

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ**

**МИРЗО УЛУҒБЕК НОМИДАГИ
ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ**

ДАВРАНОВ Қ.

**ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИК
БИОТЕХНОЛОГИЯСИ**

Тошкент– 2009

Давранов Қ. - Қишлоқ хўжалик биотехнологияси. Тошкент 2009 й

Ушбу ўқув қўлланмада замонавий қишлоқ хўжалик биотехнологияси фанининг илмий, амалий ва услубий асосларини ёритишга ҳаракат қилинган, хусусан, алоҳида ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни ўстириш технологияси, ўстириш шароитлари ва озуқа муҳити, ўсимликларни клонал микроўпайтириш, тупроқ биотехнологияси, бактериал ўғитлар, энтомопатоген препаратлар тайёрлар, чорвачиликда биотехнология жараёнлардан фойдаланиш усуллари ва ветеринария препаратларини тайёрлаш технологиялари ёритилган. Ўқув қўлланма қишлоқ хўжалик биотехнологияси соҳасида таълим олаётган бакалавр, магистр, аспирант ва илмий тадқиқотчилар учун мўлжалланган.

Маъсул муҳаррир: проф. Рахимов М.М.

Тақризчилар: проф.Ваҳобов А.Ҳ., проф. Бўриев Ҳ.Ч.

Ушбу ўқув қўлланма Ўзбекистон Миллий университети Илмий Кенгашининг 2008 йил 28 январ №5 сонли мажлис қарори билан нашрга тавсия этилган.

СЎЗ БОШИ

Замонавий биотехнология кўп тармоқли илмий-амалий йўналиш бўлиб, у биология (микробиология, генетика, молекуляр биология, биокимё ва ҳ.к.) ва муҳандислик афнлари ютуқлари асосида пайдо бўлган.

Биотехнологиянинг ривожланиши, ўз навбатида унга тегишли бўлган бир неча фанлар бўйича оли бориладиган илмий-амалий изланишларни жадалланишига олиб келди. Айниқса микроорганизмлар асосида хилма-хил физиологик фаол моддаларни синтез қилиш, бунинг учун керакли ва иқтисодий самара берадиган, рақобатбардош микроб продуцентларни яратиш, улардан керакли маҳсулотни ажратиб олишни йўлга қўйиш, шу мақсадда ўсимлик ва ҳайвон ҳужайра ва тўқималаридан фойдаланиш масалалари бўйича эришилган ютуқлар юқоридаги фикрларни тасдиқлайди.

Биотехнология кўп тармоқли бўлганлиги учун ҳам, уни барча йўналишларини бир китобда тўплаш анча муаммоли вазифа. Шундай бўлишига қарамадан, ушбу ўқув қўлланмада қишлоқ хўжалик биотехнологияси фанининг тарихи, кечаги, бугунги ҳолати ва эртаси ҳақида фикрлар берилган.

Мазкур ўқув қўлланмани замонавий қишлоқ хўжалик биотехнологияси фанининг илмий, амалий ва услубий асосларини ёритишга ҳаракат қилинган, хусусан, алоҳида ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни ўстириш технологияси, ўстириш шароитлари ва озуқа муҳити, ўсимликларни клонал микрокўпайтириш, тупроқ биотехнологияси, бактериал ўғитлар, энтомопатоген препаратлар тайёрлар, чорвачиликда биотехнология жараёнлардан фойдаланиш усуллари ва ветеринария препаратларини тайёрлаш технологиялари ёритилган.

Материалларни жойлашда намунавий дастурда кўрсатилган кетма-кетликка амал қилинди ҳамда сўнгги вақтларда чоп этилган материаллар, интернет маълумотларидан фойдаланилди. Баъзи материаллар эса намунавий дастурда кўрсатилмагани учун мазкур қўлланмага киритилмади ва улар мустақил тайёрланиш учун қолдирилди.

Мазкур ўқув қўлланмани ёзишдан кўзда тутилган асосий мақсадлардан яна бири университетларни талабалари учун давлат тилида қишлоқ хўжалик биотехнологияси фанидан замонавий дастурда белгиланган талабларга жавоб беришга ҳаракат қилинди.

Муаллиф матнда йўл қўйилган хато ва камчиликлар ҳақидаги таклиф ва мулоҳазалар билдирган ўқувчиларга ўз миннатдорчиликларини билдиради.

КИРИШ

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФАНИНИНГ МОҲИЯТИ ВА ВАЗИФАЛАРИ

Биотехнология ёки биологик жараёнлар технологияси биологик агентлар ёки уларнинг мажмуаларидан (микроорганизмлар, ўсимликлар ва ҳайвон ҳужайралари, уларнинг компонентларидан) керакли маҳсулотлар ишлаб чиқариш мақсадида саноатда фойдаланиш деган маънони беради.

Адабиётларда «Биотехнология» термини мутахассис олимлар томонидан турли хил таърифлар бериб келинмоқдаки, фаннинг ҳозирги ривожланган даврида ҳам бирорта аниқ тўхтама келинмаган. Қуйида биотехнология соҳасининг етук олимлари томонидан ушбу терминга берилган таърифларга тўхталиб ўтамиз.

- а) *Анбаиш, А.Хемфери, Н.Миллисларнинг (1975) фикрига кўра “Биотехнология” - янги биокимёвий ишлаб чиқаришлар маҳсулидир (витаминлар, антибиотиклар).*
- б) *“Биотехнология” моддаларни биосинтез усули орқали озуқа олиш фанининг бўлими бўлиб, у «биоинженерия» соҳаси билан боғлиқдир.*
- в) *А.Хастинг (1983) фикри бўйича «Биотехнология» - пиво, вино, пишлоқ, витаминларни саноат асосида олиш жараёнидир.*
- г) *1980 йил Европа федерацияси Кенгаши муҳокомасида “Биотехнология” - биологик тизимлар асосидаги саноат жараёни деб қаралган.*
- д) *1983 йил Братиславада бўлиб ўтган кенгаишда «Биотехнология» - моддаларни катта миқдордаги саноат асосида (биокатализаторлар орқали) олиш ва атроф муҳитни ҳимоя қиладиган фан деб таърифланган.*
- е) *А.А.Баев (1986), Ю.А.Овчинников (1982) “Биотехнология” биологик жараёнларни ишлаб чиқаришга жорий этиш тўғрисидаги фан деб таърифлашган.*

Биотехнология жараёнлари микроорганизмлардан, ўсимлик ва ҳайвон ҳужайралари ва тўқималаридан, ҳужайра органеллалари, уларни ўраб турган мембраналарнинг соф ёки уларнинг иммобиллашган ҳолатида оқсил, органик кислоталар, аминокислоталар, спиртлар, доривор моддалар, ферментлар, гормонлар ва бошқа органик моддаларни (масалан, биогаз) ишлаб чиқариш (синтез қилишда), соф ҳолда металл ажратиш, оқова сувларни ва қишлоқ хўжалик ёки саноат чиқиндиларини қайта ишлашда кенг фойдаланилади.

Фан сифатида ўтган асрнинг 60-йилларидан шакллана бошлаган биотехнологиянинг тарихига чуқурроқ назар ташласак микроорганизмлар ёрдамида “бижғитиш”, “ачитиш” жараёнлари инсоният томонидан қадимдан кенг ишлатилиб келинаётганлигининг гувоҳи бўламиз. Сутдан- қатик, узумдан- вино ва сирка, ачитқилар ёрдамида -нон тайёрлаш ва бошқа бир қанча биотехнологик жараёнларнинг қачон ихтиро қилинганлиги ҳозирча аниқ маълум эмас.

Умуман, юқорида зикр этилган микроорганизмлар ёрдамида амалга ошириладиган биотехнологик жараёнлардан ҳозиргача ҳам инсониятнинг рўзғор юритишида кенг қўлланилиб келинмоқда.

Биотехнологиянинг моҳиятини тушуниш учун мисолларга мурожаат қилайлик. Бактерия хужайраси ҳар 20-60 минутда, ачитқи замбуруғлари 1,5-2,0 соатда иккига бўлиниб кўпайсалар, сут эмизувчилар хужайраларининг иккига бўлиниши учун 24 соат керак бўлади. Бир кеча-кундузда оғирлиги 500 килограммли бўлган қорамол 500 грамм оқсил моддаси тўпласа, 500 килограмм ачитқи замбуруғи 500000 килограмм ёки ундан 1000 маротаба кўпроқ оқсил тўплайди.

Яна бир мисол: 1 куб метр озуқа муҳитида ачитқи замбуруғлари 24 соатда 30 килограмм оқсил тўплайди, шунча микдорда оқсил тўплаш учун 18 гектар ерга нўхат экиб, уч ой парвариш қилиш лозим бўлади.

Қолаверса, микроб етиштириш на об-ҳавога ва на фаслга боғлиқ. Уларни энг арзон озуқа муҳитида ҳар хил чиқиндилар, клетчатка, метанол, метан гази ва водородда ўстириш мумкин. Микроорганизмлар нафақат оқсил, балки турли ферментлар, ёғлар, витаминлар, полисахаридлар ва бошқа бир қатор фойдали маҳсулотлар синтез қилади.

Бугунга келиб, замонавий биотехнологик усуллар ва ген муҳандислиги ёрдамида фармацевтика учун интерферонлар, инсулин, соматотропин, гепатитга қарши вакцина, ферментлар, клиник тадқиқотлар учун диагностик ашёлар (гиёҳвандлик, гепатит ва бошқа бир қатор юқумли касалликларни аниқлаш учун тест тизимлар, биокимёвий текширишлар учун турли хилдаги реактивлар, эгилувчан биологик пластмассалар, антибиотиклар, ва бошқа кўплаб биоаралашмали маҳсулотлар) ишлаб чиқарилади.

Пиво, спирт, кир ювиш воситалари ишлаб чиқариш, тўқимачилик ва тери ошлаш каби жарёнларда ишлатиладиган фермент препаратлари ишлаб чиқариш ва қўллаш ҳам кенг йўлга қўйилган.

Биотехнологиянинг асосий йўналишларини, шартли равишда, қуйидагича тавсифлаш мумкин:

- *озуқа маҳсулотлари биотехнологияси;*
- *қишлоқ хўжалигида ишлатиладиган препаратлар биотехнологияси;*
- *саноат маҳсулотлари биотехнологияси;*
- *доривор моддалар, диагностика ва реактивлар биотехнологияси;*
- *биогидрометаллургияда ишлатиладиган биотехнология;*
- *табиатни муҳофаза қилиш учун зарур бўлган биотехнологиялар.*

Одатда, микроорганизмларни фойдали ва зарарли деб ўрганишга ҳаракат қилинади. Бу фикр мутлақо тўғри эмас. Фикримизча, барча микроорганизмлар фойдали, чунки улар табиатда модда алмашинувида фаол қатнашади ва кўплаб хилма-хил ҳаётий зарур моддалар синтез қилади. Бинобарин, микроорганизмлар биз яшаб турган дунёнинг энг қудратли ишлаб чиқарувчи кучидир.

