqa uglevod birikmalarini, masalan: mannit qo'shilsa kultura o'sishi tezlashadi. SHunga o'xshash agar-agar solinib, agarli muhit hozirgi vaqtgacha tuganak bakteriyalarni preparatini olish uchun (Bolgariya, Ruminiyada) qo'llanib kelinmoqda.

Bu shaklda sanoat asosida nitrogin ishlab chiqarish, agar-agarining noyobligi va bahosining yuqori ekanligi tufayli iqtisodiy samara bermadi. Bu masalada tuproqni (odatda bog'lar tuprog'ini) substrat sifatida foydalanish, nisbatan yaxshi natija berdi.

Sterilizatsiya qilingan-tuproq, sut shishalariga, flakonlarga va shu kabi boshqa idishlarga joylanadi, tuganak bakteriyalarning suyuq kulturasi yuboriladi. Lekin tuproq nitroginida bakteriyalarni yuqori titriga erishib bo'lmaydi. Shuning uchun ko'p tajribalardan keyin substrat-tashuvchi (bakteriyani o'ziga shimdiruvchi) sifatida torfdan foydalana boshlandi. Torf zahirasiga ega bo'lmagan mamlakatlar substrat sifatida boshqa maxsulotlardan foydalanila boshlandi.

Respublikamizda Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya institutida tuganak bakteriyalar asosida "Bakterial o'g'it" nomi bilan dukkakli o'simliklarni hosildorligini oshiradigan atrof muhitni ifloslantirmay-digan,



25-rasm. Tuganak bakteriyalar va ular asosida olingan preparatlar

Nazorat savollari:

1. Tuganak bakteriyalar asosida ajratib olinadigan qanday preparatlar bor?
2. Bakteriyali o'g'it tayyorlash qanday amalga oshiriladi?
3. Azotofiksatorlar nechchi guruhga bo'linadi?

11 – ish. Nitragin, azotobakterin va fosforobakterin preparatlarini olish texnologiyasi

11.1 – ish. Nitragin preparatini olish texnologiyasi

Asbob-uskunalar va materiallar. Dukkakli o'simlik ildizi, oziqa muhiti, mikroskop, immersion moy, filtr qog'ozlar, buyum va qoplag'ich oynachalar, mikrobiologik sirtmoq, skalpel, pinsetlar, bo'yoqlar (metilen ko'ki, fuksin), tuproq, tarozi, kolbalar.

Mavzuni tushuntirish. Tuproqdagi azotning umumiy balansida mikroorganizmlar tomonidan assimilyasiya qilinishi muhim ahamiyatga ega. Azotni tuproqda fiksatsiyalanib qolishida bakteriyalarni ahamiyati alohida hisoblanadi. Chunki ular havo tarkibidagi molyakulyar azotni o'zlashtirib, tuproqni bog'lagan azot bilan boyitadi.

Havodagi molekulyar azotning biologik usulda tuproqqa yig'ilishi qishloq xo'jaligida katta ahamiyatga ega. Atmosfera havosining 78% erkin azotdan iborat. Atmosferadagi azot zahirasidan o'simlik to'la foydalana olmaydi. Havodagi azotni o'zlashtirib, uni o'simlik oziqlana oladigan holga keltiradigan alohida mikroorganizmlar bor. Azotning

mikroorganizmlar tomonidan yig'ilishi tabiatdagi azotning aylanishida hal qiluvchi bo'g'in hisoblanadi. Bunday mikroorganizmlar *azotfiksatorlar* deyiladi.

Professor E.N.Mishustinning ma'lumotlariga ko'ra, azotfiksatorlar yil davomida er kurrasidagi ekin ekiladigan erlarda, barcha mamlakatlardagi kimyo zavodlarining etkazib beradigan azotidan 7 barobar ko'p azot to'playdi. Agar ekin ekiladigan erlariga hisob qilganda azotfiksatorlar bir yil mobaynida 1-1,5 mln tonnaga yaqin azot to'playdi. Demak, qishloq xo'jaligi mutaxassisleri mikroorganizmlar-ning fiziologik xususiyatlari va rivojlanish qonuniyatlarini sinchiklab o'rganishlari dexqonchilikda hosildorlikni oshirishdagi omillardan biri hisoblanadi.

Simbiotik azotfiksatorlar. Bular tugunak bakteriyalar bo'lib, dukkakli o'simliklar bilan simbioz holatda yashaydi va havodagi azotning tuproqqa yig'ilishiga yordam beradi. Tugunak bakteriyalar dukkakli o'simliklarning ildizida yashashga va rivojlanishga moslashgan. Hozirgi vaqtda olimlar tugunak bakteriyalarning 16 tur xillarini aniqlagan. Bular bir-birlaridan morfologik, fiziologik va kultural xususiyatlariga qarab farqlanadi. Har qaysi tugunak bakteriya dukkakli o'simliklar ildizida yashashga moslashgan. No'xat, mosh, beda, loviya, sebarga, nut, lyupina va boshqa dukkakli o'simliklar bilan simbioz holatda yashab, azot to'playdi.

Tugunak bakteriyalari o'zining faolligi va tuproqdagi azot to'plash qobiliyatiga qarab ham bir necha xilga bo'linadi. Tugunak bakteriyalarning faol shakli dukkakli o'simliklar ildizida hosil qilgan tugunaklari odatda katta, usti tekis, pushti rangli bo'ladi. Tugunak bakteriyalarning rivojlanish jarayoni juda murakkab bo'ladi. Rivojlanishning boshlang'ich davrida ular harakatchan, mayda tayoqcha shaklida bo'lib, so'ngra o'zlarining shakllarini o'zgartirib, belbog'li yirik tayoqcha bakterioidlarga aylanadi, ya'ni o'zlarining tanalarida shoxchalar hosil bo'ladi.

Tugunak bakteriyalar hujayrasining kattaligi 1 mikrondan 4-5 mikrongacha, optimal yashash harorati 25-28°C bo'lib, 60-70°C da nobud bo'ladi, 15-19°C sovuqda rivojlanishda to'xtamaydi. Muhitning reaksiyasi betaraf bo'lsa, tugunak bakteriyalar yaxshi rivojlanadi. O'simliklar gullaganda dukkakli o'simlik ildizidagi tugunaklarning faolligi oshadi. Tugunak bakteriyalar tuproqdan dukkakli o'simliklar ildiziga ildiz tukchalari orqali o'tib ildizda tugunaklar hosil bo'ladi.

Rhizobium turkumiga kiruvchi bakteriya turlari 1300 turga mansub dukkakdoshlarga kiruvchi o'simliklarda tugunaklarni hosil qiladi. O'simlik

ildiz to'qimasiga tushgan tuganak bakteriyalari infeksiyon ipchalar hosil qilib meristema to'qimasiga etib borganidan so'ng jadal bo'lina boshlaydi va bu erda tuganaklarni hosil qiladi. Natijada o'simlik va bakteriya o'rtasida modda almashinishi sodir bo'ladi. O'simlik bakteriyani uglevod va mineral moddalar bilan ta'minlasa, bakteriya o'z navbatida o'simlikni 70% gacha assimilyasiyalanadigan azot bilan ta'minlaydi. Turli dukkakli o'simliklarning ildizida bu tuganaklar turli shakl va o'lchamda bo'ladi. Ularning o'lchami asosan tariq kattaligidan yong'oq mevasining kattaligicha bo'lishi mumkin.

Tuganak bakteriyalarni sof kulturasini olish uchun dukkakdoshlarga mansub ekin turini birontasini (mosh, loviya, no'xat va boshqalar) olib, uning ildizi vodoprovod suvida yaxshilab yuviladi va bir nechta yirik tuganaklar qirqib olinadi. Bu tuganaklar 3-4 marta steril suvda chayiladi hamda ularni 0,1% li sulema eritmasi solingan Petri likobchasiga botirib, 5 daqiqa davomida chayqatiladi. So'ngra bu tuganaklar Petri likobchasidagi steril suvga solinadi va unda ham 5 daqiqa ushlab turiladi hamda spirt solingan Petri likobchasiga 1 daqiqa davomida solib qo'yiladi. Tuganaklardagi spirt alangada yondirib yo'qotiladi. Keyin steril pinset yordamida tuganaklar steril Petri likobchasiga ko'chiriladi va steril skalpel pichog'i yordamida bo'laklarga ajratiladi. Bakteriologik ilgak yordamida tuganakning bir bo'lakchasini Petri likobchasidagi oziqa muhit sirtidagi bir tomchi suvga qo'shiladi va shpatel yordamida oziqa muhiti yuzasiga bir tekis qilib surtiladi. Tuganak bakteriya-larning sof kulturasini olishda oziqa muhitlaridan (6, 7, 8, 9, 10 – jadvallar) foydalaniladi.

Dukkakli don qaynatmasini tayyorlash uchun 50 g (mosh, loviya, no'xat, oq fasol) don solingan idishga 1 l vodoprovod suvidan solinadi va sirtidagi po'stlog'i shishib yorilguncha qaynatiladi, lekin don shishib ketmasligi kerak. Qaynatma paxta yoki doka orqali o'tkazib filtrlanadi va unga vodoprovod suvidan 1 l bo'lguncha qo'shiladi, so'ngra unga oziqa muhiti tarkibiga kiruvchi qolgan komponentlar qo'shiladi.

6-jadval

Fred oziqasi

Mannit (saxaroza yoki glyukoza)	10 g
KH_2PO_4	0,5 g
MgSO_4	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCO_3	3 g
Achitqili suv (rN 6,8)	100 ml
Agar-agar	15 g
Distillangan suv	0,9 l

7-jadval

Dukkakli agar

Dukkakli don qaynatmasi	1000 ml
KH_2PO_4	1 g
MgSO_4	0,3 g
Agar-agar	15 g

Yuqoridagi oziqa muhitlarini pH ini 7 gacha soda qo'shish yo'li bilan keltiriladi. 0,5 atm bosim, 120°C haroratda 30 daqiqa sterillanadi. Bu oziqa muhitida tuganak bakteriyalari stearin tomchisiga o'xshash oqish, xira, shilimshiq koloniyalar hosil qiladi.

8-jadval

Lazarev oziqasi

KH_2PO_4	0,5 g
MgSO_4	0,2 g
NaCl	0,2 g
MnSO_4	0,005 g
NH_4MoO_4	0,002 g
Mannit yoki saxaroza	10 g
Achitqili suv	100 l
Agar-agar	1,5 %
Suv	0,9 l

9-jadval

Norris oziqasi

K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8 g
NaCl	0,2 g
FeCl_3	0,01 g
Mannit	10 g
Yangi tayyorlangan achitqi (drojja) ekstrakti	100 ml
Suv	0,9 l
pH	7,2

Sekin o'suvchi tuganak bakteriyalar (soya, lyupin) uchun uyidagi oziqa muhiti tavsiya qilinadi:

Mannit yoki saxaroza	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,2 g
NaCl	0,1 g
Glyukonat kalsiy	1,5 g
FeCl ₃	0,01 g
Achitqi ekstrakti	2 g
Suv	1 l
Agar-agar	20 g

Petri likobchasida yuzaga kelgan koloniyalardan sof kulturalar ajratib olinadi. Bu kulturalar Fred yoki dukkakli agar oziqa muhiti solingan qiya agarli probirkalarga ekiladi.

Tarkibi yuqorida keltirilgan oziqa muhitlaridan tashqari tuganak bakteriyalari 8, 9, 10 – jadvallarda keltirilgan oziqa muhitlarida ham yaxshi o'sadi.

Nitragin – preparati *Rhizobium* turkumi bakteriyalarining toza kulturasini saqlovchi preparatdir. Tuganak bakteriyalari – aerob, kichik, sporasiz tayoqchadir. Ma'lum bakteriya shtammlari bir biridan o'simlik bilan simbioz holda atmosfera azotini o'zlashtirish faolligi bilan farq qiladi (faol, kam faol, faol emas). Bularning aniq turlari bu xususiyatlarini faqatgina aniq xo'jayin-o'simlikdagina namoyon qiladi.

Rossiyada nitraginning ikki turi: tuproqli va quruq preparatlari ishlab chiqariladi.

Tuproqli nitraginda tuganak bakteriyasi kulturalari steril tuproqda rivojlanadi. Nitragin ishlab chiqarish texnologiyasi etarli darajada samarali emas, chunki bunda yuqori sifatli preparat olish imkoniyati yo'q.

Quruq nitragin o'zida tuganak bakteriyalar bilan qo'shimcha-larning (torf, bentonit) birgalikdagi kukunini mujassamlash-tiradi. Tuproqli nitraginga nisbatan quruq nitragin preparati yuqoriroq samaradorlikka egadir. Quruq nitragin ishlab chiqarish texnologiyasi mikrobiologik ishlab chiqarish texnologiyasidagi asosiy harakterli bosqichlardan iborat (26-rasm).

Har bir dukkakli o'simlik turi uchun muvofiq tuganak bakteriya turidan o'stirilib quruq nitragin preparati tayyor-lanadi. Agarli oziqada

o'stirilgan dastlabki tuganak bakteriya kulturasidan ekish materialini olish uchun uni suyuq oziqa muhitida $28-30^{\circ}\text{C}$ haroratda 24–48 soat davomida o'stiriladi. Suyuq oziqa muhiti tarkibi bakteriyani barcha bosqichlarda o'stirish uchun bir xildagi tarkibga ega bo'ladi: melassa, makkajo'xori ekstrakti va mineral tuzlar (NaHCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , K_2HPO_4 , temir tuzi, molibden va h.k.).

O'stirilgan kulturalar 1 ml da 8–10 mlrd. hujayra saqla-ganda ularni sig'imi 100–150 l bo'lgan o'stirish inokulyatorlariga fermentyorda fermentatsiya jarayoni $28-30^{\circ}\text{C}$ haroratda intensiv aralashtirish va aeratsiyada 48–72 soat davomida olib boriladi.

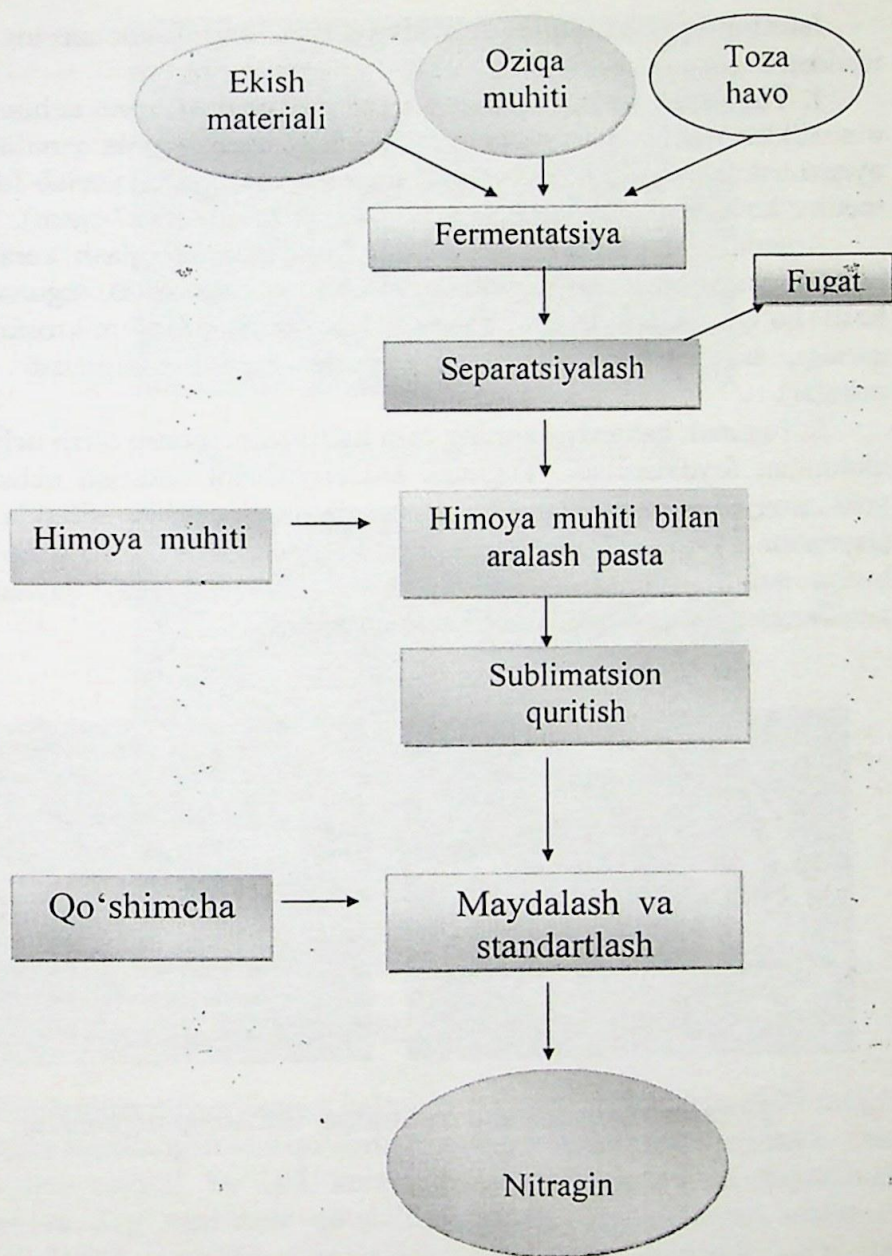
Fermentatsiya jarayonidan keyin kultural suyuqlik 1 ml 10 mlrd. hujayra titri saqlaydi. Fermentatsiya jarayoni tugallangandan so'ng kultural suyuqlik separatorga uzatiladi.