Улар ҳар хил физик-кимёвий муҳитга чидамли, тез мосланувчан, турли озуқа муҳитида яшаш қобилиятига эга.

Биологик жараёнларда ачитқи замбуруғлари, микромицетлар, бактериялар ва актиномицетлар (шуълали замбуруғлар) каби микроорганизмлардан фойдаланилади. Бутун мавжудот микроорганизмларсиз яшай олмайди, микроорганизмларнинг ўзи эса яшайверади. Айтайлик, овқат ҳазм қилиш тизимида фаол қатнашадиган микроорганизмлар микдори камайиб кетса,

дисбактериоз ва у билан боғлиқ бўлган бошқа касалликлар рўй беради. Яна бир мисол, тупроғи стерилланган, яъни микроблари ўлдирилган тувакларга ўсимлик ўтказиб барча керакли минерал ўғитларни ҳам стерилланган ҳолда солсангиз, кўчат 4-5 кундаёқ сўлиб қолади.

XXI – асрга замонавий биотехнология улкан ютуқлар билан кириб келди. Инсон геномининг тўла ўқилиши, олдиндан режалаштирилган хусусиятларга эга бўлган штаммларни ярата билиш, қаримаслик сирларини очиш сари интилиш, бир сўз билан айтганда абадийликка интилиш, бугунги кун фани ютуқлари олдида афсона эмаслиги ҳаммага маълумдир.

Ўтган асрнинг 80 – 90 йилларидан бошлаб, дунё олимларининг “XXI – аср биотехнология асри бўлади” деган башоратомуз сўзлари бежиз эмаслиги кўплаб мисоллар билан ўз тасдиғини топмоқда.

Ривожланган, замонавий биотехнология фанининг асосида унинг улкан ютуқлар манбаи бўлмиш микроорганизмлар дунёси ётади. Шундай экан эришилган ютуқларда кўз илғамас, жажжи организмларнинг ҳам ўз ўрни бор, албатта.

Келинг, энди ушбу тармоқларнинг республикамызда ривожланиши учун нималарга эътибор беришимиз лозимлиги ҳақида фикр юритайлик. Дастлаб, эътиборимизни бутун жаҳон диққат эътиборида турган оқсил танқислиги муаммосига қаратмоқчимиз. Статистик маълумотларга кўра: дунёда оқсил танқислиги йилига деярли 12 –15 млн. тоннани ташкил этади. Бу билан боғлиқ бўлган қуйидаги маълумотлар сизларни бефарқ қолдирмайди деб ўйлаймиз:

Дунё бўйича 850 млн. дан ортиқ киши оқсилга муҳтож, шундан 200 млн. дан ортиқроғи 5 ёшгача бўлган болалардир. 50 млн. дан ортиқ киши очликдан вафот этади, улардан 40 млн дан ортиқроғи ёш болалардир. 1 суткада ўртача 11000 ёш бола ҳаётдан кўз юмади. Албатта, келтирилган жумлалар ҳар бир инсонни ларзага солмай қўймайди.

Хўш, оқсил танқислиги муаммосини ҳал қилиш учун қандай ишлар амалга оширилмоқда, қолаверса, биотехнология саноати бунга қай даражада ҳисса қўшмоқда.

Оқсил муаммосини ҳал қилиш учун дастлабки уринишлар эру-хотин Таусонларнинг ачитқилар ва бактерияларни ўстириш учун парафиндан фойдаланишни таклиф этишгандан бошланган эди. Т.А.Таусон ачитқиларнинг парафиндан оксидланиш жараёнининг айрим оралиқ маҳсулотлари ва В₁ витаминини синтез қилишини исботлаб берди. Бу дастлабки уринишлар эди, албатта. Шундан кейин С.И.Кузнецова, Б.И.Исоченко, Л.Д.Штурим, Г.Н.Могилевский ва бошқа шу каби олимларнинг изланишлари, назарий ва амалий тажрибалари кўпгина микроорганизмлар углеводородларни оксидлай олиши мумкинлигини рад этиб бўлмас даражада исботлади.

Бу тадқиқотлар инсоният айниқса, олдида оқсил танқислиги ўткир муаммо бўлиб турган бир пайтда катта эътиборни жалб этади.

Франция, Италия, Япония ва АҚШ каби жаҳоннинг ривожланган мамлакатларида ҳам нефтдан оқсил олиш муаммоларини ечиш учун илмий изланишлар олиб борилди ва бир қадар ўз ечимини топди.

Фикримизни кенгайтирган ҳолда ўқувчиларга тушунарли бўлиши учун бу жараёнда микроорганизмлар фаолияти механизми ҳақида тўхталиб ўтишни жоиз деб ҳисоблаймиз.

Ачитқи ва бактериялар парафиндан биомасса ҳосил қилиш учун ўзларига керакли бўлган углеродни ва ҳужайранинг ҳаётий фаолияти учун энергия манбаи бўлиб хизмат қиладиган, оксил ва витаминларни синтезлайдиган, рақиб ва душманлардан ҳимоя қиладиган водородни топиб оладилар. Шунинг учун ҳам биосинтезнинг ниҳоятда юқори босқичда ўтиши ва ўта маҳсулдорлиги ажабланарли ҳол эмас.

Фикримизнинг исботи сифатида қуйидаги мисолларни келтирмоқчимиз: Микроорганизмлар 1 т. мўътадил тузилишдаги парафинлардан (10% намликдаги тайёр маҳсулотга ҳисобланганда) 580–630 кг оксил сақлаган 1 т. биомасса ҳосил қилади. Айти пайтда гидролиз заводлари эса шунча миқдордаги ачитқи маҳсулоти ишлаб чиқариш учун 5,5–6,4 тонна мутлақо куруқ ҳолатдаги ёғоч кипикларидан фойдаланадилар. Орадаги фарқ албатта жиддий, қолаверса, парафинда ёғочга нисбатан углерод ва водородлар миқдори ниҳоятда кўп бўлиб, биосинтез жараёнига сезиларли таъсир кўрсатади.

Гидролиз маҳсулотларидан фарқли равишда бу маҳсулотни оксил – витаминли концентрат (ОВК) деб юритила бошланди. Узоқ вақтлар давомида олиб борилган илмий изланишлар натижасида, ОВК нинг чорва молларига ва инсонларга безарар эканлиги исботланди.

Келинг, шу ўринда эътиборимизни чорвачиликда оксилга бўлган талабга қаратайлик. Дастлаб эътиборингизга қуйидаги статистика маълумотларини ҳавола этмоқчимиз: мамлакатимизда, биргина паррандачилик комплекси 200000 т. озуқа ишлатади, бу озуқага 20000 т. ОВК, 200 т. амилаза, 200 т. целлюлаза, 80 т. лизин ва 60 т. метионин қўшиш керак бўлади.

Хўш, буларнинг ўрнини қандай кондириш мумкин? Маълумки, дон чорвачилик учун асосий энергия ва оксил манбаи ҳисобланади. Паррандачиликда деярли 100%, чўчкачиликда 80%, қорамолчиликда 30% озуқа - бу маккажўхори, арпа, буғдой ва жавдар каби бошоқли экинлар ҳиссасига тўғри келади.

Ҳайвонларнинг маҳсулдорлигини унга бериладиган озуқанинг тўйимлилиги, шунингдек ундаги оксилнинг танқис аминокислоталарга бойлиги таъминлайди. Бироқ, асосий фураж экинлари – маккажўхори ва буғдой – бу талабларга жавоб бермайди. Фикримизнинг исботи сифатида қишлоқ хўжалик фанлари доктори Г.В.Редчиковнинг қуйидаги илмий маълумотини келтирамиз: “Буғдой, арпа, маккажўхори донида оксил миқдори жуда кам бўлиб, энг муҳими чўчка болалари учун зарур бўлган лизиннинг атиги 23 – 37%, жўжалар учун эса атиги 20 – 32% мавжуд. Лизиннинг бунча етарли бўлмаган миқдорини ҳам ҳайвонлар тўлалигича ўзлаштира олмайдилар, яъни чўчка арпа дони таркибидаги лизиннинг 26, маккажўхоридаги лизиннинг 72, буғдойдагининг 50 фоизини ўзлаштириши мумкин, холос (Дон оксилни яхшилаш ва уларни баҳолаш: М. Колос, 1978. 168 б)

Маълумки, ҳайвонлар озуқадаги фақат танқис аминокислоталар улушига тенг келадиган оксил қисмидан самарали фойдаланиш қобилиятига эга. Бундан

келиб чиқадиган бўлсак, дон озукасига энг қимматли компонент – оксил, агар у лизинга тўйинмаган бўлса, ҳайвонлар организми уларни ўз организмлари ва тўқималарида оксил ҳосил қилишга эмас, бошқачароқ айтганда гўшт, сут, тухум ёки жун ҳосил қилишга эмас, балки ички энергия манбаи сифатида сарфлайдилар. Донда танқис аминокислоталар – сифатида треонин ва триптофан етишмаса ҳам шу ҳолат юз беради.

Хўш, бошоқли экинлардаги бундай табиий етишмовчиликни қандай бартараф этиш мумкин? Бунинг учун донли озукани таркибига балиқ ва суяк уни, сут кукуни, соя (дондан ёғи ажратиб олингандан кейин қолган шрот ёки кунжараси) ва озиқа ачитқисини қўшиш керак.

Мутахассисларнинг ҳисобларига кўра, ишлаб чиқариш ҳажмининг энг юқори унумдорлиги шароитида қорамолларни боқиш учун балиқ ва суяк уни, сут кукуни, соя кунжараси ишлатилиб, 1995–2000 йилларда чорвачиликнинг оксилга бўлган талабини бор йўғи 28–30% миқдорида қондиради, дейилганди.

Бу етишмовчиликни бартараф этиш учун биотехнология саноати маҳсулотлари энг аввал чорвачиликни комплекс омукта емини бойитишга мўлжалланган турли маҳсулотларидан фойдаланади. Улар орасида озукани ачитқиси алоҳида ўрин тутаяди.