Biomassa 70–80% namlikdagi pasta ko'rinishida olinadi. Quritishdan oldin pasta, 20% melassa va 1% tiomochevina saqlovchi himoya muhiti bilan aralashtiriladi.

Biomassani sublimatsion quritish $-30-35^{\circ}\text{S}$ haroratda, sekinlik bilan beriladigan 10–13 kPa bosim vakuum ostida amalga oshiriladi.

Quritilgan biomassa qo'shimchalar (bentonint, kaolin va torf kabi) bilan shunday aralashtiriladiki, natijada 1 g. preparat 9–10 mlrd. tuganak bakteriyalar saqlashi lozim. Quruq nitragin preparati polietilen qopchalarga joylanib, germetik berkitiladi va harorati 15°C dan yuqori bo'lmagan joylarda saqlanadi.

Dukkakli o'simliklar urug'i erga ekilmasdan nitragin preparati bilan bevosita ishlov beriladi. Bunday ishlov berish natijasida ildizdagi tuganaklar va shu bilan bir vaqtning o'zida o'simlikda azot miqdori oshib hosildorlikning yuqori bo'lishini ta'minlaydi.



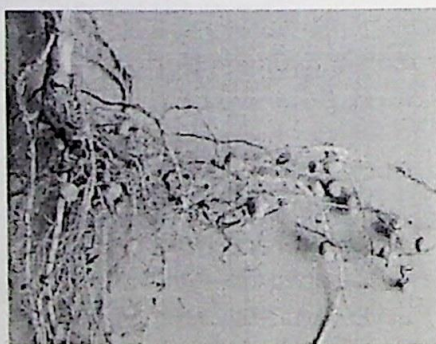
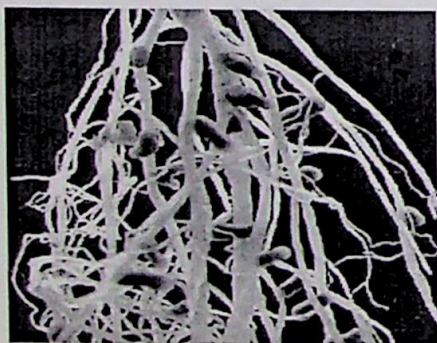
26-rasm. Nitragin ishlab chiqarishning texnologik chizmasi

Ishning borishi. Tugunak bakteriyalarni aniqlash uchun bir necha xil usuldan foydalaniladi.

1. Tugunak bakteriyalarning morfologiyasini aniqlash uchun dukkakli o'simliklar ildizidan tugunak olib, u sterillangan suvda yuvilib, buyum oynasi ustida eziladi, hosil bo'lgan shiradan preparat tayyorlab fuksin yoki metilen ko'ki bilan bo'yab mikroskop ostida ko'riladi (27-rasm).

Agarda tugunak bakteriyalarining harakatini aniqlash kerak bo'lsa, buyum oynasi ustiga bir tomchi sterillangan suv tomizilib, tugunak eziladi, hosil bo'lgan shira ustiga qoplag'ich oyna yopilib, mikroskop orqali qaralsa, harakatchan mayda tayoqchalar borligi aniqlanadi (28, 29-rasmlar).

2. Tugunak bakteriyalarining toza kulturasini ajratib olish uchun oziqli muhitidan foydalaniladi. Tugunak bakteriyalarini undirish uchun no'xat yoki loviyadan tayyorlangan qaynatma oziq muhiti sifatida olinadi. Qaynatma quyidagi usulda tayyorlanadi: 100 ml suvga 10 g no'xat yoki loviya solinib, dukkaklari yorilguncha (30-40 daqiqa) qaynatiladi va sterillangan kolbaga filtdan o'tkazib qo'yiladi.



27-rasm. Dukkakdosh o'simliklar ildizidagi tugunaklar

Nazorat savollari:

1. Nitragin preparatlarni ajratish usularini ayting?
2. Simbiotik azotfiksatorlar o'simliklarga qanday ahamiyatga ega?
3. Tugunak bakteriyalarni aniqlashda qaysi usullardan foydalaniladi?

11.2 – ish. Azotobakterin olish texnologiyasi

Asbob-uskunalar va materiallar. Tuproq namunalari, Petri likobchalari, oziqa muhiti (melassa, makkajo'xori ekstrakti va mineral tuzlar), termostat, mikroskop, immersion moy, mikrobiologik sirtmoq, buyum va qoplag'ich oynalar.

Mavzuni tushuntirish. Erkin holda yashaydigan azotfiksatorlarga *Azotobacter chroococcum* - azotfiksator va anaerob azotfiksator *Clostridium pasterianum* kiradi. Azotobakteriyalar tuproqda erkin yashab, har gektar erga 15-30 kg azot to'plashdan tashqari, yana boshqa xususiyatlari bor. Masalan, o'simliklar o'sishi uchun auksin tipidagi o'sish faktorini hosil qilib, rizosfera mikroblarining yaxshi rivojlanishiga yordam beradi.

Azotobakterin – preparati o'zida atmosferadan azot o'zlashtirish qobiliyatiga ega bo'lgan tuproq mikroorganizm-laridan biri *Azotobacter chroococcum* kulturasini saqlaydi. *Azotobacter* bakteriyasi aerob va sporasiz bo'lib tuproqda erkin yashaydi. O'g'it sifatida ushbu bakteriya tuproqda to'planganda tuproqqa biologik faol moddalar (nikotin va pantogen kislotalar, piridoksin, biotin, geteroauksin, gibberlin va boshqalar), o'simlik o'sishi va rivojlanishini boshqaruvchi moddalar, Shuningdek, anisomitsin guruhidan fungitsidli moddalar hosil qiladi, ular esa ba'zi bir o'simlik rizosferasidagi zararli mikroskopik zamburug'larning rivojlanishini chegaralab turadi.

Azotobakterning barcha turlar - qat'iy aeroblardir. Bu mikroorganizmlar oziqa muhitidagi organik va noorganik birikmalar ko'rinishidagi fosforga o'ta sezgir bo'lib, uning yuqori miqdori oziqada mavjud bo'lsa juda yaxshi rivojlanadi.

Fosfor etishmaganda ularning azot o'zlashtirish qobiliyati va rivojlanishi keskin susayadi. Azotobakterlarning ko'pchilik turlari esa muhitda azot mavjud bo'lgandagina azot o'zlashtirish xususiyatlarini namayon qiladilar. Kulturalarning azot o'zlashtirish qobiliyatini ammiak pasaytiradi, ammo molibden birikmalari va ba'zan vanadiy esa oshishiga ta'sir ko'rsatadi.

Ikkala azotfiksator azot to'plash uchun energiyaga muhtoj nobud bo'ladi. Ular qandni oksidlab yoki bijg'itib shunday energiya oladi. *Azotobacter* - aerob nobud bo'ladi, Shuning uchun u qandni havo kislorodi bilan oksidlaydi. Paster klostridiyi - anaerobdir, Shuning uchun u qandni moy kislota hosil qilib bijg'itadi. *Azotobacter* ning tuproqdagi elektiv kulturasini olish uchun tuproqqa 2% li mannit qo'shib aralashtiriladi, loy quyuq xamir holiga kelguncha suv qo'shib qoriladi, shu loy Petri likobchasiga solinib, ho'l shpatel bilan yoyiladi va termostatga qo'yiladi. Mannit energiya manbaidir. Mannit borligi tufayli azotobakter yaltiroq, tiniq shilimshiq koloniyalar shaklida o'sib chiqadi. Paster klostriydining elektiv kulturasini olish uchun tuproqqa 1% li glyukoza va suv qo'shib, atala qilinadi. Shu tuproq atalasi Petri likobchasiga solinib, termostatga quyiladi.

Clostridium pasterianum uchun tuproqqa azotbakterdagiga nisbatan ko'proq suv qo'shamiz, chunki tuproqda suv qancha ko'p bo'lsa havo shuncha kam nobud bo'ladi, ya'ni anaerob sharoit vujudga keladi. Paster klostridiyi anaerob bo'lib, tuproq ichida o'sadi. U qandni bijg'itib gaz hosil qiladi, shu sababli uning rivojlanayotganligi gaz pufakchalari paydo bo'lganligidan bilinadi, gaz pufaklari tuproqni ko'tarib, do'mboqchalar paydo qiladi.

Mikrobiologik sanoat asosida azotobakterning bir necha turlari ishlab chiqariladi: quruq, tuproqli va torfli.

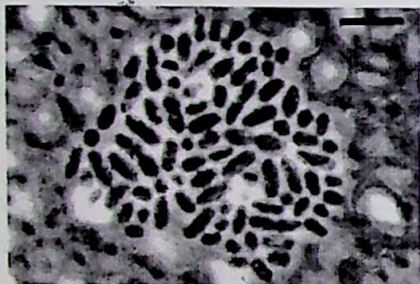
Quruq azotobakterin olish texnologiyasi. Quruq azotobakterin ishlab chiqarish texnologiyasi nitragin ishlab chiqarish bosqichlariga juda o'xshash bo'lganligi uchun ba'zi bir farq qiluvchi xususiyatlarigagina to'xtalib o'tamiz.

Quruq azotobakterin o'zida quritilgan azotobakterii hujayrasining faol kulturasini va qo'shimchani mujassam-lashtiradi. 1 g quruq preparatda 0,5 mlrd. hayotchan hujayralar mavjud bo'lishi lozim (30-rasm). Ushbu kulturalar. *Rhizobium* hujayralari o'stiriladigan suyuq oziqa muhitida o'stiriladi. Bunga qo'shimcha sifatida temir sulfat, manganets, Shuningdek, molibden kislotasi murakkab tuzlari qo'shiladi. O'stirishda pH muhiti 5,7-6,5, aeratsiya esa 1 hajm havo 1 hajm oziqaga 1 minutda beriladi.

Fermentatsiya jarayoni kultura o'sishining statsionar fazasigacha olib boriladi, chunki shu fazada hujayradan biologik faol moddalar ajraladi va kultural suyuqlikda qoladi. Bunda tug'iladigan xafv. Shundan iboratki, ularning hujayradan ko'plab chiqishi oqibatida tuproqqa tushgandan so'ng, hujayraning atmosfera azotini o'zlashtirish xususiyati yo'qolishi mumkin. Biologik faol moddalar to'liq yoki qisman hujayrani quritish jarayonida

yo'qotiladi, biroq anabiozdan chiqqan azotobakterning hayotchan hujayralarida yana biologik faol moddalar hosil qilish xususiyati tiklanadi.

Quritilgan kultura zarur qo'shimchalar bilan standartlanadi va polietilen qopchalarga 0,4-2 kg dan qadoqlanadi. Qopchalar germetik holatda 15°C haroratdan ortiq bo'lmagan haroratli xonalarda 3 oygacha saqlanadi (31-rasm).



30-rasm. *Azotobacter chroococcum*



31-rasm. Erkin holda yashovchi azotfiksatorlardan olingan azotobakterin

Torfli va tuproqli azotobakterin olish texnologiyasi. Bu turdagi azotobakterin preparati o'zida, qattiq oziqa muhitida rivojlangan faol azotobakter kultasini namoyon qiladi va 1 g. preparatda 50 mln. dan kam bo'lmagan hayotchan hujayralarni saqlaydi.

Ularni tayyorlash uchun serhosil tuproq yoki yaxshi uvalanadigan torfdan neytral muhit reaksiyasi bilan foydalaniladi. Ekish uchun olingan qattiq substratga 2% gacha ohak va 0,1% superfosfat qo'shiladi. Olingan aralashma 500 g. dan 0,5 l. hajmli shisha idishlarga joylanadi va 40-60% hajmda suv bilan namlanib, og'zi paxta tiqin bilan yopiladi va sterilanadi.

Ekish materiali 2% gacha saxarozalar va mineral tuzlar saqllovchi agarli oziqa muhitida tayyorlanadi. Kulturalar 27°C haroratda 3-5 kun atrofida o'stiriladi. Jarayonning tugallan-ganligi agar sirtini jigarrang, shilimshiq massa qoplaganligiga qarab baholanadi. Olingan ekish materiali agar sirtidan steril holatda suv bilan yuvib olinadi va tayyorlangan substratga o'tkaziladi. Shisha idishlarga solingandan so'ng yaxshilab aralashtiriladi va 25-27°C haroratda termostatda saqlanadi. O'stirish jarayoni 1 g. tuproq yoki torfda bakteriyalar miqdori 50 mln. bo'lguncha davom ettiriladi. Bu usulda olingan preparat o'z faolligini 2-3 oygacha saqlaydi.

Azotobakterin preparatlaridan fosfor va mikroelementlar saqllovchi

(molibden, vanadiy, bor va x.k) serhosil tuproqda foydalanish tavsiya etiladi. Azotobakterin urugʻ, koʻchatlar va kompostlar bakterizatsiyasi uchun qoʻllaniladi. Bunda oʻsimlik ildizi oziqlanishi oshib, boshqoli, texnik va sabzavot kulturalarida hosildorligi oshadi.

Quruq azotobakterdan foydalanish usuli ekish materiali xususiyatiga bogʻliq boʻladi. Boshqolilar urugʻiga quruq preparatni surkash mexanik usulda 1 gektarga etadigan urugʻga 100 mlrd. hujayra hisobida amalga oshiriladi.

Kartoshka, sabzavot koʻchatlarining ildiz tizimiga esa preparatning suvli suspenziyasi sepiladi. Bunda 1 gektarga etarli suspenziya meʼyorini tayyorlash uchun preparat (300 mlrd.hujayra) 15 l. suvda suyultiriladi.

Ishning borishi. Erkin holda yashaydigan azotfiksatorlarning tuproqdagi elektiv kulturalarini mikroskop ostida tekshirish. Mannitli tuproq plastinkalarida azotobakterning tiniq shilimshiq kapsulasi bilan oʻralgan yirik diplokokklar va tetrakkokklar koʻrinadi.

Glyukozali tuproq plastinkalari qappayib chiqadi. Plastinkaning qavargan joyidagi tuproqning yuza qavatini mikrobiologik sirtmoq bilan koʻtarib, osti boʻsh boʻlib qolganini aniqlaymiz. Glyukozaning achishidan hosil boʻlgan gazlar shunday boʻshliqni vujudga keltiradi. SHu joydan sirtmoq bilan tuproq donasini olib, quruq mazok preparat tayyorlaymiz. Preparatni eritrozini bilan boʻyaymiz. Plastinkalarning qavargan joyidan tayyorlangan preparatda Paster klostridiyining limonga oʻxshash yirik sporali hujayralari koʻrinadi.

Nazorat savollari:

1. Azotobakterin preparatining avfzaligi nimada?
2. Azotobakterin preparati olishda qaysi bakteriyalar ishtirok etadi?
3. Simbiotik azotofiksatorlarning vazifasi nimadan iborat?

11.3 – ish. Fosfobakterin olish texnologiyasi

Asbob-uskunalar va materiallar. Tuproq namunalari, Petri likobchalari, oziqa muhiti (melassa, makkajoʻxori ekstrakti va mineral tuzlar), termostat, mikroskop, immersion moy, mikrobiologik sirtmoq, buyum va qoplagʻich oynalar.

Mavzuni tushuntirish. Fosfobakterin - *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* mikroorganizmi sporalari saqlovchi bakterial oʻgʻitdir.

Bu bakteriyalar murakkab fosfoorganik birikmalar (nuklein kislotalar, nukleoproteidlar va x.k.) va qiyin oʻzlashtiriladigan mineral fosfatlar

(pirofosfatlar, polifosfatlar) ni o'simlik o'zlashtirishiga qulay holatga aylantirib berish xususiyatiga egadir. Bundan tashqari, biologik faol moddalar ishlab chiqaradilar (tiamin, piridoksin, biotin, pantoten va nikotin kislotalar, B₁₂-vitamini va x.k.), bular esa o'simliklar o'sishini boshqarishda, ayniqsa dastlabki o'sish bosqichlarida katta ahamiyat kasb etadi.

Fosfobakterin fosfor o'g'itlari o'rnini egallamaydi va ularsiz ta'sir ham etmaydi. Preparatning asosiy samaradorligi o'stirish xususiyati bilan belgilanadi. *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* morfologik xususiyatiga ko'ra kichik, grammmusbat, aerob spora hosil qiluvchi tayoqchalari o'lchami (1,8-2,0)×(5-6) mkm bo'ladi. Hujayra katta miqdorda fosfor birikmalarini saqlaydi. Bu hujayralar dastlab harakatchan bitta tayoqcha bo'lib rivojlanishi oxirida 0,7×1,2 mkm o'lchamdagi endosporalar hosil qiladi.

Bu mikroorganizm asosida olinadigan preparat asosan sporadan tashkil topadi, Shuning uchun ham o'stirish texnologiyasi ham spora hosil qilishga qaratilgandir. Biroq fosfobakterin ishlab chiqarish texnologiyasi nitragin, azotobakterin kabi preparatlar ishlab chiqarish texnologiyasidan kam farq qiladi.

Sanoat asosida fosfobakterin ishlab chiqarishda shunday omil borki, bu bakterial o'g'it olishda kulturaning fagolizisi va o'smaydigan sporalar hosil bo'lishiga sabab bo'ladi

Kulturalar fagolizisi shu bilan izohlanadiki, bir tomondan *Bacillus megaterium* shtammlari bakteriofaglar ta'siriga juda sezgir va fagolizis natijasida zararlangan kultura nobud bo'ladi, ikkinchi tomondan esa dastlabki kultura o'ziga o'zi mutagen hisoblanadi ya'ni o'zida ma'lum sharoitda faollashadigan profag saqlaydi.

Kompleks korxonalarda fagolizisga qarshi kurashish uchun ishlab chiqarishning barcha bosqichlarida o'stirishning aseptik sharoitini ushlab turish, fagga chidamli shtammlarni saralash va seleksiya qilish hamda kulturaning o'sishiga ta'sir qilmaydigan miqdorda organik kislotalar tuzini oziqaga qo'shish (odatda 0,075-0,1% atrofida) kabi chora tadbirlar qo'llaniladi.

O'simlik urug'ini preparat bilan ishlov berishda mexanik usuldan foydalaniladi, bunda fosfobakterin va qo'shimcha nisbati 1:40 ni tashkil etadi. Kartoshka tuganagiga mo'tadil ishlov berilishi uchun esa 15 g. preparat 15 l. suvda suyul-tiriladi. Bu miqdor 1 gektar erga etadigan ekish materialiga sarflanadi. Fosfobakterin qo'llanilishi hosildorlikni 10% va undan ham ortiqroq oshiradi.

Keyingi yillarda o'simlik rizosferasida va rizoplanida yashaydigan mikroorganizmlar asosida ko'plab bioo'g'itlar va o'simliklarni himoya qiluvchi vositalar ishlab chiqarish yo'lga qo'yilgan. Ayniqsa rizosfera mikroorganizmlari asosida o'simliklarni himoya qiluvchi vositalarga talab va qiziqish katta. Bionazorat prinsipida faoliyat ko'rsatadigan mikropreparatlar ekologik toza mahsulot etishtirish uchun o'ta foydalidir. Shulardan biri Rossiya olimlari tomonidan chiqarilgan ekstrasol preparatidir. Bu preparat asosini *Bacillus subtilis* bakteriyasi tashkil etgan bo'lib, u kasallik qo'zg'atuvchi *Fusarium*, *Verticillium* va *Rhizoctonium* larga antoganistik ta'sir ko'rsatadi va o'simliklarni kasallanishdan saqlaydi.

O'zbekistonda "Er malhami" nomli bioo'g'it ishlab chiqarish yo'lga qo'yilgan. Bu preparat asosini *Azotobacter chroococum* A-2 shtammi tashkil etib, bu shtamm azotfiksatsiya bilan bir qatorda yuqori konsentratsiyada fitogormonlar ham sintez qiladi. Preparat ayniqsa yuqori sho'rlangan tuproqlarda katta samara bilan ishlatilib kelinmoqda.

Ishning borishi. *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* kulturasida barcha bosqichlarini sanoat asosida o'stirish, suyuq oziqa ichiga ekish orqali amalga oshiriladi (11-jadval).

11-jadval

Dastlabki liofillab quritilgan kultura quyidagi tarkibli oziqa muhitida o'stiriladi (% hisobida)

1-oziqa muhiti tarkibi	2-oziqa muhiti tarkibi
Makkajo'xori ekstrakti - 1,8	Makkajo'xori uni - 2
Melassa - 1,5	Melassa - 1,5
Ammoniy sulfat - 0,1	B-kompleksi (D-vitamiini ishlab
Ohak - 1	chiqarishning qoldig'i) - 2
Suv - qolgan suvdan iborat	Kaliy fosfat (ikki almashinishli) - 0,01
	Kalsiy karboksid - 0,3
	Qolgan suvdan iborat

O'stirish fermentyorda qat'iy aseptik sharoitda, doimiy aralashtirish va spora hosil qilish jarayonigacha aeratsiyada olib boriladi. Jarayonning asosiy ko'rsatkichlari: harorat 28-30°C, muhit pH 6,5-7,5 o'stirish davomiyligi 1,5-2 kun.

Birinchi oziqa muhitida o'stirilganda tayyor kultural suyuqlikda hujayra titri 1 ml. da 2,7-3 mlrd. spora, 2-oziqa muhitida esa 1 ml. da 4,3 mlrd. sporani tashkil etadi.

O'stirib olingan hujayra biomassasi sentrifugalash orqali alohidalanib, purkab quritgich moslamada 65-70°C haroratda 2-3% namlik qolguncha quritiladi. Quritilgan sporalar qo'shimcha (kaolin) bilan aralashtiriladi. Bu usulda tayyorlangan preparat 1 grammida 8 mlrd. dan kam bo'lmagan hujayralarni saqlaydi. Ular 50-500 g. dan namlikni saqlab turadigan, germetik qopchalarga joylanadi. Fosfobakterin, azotobakterin va nitragindan saqlashga bo'lgan chidamliligi bilan farqlanadi. Bular 1 yil saqlangandan so'ng hujayraning hayotchanligini yo'qotishi 20% dan oshmaydi.

Nazorat savollari:

1. Fosfobakterin qaysi mikroorganizmlar asosida tayyorlanadi?
2. Fosfobakterin qo'llanilganda o'simliklarga qanday ta'sir qo'rsatadi?
3. Fosfobakterin preparatlarni sanab bering?

12 – ish. Entomopatogen mikroorganizmlarni ajratish va ular asosida preparatlar olish texnologiyasi

12.1 – ish. Bakteriyalar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar

Asbob-uskunalar va materiallar. Bakteriyalarni o'stirish uchun peptonli oziqa muhiti, *Bacillus thuringiensis* bakteriyasining vegetativ kulturasini, Yorug'lik mikroskopi, kulturalarni o'stirish uchun tebratgich, tirik hujayralar sonini aniqlash uchun Goryaeva kamerasi, termostat va pH-metr.

Mavzuni tushuntirish. O'simliklarni *B.thuringiensis* turiga mansub spora-kristal hosil qiluvchi entomopatogen bakteriyalar asosida yaratilgan mikroorganizm insektitsid preparatlari 160 turdan ortiq zararkunandalarga endomotsid ta'sir etish xususiyatiga egadir. Hasharotlar organizmi bu insektitsidlarga qarshi deyarli moslasha olmaydi. Shuningdek ular ekologik zararasiz, issiq qonli hayvonlarga, baliqlarga va insonlarga salbiy ta'sir ko'rsatmaydi.

Mikrob patogenlarini suyuq oziqada o'stirish entomopatogen bakteriyalardan maksimal hujayralar olish yoki toksinlar to'plashga asoslanganidir.

Bakterial entomopatogen preparatlar ishlab chiqarishni entobakterin misolida ko'rib chiqamiz.

Entobakterinni ishlab chiqarish texnologiyasi hohlagan mikrobiologik

ishlab chiqarishdagi suyuq oziqa ichida o'stirish jarayonida kechadigan barcha bosqichlarni o'zida mujassamlashtiradi: *Ekish materialini olish*;

- *Oziqa muhiti tayyorlash va sterillash*;
- *Havoni sterillash*;
- *Fermentatsiya*;
- *Kultural suyuqlikni quyushtirish*;
- *Preparatni quritish va qadoqlash*.

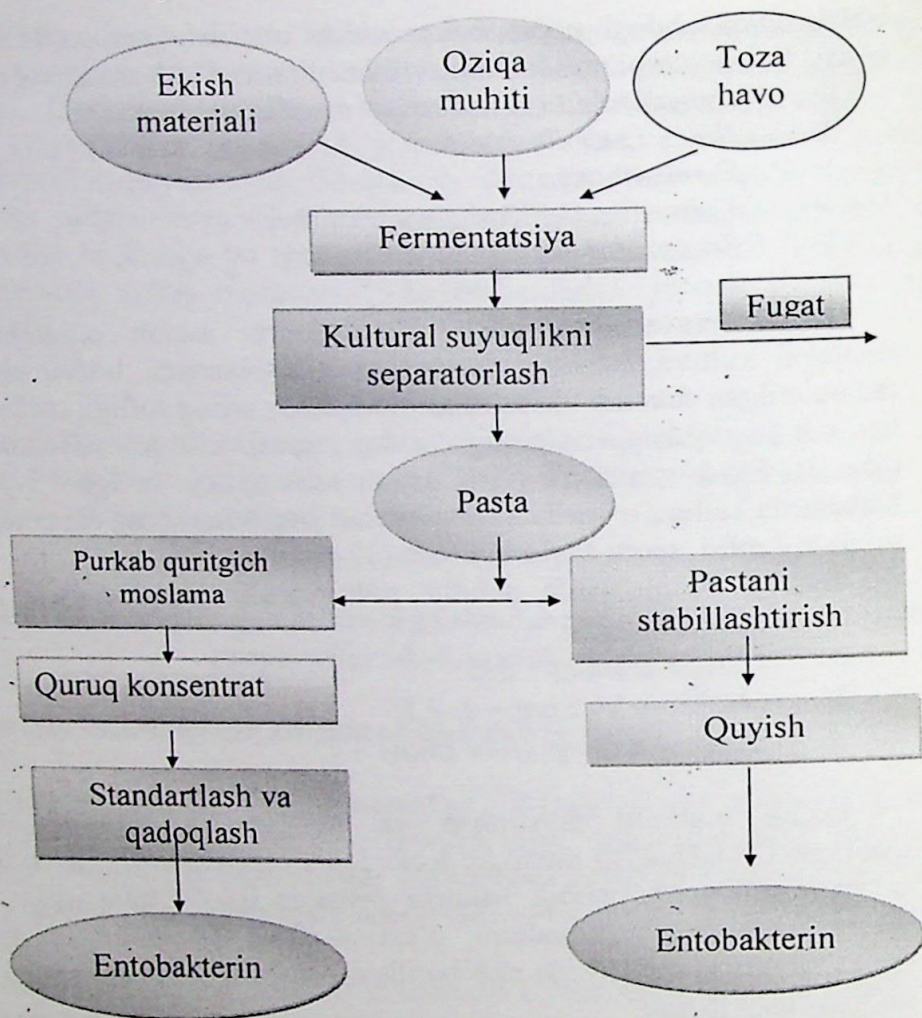
Ekish materialini olish. Entobakterin ishlab chiqarish uchun dastlabki kultura *Bacillus thuringiensis* hisoblanadi. Ishlab chiqarishga tadbiq etilgan shtamm zavod laboratoriyasida uning sofliqi, mahsuldorligi, kultural suyuqlikda virulentligi va fag saqlash kabi xususiyatlari nazorat qilinadi. Ekish materialini olish uchun tubi aylana bo'lgan 3 l sig'imli kolbalarda kultura o'stiriladi. O'stirib bo'lingandan so'ng ekish materialini 1 ml da 1,7 mlrd. spora saqlashi lozim (32-rasm).

Barcha bosqichlarda achitqi polisaxaridli oziqa muhiti quyidagi tarkibda qo'llaniladi (%):

- *Oziqa achitqisi* – 2–3;
- *Makkajo 'xori uni* – 1–1,5;
- *Kashalatli yog' (kam emas)* – 1.

Oziqa muhitini tayyorlash va sterilizatsiya qilishda odatdagi usullardan foydalanish mumkin. Kolbalarda olingan ekish materialini ekish uskunasiidagi oziqa muhiti hajmiga nisbatan 0,05% miqdorida ekiladi. Ushbu uskuna kulturalarni o'stirish 28–30°C haroratda uzluksiz aralashtirish va aeratsiyada olib borilishi hamda uskuna bosimi 0,14–0,15 Mpa bo'lishi lozim.

O'stirish davomiyligi 35–40 soatni tashkil etadi. Ekish materialini ishlab chiqarish fermentyoriga berilish oldidan unda yot mikroflora yoki faglar mavjudligi qat'iy ravishda tekshirishdan o'tkaziladi.



32-rasm. Entobakterin ishlab chiqarish texnologiyasining chizmasi

Fermentatsiya. Fermentatorga solingan ekish materiali ekish uskunasidagi texnologik jarayonlar asosida oʻstiriladi.

Oʻstirish jarayoni 35–40 soat davom ettiriladi. Oʻstirish jarayoni kultural suyuqlikda erkin spora kristallar miqdori 5–10% ni tashkil etganda yakunlanadi. Kultural suyuqlik 1 ml da 1 mlrd. spora saqlashi lozim.

Kultural suyuqlikni quyuqlashtirish. Maxsus yigʻichlarda toʻplangan kultural suyuqlik separatorga yoʻllanadi. Separatorida yigʻilgan pasta 30 minut davomida maxsus toʻplash joyida aralashtiriladi va uning spora saqlashi, virulentligi, fag mavjudligi va namligi tekshiriladi. Odatda

1 m³ kultural suyuqlik separatordan o'tkazilganda 100 kg pasta chiqishi lozim. Pastaning namligi 85% bo'lib, taxminan 1 grammida 20 mlrd. sporalar titrini saqlashi kerak.

Quritish va entobakterinni tayyor maxsulot shaklida olish. Pasta muvofiq nazoratlardan o'tkazilgandan so'ng purkab quritish moslamasiga yo'naltiriladi. Quritishdan so'ng preparatning namligi 10% dan oshmasligi lozim. 1 m³ kultural suyuqlikdan 12–13 kg quruq preparat chiqadi. Preparat 1 grammida 100–150 mlrd. sporalar titrini saqlaydi. Uni standartlash uchun qo'shimcha sifatida kaolin qo'shiladi va polietilenli almashtiriladigan tegishli ko'rsatmalar ko'rsatilgan etiketkalar yopishtirilgan to'rt qatlamli kraft–qopchalariga 20 kg dan joylanadi.

Tayyor entobakterin preparati 1 grammida 30 mlrd. dan kam bo'lmagan sporalar titri va shuncha miqdorda kristallar saqlaydi. Ushbu preparat bog', tomorqa va issiqxonada uchraydigan 60 dan ortiq zararkunanda hasharotlar turlariga qarshi samarali hisoblanadi. Zararkunanda bilan zararlangan o'simlikka entobakterin preparati suvli suspenziya ko'rinishida 0,5–1% miqdorida zararkunandaning faol oziqlanishi oldidan purkab sepiladi. Hasharotlarning asosiy qismi 2–10 kunlari nobud bo'ladi. Entobakterin preparati hozirda pasta ko'rinishida ham ishlab chiqarilmoqda. Bu holda ishlab chiqarish quruq preparatga nisbatan bir qadar arzon va qulaydir. Kultural suyuqlikdan olingan pasta, unga aniqlangan miqdorda stabilizator–karboksi-metilsellyuloza (KSM) qo'shiladigan maxsus idishga yo'naltiriladi.

KMS molekulalari spora va oqsilli kristallarni sorbsiya qiladi va buning natijasida ularning bir-biri bilan ma'lum nisbatda joylashishi va tarqalishini ta'minlaydi. Stabilizator qo'shiladigan vaqtda pastaga uzoq vaqt saqlanishini ta'minlab beradigan turli xil konservantlar ham qo'shiladi.