Озуқани ачитқиси–тўйимлилик хусусияти бўйича барча юксак ўсимликлардан устун туради. Ҳайвон оксил рационининг 25% ни ачитқиси замбуруғи оксигани ташкил этади. Бу оксил самарадорлиги бўйича сут оксигани – казеиндан кам фарқ қилади. Ачитқиси оксиганининг 80% дан кўпроғи ўзлаштирилади. Ачитқиси оксиганининг ҳазм бўлиш коэффициентигани қорамоллар, қўйлар ва жўжаларда 83– 91% оралиғида ўзгариб туради. Уларнинг устун томони шундаки, айнан ачитқиси таркибига донли озиқада етарли бўлмаган танқис аминокислоталар кўп бўлади.

Мисол тариқасида қуйидагиларни эътиборингизга ҳавола этамиз. Бир тонна ачитқигида 41–42 кг танқис аминокислота (лизин) бўлса, 1 т. арпа ва сўлида бу миқдор 10 марта камдир: бошқа танқис аминокислоталар (треонин, метионин, триптофан) ачитқигида арпа ва сўлидагидан 3 – 5 марта кўп. Глутамин кислота эса 1 тонна ачитқигида 65 – 110 кг атрофида бўлиб, дондагидан анча кўп бўлади.

Бу кўрсаткичлар ачитқининг унча кўп бўлмаган миқдори (ҳажмига нисбатан 5 – 6%) ўсимлик оксиганининг сифатини ва ҳазм бўлишини кескин орттиришига ҳамда улар сарфини анча камайтиришга имкон яратаяди.

Микроб биотехнологияси саноати таклиф этаётган озукани ачитқилари В гуруҳи витаминларининг ҳам манбаи бўлиб ҳисобланади.

Маълумки, чорва моллари учун зарур бўлган витаминлардан ҳатто бирортаси етишмаган тақдирда ҳам улар меъёридагидек ривожлана олмайди. Модда ва энергия алмашинуви бузилиб, организмнинг ҳимоя кучи заифлашади. Ўсимлик озиқасида эса витамин кам бўлади ва ҳатто бор витаминлар ҳам уларни тайёрлаш, сақлаш ва қайта ишлаш вақтида тез бузилади, айрим ҳаётий витаминлар эса ўсимликларда умуман ҳосил бўлмайди.

Озуқани ачитқиси таркибига арпа, сўли, нўхат ва сояга нисбатан – рибофлавин (В₂) миқдори 20–75 марта, пантатен кислотаси (В₃ витамини) 5–10

марта, холин (В₄) эса 2–6 марта кўп бўлади. Бу витаминлар ҳайвон организмида аминокислоталар алмашинувида, ўсимлик озикасидаги протеиндан фойдаланишда ва оксил биосинтезида ҳал қилувчи роль ўйнайди.

Шуни ҳам таъкидлаш лозимки, озика ачитқисида В₁₂ (цианокобаламин) витамини бўлмайди. У ўсимликларда ҳам синтез бўлмайди. Уни фақат одам ва ҳайвонлар ичагида яшовчи бактериялар ва актиномицетлар синтез қиладилар. Чўчкалар, паррандалар ва ёш қорамолларда бу витамин жуда кам ҳосил бўлади.

Шу билан бирга В₁₂ витамини қон ҳосил бўлишда, метионин, холин - нуклеин кислоталар синтезида, оксил, ёғлар ва углеводларнинг алмашуви жараёнида муҳим аҳамиятга эга. В₁₂ витамини етишмаслиги жўжалар, чўчка болалари, кўзичоқ ва янги туғилган бузоқларнинг ўсишидан қолишига, касалланишига ва ўлимига олиб келади, ҳамда чорва моллари маҳсулдорлигини камайтириб, ўсимлик озикаси оксилнинг ҳазм бўлишини қийинлаштиради.

Шунинг учун рационга унчалик кўп бўлмаган миқдорда В₁₂ витамини қўшиш (1 тонна озика ҳисобига бор йўғи 0,015 – 0,025 грамм) қўшиш ажойиб натижалар бериб, юқоридаги барча кўнгилсизликларнинг олдини олади.

Микробиологик биотехнология саноатида эса В₁₂ витаминини ацетон-бутил ишлаб чиқаришдаги чиқиндиларни метанобактериялар билан ачитиш орқали олиш мумкин.

Бундан ташқари чорвачиликда биотехнологик саноатнинг ажойиб маҳсулоти – ферментли препаратлардан фойдаланиб қўшимча гўшт ва сут етиштириш мумкин. Рацион таркибига қўшилган фермент препаратлари тирик организмга, айниқса улар анча ёш бўлганда, озика моддаларининг яхши ҳазм бўлишида ёрдам беради. Шу туфайли чўчка болалари, бузоқлар ва кўзичоқлар ўсиши тезлашади. Уларнинг ўрта суткалик вазни 10–12% га ортади, озика сарфи тежалади. Бироқ бу ҳали ҳаммаси эмас. Яхши озика массасини сут ачитувчи бактериялар ҳосил қиладиган сут кислотаси билан қишга силос тайёрлаш, консервалаш мумкин. Силос тайёрланганда озика моддалари, жумладан, витаминлар одатдаги пичан тайёрлашдагига нисбатан анча кам нобуд бўлади.

Демак, чорвачиликни ривожлантиришнинг энг муҳим томонларидан бири – бу озика сифатини такомиллаштиришдир.

Биз шу пайтгача микроорганизмларни фойдали томонлари чорвачилик озика рационини бойитиш йўллари ҳақида ҳикоя қилдик. Энди эса бактериялар ва замбуруғлардан фойдаланган ҳолда одамнинг овқатланиш рационини такомиллаштиришга эътиборимизни қаратмоқчимиз.

Ғалла ва бошқа қишлоқ хўжалик экинларини етиштириш учун қанчалик куч ғайрат ва меҳнат сарф қилиниши ҳеч кимга сир эмас. Шунингдек, чорвачиликда ҳам буни кўриш мумкин. Мисол тариқасида қуйидаги маълумотларни эътиборингизга ҳавола этмоқчимиз: Ҳар бир тонна ҳайвон оксили синтези учун камида 4,8 – 4,9 тонна енгил ҳазм бўладиган озика оксили сарф қилишга тўғри келади. Агар биз исътемом қиладиган ҳайвон маҳсулотларини алоҳида олиб кўрадиган бўлсак, қуйидаги манзара намоён бўлади: 1 т сут оксилни тайёрлаш учун 3,8 – 4,0 т; 1 т. тухум оксили учун – 3,9

– 4,1 т; 1 т. парранда гўшти оқсили учун – 4,5 – 4,7 т; 1 т. мол гўшти оқсили учун эса 9,3 – 9,7 т. ҳисобига озиқа оқсили сарфланиши аниқланган.

Ҳайвонларни бундай катта – сарф харажатлар билан узоқ вақт парвариш қилиш чорва махсулотларидаги оқсил таннархининг қимматлашиб кетишига олиб келади.

“Хўш, нима қилиш керак?” - деган савол туғилиши табиийдир. Биотехнология, микробиология ва кимё фанлари ижодий ҳамкорликда озиқа моддалари, биринчи навбатда уларнинг энг муҳим ва қимматли қисми – оқсил олишнинг замонавий технологияларини ишлаб чиқди. Яъни, ачитқи замбуруғлар озуқа махсулотларининг таркибини бойитишнинг энг асосий манбаларидан бири эканлиги исботланди.

Шунингдек, *Candida* авлодига мансуб, тез ривожланувчи ачитқилар ва секин ўсадиган *Saccharomyces* авлодига мансуб ачитқи замбуруғлар вакиллари нонвойчилик ва пивочилик соҳаларида ишлатилиши барчамизга маълумдир. Мазкур микроблар ёрдамида ўша танқис аминокислоталар – лизин, триптофан, треонин ва метионин ишлаб чиқариш йўлга қўйилган.

Аминокислота ва ачитқилардан биринчи навбатда энг асосий озиқа махсулоти, ризқ-рўзимиз бўлган ноннинг озиқа қийматини оширишда фойдаланиш мумкин.

Олимларнинг аниқлашича нонда оқсил миқдори унчалик кўп эмас: жавдар унидан тайёрланган ноннинг 100 грамида ҳаммаси бўлиб 6,5 граммгача, буғдой унидан тайёрланган нонда – 8,3 грамм оқсил бўлади, холос. Бироқ, олимлар ўрта ёшли кишининг бир кунда 450 г нон ейиши туфайли оладиган оқсил миқдори бор – йўғи 29 граммга яъни унинг ўртача суткалик эҳтиёжининг учдан бирига тенг келишини аниқлаганлар. Шунингдек, нонда лизин, триптофан, метионин етишмайди. Умуман буғдой ноннинг биологик қиймати 38% ни ташкил этса, оқсилнинг соф парчаланиши 33% га тенг. Хўш, қандай усуллар билан ноннинг биологик самарадорлигини ошириш мумкин?

Бунда бизга яна биотехнологик жараён орқали олинган лизин ёрдам бериши мумкин. Олимларнинг таъкидлашларича: 1 т унга атиги 150 грамм лизин қўшилганда нондаги оқсил сифати кескин ошиши аниқланган.

Буғдой унига биргина танқис аминокислота – лизин қўшилгандагина натижалар ана шундай. Агар ун таркибига етишмаётган барча танқис аминокислоталар қўшилса, нима бўлади?

Демак, буғдой унига танқис аминокислоталарга бой бўлган аминокислоталарни, замбуруғларни (хамиртуруш) солиш орқали биз аминокислоталар таркиби ва биологик қиймати бўйича сут ва тухум оқсилларига яқин ва мол гўшти оқсилларидан қолишмайдиган нон махсулотларини олишимиз мумкин. Хамиртуруш фақатгина танқис аминокислоталарга эмас, балки витаминларнинг миқдори ва сифати бўйича ҳам анча бойдир.

Умуман, биотехнология ва саноат микробиологиясининг ривожланиши фақат кўп тоннали қимматли озиқа ишлаб чиқаришни эмас, балки турли хилдаги физиологик фаол моддалар ишлаб чиқариш имконини ҳам беради.

Бу борада биотехнология саноати имкониятлари беқиёсдир. Уларнинг яна бир тармоғи ўсимлик қолдиқларидан (шоҳ – шабба, ғўзапоя, маккажўхори пояси, сомон ва ҳоказо) шакар ва унинг ўрнини босувчи махсулотлар ишлаб чиқаришдир.