Fagolizisga qarshi kurashish. Entobakterin ishlab chiqarish texnologiyasida asosiy qiyinchilik, boshqa entomopatogen preparatlar ishlab chiqarishdagi kabi fagolizisga qarshi kurashishda paydo nobud bo'ladi. Fag–bu bakteriyani nobud qiluvchi virusdir. Uning ta'sir etish mexanizmi xo'jayin–bakteriyada DNK sintezini to'xtatadi va natijada bakteriya nobud bo'ladi. Fag rivojlanishini chegaralab tashlash xususiyatiga ega bo'lgan turli xil birikmalar – antifag faktorlarini qo'shish fagolizisga qarshi kurashishning bir usuli hisoblanadi. Bunday birikmalarni olish juda qimmat bo'lganligi uchun keng miqyosda qo'llanilmaydi. Yana bir usul bu fagga bardoshli shtammlardan

foydalanish hisoblanadi, ammo bunda ham ko'p mehnat talab qiladigan genetik va seleksiya ishlarini bajarish lozim bo'ladi.

Ishning borishi. Hasharotlar organizmidan kulturalarni Skring usulida ajratib olinadi. Bunda uning tanasining ustki qismi sterilizatsiya qilinadi va uning oshqozon-ichak sistemasidan mikroorganizmlar qattiq oziqa muhitiga ekib olinadi. O'sgan koloniyalar alohida ekib olinadi. Ularni biokimyoviy testlar orqali identifikatsiya qilinadi. *B.thuringiensis* entomopatogen bakteriyasi peptonli agar (PA) oziqa muhitida 72 soat o'stiriladi. Bunda kulturalar 750 ml sig'imli kolbalarda 100 ml suyuq oziqa muhiti solib 48-72 soat mobaynida minutiga 180 marotaba tebranadigan (180 tez/min) chayqatgichda, 27-28°C haroratli xonada o'stiriladi. Tirik hujayralar miqdori qattiq agarli muhitda o'sgan alohida koloniyalar soniga qarab hisoblanadi. Spora-kristallar nisbati bo'yalgan mazokda taqqoslab o'rganiladi. Hujayralar soni Goryaev kamerasi yordamida sanab o'rganiladi. Bakteriya kulturalarining rivojlanishi davomida oziqa muhitida pH ko'rsatgichini o'zgartirishi kultural suyuqlikda har 24, 36, 60 va 72 soatda tekshiriladi.

B.thuringiensis bakteriyasining zarakunanda hasharotlarga entomopatogen ta'sirini o'rganish uchun, kulturalar entomo-patogen-ta'siri qo'ng'izlarda umumiy qabul qilingan usul yordamida o'rganiladi. Qo'ng'izlarning o'rtacha og'irligi 50 mg bo'lishi kerak. Kultura suspenziyasi (spora-kristalli aralashmasi, 2,0 x mln. hujayra/ml) 3 g miqdordagi qo'ng'izlar quruq oziqaga 1 ml qo'shiladi va Petri likobchasiga aralashtirib solinadi. Har bir Petri likobchasiga 10 tadan qo'ng'iz solinadi. Har bir preparat faolligi 30 ta qo'ng'izda, ya'ni nobud bo'lgan qo'ng'izlar sonining nazorat oziqa muhitiga nisbatan o'zgarishi 7 kungacha kuzatiladi.

B.thuringiensis bakteriyasi shtammlari morfo-kultural, fiziologik va biokimyoviy xususiyatlarini o'rganish uchun bakteriyalar o'lchami, uning kristall oqsilli yig'indisi va sporalari o'lchami okulyar mikrometrda o'rganiladi. Bundan tashqari bakteriyalar xarakatchanligi ularni yarim suyuq oziqa muhitiga (NaCl-0,5 g, K₂HPO₄- 0,5 g, MgSO₄-0,5 g, pepton-10 g, saxaroza-2 g, agar-agar 2,5 g, suv -1000 ml) ekish orqali aniqlanadi. Ushbu oziqa muhitida o'sgan kulturalarning quyidagi xususiyatlari o'rganiladi: parda hosil qilish xarakteri, oziqa muhitining rangini o'zgartirishi (tiniqsizlanishi), qoldiq xarakteri, uning rangi va konsistensiyasi, o'sish xarakteri, shakli, yuzasi, relfi, konsistensiyasi, atsetil-metil-karbonol hosil qilishi aniqlanadi.

Nazorat savollari:

1. Entobakterin ishlab chiqarish texnologiyasida asosiy qiyinchiliklar nimadan iborat?
2. *Bacillus thuringiensis* preparatini ajratishning qanday usullari bor?
3. *Bacillus thuringiensis* preparatining avfzaligin nimada?

12.2 – ish. Zamburug‘lar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar

Asbob-uskunalar va materiallar. Zamburug‘larni o‘stirish uchun qattiq va suyuq oziqa muhitlari, zamburug‘larning sof kulturasi, Yorug‘lik mikroskopi, kulturalarni o‘stirish uchun tebratgich, tirik hujayralar sonini aniqlash uchun Goryaev kamerasi, termostat va pH -metr.

Mavzuni tushuntirish. Zamburug‘li entomopatogen preparatlar zararli hasharotlarda miko‘z kasalligini tug‘dirish orqali ularning nobud bo‘lishiga olib keladi.

Entomopatogen bakteriyalar va viruslarga nisbatan zamburug‘lar quyidagi o‘ziga xos xususiyatlarga ega:

- nobud bo‘lish ovqat hazm qilish yo‘llari orqali emas, balki bevosita kutikula orqali ruy beradi;
- hasharotlar o‘zining g‘umboy va imago rivojlanishi fazasida nobud bo‘ladiki, bu boshqa mikroorganizmlar bilan nobud bo‘ladigan o‘zaro munosabatlarda kuzatilmaydi;
- zamburug‘lar nisbatan tez o‘sishi va juda katta reproduktiv qobiliyatiga egaligi bilan xarakterlanadi, entomopatogen faolligini pasaytmasdan spora holatida uzoq vaqtgacha tabiatda saqlanishi mumkin;
- ayrim hasharotlar turlarini nobud qilishda yuqori darajada spetsifik bo‘lib, binobarin ularning virulentligi sezilarli darajada ishlatiladigan zamburug‘larni shtammiga bog‘liq nobud bo‘ladi.

Zamburug‘li preparatning xashoratga ta’siri sporalarning tana bo‘shlig‘iga teri orqali kirishidan boshlanadi. Xasharot tanasiga tushgan zamburug‘ sporasi o‘sib gifaga aylanadi, keyin mitseliyga, qaysiki ulardan gifali tanachalar entomopatogen zamburug‘larning infeksiyali birligini tashkil qiluvchi konidiyalar ajralib chiqadi.

Kopidiyalar o‘sib chiqqandan keyin to hasharotlar nobud bo‘lishigacha nobud bo‘ladigan oraliq vaqt hasharotlar katta-kichikligiga qarab 2–8 sutkagacha davom etishi mumkin.

Beauveria turkumiga mansub zamburug‘lardan preparatlar olish

ularning *B.bassiana* Vuill (60 dan ortiq turdagi hasharotlarni nobud qiladi) va *B.tenella* Del. (10 dan ortiq turdagi hasharotlarni nobud qiladi) turlari asosida sanoat miqyosida preparatlarni ishlab chiqarishga asoslangan.

Hozirgi paytda *B.bassiana* (Bals.) Vuill. ni gafolitseti konidiosporasini tashkil qiluvchi zamburug'li entomopatogen preparat-boverin ishlab chiqarish keng yo'lga qo'yilgan.

Tayyor holdagi bu preparat oq yoki kremsimon ko'rinishidagi poroshok bo'lib, 1 gr. preparatda 1,5 dan 6 mlrd. gacha konidiosporalar mavjud. Sporalar bilan bir qatorda boverin faolligi zamburug'da sintez qilinadigan toksin-boveritsin bilan ham belgilanadi. Bu preparatni qo'llash dexqonchilikda qo'llaniladigan kimyoviy preparatlarni 90% gacha qisqartirishga imkon beradi. Shu bilan birga preparat insonlar, issiq qonli hayvonlar uchun zararsizdir.

Boverinni sanoat asosida olish uchun ishlab chiqarish shtammini ham suyuq oziqada, ham qattiq oziqa muhitida o'stirish mumkin.

Konidiosporalar ishlab chiqarishda texnologik-iqtisodiy ko'rsatkichlar suyuq oziqada o'stirish bilan qattiq oziqa yuzasida o'stirish usullarida deyarli o'xshash nobud bo'ladi.

Biroq, konidiosporalarni suyuq oziqa fazasida o'stirish orqali olish oddiy ish emas, buning o'ziga xos texnik noqulayliklari mavjud.

B.bassiana Vuill zamburug'ini suyuqlik usuli orqali o'stirilganda ular vegetativ ko'payib, havo konidiosporalardan farq qiluvchi konidiya (blastospora, silindraspora) deb nomlanuvchi gifali tana hosil qiladi.

Hashoratlarga ta'siri yuzasidan konidiyalar, konidiyalardan qolishmaydi, ammo ishlab chiqarish sharoitida konidiyalar asosida yuqori faollikka ega preparatlar olish imkoni yo'q, chunki ular konidiylarga nisbatan quritish bosqichidagi yuqori haroratga o'ta darajada sezgir va chidamsizdir. An'anaviy yuqori haroratda purkab quritgich moslamalarda boverin ishlab chiqarishda preparatlar quritilganda 90% konidiospora va 20-50% konidiospora nobud nobud bo'ladi. Shuning uchun quritilgandan so'ng sporalar yashovchanligi va ularning virulentligiga ko'ra boverin ishlab chiqarishda e'tibor konidiospora miqdorini maksimal darajada olishga yo'naltirilgan.

B.bassiana Vuill zamburug'ini suyuq oziqada o'stirish orqali konidiospora olish muammosi oziqa muhiti va fermentatsiya sharoitini tanlash muammosi hal qilinganda echildi.

Ishning borishi. Suyuq oziqada o'stirish usuli orqali boverin olish texnologiyasi. Bu usulda boverin olish qat'iy aseptik sharoitda olib

boriladi. Bunda eng asosiy va zarur bosqichlardan biri bu ekish materialini olish texnologiyasini tanlash hisoblanadi.

Agarli kosyaklarda Sabur yoki pivo suslosi oziqa muhitlarida saqlanayotgan tabiiy shtamm dastlab kolbalarda $25-28^{\circ}\text{C}$ haroratda 3-4 kun mobaynida suyuq oziqa muhitida aralashtir-gichda o'stirib olinadi. Olingan konidiosporalar liofilizatsiya usulida quritiladi. Bunday ekish materialini 1 yilgacha o'zining yashovchanligi va virulentligini yo'qotmasdan saqlash mumkin.

Fermentyorga oziqa muhitiga ekish materialini ekish ikki bosqichda: dastlab kulturalarni kolbalarda o'stirib olish, keyin inokulyatorda yoki to'g'ridan-to'g'ri inokulyatorda o'stirish. Orqali olib boriladi Asosiy uskunada ekilganda ekish material oziqa muhitining 2-10% nisbatda hajmni tashkil etishi talab etiladi. Sanoat asosida o'stirishning barcha bosqichlarida bir xil oziqa muhiti, tarkibi va harorat turli xil shtammlarga muvofiq ravishda qo'llaniladi.

Oziqa muhiti tarkibida odatda: (%) lizirlanmagan oziqa achitqisi-2; kraxmall-1; natriy xlor-0,2; marganets xlor-0,001; kalsiy xlor -0,005 miqdorda nobud bo'ladi.

Oziqa muhitiga barcha komponentlar solingandan so'ng, oziqa muhiti rN ko'rsatkichi 4,5-5,6 gacha bo'lishi kuzatiladi. Sporali ekish materialini o'stirish $25-28^{\circ}\text{S}$ haroratda 25-28 soat mobaynida olib boriladi. O'stirishning davomi shu haroratda asosiy fermentyorda 3-4 kun olib boriladi. Zamburug'larni ekish moslamasida va ishlab chiqarish fermentyorlarida o'stirish doimiy aralashtirish va doimiy bir xil aeratsiya sharoitida olib boriladi. Bunga sabab foydalanilayotgan shtammga bog'liq holda havo o'zlashtirilishi keskin o'zgarib turadi: bir minutda oziqa muhiti 1 hajmdan 2,5 hajmgacha o'zgarishi mumkin.

Asosiy moslamada ishlab chiqarishda oziqa muhiti aminli azot saqlashi katta ta'sir ko'rsatadi, uning etishmasligi kulturaning o'sish tezligini keskin sekinlashtiradi va konidiosporalar hosil bo'lish foizini pasaytirib, konidiy hosil bo'lishini keskin oshirish qobiliyatiga ega. Oziqa muhitida aminli azotning mo'tadil miqdori 10-15 mg foiz hisoblanadi.

Suyuqlikda zamburug'ni o'stirishning birinchi 1-1,5 sutkasi davomida oziqa achitqisi to'liq lizis nobud bo'ladi, zamburug' esa bu vaqtda o'zining barcha o'sish fazalarini bosib o'tgan nobud bo'ladi (mitselialli, konidialli). Oziqada oqsil mahsulotlari saqlanishi konidiy hosil bo'lishining bir qadar yaxshilanishini ta'minlaydi. Zamburug'ni to'liq voyaga etishi yakunlanganda mitseliy lizisi va konidiy to'planishni ta'minlashga olib keladigan maksimal darajada fermentlar ajratadi.

Kultural suyuqlikda konidiosporalar hosil bo'lishi produtsent-shtamm tabiatiga va uni o'stirish sharoitiga bog'liq holda 1 ml da 0,3 dan 1,3 mlrd. gacha o'zgarib turishi mumkin.

Bunda bu kultura 90–92% konidiospora, 3–5% miqdorda konidiy hosil qiladi, mitselli to'liq bo'lmaydi. Tayyor kultural suyuqlik separatsiya yoki filtratsiya usulida cho'ktiriladi.

Filtrlangandan keyin 70–80% namlikdagi, 6–8 mlrd. spora titri bo'lgan pasta olinadi va u yuqori haroratda purkab, quritish moslamasiga o'tkaziladi. Quritilgan sporalar kichik zarrachasimon kukun ko'rinishda 10% namlikda bo'lib 1 grammda 8×10^9 gacha hujayra titri saqlaydi.

Olingan kukunning LK_{50} ko'rsatkichi aniqlangandan so'ng (letal miqdori, test-hashoratni 50% nobud qilishi zarur) muvofiq ravishda kaolinda standartlanadi. Tayyor preparatga ba'zan qo'shimchalar yopishuvchi xususiyat beradi.

Zamburug'ni yuza qismga ekish usuli orqali boverin olish texnologiyasi. Boverin olishning yana bir usuli zamburug'ning sporali qatlamini yuza qismga ekish orqali olinadigan texnologiyaga asoslanadi. Bu bir qadar uzoq vaqt va ko'p mehnat talab qiladi, Shuning uchun undan foydalanish chegaralangandir.

Quyida biz bu usulning ishlab chiqarish va kichik ishlab chiqarishdagi ba'zi bir asosiy ko'rsatkichlari bilan tanishib chiqamiz.

Zamburug'ni yuza qismga ekish ham suyuq va yarim suyuq oziqaga ekishdagidek amalga oshiriladi, bu oziqa muhitida zamburug' juda yaxshi o'sish tezligini namoyon etadi. Uni mikrobiologik ishlab chiqarish sporali qatlam olingan bosqichida yakunlanib, keyin ajratiladi, quritiladi, maydalanadi va muvofiq miqdordagi qo'shimchalar bilan standartlanadi.

Boverinni ishlab chiqarishda yuza qismga ekish usullari bir-biridan farq qiladi:

- *Zamburug'ni sterilizatsiya qilinmagan suyuq oziqa muhitga ekiladi, aralashtiriladi va aeratsiya hosil qilinadi;*
- *Sterilizatsiyalangan qattiq va suyuq oziqa muhitga ekiladi, aralashtirilmaydi va majburiy aeratsiyalanadi;*
- *Aralash usullarda zamburug' qatlami o'stiriladi.*

Birinchi ikki usul asosida o'stirilganda zamburug' qishloq xo'jalik qoldiq mahsulotlari turli xil o'simlik substratlarida juda yaxshi o'sadi.

Zamburug' rivojlanishi uchun mo'tadil harorat $18-28^{\circ}\text{C}$ atrofida bo'lib, janubiy tumanlarda zamburug'ni mavsumiy o'stirishda ob-havo haroratiga mos ravishda amalga oshiriladi.

Zamburug'ni sterilizatsiya qilinmagan suyuq oziqa muhitida, aralashtirmasdan va majburiy aeratsiya holatda o'stirishda oziqa muhiti sterilizatsiyalanmasdan, oddiygina qaynash darajasigacha qizdiriladi va yog'och karkaslarga (idish) quyilib ustiga yupqa polietilen plyonka yopiladi. Oziqa 35–40°C gacha sovutiladi va quruq sporalar ekiladi. Karkaslarning usti polietilen klyonka bilan yopiladi va zamburug' ekilgan sporalj qatlam hosil bo'lgandan so'ng u ajratib olinadi.

Oziqa muhiti sifatida barcha qaynatmalardan, masalan qand lavlagi, kartoshka, oshqovoq va g'alla undan foydalanish mumkin.

Qattiq oziqa muhitlarida entomopatogen zamburug'larni o'stirish texnologiyasi. Zamburug'ni sterillangan qattiq va suyuq oziqa muhitida aralashtirmasdan va majburiy aeratsiyada, sterilizatsiyada, oziqa muhiti alohida sterilizatsiya qilinadi, qattiq-suslo - agar, kartoshka, sabzi, makkajo'xori, tarvuz po'stlog'i, ba'zan bug'doy doni va makkajo'xori 40 minut davomida 112°C da, shakar saqlovchi 7 % gacha, qand saqlovchi suyuq suslo 20 minut davomida 110°C da haroratda sterilizatsiya qilinadi.

Steril substratga quruq sporalar yoki ularni suspenziyasi ekiladigan material bir xil holatda tarqatiladi va 18–23°C haroratda saqlanadi.

Qattiq substratda konidiosporalar hosil bo'lishi 12–15 kun oxirlarida tugallanadi.

Zamburug' kulturalari substrat qoldig'i bilan birga stellajlarda 25–28°C haroratda quritiladi. Olingan tayyor preparat kukun holiga kelguncha maydalanadi. Suyuq substratlarda 7–10 sutkadan keyin spora hosil ko'zatiladi, 18–25 sutkada esa hosil bo'lgan sporalari yupqa qatlam ajratiladi. Uni shishada quritiladi, ajratiladi, maydalanadi va torf yoki talk bilan aralashtiriladi.

Bu har ikkala usulni ham mahalliyashtirish mumkin. Bunday ishlab chiqarish sexlarida 1 oyda 1 grammida $1,5 \times 10^9$ spora bo'lgan 750–800 kg preparat tayyorlash mumkin.

Ishlab chiqarishga qulay bo'lgan usul zamburug' qatlamini kombinirlangan usulda o'stirish hisoblanadi. U quyidagilarni o'ziga birlashtiradi:

- *g'allada onalik kulturasini olish;*
- *kolbalarida 12–17 soat davomida suyuq oziqa muhitida inokulyatni o'stirish;*
- *fermentyorlarda aralashtirib, majburiy aeratsiyada 22–28 soat davomida o'stirish va vegetativ kulturalarni to'plash;*
- *kyuvelalarda kultural suyuqliklarni qo'yish va sporalari qatlamda hosil*

qilib o'stirish;

- *sporali qatlamni quritish va miqdorlash;*
- *preparatni kaolin bilan standartlash.*

Zamburug'ni o'stirish uchun tarkibida: (%) melassa-6; makkajo'xori ekstrakti-1%; $MgSO_4$ -0,05%; K_3PO_4 -0,2 saqlovchi oziqa muhitidan foydalaniladi.

O'stirish 24-26°C da olib boriladi. Konidiy titri inokulyat bosqichida 1 ml ekish materialida 0,5-2 mln. ni tashkil etadi.

Inokulyant miqdori fermentyorlarga ekilayotganda oziqa muhiti hajmining 2-4 % ini tashkil etishi zarur.

Tayyor kultural suyuqlikning 1 ml da 50-100 ml hujayra titri bo'ladi. Qatlamda o'stirish uchun kyuvetalar vertikal kameralardan tashkil topgan nobud bo'ladi (har biri 35-70 donadan). 25-26°C o'stiriladi 16-18 soatdan keyin yupqa qavat hosil bo'lishi ko'zlatiladi, 3-4 sutkadan keyin spora hosil bo'lishi, 4-5 sutkadan so'ng to'liq konidiy hosil bo'lishi boshlanadi.

Bu davrda qatlam ajratiladi va quruq kyuvetkaga joylashtirilib, qopqog'i yopiladi va 2-3 kun miqdorlash uchun qoldiriladi. Shundan keyin ular ajratiladi va 28°C haroratda quritiladi.

Quritilgan spora qatlami polietilen qopchalarga joylanib, 18-20°C haroratda quruq joylarda saqlanadi.

Boverin tayyorlanishidan avval tayyor sporali material sharsimon idishda maydalaniladi va qator elaklardan o'tkaziladi. Tayyor materialning titri aniqlanadi va 15-20 minut davomida zarur kaolin miqdori bilan aralashtiriladi. Tayyor preparatning 1 grammida 1,5 mlrd. dan kam bo'lmagan konidio-sporalar nobud bo'ladi.

Barcha amalga oshirilgan bosqichlar 11-12 kunni egallaydi, Shundan inokulyat olish uchun-1 kun; fermentyorda o'stirish -1-1,5; shkaflarda ushlash-5; qatlamni dozalash-2; qatlamni quritish 2-3 kunni tashkil etadi.

Boverin qayrag'och barg kemiruvchi zararkunandalari, Shuningdek olma, sharqiy mevaxo'r va o'rmon zararkunandalariga qarshi qo'llaniladi.

Boverinni kartoshka o'simligidagi kolorado qo'ng'iziga qarshi qo'llash samarali foyda beradi. Preparatga kimyoviy insektitsidlar qo'shib qo'llash 100% barcha yoshdagi lichinkalarni 100% gacha nobud qiladi. Boverinning sarf me'yori 1 gektarga 1-2 kg bo'ladi. O'simliklarga preparat purkash orqali sepiladi. Kimyoviy preparatlar bilan aralashtirish,

preparatni qo'llashdan 2 soat oldin amalga oshiriladi.

Nazorat savollari:

1. Entomopatogen zamburug'lar qanday xususiyatlarga ega?
2. Qanday zamburug'li entomopatogen preparatlarni bilasiz?
3. Zamburug'li entomopatogen preparatning kimyoviy preparatlardan farqi nimada?

12.3 – ish. Viruslar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar

Asbob-uskunalar va materiallar. Viruslar bilan zararlangan zararkunandalar, viruslardan preparat tayyorlash uchun ishlatiladigan aldamchi em, sentrifuga, flakonlar, distillangan suv, glitserin va atseton.

Mavzuni tushuntirish. Hamma entomopatogen preparatlar ichida virusli preparatlar xo'jayin hasharotga nisbatan o'zining o'ta spetsifikligi bilan xarakterlanadi. Ular odatda bir turdagi hasharot-largagina ta'sir ko'rsatadi.

Ularning bu yaqqol tor doiradagi ta'sirining o'zi bu preparatlarning inson, flora va fauna uchun bezararligini ko'rsatadi. Viruslar o'zlarining noqulay tashqi ta'sirlariga (harorat, namlik) o'ta chidamli bo'lib, ular hasharotlardan tashqi holatda ham 10–15 yilgacha o'z ta'sir kuchini yo'qotmaydi.

Hasharotning viruslar bilan kasallanishi ularning ovqatlanishi orqali yuz beradi. Hasharot ichaklariga tushgan virusli tanacha ishqorli pH da parchalanishni boshlaydi. Erkinlikka chiqqan virionlar ichak devorlari orqali hujayralarga o'tib, yadrolarda viruslar replikatsiyasi ruy beradi. Bo'sh viruslar boshqa hujayralarni ham zararlav boshlaydi va oqibatda hasharotlar lichinkalarining nobud bo'lishiga olib keladi.

Viruslarning farqlanuvchi belgilari shuki, ular faqatgina tirik to'qimalardagini ko'paya oladi. Bu esa o'z navbatida sanoat miqyosida virusli entomopatogen preparatlarni ishlab chiqarishda bir muncha qiyinchiliklar tug'diradi, chunki viruslarni ko'paytirish texnologiyasi jarayonida faqatgina tirik xo'jayin-hasharotlardan foydalanishi talab etiladi.

Hozirgi paytda 3 xil virusli entomopatogen preparatlarni ishlab chiqarish yo'lga qo'yilgan: virin-EKS (karam qurtiga qarshi), ENSH (tok ichak qurti kasaliga qarshi), ABB (ameraka oq kapalagiga qarshi).

Har qanday virusli preparatni ishlab chiqarish xo'jayin hasharotni

ularning fiziologik sog'lomligini ta'minlovchi sun'iy oziqa muhitida o'stirishdan boshlanadi. Ma'lum bir rivojlanish fazasida (odatda qo'ng'iz davrida) hasharotlar ovqatiga virusli suspenziya qo'shish yo'li bilan ular zararlantiriladi. Buning uchun inokulyat oldindan bir qancha kasallangan lichinkalardan olib tayyorlanadi.

Hashorotlar zararlengandan so'ng uning to'qimasida maksimal viruslar to'planishini ta'minlovchi qat'iy aniq sharoitda saqlanadi.

Ishning borishi. 7-9 kundan keyin nobud bo'lgan va chalajon lichinkalar yig'iladi, 33-35°C da ular quritiladi, mexanik usulda to'qimalar yig'indisi - tana maydalanadi. Olingan massaga fiziologik eritma yoki distillangan suv 1 qo'ng'izga 1 ml hisobida qo'yiladi, maydalanib suyultirilgan to'qima filtrlanadi.

Ishlab chiqarish preparati virin-EKS poliedralari filtratni sentrafigura usulida cho'ktirib olinadi. Cho'kma minimal miqdorda distillangan suvda suyultiriladi va 1 ml dan 1 mlrd. gacha poliedrlar titri bo'lguncha sterillangan glitserin qo'shiladi.

Tayyor preparat flakonlarga bir yoki bir necha gektaga etarli miqdordagi me'yorda joylanadi. Ushbu texnologiya inokulyat sarfi bilan taqqoslanganda poliedrlar miqdorini 5-10 ming marta oshirish imkoniyatini beradi. Bitta qo'ng'izda o'rtacha 36 mlrd gacha poliedrlar uning quruqmas og'irligining 30% ini tashkil etuvchi 36 mlrd gacha poliedrlar olish imkoniyati mavjud.

Ishlab chiqarishda virin-ENSH preparati filtratiga laktoza qo'shiladi aralashtirilgandan so'ng suspenziya hajmining 4:1 nisbatida atseton qo'shiladi.

Tindirilgandan so'ng ustki qism suyuqligi to'kiladi cho'kma esa atseton to'liq uchib ketguncha quritiladi. Tayyor preparat formasini tayyorlashda quruq cho'kma qo'shimchalar - kaolin yoki bentonitga 1 grammari 1 mlrd. poliedrlar titrini olishgacha aralashtiriladi.

Preparatning yog'li formasi cho'kmani dastlab steril 50% li glitserin eritmasida 1 ml da poliedrlar titri 2 mlrd - bo'lguncha despirgirlash yo'li bilan tayyorlanadi, keyin steril holda solyar moyi hajmi miqdorida qo'shiladi, aralashtiriladi va flakonlarga qo'yiladi.

Nazorat savollari:

1. Virusli entomopatogen preparatlar olish texnologiyasini bilasizmi?
2. Virusli entomopatogen preparatlarni ajratib olish usulari-ni aytib bering?
3. Hasharotlarda virusli preparatlar qanday ta'sir qiladi?

13 – ish. Antagonist mikroorganizmlarni ajratish va ko‘paytirish

Mavzuni tushuntirish. Fitopatogen mikroorganizmlarga qarshi tekshirish uchun olingan mikroorganizmlarni antibiotik hosil qilish xususiyatlari agarli oziqa muhitlariga ekish orqali aniqlanadi. Buning uchun fitopatogen mikroorganizmlar test sifatida foydalaniladi va ular agarli oziqa quyilgan Petri likobchalariga ekiladi. 7-10 sutka davomida suyuq oziqa muhitlarida o‘stirilgan tekshirilayotgan mikroorganizmlarning kultural suyuqligiga botirilgan qog‘ozli filtr disklari agarli oziqa muhiti sirtiga teriladi va ekilgan Petri likobchalari 24-26°C haroratli termostatlarga qo‘yiladi, hamda natijalar daftarga yozib boriladi.

Nazorat savollari:

1. Antagonist mikroorganizmlar qanday ajratiladi?
2. Qaysi mikroorganizmlar guruhida fitopatogenlarga nisbatan antagonistlar ko‘proq?
3. Antagonist mikroorganizmlar boshka mikroorganizmlardan farqi nimada?

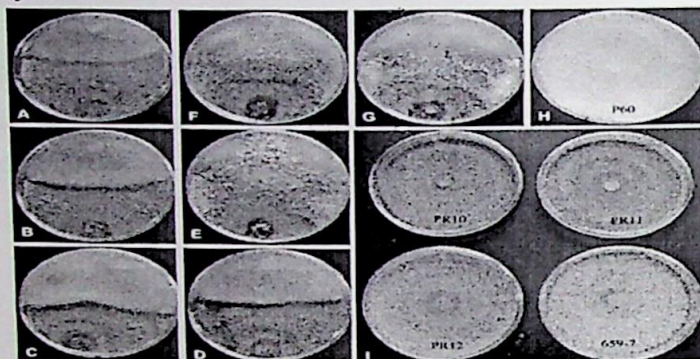
13.1– ish. Tuproq namunalarini olish va ulardan antagonist mikroorganizmlarni ajratish

Asbob-uskunalar va materiallar. Tuproq namunalari solingan sterillangan qog‘oz paketlar, Petri likobchalari, filtr qog‘oz, pinset, avtoklav, termostat, sovutgich, oziqa muhiti solingan steril probirkalar.

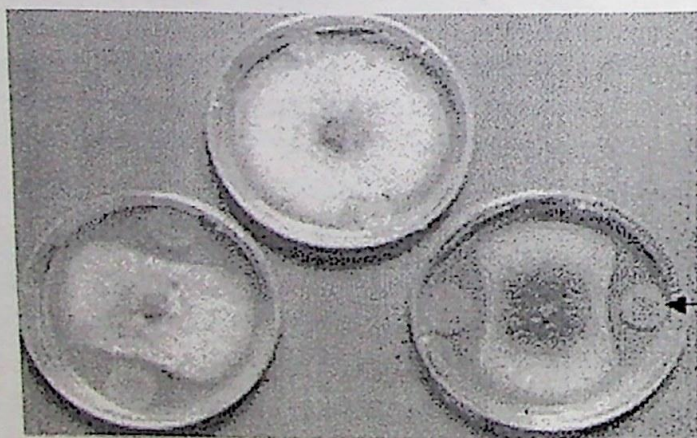
Ishning borishi. Laboratoriya ishi uchun ekinlari bilan band bo‘lgan dalalardagi tuproqdan diogonal bo‘ylab olingan namunalar ishlatiladi. Bu namunalar 0-30 sm chuqurlikkacha olingan bo‘lib, ular oldindan tayyorlab qo‘yilgan sterillangan qog‘oz paketda saqlanadi. Tuproq namunalarini shu kuni laboratoriyada tekshirish imkoniyati bo‘lmasa ularni sovutkichlarga qo‘yiladi.

Antagonist mikroorganizmlarni namlik kamerasi usulida ajratib olish uchun Petri likobchasidan foydalaniladi. Steril Petri likobchasi tagiga to‘shalgan filtr qog‘oz doirachasini spirt lampasi alangasi oldida shisha pipetka yordamida sterillangan suv bilan namlanadi. So‘ngra mayda tuproq bo‘lakchalari steril pinset yordamida filtr qog‘oz sirtiga terib chiqiladi.

Tuproq namunalari ekilgan Petri likobchalari 25-27⁰C haroratda termostatlarda saqlanadi. Antagonist mikroorganizm-larni o'sishi uchunchi kundan boshlab kuzatiladi va o'sib chiqqanlari oziqa moddasi solingan probirkalarga sof holda ajratib ekiladi (33, 34-rasmlar). Antagonist mikroorganizmlarni o'stirish uchun Chapeka oziqasi yoki agarli suslo oziqasidan foydalaniladi.



33-rasm. Zamburug'larni antagonistik faolligini namoyon bo'lishi



34-rasm. Aktinomitsetlarning antagonistik faolligini namoyon bo'lishi

Nazorat savollari:

1. Tuproqning qaysi qatlamida mikroorganizmlar soni ko'p bo'ladi?
2. Tuproqdan mikroorganizmlar ajratib olish usullarini sanab o'ting?

3. Tuproqda o'simliklar bilan simbioz xayot kechiradigan mikro-organizmlarni aytib bering?

13.2 – ish. Antagonist mikroorganizmlar kulturasidan undirma olish uchun ekish materialli tayyorlash

Asbob-uskunalar va materiallar. 250 ml kolbalar, termostat, avtoklav, maydalangan makkajo'xori, bug'doy uning kepagi, H_2SO_4 kislota, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $CuSO_4$.