Микробиолог олимларнинг тажриба – саноат синовлари ва ҳисобларининг кўрсатишича, 1 т. куруқ ёғочдан 450 – 500 килограммга етказиб шакар ёки бир кубометр зичланган ёғоч қипиғи, дарахт парчалари ва ўтиндан эса 180 – 200 кг гача шакар олиш мумкин. Олинган тоза шакар моддаси микробиология саноати учун оксил моддалари ачитқилари, витаминлар, спирт ва бир қатор моддалар ва махсулотлар ишлаб чиқаришга яроқли бўлади. Худди шу йўл билан глюкозани ишлаб чиқариш ҳам мумкин. Бунда яна биотехнологлар ёрдамига таянамиз.

Бунинг учун ўсимликнинг целюлоза сақловчи қолдиқларига кимёвий ёки ферментатив ишлов берилади ва натижада 55% глюкоза ва 45% фруктозалардан иборат шарбат олиш мумкин. Бундай аралашма ширинлиги бўйича биз одатланган сахарозага тенглашиб, саноат йўли билан олинадиган лавлаги шакари ўрнини босиши мумкин.

Глюкозаизомеразанинг кашф этилиши ва унинг кенг қўлланилиши шакарли моддалар ишлаб чиқариш йўлида катта бурилиш ясади. Иммунизация қилинган бу фермент ёрдамида АҚШ, Япония, Дания, Финландия каби бир қатор ривожланган мамлакатларда қанд лавлагидан эмас, балки анча арзон ва етарли бўлган хомашё маккажўхори донидан миллионлаб тонна шакарли озика махсулотлари ишлаб чиқарилмоқда. 2000 йилнинг ўзида 3 млн. тонна глюкоза фуктоза шарбати ишлаб чиқарилган ва бу жараён учун зарур бўлган глюкозаизомераза ферменти 40 млн. АҚШ доллари ҳажмида ишлаб чиқарилган.

Шу ўринда эътиборингизни ширин таъм берувчи моддаларга талаб даражасининг ошиб бораётганлигига қаратмоқчимиз.

Эндиликда биотехнология саноати ширин моддалар ишлаб чиқариш соҳасида мутлақо янги саҳифа очмоқда. Бу борада дастлабки самарали ишни Англиянинг Кент университети профессори К.Стеси бажарди, у ўз ходимлари билан ҳамкорликда замонавий биотехнология ва ген муҳандислиги усуллари билан шакарга нисбатан минг марта ширинроқ бўлган оксил синтез қиладиган гени ажратиб олди ва бактерияга (*E. coli*) ўтказди. Бактерия бу махсулотни ишлаб чиқара бошлади. Шунини аълоҳида таъкидлаб ўтиш лозимки, янги трансген микроб-организм, одам организми тана ҳароратидан юқори ҳароратда ўсиб кўпаяди. Шунинг учун ҳам у инсон учун умуман хавфли эмас.

Айни пайтда биотехнологик ишлаб чиқариш амалиётида қуйидаги ширин таъм берувчи махсулотлар ишлаб чиқарилмоқда. Аспартам-200,0, Стевозид-150,0, Тауматин–сахарозадан 3000,0 маротаба ширин бўлган махсулотлардир. Буларнинг барчасини синтез қилувчи генлари ичак таёқчаси (*E.coli*) бактериясига трансформация қилинган ва саноатда фойдаланилмоқда.

Бундай микроорганизмларни саноат миқёсида кўпайтириш жуда катта самара бериши табиий ҳолдир. Айни вақтда мамлакатимизда шакар махсулотига бўлган талабни қондиришда бу усул жуда асқотади деб ҳисоблаймиз.

Бундан ташқари микробиологик синтез йўли билан олинган оксил ва бошқа озика моддалардан, суний озик-овқат махсулотлари тайёрлаш мақсадида фойдаланилганда тўла қийматли озика ишлаб чиқаришни амалда чекланмаган ҳажмда ташкил қилиш мумкин.

Ёшлик даврини узайтириш, кексаликгача бўлган муддатни имконият даражасида чўзиш, меҳнат ва ижтимоий қобилиятни узок йиллар сақлаб қолиш муаммолари кўп маънода одамнинг оқилона ва сифатли овқатланишига боғлиқ.

ЎЗБЕКИСТОНДА БИОТЕХНОЛОГИЯНИНГ РИВОЖЛАНИШ ТАРИХИ

Озик-овқат ва озуқа махсулотлари биотехнологияси Ўзбекистон учун энг кенжа фанлардан бўлиб, унинг тарихи узокқа бормайди (қадимий биотехнологиялар нон ёпиш, қатиқ тайёрлаш ва ҳ.к. бундан истисно).

Биотехнология ихтисослиги бўйича биринчи ўзбек академиги А.Г.Холмуродов (1939-1996) фузариум авлодига мансуб замбуруғлардан НАД-коферменти ва витаминлар комплекси (В гуруҳига кирувчи витаминлар, витамин РР, 10Q ва ҳ.к.) тайёрлаш технологиясини яратди. Академик М.И.Мавлоний Ўзбекистонда учрайдиган ачитқи замбуруғларни таҳлил қилиб, уларни нонвойчилик, виночилик ва чорвачиликка қўл келадиган турларини топди ва улар асосида махсус хамиртурушлар ва виночилик учун ачитқи тайёрлаш технологияларни яратди.

Профессор Қ.Д.Давранов МДХ мамлакатларида биринчилардан бўлиб, ёғ парчаловчи липаза ферментини тайёрлаш технологиясини яратди. Бу ферментни кўп шаклилиги сабабларини таҳлил қила туриб, ҳар бир биотехнологик жараён учун ўзига хос хусусиятга эга бўлган липаза ферменти зарур деган фикрга келди ва буни амалиётда исботлаб берди. Қ.Д.Давранов яратган "Ер малҳами" биопрепарати азот ўзлаштирувчи микроорганизмлар асосида тайёрланган бўлиб, мамлакатимиз кишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Бундан ташқари Қ.Д.Давранов раҳбарлигида З.Р.Ахмедова табиий целлюлоза-лигнин биокаркасини (ғўзапоя, сомон, каноп пояси, қипиқ ва бошқалар) шу мақсад учун махсус тайёрланган базидиомицетларнинг ферментлари иштирокида парчаланиш шароитларини ишлаб чиқдилар.

Б.ф.д. Ж.Ташпўлатов (1938-2005) сомон ва ғўзапояни парчалашда "триходерма харзианум" деб аталмиш замбуруғ ферментларидан фойдаланиш мумкинлигини илмий асослаб берди ва бу технологияни амалиётга қўллаш бўйича таклиф ва мулохазаларни чоп этди. Ж.Ташпўлатов яратган бу технология қўлланилганда сомонда шакар миқдори 6-7% га етгани, унда витаминлар, аминокислоталар пайдо бўлганлиги ва шу туфайли сомоннинг озика-бирлиги бир неча баробар ошганлиги исботлаб берилган.

Ўзбекистонда биотехнология фанининг ривожланишига бош бўлган олим, б.ф.д., профессор М.М.Рахимовдир. Бу олим мамлакатимизнинг бир неча олийгоҳларида биотехнология кафедраларини очишда бош бўлди. Олимнинг озик-овқат саноатида ферментлар ёрдамида, янги самарадор технологиялар яратганлиги таҳсинга сазовордир.

Ўзбек олимларидан Т.Г.Гулямова, А.Х.Вахобов, Х.А.Бердикулов, Р.Шаякубов, З.Р.Ахмедова, З.Ф.Исмоилов, И.Ж.Жуманиёзов ва бошқалар мамлакатимизда микроб биотехнологиясининг ривожлантириш устида чуқур илмий ва амаллий ишлар олиб бормоқдалар. Шунингдек, марҳум профессорлар М.М.Муродов ва Т.Ю.Юсуповлар олиб борган чуқур илмий изланишлар асосида катта илмий амаллий назариялар яратилган.

Шу ўринда, Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланишига катта ҳисса қўшган айрим йирик олимлар ҳақида қисқа маълумотлар бериб ўтишни лозим топдик. Зероки уларнинг улкан меҳнатлари туфайли маҳаллий биотехнология соҳаси пайдо бўлган.

Холмуродов Асқар Ғаниевич (1939-1997) – Қашқадарё вилоятида туғилган. 1960 йилда Ўрта Осиё Университетини тамомлаган. Сўнгра Украина фанлар академиясига қаршли Биокимё институтида номзодлик (1965) ва докторлик диссертациясини (1976) химоя қилган ва ушбу институтда йигирма йил давомида фаолият олиб борган. 1980 йилдан бошлаб профессор. 1986-1997 йиллар давомида ЎзФА Микробиология институти директори ЎзРФА мухбир аъзоси (1987) ва ҳақиқий академиги (1989) шунингдек, ЎзРФА Президиуми бош илмий котиби (1988) ва вице-президент (1990) лавозимларида фаолият юритган. 1994 йилда Ўзбекистон Республикаси Олий мажлисига депутат бўлиб сайланган ва фан, таълим, маъданият ва спорт қўмитасини бошқарган. Биокимё ва биотехнология соҳасида дунё тан олган йирик олим ҳисобланади. Илмий фаолияти давомида 300 дан ортиқ илмий мақолалар ва ихтиролар муаллифи. 40 дан ортиқ фан доктори ва фан номзодларига раҳбарлик қилган. 1979 йилда “Витаминология” ҳамда “Энзимология усуллари” номли иккита китоби чоп этилган. Бундан ташқари “Транспорт жирорастворимых витаминов” (1980) ва «Мембранный транспорт коферментных витаминов и коферментов» (1982) номли монографияларида биринчи марта алмашинмайдиган биологик фаол бирикмалар гуруҳининг мембранада ташилиши, рецепцияси ва боғланиш механизмлари ҳақидаги маълумотларни систематикага солганлиги учун дунё бўйича фундаментал аҳамиятга эга бўлган қўлланма ҳисобланади ва шу сабабли бир қанча давлатларда хорижий тилларга таржима қилинган. Бундан ташқари “Тиаминфосфатлар” бўйича тайёрлаган услубий қўлланмаси ҳам дунё миқёсида аҳамиятга эга бўлган капитал ишланма ҳисобланади, бу қўлланма АҚШ да чоп этилган. Биринчи марта қишлоқ хўжалик ҳайвонлари ва паррандалар учун никотин кислотаси ўрнини босувчи “Корник” номли озуқа препаратини яратган ва амалиётга жорий этганлиги учун собиқ иттифокнинг ХХЮК бронза медалига сазовор бўлган. Бундан ташқари ЎзРФА сининг академик А.В.Палладин номидаги мукофотига сазовор бўлган. АҚШ нинг “Кто есть кто в науке и технологиях” номли фахрийлар китобига 1996-1997 йилларда совриндор сифатида номи киритилган ва махсус диплом билан мукофотланган.

Музаффаров Аҳроп Музаффарович (1909- 1987) – ботаника, экология, алькология, гидробиология, гидроэкология ва сув ўтлари биотехнологияси соҳалари бўйича фаолият олиб борган йирик олим. ЎзРФА нинг ҳақиқий аъзоси (1960). Ўз ФА Ботаник институтининг директори (1956-1960), ЎзРФА Президиуми аъзоси ва кимё-технология ва биология фанлари бўлими академик-

котиби (1966-1970), ЎзРФА Микробиология бўлими раҳбари (1970-1977) кейин эса шу бўлим асосида микробиология институтини ташкил этиб унга раҳбарлик қилган (1977-1985). Мамлакатнинг кўплаб орден медаллари ва мукофотларига сазовор бўлган. Марказий Осиё сув хавзаларининг экологик ва типологик ўзига хослигини чуқур ўрганиб, улардан сув ўтларининг серхосил штамmlарини ажратиб, уларнинг очик ҳавода ва бекиг ускуналарда ўстириш усулларини яратган ва улар асосида янги биотехнологик жараёнларнинг яратилишига раҳбарлик қилган. Ўнлаб монографиялар ва 200 дан ортиқ илмий мақолалар чоп эттирган. Уларни ҳаёти ва илмий-педогогик фаолияти ҳақида ўндан ошиқ китоблар ва мақолалар тайёрланган. Абу Райхон Беруний номидаги давлат мукофоти совриндори (1979). Ўзбекистонда хизмат кўрсатган фан арбоби.

Асқарова Салима Асқаровна (1922-1997) – ЎзРФА қошидаги институт мақомига эга бўлган Микробиология бўлимининг ташкилотчиси ва биринчи директори. Асосий илмий йўналиши микроорганизмлар физиологияси ва биокимёсига бағишланган. Республикамизда қишлоқ хўжалик экинларини микробиологик усулда ҳимоя қилиш муаммолари бўйича йирик илмий лойиҳаларни амалга оширган. Ўзбекистон микробиологлар жамияти асосчиси ва биринчи президенти. Ўзбекистонда саноат микробиологияси ривожланишига кўшган катта ҳиссаси ва педагогик, илмий ташкилий ишлардаги самарали меҳнатлари учун хизмат курсатган фан арбоби даражасига эришган. Маориф аълочиси, биология фанлари доктори, профессор. Унинг раҳбарлигида йигирмадан ортиқ фан докторлари ва фан номзодлари тайёрланган.

Ибрагимов Ахмад Поччаевич – 1928 йил 12 декабрда кўҳна Туркистон шаҳрида туғилган. 1950 йилда Тошкент Фармацевтика институтини тамомлаган. 1954 йилда ЎзРФА Кимё институтининг аспирантурасида таҳсил олиб, кимё фани бўйича номзодлик диссертациясини ҳимоя қилди. 1954-1957 йиллар давомида Самарқанд Давлат Қишлоқ хўжалик институтида Органик ва биологик кимё кафедраси мудири. 1957 йилдан бошлаб ЎзРФА Ядро физикаси институтининг радиоцион кимё лабораториясини бошқарди. 1966 йилда “Ўза уруғида физик-кимёвий, биокимёвий ва гамма нурлари таъсирида айрим муҳим биологик моддаларнинг ўзгаришини тадқиқ этиш” мавзусидаги докторлик диссертациясини ҳимоя қилди. 1967 йилда ЎзРФА Биокимё институти директори муовини ва айна пайтда Нуклеин кислотлар биокимёси лабораториясини бошқарди. 1969 йилдан профессор. 1976 йилда у бошқараётган лаборатория ЎзРФА Ўсимликлар экспериментал биологияси институти таркибига ўтказилиб “Молекуляр генетика” лабораторияси номи билан атала бошланди. 1984 йили ЎзРФА мухбир аъзоси. Асосий илмий йўналишини ўсимликлар ҳужайрасининг ташкилий тузилиши, генетик ахборот функцияси ҳамда ушбу жараёнларнинг онтогенетик ва ревалюцион кўриниши, стресс омиллар – ионлаштирувчи нурлар ва ҳар хил касалликлар таъсирига генетик ахборот системаларининг чидамлилиги масалаларини ечишга бағишлаган таъниқли молекуляр генетик, биокимёгар олим, биология фанлари доктори, профессор, ЎзРФА академиги (2000), Ўзбекистонда хизмат кўрсатган фан арбоби (1989) унвонлари совриндори. Унинг муаллифлигида 300 дан ортиқ илмий мақолалар ва бешта монография чоп этилган. 40 дан ортиқ фан

докторлари ва фан номзодларига раҳбарлик қилган ва айни кунларда ЎзРФА Ботаника илмий ишлаб чиқариш марказида ўсимликлар молекуляр биологияси лабораториясини ташкил этиб ғўза молекуляр генетикаси соҳасида олиб борилаётган илмий тадқиқотлар ишларига раҳбарлик қилиб келмоқда.

Рахимов Мирзаатхам Мирзаҳакимович - 1943 Тошкентда туғилган. Олий маълумотни М.В.Ломоносов номидаги Москва Давлат Университетида олган. Ушбу олийгоҳда аспирантурада таҳсил олиб кимё фанлар номзоди илмий унвонига сазовор бўлган (1972). Ўзбекистонда биотехнология фанининг ташкилотчиларидан бири ҳисобланади. Ўзбекистон Миллий Университети ва бошқа қатор олий ўқув юртларида биотехнология кафедралари ва марказларини ташкил этган. Асосий илмий йўналиши ферментатив катализ асосида биотехнологик жараёнлар яратиш бўлсада, биология, тиббиёт, кимё, озиқ-овқат ва бошқа йўналишларда ўта кенг фаолият кўрсатиб келаётган йирик олимдир. Юзга яқин фан докторлари ва фан номзодларига устозлик қилиб келмоқда. 500 дан ортиқ илмий мақолалар, ўқув қўлланмалар, дарсликлар ва патентлар муаллифи.

Абдукаримов Абдусаттор Абдукаримович – 04.04.1942 йилда Тошкент вилоятида туғилган. Олий маълумотни Тошкент Давлат Университетида олган (1966). 1961-1967 йилларда ЎзРФА Ядро физикаси институтида фаолият юритган. 1967-1969 йилларда ЎзРФА Биокимё институти аспиранти, шу институтда 1967-1992 йилларда шу институт кичик, катта илмий ходими ва лаборатория мудирини. 1982 йилда республикада илк бор ген муҳандислиги лабораториясини ташкиллаштирган. 1979 йилда академиклар Ё.Х.Тўрақулов ва Д.Х.Хамидовлар раҳбарлигида фан доктори илмий даражасига эришган. 1992 йилдан ЎзРФА Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институт директори лавозимида фаолият олиб бормоқда. 1994 йилдан ЎзРФА мухбир аъзоси, 2000 йилдан ЎзРФА академиги. Илмий фаолияти ген муҳандислиги ва молекуляр генетикага асосланган биотехнология фанини ривожлантиришга бағишланган. Ген муҳандислиги бўйича ЎзРФА ва ДФТҚ сининг трансген ўсимликлар яратиш бўйича қўшма дастури “Генинмар” нинг илмий раҳбари, илмий техник кенгаш раиси, институтнинг молекуляр генетика бўлими мудирини, айни пайтда ЎзР ўсимлик генетик ресурсларини сақлаш ва ўрганиш бўйича ДФТҚ таркибидаги мувофиқлаштирувчи кенгаш раиси. Ўсимлик генетик ресурсларини сақлаш бўйича ФАО халқаро институти (IPGRI) нинг Марказий Осиё мамлакатлари бўйича мувофиқлаштирувчи кенгаш раҳбари. Унинг асосий илмий йўналиши Республикада экиладиган ғўза навларини ген муҳандислиги усули билан янада яхшилаш муаммоларига бағишланган. Шу билан бир пайтда ғўзанинг янги навларини яратишнинг молекуляр, физиологик, генетик ва селекцион ҳамда агротехнологик асосларини бир тизимга келтириш борасида самарали меҳнат қилмоқда. “Умумий биология” дарслиги муаллифларидан бири, Маориф Вазирлигининг биология фанини ўқитиш услубий кенгаши раиси сифати жамоат ишларида ҳам фаол иштирок этиб келмоқда. Бир дарслик, битта монография ва 100 дан ортиқ илмий мақолалар муаллифи, 4 нафар фан доктори ва 11 нафар фан номзодларига илмий раҳбарлик қилган. Айни кунларда ҳам ёшларга илмий раҳбарлик қилиш билан

бирга Ўзбекистоннинг молекуляр генетика ва биотехнология фани ютуқларини жаҳон миқёсига олиб чиқиш ва ривожлантириш бўйича самарали меҳнат қилмоқда.

Бу каби биотехнологик ишлаб чиқариш назарияларини яратиш, уни амалиётга тадбиқ этиш ишлари юзасидан ЎзФА Микробиология институти, М.Улуғбек номидаги Ўзбекистон Миллий Университети, биология ва тупроқшунослик факультетининг Биотехнология кафедраси, Тошкент кимё-технология институтининг Биотехнология кафедраси ва Тошкент давлат аграр университети, қишлоқ хўжалик биотехнологияси ва фитопатологияси кафедраси, Ўсимликлар биотехнологияси лабораторияси ҳамда Самарқанд Давлат Университети Биотехнология кафедраси олимлари ҳам фаол илмий изланишлар олиб бормоқдалар. 2004 йилда Тошкент кимё технология институти таркибида ҳам биотехнология кафедраси ташкил этилиб, айти кунларда республикамизда биринчи бўлиб, биотехнология йўналиши бўйича мутахасслар тайёрлайдиган олий ўқув юртига айланди.

Мамлакатимиз равнақи, унинг иқтисодини янада юксалтириш мақсадида энг аввало куйидаги биопрепаратларни ишлаб чиқаришни йўлга қўймоқ зарур:

- *Озиқ-овқат ва чорвачилик учун оқсил моддалари;*
- *Аминокислоталар (лизин, метионин ва бошқалар);*
- *Органик кислоталар (лимон кислотаси ва уни ўрнини босадиганлар);*
- *Антибиотиклар (биринчи навбатда 4-5 авлодга мансуб антибиотиклар);*
- *Витаминлар;*
- *Ўсимликларни ҳимоя қилиш воситалари ишлаб чиқариши ва ҳ.к.*

Афсуски, юқоридагилар ҳозиргача мамлакатимизга ташқаридан, валютага келтирилади. Олимларимизнинг қолаверса бугунги кунда таълим олаётган талабаларнинг олдиларига қўйиладиган кўп сонли масалаларнинг энг долзарблари юқоридагилардан иборат.