Ishning borishi. Mikroorganizm sifatida ko'pgina fito-patogenlarning antagonisti *Trichoderma lignorum* zamburug'ini olamiz. Buning uchun 250 ml kolbaga quyidagi tarkibli oziqadan 10 g qo'shiladi: 10 g maydalangan makkajo'xori, 100 g bug'doy unining kepagi va 60 ml 0,2 H_2SO_4 sulfat kislota. Tarkibida 0,62% $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,63% $FeSO_4 \times 7H_2O$ va $CuSO_4 \times 5H_2O$. Sterilizatsiyadan so'ng sovigan muxitga *Trichoderma lignorum* kolbalarga taqsimlanib 25-27°S xaroratdagi termostatda saqlanadi. Shundan so'ng spora hosil qilishi maksimum darajaga etadi, kultura tezda quritiladi va qo'llashga qadar saqlanadi. Kuritilgan sporali kultura yashil rangda bo'lishi kerak, jigar rang yoki qora rangda emas. Nam kepakka ekish uchun ham xuddi shu kulturadan 1% talab qilinadi.

Nazorat savollari:

1. Antagonist mikroorganizmlarning avfzalligi nimada?
2. Antagonist mikroorganizmlar qaysi sun'iy oziqa muxitida o'stiriladi?
3. Antagonist mikroorganizmlarning o'simliklarda ta'siri?

13.3 – ish. Antagonist mikroorganizmlarni g'alla donlarida ko'paytirish

Asbob-uskunalar va materiallar. Probirkalar, avtoklav, termostat, tariq doni, suslo agarli oziqa muhiti. Tariqda zamburug'ni ekish materialini tayyorlash.

Ishning borishi. 20x2 sm probirkaga 8-10 g toza, qurigan tariq solinadi. Paxta tiqin bilan yopiladi va avtoklavda 2 atm. bosim ostida (134°C) 20 minut davomida har 20-24 soatda 2 marotaba sterillanadi. Sterillangandan so'ng probirkaga sterillangan vodoprovod suvidan (probirkadagi massani 60-80% ni tariq tashkil qilishi kerak) solinadi va yana sterillanadi. Oxirgi sterilizatsiyadan so'ng probirkadagi tariq silkitiladi, sovitiladi va Bilay muxitida undirilgan konidiylardan ekiladi. Muhit konsentratsiyasi 1 ml $2 \cdot 10^6$ konidiy bo'lsa, har bir probirkaga 1 ml dan solinadi. Agarli kulturadan ham konidiylarni ekish mumkin. 8-10 kun davomida zamburug' 24-25°C haroratda o'stiriladi. Olingan ekish materiallari xona haroratida, quruq joyda keyinchalik ekishgacha saqlab qo'yiladi. Kulturani saqlash muddati 1 yil.

Nazorat savollari:

1. Antagonist mikroorganizmlar qaysi donli ekinlarda o'stiriladi?
2. Antagonist mikroorganizmlarning metabiozdan farqi nimada?
3. Antagonist mikroorganizmlarning xususiyatlari nimada?

13.4 – ish. Zamburug'ning ekish materialini tayyorlash

Asbob-uskunalar va materiallar. Flakonlar, avtoklav, termostat, vakummli quritgich, Chapeka, suslo agarli, Xottinger yoki MPA, MPB oziqa muhitlari.

Ishning borishi. Ekish materialini olish uchun sulini oliy yoki birinchi navi ishlatiladi. Suli doni qaynayotgan ichimlik suviga (suv va suli doni quruq massaga nisbatan 1:1 nisbatda) solinadi va 15-20 daqiqa davomida qaynatiladi, qaynatilgan don 15-20 daqiqa issiq holda (qaynagan suv ichida) saqlanadi va quritish (selgitish) uchun filtr qog'ozga o'tkaziladi. Keyin sulining quruq massasi hisobida mahsus 250 ml hajmli flakonlarga 10-15 g dan qilib solib chiqiladi. Flakonlar paxta tiqin bilan berkitilib, ustidan doka bilan yopilib, bug'da 100°C haroratda 30 daqiqa sterilizatsiyalanadi. So'ngra harorat ko'tarilib 1 atmosfera bosimda 30 daqiqa yana sterillanadi. Sterillangandan so'ng suli sovitiladi.

Tayyor muhitga ekish uchun susloli agarda undirilgan kultura yoki konidiyalar suspenziyasidan foydalanish mumkin. Konidiyalar suspenziyasi 1 ml da 105 konidiya bo'lishi lozim. Ekish uchun har bir flakondagi oziqa muhitiga 0,5-1 ml suspenziya solinadi.

Flakonlarga konidiyalar ekilgandan so'ng silkitiladi va suspenziya muhitiga bir xil tarqalishiga erishiladi hamda flakonlar termostatga 24-25°C haroratda 7-10 kun davomida qo'yib qo'yiladi. O'sish davrida kultura silkitib turiladi.

Unib chiqqan kultura uzluksiz vakuumli quritgichda doimiy massaga etgunga qadar 28°S gacha bo'lgan haroratda 48-72 soat ushlab turiladi. Bug'langan namlikning kundalik o'lchash yuli bilan anqlanadi. Quritilgandan keyin flakon berkitilib, og'zi pergament qisqich bilan yopiladi. Har bir flakonga shtamm nomi, pasport nomeri, tayyorlangan kuni va saqlanish muddati yozilgan yorlik, yopishtirib qo'yiladi. SHunday qilib, tayyorlangan ekish materiali xona haroratida va normal namlikda saqlanadi. Ekish materialining saqlanish muddati - substratga konidiyalarni ekan kundan boshlab 1 yil hisoblanadi.

Ekish materialida begona mikroorganizmlar bo'lmasligi lozim. Ekish materialini tozaligini Xottinger yoki MPA va MPB oziqa muhitlariga ekib, 4 sutka davomida 37°C haroartda saqlab tekshiriladi. Begona mikroorganizm bilan ifloslanganda ekish materiali suslo agarda yoki Chapek muhitiga 25-37°C da 5 kun davoimda inkubatsiya qilinadi.

Nazorat savollari:

1. Zamburug'lar qaysi oziqa muxitlarida yaxshi o'sadi?
2. Zamburug'lar tabiiy substartlardan qanday ajratib olinadi?
3. Zamburug'larning bakteriyalardan farqi nimada?

13.5 – ish. Hujayralarning biopreparatdagi va suspenziyadagi zichligini Goryaev kamerasida hisobini olish

Asbob-uskunalar va materiallar. Yorug'lik mikroskopi, buyum oynasi, qoplag'ich oyna, Goraev kamerasi, preparat tayyorlash uchun flakonli suyuqlik.

Ishning borishi. Tom, Goryaev kamerasi shisha plastinka bo'lib, uning kattaligi mikroskopda obektlarni ko'rish uchun foydalaniladigan buyum oynasining o'lchamidek bo'ladi. Lekin undan qalin bo'lishi va markazida 0,1 mm chuqurlikdagi kamerasining bo'lishi hamda bu kamera tubida yoki uning ikki chetida chizilgan katakchalarni borligi bilan farq qiladi. Bu katakchalar katta kvadratlar va ularning bir qismi 16 ta dan kichik kvadratlar bo'lingandir. Kichik kvadratning hajmi $1/4000=0,00025 \text{ mm}^3$, katta kvadratniki esa $-16/4000=1/250=0,004 \text{ mm}^3$ teng.

Hujayralarning hisobini olishda, hujayraning katta qismi kvadrat ichida bo'lsa hisobga olinadi, hujayraning katta qismi kvadratdan tashqarida bo'lsa, uning hisobi olinmaydi. Agar hujayra qoq o'rtasidan kvadratga kirib turgan bo'lsa, u holda kvadratning faqat pastki va chap tomondagi hujayralarining hisobi olinadi.

Suspenziyaning xar tomchisidan 10 ta katta kvadratda joylashgan hujayralarining soni aniqlanadi. Hujayralarning kamida beshta tomchisidagi soni hisoblab chiqilishi kerak. Quyuq suspenziyalar suyultiriladi va katta kvadratda hujayralarining soni 16 ta dan oshmagan suspenziyadan foydalaniladi. Bunda 50 ta katta kvadrat (5×10 katta kvadrat)ning hajmi 0,2 mm ga teng bo'ladi.

Masalan, 50 ta katta kvadratlardagi suspenziyada 530 ta hujayra bor. Agar 1 mm^3 0,001 ml ga teng bo'lsa, bitta kichik kvadratda:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mm}^3 &- 0,001 \text{ ml} \\ 0,00025 \text{ mm}^3 &- x \text{ ml} \end{aligned}$$

$$X = \frac{0,00025 \text{ мм куб} \times 0,001 \text{ мл}}{1 \text{ мм куб}} = 0,00000025 \text{ мл} \quad \text{hujayra suspenziyasi bor}$$

Bitta katta kvadratda esa:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mm}^3 &- 0,001 \text{ ml} \\ 0,004 \text{ mm}^3 &- X \text{ ml} \end{aligned}$$

$$X = \frac{0,004 \text{ ммкүб} \times 0,001 \text{ мл}}{1 \text{ ммкүб}} = 0,000004 \text{ мл} \quad \text{hujayra suspenziyasi bor}$$

Demak, 50 ta katta kvadratlardagi 0.0002 ml (0.000004 ml x 50) hujayra suspenziyasida 530 ta hujayra bor bo'lsa, u holda 1 ml suspenziyada:

0.0002 ml — 530 ta

1 ml — x ta

$$X = \frac{1 \text{ мл} \times 530 \text{ та}}{0,0002 \text{ мл}} = 2650000 \quad \text{ta hujayra bor}$$

Kukun holdagi biopreparatdagi hujayralar sonini aniqlashda uning suyultirilganlik darajasi ham hisobga olinadi. Masalan, biopreparat 1:100 marta suyultirilgan bo'lsa, u holda suspenziyada aniqlangan hujayralar soni 100 ga ko'paytiriladi:

$$2650000 \times 100 = 265000000 \text{ ta}$$

Demak kukun holdagi biopreparatning 1 g da 265000000 ta hujayra bor ekan.

Nazorat savollari:

1. Goraev kamerasi qanday tuzilishga ega?
2. Goraev kamerasi bilan qanday ishlanadi?
3. Goraev kamerasida mikroorganizm xujayrasining soni qanday topiladi?

GLOSSARIY

Agar-agar	ba'zi dengiz o'simliklaridan olinadigan mahsulot; uning eng muhim tarkibiy qismi uglevodlar qatoriga kiradi, u sovuq suvga solinganida bo'kadi, qaynoq suvda batamom eriydi, eritmasi soviganda ta'msiz va hidsiz, tiniq, iviq cho'kma hosil bo'ladi. Bu mahsulot mikroorganizmlarga qattiq oziqa muhiti tayyorlashda, qandolatchilikda shirinliklar tayyorlashda ishlatiladi. Turlari: o't (safro) suyuqligi va binafsha rang agar; jo'xori uni qaynatmasidagi agar; pivo atalasidagi agar; achitqi zamburug'li ekstraktli agar; suv peptonli agar; glitserinli agar; uzum shakarli agar; dezoksixolli agar; laktozali dezoksixolli agar; dekstrozali agar; jelatinali agar; safroli agar; kartoshka va qonli agar; kraxmalli agar; qonli agar; laktoza-lakmusli agar manitli agar; sut-peptonli agar; siydikli agar; yumshoq agar-mikroblarni ikki qatlamli oziqa muhitida undirishga ishlatiladi-gan agarning ustki qatlami; go'sht-peptonli agar; oziqali agar; yarim suyuq agar; oddiy agar; baliq-jelatinali agar; shakarli agar; qo'rg'oshin-sirkali agar; qiyshaytirilgan agar; pivo atalali agar; zardobli agar; fenolftaleinli agar; fuksinli agar; tuxum oqsilidagi agar; tuxum sarig'idagi agar.
Agaroza	dengiz suvo'tlaridan olinadigan polisaxarid; elektroforez va xromatografiyada gelli muhit sifatida foydalaniladi.
Agregatsiya	ayrim organizm yoki hujayralarning to'planishi, g'uj bo'lib qolishi.
Agrobiotsenoz	ekin ekiladigan erlarda yashaydigan organizmlar yig'indisi.
Adaptatsiya	moslashish-organizmlarning evolyusiya jarayonida yuzaga kelgan yashash sharoitiga moslashuvi.
✓ Adventiv kurtaklar	o'simliklardagi kurtaklar, ular odatda paydo qilmaydigan hujayra va to'qimalardan hosil bo'ladi.
Adenillanish	yo'li bilan fermentlar faolligi o'zgarishining bir turi.

Adenin	(aminopurin)-azotli organik birikma bo'lib, adenin nukleotidi tarkibiga kiradi.
Azotobakterin	ushbu turga kiradigan bakteriyalardan tashkil topgan bakterial o'g'it.
Azotobakter	erkin holda yashab, havodan azot to'plovchi bakteriyalar turi.
Akropetal transport	o'simlikda moddalarning poya apikal meristemiya yo'nalishi bo'yicha tashilishi.
Amplifikatsiya	xromosoma DNK ketma-ketligining qo'shimcha nusxasini hosil bo'lishi.
Anaeroblar	kislorodsiz muhitda modda almashinishi va ko'payishini davom ettira oladigan mikroorganizmlar; faqat anaerob sharoitda o'sadigan mikroorganizmlar; fakultativ anaeroblar kislorodli yoki kislorodsiz sharoitda o'sa oladigan mikroorganizmlar.
Androgenez	mikrospora yoki chang donachalaridan somatik embriogenez yoki kallus hosil qilish orqali o'simlik yoki uning organlarining hosil bo'lish jarayoni.
Antagonist	raqib-mikroorganizmlar hayotini to'xtatuvchi yoki butunlay barbod qiluvchi boshqa bir mikroorganizm.
Antibiotiklar	mikroorganizmlar hayot faoliyati davomida hosil bo'ladigan kimyoviy moddalar; juda oz miqdori ham boshqa mikroorganizmlarga zaharli ta'sir etadi. Antibiotiklar soni hozirda 2000 dan ortib ketgan bo'lib, ularning sintezlanishida zamburug'lar (aspergillar), sho'lasimon zamburug'lar va boshqa mikroorganizmlar xizmat qiladi; antibiotiklar ishlab chiqarishning <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporium</i> va <i>Streptomyces</i> avlodlariga mansub turlarida ishlab chiqariladigan penitsillinlar-asosiy tijorat antibiotiklar hisoblanadi;
Antigenlar	immun tizimda antitelalar hosil bo'lishini induksirlovchi, antitela paydo bo'lishiga ta'sir etuvchi spetsifik hamkorlik qiluvchi oqsillar.
Antitela	immun tizim tomonida yoki patogen agentlar; oqsillarni (antigenlar) yo'qotuvchi ta'sirga ega

	oqsillar.
✓ Apikal dominantlik	apikal meristemadagi gormonlar yordamida yon navdalarning yuqori meristemi kurtaklari o'sishini to'xtatishi.
Attragirlash xususiyati	stimulyator fitogarmonlarning oziqa moddalarni o'suvchi organga katta miqdorda tashilishini faollash xususiyati.
Auksotrof mutantlar	jinsiy bo'lmagan xromosomalar to'plami (1, 2, 3, va hokazo sonlar bilan belgilanadi).
Bazal	asosiy, asosga tegishli; asosida yoki uning tagida joylashgan-bazal tanachalar-eukariotik jonivorlar (oddiy jonivorlar, suvo'tlar) xivchinlarini sitoplazmaning tashqi qavatiga yopishib turishiga yordam beradigan tuzilma.
Bazipetal transport	o'simlikdagi moddalarning ildizning apikal meristemasiga transporti.
Bakteriofaglar	bakteriyalarni infeksiyalovchi viruslar.
Binar	ikki qismdan iborat; binarli nomenklatura-mikroorganizmlarda avlod va tur nomi bilan atalishi; binarli bo'linish-hujayralarning ko'payish vaqtida ikkiga bo'linishi.
Biogenez	tirik organizmlar tomonidan organik birikmalar-ni hosil bo'lishi.
Biomassa	mikroorganizmlarni o'stirilganida hujayralari massasi yoki tirik organizm massasi; faol biomassa-biologik faollik ko'rsatuvchi massa; quruq biomassa-organizmlarning quruq biomassasi. U ho'l biomassaning 15-30% ni tashkil etadi; ho'l biomassa-suzish yoki aylantirish, cho'ktirish natijasida suyuq oziqa muhitidan ajratib olingan hujayra massasi.
Bioreaktor	biologik reaksiyalarni amalga oshirishga mo'ljallangan sig'im. Bu atama aerob va anaerob organizm hujayralarini o'stirish uchun zarur bo'lgan sig'implarda hamda hujayra va fermentlarni to'plashda foydalanadigan naychalarga nisbatan ishlatiladi.
Biosintez	fermentlar ta'sirida tirik organizmlarda oddiy birikmalardan murakkab organik moddalarning