Ҳозирги вақтда қайси продуцент (микроорганизм) дан фойдаланган ҳолда фойдали махсулотлар синтез қилиш мумкинлигини аниқ кўрсатиб бериш мумкин. Агарда бундай продуцент бўлмаса, қай тарих ва қандай шароитда юқори даражада, исталган турдаги махсулотни олиш хусусиятини намоён қилувчи продуцентни яратиш мумкинлигини олдиндан айтиб бериш имкониятлари мавжуддир.

Биотехнологик ишлаб чиқаришда бугунги кунда микроорганизмларни минглаб штаммларидан фойдаланилмоқда.

Озиқ-овқат саноати биотехнологиясида ген муҳандислиги соҳасини ўрганишдан мақсад:

- ✓ *тирик организмлар ирсий белгилари ҳақидаги ахборот жойлашган ДНК молекуласининг тузилиши, роляси ҳамда унинг молекуляр биологияси;*
- ✓ *генетик муҳандисликнинг моддий асослари: трансформация, трансдукция, кўчиб юрувчи генетик элементлар-транспозонлар, плазмидалар, вируслар, бактериофаглар, рестриктазалар, рекомбинант ДНК олиши, генларни*

клонлаш, ҳужайра мухандислиги, ҳужайра ва тўқималарни сунъий шароитда ўстириш технологияси;

- ✓ генетик мухандисликнинг озиқ-овқат саноатида, ҳайвонлар ва ўсимликлар селекциясида қўлланилиши;
- ✓ ген мухандислигига асосланган биотехнологиянинг озиқ-овқат саноатидаги илмий-техник тараққиётни тезлаштиришидаги роли;
- ✓ гибридмалар олиш технологияси ва унинг юқорида келтириб ўтилган махсулотларни ишлаб чиқаришида қўллашни ҳамда генетик мухандисликнинг истиқболлари ҳақида аниқ билимларни ўзлаштиришдан иборат.

Ушбу фаннинг асосий вазифаси замонавий ген мухандислиги ютуқларини халқ хўжалиги амалиётида кенг қўламда қўллашдан иборат.

Ген мухандислиги анъанавий танлаш (селекция) усулларини инкор қилмасдан, аксинча унинг имкониятларини янада кенгайтиради. Ген мухандислиги усуллари қуйидаги вазифаларни ҳал қила олади:

- ✓ продуцентларнинг алоҳида олинган генларини ўзгартириш, уларни керакли функцияларини кучайтириш, яъни янги генетик ахборот киритмасдан, ўзида мавжуд иншакцияни модификация қилиш орқали штаммнинг самарадорлигини ошириш ёки яхшилаш;
- ✓ аниқ вазифага жавобгар бўлган, алоҳида генни ажратиб олиш ва уни ўзгартириш (мутация қилиш), ҳужайра ичида унинг нусхаларини кўпайтириш ва шу орқали маълум махсулот синтезини кучайтириш;
- ✓ промоторларни геннинг фаоллигини аниқловчи мутацияга учраган турини олиш, энхансерлар (промоторлар фаоллигини кучайтирувчилар) киритиш;
- ✓ ишлатиладиган субстратлар спектрини кенгайтириш. Масалан, сут зардобини, целлюлоза сақловчи чиқиндиларда тез ривожланиб, оқсил синтез қилувчи микробларнинг штаммларини яратиш;
- ✓ ксенобионтлар (инсон яратган биологик фаол моддалар), нефт қолдиқлари, ҳар хил токсинлар ва атроф муҳитни ифлосланттирувчи кимёвий моддаларни ва бошқа кераксиз бирикмаларни утилизация қилиш имкониятига эга бўлган микроорганизмлар штаммларини яратиш;
- ✓ қўшила олмайдиган микроорганизмларга қўшилишни таъминлаб берувчи плазмидалар киритиш ва шу туфайли штаммларнинг хоссаларини яхшилаш мақсадида рекомбинация усулларида фойдаланиш;
- ✓ бошқа гуруҳ организмлар генини киритиш ва шу орқали киритилган ген махсулотини олиш. Масалан, ўсимликлардан ширинлиги сахарозадан 3000 маротоба ортиқ бўлган полипептид генини *E.coli* га ёки *Sacch.cerivisiae* культураларига ўтказиш ва шу орқали ширин таъм берувчи махсулотлар тайёрлаш;
- ✓ Янги ген конструкция қилиб, янги оқсил олиш, кейинчалик оқсил молекуласини “архитектураси” (бирламчи, иккиламчи, учламчи ва тўртламчи структуралари) ва уларнинг биокимёвий хоссалари аниқ бўлгандан кейин, сунъий генлар синтез қилиш ва уларни клонлаш орқали янги оқсиллар яратиш ва ҳ.к.

Ҳозирги даврда *E.coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* каби микроорганизмларнинг генетикаси жуда ҳам яхши ўрганилганлиги сабабли, улар ген муҳандислигида кенг ишлатилмоқда.

Микроорганизмлар ҳужайраларидан энг муҳим бирикмалар, масалан, гормонлар (инсулин, соматостатин ва соматотропин), иммунитетни кучайтирувчи моддалар (α -тирозин, интерферон, интерлейкин, вируслар қобикларининг оқсиллари, - улардан ўта хавфли касалликлар – қутириш, оқсим, гепатит В, шунингдек, ҳозирги вақтда паррандаларга қирғин солаётган парранда гриппининг кўзгатувчиси H5N1-вируси ва бошқа юқумли касалликларга қарши эмлаш (вакцинация) воситалари олишда фойдаланилмоқда.

Ген муҳандислиги усуллари ёрдамида аминокислоталар (треонин, прольин ва ҳ.к.), ферментлар, антибиотиклар ва бошқа биологик фаол моддаларнинг супер-продуцентлари олинган.

Бу усул ген фаоллигини бошқариш, унинг функциясини, тузилишини ўрганиш, прокариот ва эукариот организмларда генетик материалларни ташкил қилиш масалаларида чегараланмаган имкониятларни очиб беради.

Тирик организмлар ирсий ахборотини сунъий йўл билан маълум мақсадга мувофиқ ўзгартириш жараёни генетик муҳандислик фанининг асосий устқурмаси ҳисобланади. Генетик муҳандислик ҳужайра, хромосома ва ген даражасида амалга оширилади:

1. *Ҳужайра даражасидаги генетик муҳандислик - икки ҳужайрани ўзаро қўйиши йўли билан амалга оширилади.*
2. *Хромосома даражасидаги генетик муҳандислик -ҳужайра ядросига қўйишмча хромосомалар киритиши орқали амалга оширилади.*
3. *Ген даражасидаги генетик муҳандислик ёки ген муҳандислиги - энг мураккаб бўлиб, қўйидаги босқичлар асосида амалга оширилади:*
 - а. аниқ мақсаддан келиб чиққан ҳолда, шу мақсадга жавоб бераоладиган ген, унинг функциясини ўрганиш орқали қидириб топилади, ажратиб олинади, клонланади ва тузилиши ўрганилади.*
 - б. ажратиб олинган ген хромосома ДНК си билан рекомбинацияланувчи бирор фаг геноми, транспозон ёки плазмида ДНК си билан бириктирилиб вектор конструкция яратилади.*
 - с. вектор конструкция трансформация усули билан ҳужайрага киритилади ва трансген ҳужайра олинади.*

Трансген ҳужайрадан сунъий равишда етук организм ўстирилади. Ушбу усулдан фойдаланиб ўсимлик, ҳайвон ва микроорганизмлар ҳужайраларидан трансген шакллар олиш мумкин. Ҳужайра муҳандислиги усуллари билан фойдаланиб, тирик организмлардан гибрид ҳужайралар олиш биотехнологияси яратилди ва бу асосида моноклонал антителалар олиш йўлга қўйилди. Биотехнологиянинг бу соҳасига дастлабки қадамлар 1973 йил биринчи ген клонланган вақтдан бошлаб қўйилган эди (4.1-жадвал).

Замонавий биотехнологиянинг дастлабки асосий босқичлари

Кашф этилган вақти	Бажарилган ишлар
1973 йил	Биринчи ген клонланган
1974 йил	Биринчи бактерия генларини клонлаш экспрессияси амалга оширилди
1975 йил	Биринчи гибридома яратилган
1976 йил	Рекомбинант ДНК технологиясидан ишлаб чиқаришда фойдаланиш бошланган
1980 йил	Ген мухандисли усуллари ёрдамида олинган микроорганизм штамларини патентлаш ҳақидаги қарор қабул қилинган
1981 йил	Моноклонал антителла тўпламларидан фойдаланиш мумкинлиги тўғрисидаги қарор қабул қилинган. Биринчи марта генларни автоматик синтезатори сотувга чиқарилди
1982 йил	Тиббиётда рекомбинант ДНК - инсулини ва ҳайвонлар учун биринчи рекомбинант ДНК дан фойдаланишга рухсат берилди
1983 йил	Биринчи маротоба ген экспрессиясидан бир ўсимликдан бошқа турида фойдаланиш мумкинлиги исботланди

Илмий ишлар давом эттирилмоқда. Ҳозирги вақтда кун тартибида ОИТС (СПИД) ва парранда гриппининг қўзғатувчиси H5N1 вирусига қарши вакцина яратиш масаласи кўндаланг турибди.

Ген мухандислиги биотехнологиясининг ютуқлари саноат кўламида ва қишлоқ хўжалигида кенг қўлланилмоқда. Хусусан, антибиотиклар, аминокислоталар, витаминлар ва гормонлар ишлаб чиқарилмоқда, наслдор қорамол клонлари яратилмоқда, тупроқ ва сувда захарли пестицид қолдиқларини парчалайдиган микроорганизмларни трансген штамлари олинган, атмосфера азотини ўзлаштирувчи микроорганизмлар генлари асосида тупроқни азотли ўғитлар билан бойитиш муаммоси ечилмоқда, зарарли хашаротларга ва патоген микроорганизмларга чидамли, экологияни асровчи трансген ўсимлик навлари етиштирилмоқда, ирсий касалликларни тезкор ташхис қилиш учун диагностикаумлар тайёрланмоқда, шунингдек, ген терапия усуллари такомиллаштирилмоқда.

Бугунги кунда генетик мухандисликка асосланган биотехнология тезкор ошиб бораётган, инсон эҳтиёжларини қондириш учун классик технологиялардан ўта самарали эканлигини тўла намоён қилмоқда.

Ген мухандислигининг моҳияти ва вазифалари

Вируслар билан прокариот хужайралар орасидаги материалнинг кўчирилишини, табиий шароитда бактерияларда ўтадиган рекомбинация механизмларини ўрганиш, плазмидалар ва мўътадил фагларнинг хужайрадаги ҳаётини тушуниш генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш имкониятини беради. Олимлар кўлида ДНКнинг керакли бир қисмини бактерия хужайрасига кўчириб ўтказадиган система -плазмидалар ҳам бор. Бундай трансмиссив кўчириб ўтказувчи халқали молекулалар - плазмидалар ва мўътадил вируслар **вектор** деб аталади (4.3-жадвал).

Улар табиатнинг ўзи биологларга тақдим қилган совға бўлади. Шундай экан, энди бактерияларни културада (улар ўсадиган муҳитда) инсонлар учун керакли оқсилларни, ферментларни синтезлашга мажбур қилиб бўлмасмикан деган савол туғилади?

Бу ғояларнинг амалда юзага чиқиши ген мухандислиги ёки генетик мухандислик деб аталадиган ва катта истиқболга эга бўлган янги соҳани дунёга келтирди.

4.3-жадвал

Биотехнологияда кенг қўлланиладиган баъзи бир векторлар тавсифи

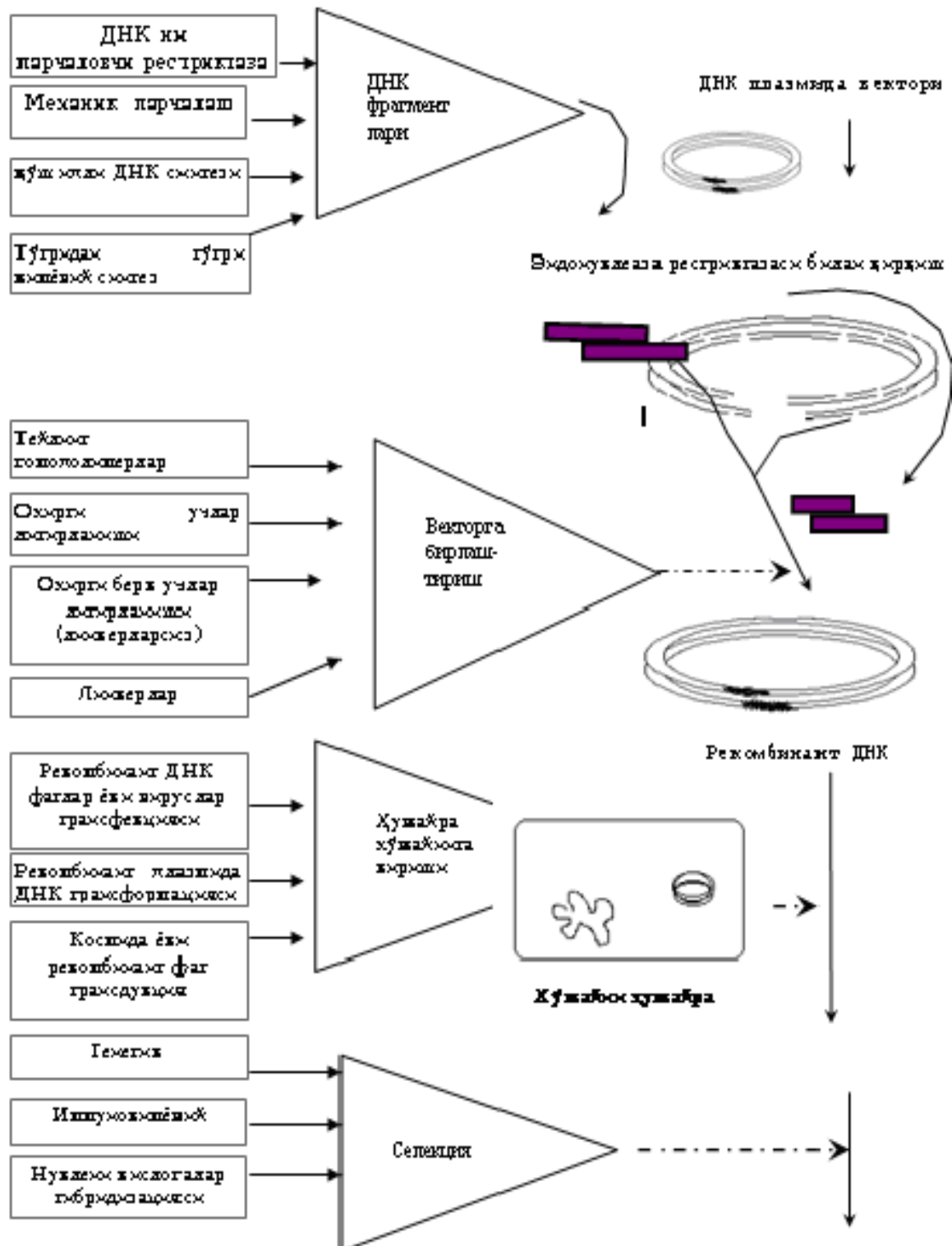
Векторлар	Нусхалар миқдори	Ўлчами, минг нуклеотидлар
клонлаш учун плазмида векторлари: pBR 322 pACY 184	40-50 ~20	4,4 4,0
клонлашда махсус катталиқдаги векторлар: λ Chron 4A космида pHC 79	100-200 ~20	41,8 6,4
генлар экспрессияси учун плазмида векторлари: p trp ED5-1	40-50	6,7

Ген мухандислиги қисқача айтганда, генлар устида турли манипуляциялар ўтказиш, уларни тўла ўрганиш асосида функционал қисмларга бўлиш, керакли жойидан кесиш, керак бўлмаган қисмини олиб ташлаш, керак бўлган қисмларини бошқа генлардан ёки синтез йўли билан олиб улаш ва шу усулда тайёрланган дурагай ёки рекомбинант генни мувофиқ организмга киритиб (Масалан, одамнинг инсулин генини микроб хужайрага ёки сичқоннинг ўсиш гормони генини каламушга), зарур турларни ёки препаратларни синтез қилиш ва ҳақозо ғоялар ва технологияларнинг йиғиндисидир (4.2-расм).

Айрим ДНК молекулалари - генларнинг бир турини кўп нусхасини ҳосил қилиш мақсадида илгаридан хужайраларнинг тоза линияларини олишда кўпдан бери ишлатилатиб келинган, клонланиш техникасини молекулаларга

мослаштирилган варианты қўлланилмоқда. Хужайра линияларининг бир хиллигини, клонлаш усули билан ҳам кучайтириш мумкин.

Клон - деб бирдан-бир олд хужайрадан келиб чиққан хужайралар популяциясига айтилади. Клонлаш асосан мутант хужайралар олиш учун ишлатилади. Молекуляр клонлаш ДНК нинг аниқ бир намунасини тоза ҳолда кўпайтиришдан иборат.



1-чизма. Ген муҳандислиги манипуляциялари механизми

ҲУЖАЙРА ВА ТЎҚИМАЛАР БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

(ўсимликшунослик асосида)

Ҳужайра биотехнологияси

Ҳужайра биотехнологияси – ҳужайра, тўқима ва протопластларни ишлатишга асосланади. Ҳужайраларни манипуляция (фаолиятига қандайдир ўзгаришлар киритиш) қилиш учун, уларни ўсимликдан ажратиб олиш ўсимлик организмидан ташқарида яшаши ва кўпайиши учун шароит туғдириб бериш лозим. Ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни сунъий озуқа муҳитида, стерил шароитда (*in vitro*) ўстириш усули ажратилган тўқималар культураси деб ном олди ва уларни биотехнологияда ишлатиш мумкинлиги сабабли катта аҳамият касб этди.

Биотехнология узоқ - узоқлардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида ўтган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният энг аввало ўзи учун ўта зарур бўлган яъни озиқ-овқат, энергетика, захира (ресурс), атроф – муҳит муҳофазаси ва ҳ.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди.

Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва ҳайвон тўқималари, ҳужайралари ва органеллаларидан фойдаланишга асосланади. Ҳозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида эътибор берилмоқда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқа технологияларга нисбатан бир қатор устунликка эгалитидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва ҳ.к. Шунинг билан бир қаторда, биотехнология стандарт жиҳозлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иқлим шароитига қарамасдан ҳамда кўп майдон эгалламаган ҳолда жараёнларни йил бўйи ўтказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва ҳайвонларни ҳужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги рольини уч йўналишда кўриш мумкин:

Биринчи йўналиш - ажратиб олинган ўсимлик ҳужайрасини тиббиёт, ветеринария, косметика ва бошқа соҳалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, эфир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боғлиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар қаттиқ (агарли) ёки суюқ озуқа муҳитида ўстирилган каллус тўқималардан олинади. Ҳужайра технологияси асосида диосгенин – диоскоре ҳужайрасидан; аймолин – илон рацвольфи ҳужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар – женьшен ҳужайрасидан ажратиб олинади ва тиббиёт ҳамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг эътиборга олиш керакки, ўстириладиган ҳужайраларни ҳосилдорлиги, бутун ўсимликни ҳосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириши имконияти бўлмаган

шароитда (совуқ ёки иссиқ иқлимли минтақаларда), уларни хужайраларини бутун йил мабойинида ўстириш мумкин.

Иккинчи йўналиш – ажратиб олинган хужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва шу орқали тез ривожланувчи, ҳар хил ташқи муҳит таъсирига чидамли (иссиққа, совуққа, шўрланишга, оғир металлларга, қурғоқчиликка, касалликка ва ҳ.к.) ўсимликлар яратиш. Шунинг билан бирга бу йўналиш, ажратилган протопластларни қўшилиши орқали янги ўсимликлар яратиш ҳамда ножинсий (сомотик) гибридлар олишни ҳам ўз ичига олади. Ажратиб олинган протопластларга ген мухандислиги усуллари ёрдамида бегона генларни киритилиши, кейинчалик янги, мерос қоладиган хоссаларга эга бўлган ўсимлик яратишга ҳам олиб келади. Ажратиб олинган чангдон ва уруғ куртакни сунъий озуқа муҳитида ўстириш, гаплоидлар олиш имконини берса, муртакларни ўстириш – ўсаолмайдиغان (эндоспермаси ёмон ривожланган) ўсимликлардан гибрид уруғлар етиштириш имконини беради.

Учинчи йўналиш – ажратиб олинган тўқималарни кўпайтириш ва экув материалларини вируслар ҳамда бошқа патогенлардан соғломлаштириш мақсадида ишлатиш. Бу усул, ўсимликларни **клонал микрокўпайтириш** дейилади ва битта меристемаадан йилига юз минглаб ўсимлик олиш имконини беради.