	hosil bo'lishi.
Biotexnologiya	tirik organizmlar yoki biologik qonuniyat va xususiyatlarning sanoat miqyosida ishlatilishi haqidagi fan yo'nalishi.
Vektor	genlarni klonlashda foydalaniladigan replikon. Tabiiy vektorlar-kichik plazmidalar, viruslar va bakteriofaglar. Sun'iy vektorlar esa DNK-ligaza yordamida har xil manbalardan olingan DNKni birlashtirish asosida tuziladi; o'rnini olish vektoriga klonlashtiruvchi vektor; o'simliklarda klonlash vektoriga o'simlik hujayrasiga begona DNKni o'tkazish va joylashtirish bilan shug'ullanadigan gen muhandisligida ishlatiladigan vektor; plazmida vektoriga begona, yot DNKdagi gen yoki bir necha genlarni bu xildagi genlari bo'lmagan organizmga o'tkazib qo'yishida qatnashadigan plazmida.
Viruslar	birorta tirik organizmda rivojlanish qobiliyatiga ega bo'lgan, tarkibida nuklein kislotalar, oqsillar, ayrimhollarda lipidlar bo'lgan zarrachalar. Viruslar zarrachalardan tashkil topgan bo'lib, ular nuklein kislotalar va oqsillar po'stloqli holda bo'ladi. Viruslar 1892 yilda D.I.Ivanovskiy tomonidan ochilgan bo'lib, 1889 yilda "virus" atamasi M.Beyerink tomonidan taklif etilgan. Virus hamma tirik organizmlarda kasallik qo'zg'atadi va hamma erda tarqalgan.
Gaploid	bir organizm turiga hos bo'lgan butun to'plamning yarmi, xromosomalar to'plamining bilan xarakterlanuvchi yadro, hujayra, organizm.
Gen	genetik axborotlarning yagona strukturasi muayyan reguliyator funksiya, bir yoki bir nechta polipeptid zanjirlar, yoki RNK molekulasi strukturasi kodirlovchi xromosoma qismi (DNK molekulasi).
Gen muhandisligi	usullar va texnologiyalar; rekombinant ribonuklein va dezoksiribonukleinkislotalar olish texnologiyasi, organizmlardan genlarni ajratish, ular bilan turli manipulyasiyalar o'tkazish va ularni boshqa organizmlarga kiritish texnologiyalari.

Genetik kod (GK)	nuklein kislotalar izchilligi ko‘rinishidagi nuklein kislotalari molekularida nasliy axborotning yozma tizimi. GK birligi bo‘lib kodon yoki triplet xizmat qiladi. GK sintezlanayotgan polipeptid zanjiriga aminokislotalarning birikish tartibini aniqlaydi. Nuklein kislotalari molekularida ketma-ketlik ko‘rinishida “yozilgan” irsiy axborotning tirik organizmlarga hos yagona tizimi. Genetik kodning birligi kodondir.
Genetik modifikatsiyalangan transgen organizmlar (GMO)	gen – muhandisligi usullari yordamida genomiga begona genlarni kiritilishi orqali irsiyati o‘zgargan o‘simlik, hayvon, mikroorganizm va viruslar.
Genetik havf	insonlar hayoti va sog‘ligi, atrof-muhit uchun havfli bo‘lgan kutilmagan irsiy o‘zgarishlarning genomda paydo bo‘lishi va organizmlar sifatining o‘zgarishi.
Genlar bibliotekasi	butun genomni tutuvchi klonlangan DNK fragmentlari to‘plami.
Genlar ekspressiyasi	genda ribonuklein kislota, oqsil va fenotipik xususiyatlar shaklida yozilgan genetik axborotlarning yuzaga chiqishi.
Genom	mazkur organizm protoplazmasi organellalarida joylashgan xromosomalardan tashqari genlarini tutuvchi genlar yig‘indisi. Diploid holatdagi turlar gametasida bittadan, somatik hujayralarda esa ikkitadan genom bo‘ladi.
Genoterapiya	retsipient genomiga begona genlarni kiritish yoki biologik ob‘ekt to‘qimalarida genetik sog‘lom somatik hujayralarni olish yordamida nasliy kasalliklarini davolash.
Genotip	asos genlarining to‘plami. Irsiy asos-organizmlarning genetik (irsiy) konstitutsiyasining va uning barcha genlarining majmui.
Genofond	organizm turlari yoki populyasiyasidagi har xil genlar turlarining soni va tarixi.
Geterozis	bir-biridan qator xususiyatlar va belgilari bilan farqlanuvchi boshlang‘ich shakllarni chatishtirish

	natijasida paydo bo'lgan birinchi avlod duragaylarining yashash qobiliyatining oshishi.
Gibrid	duragay-genetik jihatdan har xil bo'lgan turlarni chatishtirish natijasida hosil bo'lgan geterozigota jinsi. Ota-ona irsiy belgilarini o'zida mujassamlashtirgan organizm.
Ginogenez	murtak xaltasi hujayralaridan o'simlik paydo bo'lish jarayoni.
Giflar	ipchalar-zamburug' tanasini tashkil etuvchi bir yoki bir necha hujayradan hosil bo'lgan, mikroskopda arang ko'rish mumkin bo'lgan iplar.
Gormon retseptor kompleks	gormon va oqsil retseptorining birikishi, gormon ta'siri amalga oshishining birinchi bosqichi.
Gormon statusi	ontogenezda o'simlik va hayvon gormon tizimining umumiy holati, endogen va ekzogen ta'sirlarga nisbatan hosil bo'lish jarayonlarida gormonlar miqdori va ular orasidagi nisbati, harakati, foydalanilish va inaktivatsiyasi.
Destruksiya	moddalarning parchalanish orqali fiziologik faolligini yo'qotishi.
Didifferensiya	ixtisoslashgan, bo'linmaydigan hujayralarning differensiyalanmasdan bo'linayotgan kallus hujayralariga aylanish.
Diploid	mazkur turga hos sonlarni ko'rsatuvchi gomologik xromosomalarning ikkita to'plami bilan xarakterlanuvchi yadro, hujayra va organizm.
Diploidlash	xromosoma to'plamini ikki marta ko'paytiruvchi model. Xromosomalarning diploid to'plami (avtodigaploid) ota yoki ona xromosomalarni tutuvchi ikkita gaploid xromosomalar to'plami.
Differensiyalash	asosiy va yangi hosil bo'lgan hujayralar orasida, Shuningdek yangi hosil bo'lgan hujayralar orasida farq yuzaga keltiruvchi jarayonlar kompleksi.
DNK	dezoksiribonuklein kislotalar molekulasini, nukleotidlar (adenin, guanin, sitozin, timin), dezoksiriboza va fosfor kislota qoldiqlaridan tashkil topgan.

DNK bo'shlig'i	DNK zanjirida bitta yoki bir nechta nukleotidlar-ning etishmasligi.
DNK dupleksidagi uzilish	ikki zanjirli DNKning zanjirlarining bittasida yonma-yon ikkita nukleotidlar orasidagi fosfodiefir bog'ining yo'qligi.
DNK replikatsiyasi	fermentlar to'plami (DNK polimeraza, ligaza va boshqalar) yordamida DNK nusxasini hosil qilish orqali uning molekularini ikkilanishi (ikki marta ko'payishi).
YOpiq tizim	tashqi muhit bilan faqat energiya orqali almashinuvchi tizim.
YOpihqoq uchlar	komplementlar holdagi DNK molekulasi bitta ipli uchi bo'lib, endonukleazalar yordamida kesib olinadi.
Jinsiy jarayon	erkak (spermiya) va urg'ochi (tuxum hujayra) jinsiy hujayralarining qo'shilish, natijada diploid hujayra (zigota) hosil bo'ladi va asosning jinsi belgilanadi.
Jinsiy xromosomalar	asosning jinsini belgilovchi xromosomalar (X, Y, W, Z va boshqa harflar bilan belgilanadi).
Zatravka	DNKning bitta zanjiri bilan komplementar hamkorlik qiluvchi qisqa izchillik (ko'pincha RNK); erkin 3 – ON – uch hosil qilib, u asosida DNK-polimeraza dezoksiribonukleotid zanjir sintez qila boshlaydi.
Identifikatsiya	aynan o'xshatish, tenglashtirish-moddayoki mikro-organizmlar turi va xillarini aniqlashga qaratilgan tadqiqotlar turi.
Immobilizatsiya (to'plash)	membranalarda hujayra, fermentlarni to'plashda foydalaniladigan fizik va kimyoviy jarayon.
Invertirlangan takroriy izchilliklar	bir molekula tarkibidagi bir-biriga qarama –qarshi tomonlarda joylashgan bir xil izchillik-ning ikkita nusxasi. Bir-birlariga yonma-yon joylashgan invertirlangan takroriy izchilliklar palindrom hosil qiladi.
Ingibitor	to'xtatuvchi-fermentlar, faolligini to'xtatuvchi tabiiy yoki sintetik modda (sun'iy olingan).
Induktor	repressor bilan qo'shib, uni operator bilan

	qo'shilish xususiyatini yo'qotadigan, nafaol holatga o'tkazadigan past molekulali modda.
Induksiya	ferment sintezi, faglar rivojlanishi va mutatsiyaga o'xshagan biologik jarayonni harakatga tushirish.
Initsiatsiya	molekulyar biologiyadagi translyasiya jarayonining birinchi bosqichi.
Inkubatsiya	o'stirish-ma'lum sharoitda, haroratda mikroblarni ushlab turish, o'stirish.
Inokulyat	ko'paytirish usuli-tirik organizmlar, masalan, mikroorganizmlar suspenziyasi oziqa muhitga o'tkazilgandan keyin yangi avlod beradi.
Intron	genning transkripsiyalanayotgan "sukunat saqllovchi" protsessing jarayonida RNK molekulalari ajralib chiqayotgan va kodonlar mavjud bo'lmagan qismi.
Issiqlik shoki oqsillari (ISHO)	haroratning normadan oshishiga organizm tomonidan hosil bo'ladigan oqsillar.
Klon	bitta hujayra yoki molekuladan olingan hujayra va molekulalar yig'indisi.
Klonlash	populyasiyalarning organlari bilan genetik bir xil hujayralar olish.
Klonli mikro-ko'paytirish	<i>in vitro</i> jinssiz usul yordamida boshlang'ich o'simlik bilan genetik bir xil o'simliklar.
Kodon	muayyan aminokislotalar yoki komplementar terminatsiyalovchi signalni kodirlovchi nukleotidlar tripleti.
Kompetensiya	hujayra, to'qima, organ va organizmning indutsirlovchi ta'sirlarni qabul qilishi va unga rivojlanishini o'zgartirish orqali spetsifik ta'sirlanish.
Komplementar zanjir	RNK va unga hamkorlik uchun mos keladigan nukleotidlarni sintezlan uchun foydalaniladigan DNK zanjirlaridan biri.
Ligaza-DNK	zanjiridagi uzilgan qismni fosfodiefirbog' hosil qilish yordamida birlashtiruvchi ferment.
Ligirlash	DNKning bir zanjirdagi uzilish orqali ajralgan asoslar orasidagi fosfodiefir bog'larining hosil bo'lishi. Bu ibora to'g'ri uchlarni birlashtirish

	hollarida va RNK bog'lar hosil bo'lishida ham qo'llaniladi.
Lizis	erib ketish, parchalanish-fermentlar, kislotalar va ishqorlar ta'sirida hujayralarning parchalanishi; bakteriya hujayrasida bakteriofaglarining ko'payishi natijasida uning erib ketishi.
Marker (DNK)	elektroforez gelida fragmentlar o'lchamini aniqlashda foydalaniladigan ma'lum o'lchamdagi DNK fragmenti.
Marker gen	joylashgan joyi aniqlangan va aniq fenotipik ko'rinishga ega gen.
Matritsa	1) ma'lum bir tana (shakl) bo'lib, unga qarab yangi shaklning hosil bo'lishi; 2) (molekulali biologiyada) DNK va RNK iplarini komplementlar sintezlanishi uchun asos sifatida xizmat qiladigan va nuklein kislotalardagi azot asoslarining ketligi.
Mahsuldorlik jarayoni	moddalar hosil bo'lishi va metabolizmning o'simlikda bir vaqtda kechayotgan fiziologik, biokimyoviy, biofizik va boshqa jarayonlarning yig'indisi, donor-akseptor munosabatlar va genetik nazorat asosida o'simliklarning ho'jalik ahamiyati qimmatli organlarining shakllanishi, ikkilamchi almashinishni ta'minlanishi.
Meyoz	xromosomalar sonini reduksiyasiga va genlar rekombinatsiyasiga olib keluvchi jinsiy hujayralarning bo'linish jarayoni.
Meristema	faol bo'linayotgan differensiyalanmagan hujayralardan iborat to'qimalar.
Metabolizm	oraliq almashinish, ya'ni moddalarning hujayra ichiga tushgan vaqtidan oxirgi mahsulotlar hosil bo'lgunga qadar aylanishi; katabolizm va anabolizm jarayoni yig'indisi; qorong'ulikda kechadigan metabolizm-mikroorganizmlarning (qirmizi bakteriyalar <i>Rhodospirillum</i>) qorong'ida aerob holda o'sish xususiyati. Bu xususiyat bakteriyalarda nafas olish zanjirining kerakli qismlari borligidan dalolat beradi.
Metabolitlar	metabolizm jarayonida hosil bo'ladigan moddalar.

Mikoriza	yuksak o'simliklar ildizi bilan zamburug' ipchalarining birga yashashi.
Mikroorganizmlar uyushmasi	har doim birga uchraydigan va bir-biri bilan bog'liq holda yashaydigan mikroorganizmlar birlashmasi.
Mikroflora	har xil turdagi mikroorganizmlarning ma'lum yashash muhitidagi to'plami; aytoxton mikroflorasi; suv mikroflorasi; havo mikroflorasi; balchiq mikroflorasi; odatdagi mikroflora; organizm mikroflorasi; qo'shimcha mikroflora; tuproq mikroflorasi; rizosfera mikroflorasi.
Mitoz	eukariot somatik hujayralarning bo'linish jarayoni.
Mitselliy	zamburug' tana-zamburug', jumladan shulasimon zamburug'larning o'sadigan tanasi bo'lib, bir va ko'p hujayrali ipchalar (gif)dan iborat.
Modifikatsiya	mikroorganizmlarning fenotipik o'zgarishi, ya'ni hujayraning genetik apparatlariga aloqador bo'lmagan o'zgarishlar.
Morfogenez	organ (organogenez), to'qima (gistogenez) va hujayralarning (sitogenez yoki hujayralarning differensiyalanishi) shakllanish jarayoni. Organizmlarning rivojlanishi jarayonida tizimlarning tabaqalanishi.
Mutagenez	mutageniz o'zgarishning (mutagenizning) ro'y berishi-organizmda irsiy o'zgarishlar-mutatsiyalarning vujudga kelish jarayoni. Bu jarayon asosida irsiy axborotni saqlovchi va naslga o'tkazuvchi nuklein kislotalar molekulasining o'zgarishi yotadi.
Mutagenlar	DNK molekulasida mutatsiyalarning paydo bo'lish chastotalarini oshiruvchi omil. Irsiyatni o'zgartiruvchilar-mutatsiyalar hosil qiluvchi fizikaviy va kimyoviy omillar;
Mutatsiya	gen, xromosomadagi nukleotid izchillik, genomning birorta belgining o'zgarishiga va ularning avlodlarda saqlanishiga olib keluvchi spontan va indutsirlangan o'zgarishi.
Nishon - hujayra	u yoki bu fitogarmon retseptorini tutuvchi va fitogarmonning konsentratsiyasi o'zgarganda

	metabolizmni o'zgartiruvchi hujayra.
Nozern-blot-RNK	bo'lakchalarini gellardan elyuitsiya qilishda ishlatiladi.
Nuklein kislotalar	turli nukleotidlar qoldiqlaridan tashkil topgan yuqori molekulyar tabiiy birikmalar (polimerlar). Hujayra mag'zining asosini tashkil qiladi. Nuklein kislotalarning ikki turi: RNK, DNK hujayralarning doimiy komponentlaridir.
Operon	genetik regulyator strukturaning birligi, tarkibida bitta yoki bir nechta o'zaro birikkan struktura, operon va regulyator qismlar genlarini tutadi.
Organogenez	uyushmasdan o'sayotgan kallus hujayralarida organlar (ildiz, boshlang'ich barglar va nihollar) hosil bo'lish jarayoni.
Ochiq tizim	tashqi muhit bilan energiya va moddalar bilan almashinadigan tizim.
Partenogenez	asosning faqat ona hujayra genlari ishtirokida rivojlanishi.
Plazmida	avtonom replikatsiyalanishga qodir, tarkibida retsipientlarning begona genlarini va boshqa DNK izchilligini tutish va genomga kiritish xususiyatiga ega, ikki zanjirli halqasimon DNK plazmid vektori asosi.
Poliadenillash	poliadenil kislota izchilligining eukariot RNK 3-uchiga uning sintezi tugaganidan so'ng birikishi.
Poliploidiya	organizm gaploid xromosomalar yig'indisining karrali ortishi bilan bog'liq bo'lgan irsiy o'zgaruvchanlik.
Proliferatsiya	hujayra va to'qimalarning ko'payish yo'li bilan hosil bo'lishi.
Promotor	genning transkripsiyasi boshlanishi uchun javobgar qismi.
Pronukleus	urug'langan tuxum hujayra yadrosi.
Proton pompasi	maxsus oqsillar yordamida protonlarning hujayra membranasi orqali o'tish jarayoni.
Protoplast	mexanik yo'l bilan yoki fermentlar yordamida hujayralar qobig'idan mahrum qilingan, membrana yordamida shaklini ushlab turuvchi

	o'simlik hujayrasi.
Profag	bakteriya xromosomasiga o'rtnashgan fag genomi. Lizogen bakteriyalardan yashiringan, yuqmaydigan shakldagi mo'tadil bakteriofag.
Protsessing	etilish jarayoni bo'lib, unda birlamchi RNK-transkript modifikatsiyasi uchraydi va etilgan RNKga aylanadi.
Regeneratsiya	hujayralar tiklanishi.
Rekombinant gen	turli genlar komponentlaridan tarkib topgan gen.
Rekombinant DNK	turli manbalardan olingan DNK qismlaridan iborat DNK.
Rekombinatsiya	krossingover natijasida ota-onalar genlarining qayta guruhlanishi (tabaqalanishi).
Reparatsiya	DNKning sintezi vaqtida hamda har xil fizik va kimyoviy omillar ta'sirida DNK molekulasi uzilib qolgan yoki shikastlangan molekulalarni tuzatishga bo'lgan hujayralarning maxsus vazifasi.
Repressiya	gen ekspressiyasini va yoxud o'shanga taalluqli ferment sintezini to'xtatish mexanizmi.
Repressor	ma'lum operonda RNK sintezini to'xtatadigan boshqaruvchi oqsil.
Restriktazalar	kesuvchi fermentlar, restriksiya fermentlari, DNKni ma'lum bir nukleotidlar qatorida kesadigan fermentlar. Gen muhandisligida qo'llaniladigan vosita.
Rivojlanish determinatsiyasi	boshqa yo'nalishlardagi rivojlanish imkoniyatining cheklash bilan bir vaqtda boradigan organizm, organ, to'qima va hujayraning muayyan yo'l bilan rivojlanishga tayyorgarlik holati. Determinatsiya davrida rivojlanishning yangi yo'nalishi uchun ichki zaruriy sharoitlar yaratiladi.
Rivojlanishning yuvenil fazasi	urug' yoki vegetativ kurtakdan vegetativ organlarning reproduktiv organlar hosil qilish qobiliyatini namoyon bo'lishiga qadar o'sishi va rivojlanishi.
Rizosfera	ildiz atrofidagi tuproqning mikroflorasi, mikroorganizmlarning ko'pligi bilan farqlana-

	digan 2-3 mm qalinlikdagi ildiz atrofida joylashgan tuproq qatlami.
RNK	tarkibiga nukleotidlar (adenin, guanin, sitozin, uratsil), riboza va fosfor kislotasi qoldirlari kiruvchi ribonuklein kislot molekulas.
RNK blottingi	RNKni agarozali geldan nitrotsellyulda filtriga komplementar DNK bilan duragaylash uchun olinishi.
Sayt	o'rin, joylanish-genlar xaritasidagi nuqtali mutatsiya o'rni.
Sauzern bo'yicha DNK blottingi	denaturlangan DNKni komplementar nukleotid ketma-ketlik bilan duragaylash uchun agarozali geldan nitrotsellyulda filtrga olinishi.
Segment	karj, bo'lak.
Sekvenirlash	ketma-ketlikni aniqlash, sekvenirlash-oqsildagi aminokislota qoldig'ini va nuklein kislotalar-dagi nukleotidlarning ketma-ketligini aniqlash.
Seleksiya	tanlash-hayvon, o'simlik va mikroorganizmlarning yangi zotlari, navlari va shtammlarini yaratish usuli.
Sinergizm	moddalar, jarayonlar va boshqa omillarning hamkorlikdagi ta'sirini oshiruvchi samara.
Skrining	bitta hujayradan klon olish yo'li bilan mikro-organizmlarning aralash populyasiyasidan keragini ajratish.
Somaklonal variabellik	kulturalangan somatik hujayralardan regenerasiyalangan o'simliklardagi xususiyatlarning o'zgarib turishi.
Somaklonlar	boshlang'ich shakllaridan muayyan farqlar bilan farqlanuvchi somatik hujayralardan olingan reagent o'simliklar.
Somatik duragay	somatik hujayralar qo'shilishi (duragaylanishi) orqali olingan reagent o'simlik.
Somatik duragaylash	jinsiy jarayondan tashqarida yadro va organellalar genlari va xromosomalarni genetik rekombinatsiyaga chaqirish jarayoni.
Somatik embriogenez	hujayra va to'qimalar kulturasida murtaksimon strukturalar (embrioidlar) hosil bo'lish jarayoni.

Stimulyatorlar	o'simliklarning o'sishini - kuchaytiruvchi omil - o'simliklarning o'sishini, hujayralarning bo'linishini tezlashtiradigan, kuchaytiruvchi moddalar. Ular tabiiy yoki sintetik holda bo'lishi mumkin. Tabiiylari auksinlar, gibberelinlar va sitokininlar.
Stress oqsillar	noqulay sharoitlarda organizm tomonidan sintezlanuvchi va stress omillarning organizmga zarali ta'sirini kamaytirish imkonini beruvchi maxsus oqsillar.
Subbirlik	oqsil molekulalarini tashkil etuvchi (to'rtlamchi strukturasi) oqsil globulalari.
Subkulturalash	transplantlarni (inokulumlarni) boshqa kultural idishga yangi oziqa muhitiga o'tkazish.
Substrat	oziqa muhit-mikroorganizmlarning o'sishi uchun kerak bo'lgan oziqa muhiti.
Termodinamik tizim	energiyani yutish, qayta hosil qilish, to'plash va foydalanish xususiyatiga ega o'zaro bog'liq elementlar kompleksi.
Totipotentlik	muayyan o'stirish sharoitida o'simliklar somatik hujayralarining o'zining ontogonik rivojlanishi irsiy dasturini to'liq amalga oshirish.
Transgenoz	turli vektorlar yordamida donor, begona genlarni retsipient o'simlik, hayvon va mikroorganizmlar hujayrasiga kiritish jarayoni. Transduksiyaga moyil faglar yordamida genetik axborotni bakteriya hujayrasidan eukariotlar hujayrasiga sun'iy yo'l bilan o'tkazish.
Transduksiya	bakteriofaglar yordamida genetik materialni donor hujayradan retsipient hujayraga olib o'tish.
Transkripsiya	RNK polimeraza fermenti yordamida DNK matritsasida RNK-nusxasining hosil bo'lishi.
Translyasiya	axborot, transport RNKsi va boshqa omillar ishtirokida ribosomalarda oqsillar sintezi.
Transplant (inokulyum)	kallus (supenziyali) kulturasining boshqa yangi oziq muhitiga ko'chirib o'tkazishda foydalaniladigan qismi.
Transpozonlar	DNKning bir bo'laki bo'lib, molekula ichida bir joydan ikkinchi joyga va bir molekuladan

	ikkinchisiga o'tishga qodir.
Transformatsiya	alohida ajratilgan DNK yordamida hujayraga genetik axborotni kiritish. Transformatsiya yordamida olingan hujayrada va undan keyingi avlodlarda yangi belgilar DNK yordamida olingan manbadagiga o'xshagan bo'ladi.
Uratsil	RNK tarkibiga kiradigan pirimidin asosi.
O'simliklarni gormon tizimi	fitogormonlar, ularning retseptorlari va ikki-lamchi vositachilaridan iborat regulyator kompleks.
Faglar	mikroorganizmlar ichiga kirib, unda ko'payib, keyin ularni eritib yuboruvchi viruslar.
Faollashtirish	1) faollikni qo'zg'atish va kuchaytirish; 2) molekulalar faolligini qo'zg'atib kimyoviy reaksiyaga kirishni tezlatish.
Fenotip	organizmlarning rivojlanishi jarayonida yuzaga kelgan hamma belgi va xususiyatlar yig'indisi.
Fermenter	ayrim xomashyolarni mikroorganizmlar yordamida bijg'itish uchun ishlatiladigan hamma tomoni berk asbob.
Fermentlar	biologik tezlatkichlar, enzimlar-oqsilning o'ziga hos turi; tirik hujayralarda ham tezlatkich rolini bajaradi.
Fitoaleksinlar	o'simliklarning kasalliklarga qarshi chidamlilik tizimining patogenlar rivojlanishini pasaytiruvchi genotipik va real komponentlari.
Fitogormonlar biosintezi yo'llarining ajralishi	tashqi sharoit kompleksi bilan aniqlangan bir necha fitogormonlar uchun asos bo'lgan oraliqdan u yoki bu fitogormonning bir necha fitogormonlarning fermentativ biosintezi yo'li.
Fitoregulyatorlar	o'simliklarning o'sishi va rivojlanishiga ta'sir etuvchi, o'g'itlar va gerbitsidlar ta'siriga ega bo'lmagan tabiiy va sun'iy preparatlar.
Fosforobakterin	fosfor organik birikmalarni parchalash xususiyatiga ega bo'lgan bakteriyalardan tashkil topgan bakteriyali o'g'it.
Fotosintez	Yorug'lik energiyasi ishtirokida o'simliklar, suvo'tlari va ayrim bakteriyalar hujayralarida SO ₂ dan organik moddalar hosil bo'lish jarayoni.

Fragmentlar	parchalar, qismlar.
Xemosintez	ayrim mikroorganizmlarga hos bo'lgan oziqlanish turi. Ular ayrim anorganik moddalar (masalan, vodorod sulfat)ni oksidlanish natijasida hosil bo'lib, energiya hisobiga anorganik moddalardan (masalan, ko'mir kislotasi va suv) organik moddalar hosil bo'ladi.
Xromosomalar	DNK va oqsillardan iborat hujayra yadrosini genetik struktura hosilasi. Xromosomalarda organizmning irsiy axboroti berilgan.
Hujayralar seleksiyasi	selektiv sharoitlar yordamida genetik modifikatsiyalangan mutant hujayralar va somoklonal variantlar ajratish usuli.
Sentrifuga	ajratkich, cho'ktirgich-markazdan qochish kuchiga asoslangan turli xil aralashmalarni qismlarga ajratuvchi asbob; analitik (laboratoriya) ajratkich; tebranuvchi ajratkich; gorizontal ajratkich; bug'lantiruvchi ajratkich; cho'ktiruvchi ajratkich; tindiruvchi ajratkich; preparativ ajratkich; o'z-o'zini bo'shatadigan ajratkich; suzish yo'li bilan ishlaydigan ajratkich; ko'p bo'limli ajratkich; o'ta tez aylanadigan ajratkich; tabaqalashtiruvchi, tafovutli ajratkich.
Sitozin	DNK va RNK tarkibida bo'lgan pirimidin asosi.
Eksplant	oziqa muhitida inkubatsiya qilinayotgan to'qima yoki organ, yoki kallus to'qimasi olish uchun foydalani-ladigan fragmentlar.
Elektroporatsiya	hujayra membranasida qo'shimcha teshiklarni hosil qilishga yordam beruvchi elektr toki yordamida hujayraga genlarni kiritish usuli.
Elektroforez	elektr maydoni yordamida aralashmalarning bir joydan ikkinchi joyga o'tishi, bo'laklarga ajratish.
Endonukleazalar	fosfodiefir bog'larining o'ziga hos bo'lmagan parchalanishi orqali nuklein kislotalarini parchalovchi fermentlar. DNKni purin yoki pirimidin qismlaridan kesuvchi fermentlar.
In vitro	tirik materialni probirkada sun'iy oziqa muhitlarda steril sharoitda o'stirish.
In vivo	tirik materialni tabiiy sharoitda o'stirish.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Artikova R.M., Murodova S.S., Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi. -T.: Fan va texnologiya, 2010. -284 b.
2. K.D.Davranov. Biotexnologiya: ilmiy, amaliy va uslubiy asoslari. -T.: Patent-Press, 2008. -504 b.
- 3.K.D.Davranov. Mikroblar dunyosi. -T.: ToshDAU nashriyoti, 2002. - 165 b.
5. Biotexnologiya v 8-mi knigax pod redaksiy Egorova N., I.Samuilova -M.: Visshaya shkola, 1987, -159 s.
6. Selskoxozyaystvennaya biotexnologiya. Sb. rabot /Pod red. V.S.Sheveluxa i dr., Izdanie trete, pererabotannoe i dopolnenoe. -M.: Visshaya shkola, 2008. -711 s.

MUNDARIJA

Kirish	3
1-ish Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi laboratoriyasining tuzilishi, asbob-uskunalar va laboratoriyada ishlash qoidalari bilan tanishish	4
2-ish O'simlik xujayrasidan DNK ajratish	10
3-ish Bakteriya hujayrasidan plazmid DNK sini ajratish	15
4-ish Agarozali gelda DNK elektroforezi	19
5-ish O'simlik hujayra va to'qmalarini o'stirish uchun oziqa muhitlarini tayyorlash	22
6-ish Biotexnologiyada streillash usullari.....	27
7-ish <i>In vitro</i> sharoitida o'simliklarni klonli mikroko'paytirish.....	31
7.1-ish Steril o'simtalar o'stirish.....	35
7.2-ish Kartoshkaning apikal meristemasini ajratish va o'stirish	38
8-ish Kartoshkadan mikrotuganaklar olish.....	41
9-ish Fitoregulyatorlar yordamida kartoshka tuganaklarini tinim holatiga o'tishi va uyg'onishini boshqarish	43
10-ish Tuganak bakteriyalarni sof kulturasini olish va ular asosida preparatlar tayyorlash	44
11-ish Nitragin, azotobakterin va fosforobakterin preparatlarini olish texnologiyasi	47
11.1-ish Nitragin preparatini olish texnologiyasi.....	47
11.2-ish Azotobakterin olish texnologiyasi.....	56
11.3-ish Fosfobakterin olish texnologiyasi.....	59
12-ish Entomopatogen mikroorganizmlarni ajratish va ular asosida preparatlar olish texnologiyasi	62
12.1-ish Bakteriyalar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar	62
12.2-ish Zamburug'lar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar	67
12.3-ish Viruslar asosida olinadigan entomopatogen preparatlar	73
13-ish Antagonist mikroorganizmlarni ajratish va ko'paytirish.....	75
13.1-ish Tuproq namunalarini olish va ulardan antagonist mikroorganizmlarni ajratish	75
13.2-ish Antagonist mikroorganizmlar kulturasidan undirma olish uchun ekish materialli tayyorlash	77
13.3-ish Antagonist mikroorganizmlarni g'alla donlarida ko'paytirish	77
13.4-ish Zamburug'ning ekish materialini tayyorlash.....	78
13.5-ish Hujayralarning biopreparatdagi va suspenziyadagi zichligini Goryaev kamerasida hisobini olish	79
Glossariy	82
Foydalanilgan adabiyotlar.....	98

**Zuparov Mirakbar Abzalovich
Mamiev Muxiddin Salomovich
Raximov Uchqun Xamraevich
Xakimov Albert Axmadalievich
Raxmonov Ubaydullo Normamadovich
Allayarov Abduraxmon Nazaralievich**

Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi

**laboratoriya mashg'ulotlarinin o'tkazish uchun
o'quv qo'llanma**

Muharrir: M.A.Zuparov

Bosishga ruxsat berildi 03.11.2016. Bichimi (60x84) 1/16. Shartli bosma tabog'i 6,25.
Nashriyot bosma tabog'i 6,25. Adadi 100 nusxa.

O'zbekiston Respublikasi Davlat matbuot qo'mitasining 21-3540 sonli guvohnomasi asosida
ToshDAU Tahririyat-nashriyot bo'limining RIZOGRAF apparatida chop etildi;