Хужайра ва тўқималар культураларини ишлатишдаги натижалар биринчи навбатда хужайраларни бўлиниши, уларни табақаланиши ва улардан ўсимлик ўсиб чиқишини белгиловчи, физиологик жараёнларни оптимизациясига боғлиқ. Энг мураккаб томон бу алоҳида хужайрадан ўсимлик регенерация қилиш. Биринчи навбатда бу бошоқли ўсимликларга тегишли. Шунинг учун ҳам *in vitro* шароитда морфогенез, регенерация ва уларни асосида ётган жараёнларни механизмларини аниқлаш энг муҳим аҳамиятга эгадир.

Ўсимликлардан ажратиб олинган тўқималарни ўстиришга ҳаракат анча узоқлардан маълум. Бу усулнинг ривожланиш тарихини бир неча босқичларга бўлиб ўрганиш мумкин:

➤ **I-босқич (1892–1902 йиллар)** – **Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер** каби немис олимларини номлари билан боғлиқ. Улар сахароза эритмасида ҳар хил ўсимликлар тўқималарини ўстиришга уриниб кўришган, аммо ўсимликларни ўсиши кузатилмаган. Фақатгина қоқи ўтини ва тол дарахтини пояларини сигментлари учун бирламчи каллус олинган ва каллуссогенезга айланиши мумкин бўлган сегментни энг кичик ўлчами аниқланган. Экспериментал муваффақиятларга етаолмасдан бу олимлар қатор гоя ва гипотезалар яратганлар. Бу гоя ва гипотезалар анча кечроқ ўз тасдигини топган. Масалан, **Хаберландт** ҳар қандай тирик ўсимлик хужайрасини тотипотентлиги яъни хужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенциалини намоён қилиши ва бутун ўсимлик ҳосил бўлишига бошлаши ҳақида гипотеза эълон қилган эди.

➤ **II-босқич (1902-1922 йиллар)** – ҳайвон тўқималарини ўстириш учун биринчи озуқа муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу озуқа муҳитлари табиий бўлиб, таркибида қон плазмаси (қонни суюқ қисми) ва

куртак суюқлиги сақлаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстрактлари сақлаган сунъий озуқа муҳитида ўстириб кўриши мувоффақиятсиз чиққан, чунки экспериментларда юксак ўсимликларни ўсиши фаоллигини намоён қилишига тўғри келмайдиган ҳужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.

- **III-босқич (1922 – 1932 йиллар).** Бу даврда бир-бирлари билан боғлиқ бўлмаган ҳолда Америкалик олим **В.Робинс** ва немис олими **Котте** қаттиқ озуқа муҳитида помидор ва маккажўхори илдизи учидаги меристемааларни ўстириши мумкин эканлигини намоёни қилганлар. Аммо, маълум вақт ўтгач, ўсимлик тўқималари қўнғир ранга кириб, халок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириши усулининг ривожланиши – 1932 йилдан бошланган.
- **IV-босқич (1932–1940 йиллар), француз олими Р.Готре номи билан боғлиқ.** У, *in vitro* шароитида ўсимлик тўқималарини вақти- вақти билан тоза озуқа муҳитига кўчириб туриши орқали узоқ вақт ўстириши мумкинлигини намоёни қилган. Бу янгилик, тўқималар технологиясини ривожланишига катта ҳисса қўшди ва ўстиришига қўйиладиган ўсимликлар сони жуда ҳам кўпайди.
- **V-босқич (1940–1960 йиллар).** 1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон – цитокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) ҳужайраларни бўлинишини кучайтириши имконини яратди. Ўсишни кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, эксплант ҳужайрасининг бўлинишини кучайтириши, каллус тўқималарни ўсишини муҳофаза қилиши, морфогенезни кучайтириши мумкин эканлиги намоёни этилди. Шу даврда какос ёнгогини, каштан, маккажўхори ва бошқа ўсимликлар эндоспермаларини ҳужайрани ўсиши, морфогенез жараёнлари (каллус тўқима ва ҳужайра суспензиясида) га ижобий таъсир кўрсатиши аниқланган.
- **VI-босқич (1960 – 1975 йиллар).** Бу даврни энг муҳим воқеаси Ноттинген университети профессори **Э.К.Коккин**г томонидан ферментатив йўл билан помидорини илдизи ва мевасидан протопластлар олиниши ва уларни назорат қилиниб турилган шароитда ўстирилганлиги бўлган. Кейинроқ шу лабораторияда Пауэр ўзини шогирдлари билан протопластларни сунъий қўшилиши шароитларини яратишган. Бу эса, сомотик гибридлар яратишда янги йўл бўлиб хизмат қилган. Ўша даврда яратилган яна бир усул – бу ўсимликларни *in vitro* шароитида меристема культуралар ишлатиб микро кўпайтиришидир. Дастлаб бу усул француз олими **Ж.Морел** томонидан орхидей ўсимлигини соғлом кўчатини олиши мақсадида яратилган.
- **VII-босқич – (1975 йилдан ҳозирги вақтгача).** *In vitro* техникасини жадаллик билан ривожланиши, ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиши давом этмоқда. Ажратилган протопластларни электро қовуштириши усуллари ишлаб чиқилмоқда, мутагенез ва ҳужайра селекцияси усуллари, гаплоидли ўсимликлар яратиши усуллари, ҳужайраларни ажратилган протопластлар ва *Ti* ва *Ri Agrobacterium tumefaciens* ва *Agrobacterium rhizogenes* асосида тайёрланган *Ti* ва *Ri* плазмид векторларни ишлатиб суюқликда ўстириши усуллари

мукаммаллаштирилмоқда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кўчириб ўтказишни самарали усуллари ишлаб чиқилди.

Шундай қилиб, охириги йилларда ажратиб олинган ўсимлик хужайралари ва тўқималари билан ишлаш техникаси такомиллаштирилди. Аммо, бу ишларда асосий манба бўлиб, бир паллали ва икки паллали ўтлик ўсимликлар хизмат қилган. Дарахтларни ўрганиш бўйича олиб борилган ишлар унчалик кўп эмас.

АЖРАТИБ ОЛИНГАН ҲУЖАЙРА ВА ТЎҚИМАЛАРИНИ ЎСТИРИШ ТЕХНИКАСИ

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашни асосий шarti – стерилликга қатъий риоя қилишдир. Таркиби бой бўлган озуқа муҳити микроорганизмларни ривожланиши учун ҳам жуда яхши субстрат ҳисобланади, ўсимликлардан ажратиб олинган фрагментлар (эксплантлар) озуқа муҳити билан аралаштирилганда микроорганизмлар таъсирига тез учрайдилар. Шунинг учун ҳам эксплантни ҳам, озуқа муҳитини ҳам стерилизация қилиш керак.

Ажратилган хужайралар ва тўқималар билан қилинадиган барча нозик ишлар (манипуляция) асептик шароитда (ламинар-боксларда) стерилланган ускуналар ёрдамида бажарилади. Ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақлаш керак, айниқса ҳарорат ва намлик ўзгарганда, чунки пробиркаларни пахта-бинтдан тайёрланган тикинчалари намланади ва ундан микроорганизмлар осон ўтишади.

Эксплантни стерилизацияси, шунингдек, уруғлар ҳам 5-20 минут давомида стерилизация қилувчи эритмада ушлаб туриш, кейин эса стерил сув билан ювиб ташлаш орқали амалга оширилади. Стерилизация даври эксплантни характерига ҳамда эритмани стерилизация қилиш хусусиятига боғлиқ. Одатда уруғ 10-20 мин, вегетатив қисмлар эса 5-10 мин. давомида стерилизация қилинади. Стерилизация қилувчи эритмаларга мисоллар 3.1-жадвалда кўрсатилган.

1-жадвал.

Дастлабки ўсимлик материалларини стерилизация қилиш (Р.Г.Бутенка, 1990 йил)

Манба	Стерилизация вақти, мин			
	0,1% ли диацид	0,1% ли кумуш хлорид (AgCl ₂)	5-9% ли гипохлоритлар (Na, Ca)	10-12% ли водород пероксида (H ₂ O ₂)
Уруғлар				
куруқ	15-2	10-15	15-20	12-15
намланган	6-10	6-8	10-15	6-8
Тўқималар				
сутли илдиз, илдизмева	20-3	15-25	15-20	-
дарахтланган поя	20-4	20-25	20-25	-
барглар	1-3	1-3	3-6	3-5
апекслар	1-10	1-7	3-15	2-7

Эксплант олинмоқчи бўлган ўсимлик органи, дастлаб совунли сув билан шеткалар ёрдамида яхшилаб ювилади ва дистилланган сув билан чайиб ташланади, кейин эса бир неча секунд давомида 70 % ли этанолга ботириб олинади. Уруғлар спиртта 1-2 мин. ушлаб турилади. Тўқималарга спирт билан ишлов бериш, уни стерилизация қилиш хоссасидан ташқари, асосий стерилизация қилувчи эритмани таъсирини кучайтириши билан ҳам боғлиқ.

Стерилизациядан кейин ўсимлик объектлари стерилланган сув билан тозалаб ювиб ташланиши керак. Сиртки стерилизация эксплантни фақат ташқи инфекциядан озод қилади. Агар эксплант тўқималари ички инфекцияга эга бўлсалар, уларга антибиотиклар билан ишлов беришга тўғри келади. Айниқса, ички инфекцияга йирик томирли тропик ва субтропик ўсимликлар бой бўлишади. Культураларни замбуруғлар ёки бактериялар билан ифлосланиши экилгандан 1-14 кун ўтганда кўзга ташланади. Ёруғлик хонасидаги ҳавони ифлосланишдан сақлаш учун ифлосланган культурани дарҳол йўқотиш керак.

Озуқа муҳитларини автоклавда 120⁰С да 0.75 – 1,0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация қилинади. Агар озуқа муҳити таркибига юқори ҳароратда парчаланадиган моддалар кирса, уларни алоҳида совуқ стерилизация қилинди. Уларни тешиқлар диаметри 0,22–0,45 мкм бўлган бактериал филтрлардан ўтказилади ва автоклавдан чиққан озуқа муҳитини 40⁰С гача совутиб, кейин уларни аралаштирилади. Олдиндан фольгага (альюмин қоғои) ёки ўрайдиган қоғозга ўралган идишларни куруқ иссиқ билан курутгич шкафларида 160⁰С да икки соат давомида стерилизация қилинади.

Озуқа муҳити

Ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни ўстириш учун мўлжалланган озуқа муҳитлари, ўсимликларни яхши ўсиши учун керак бўлган барча макроэлементлар (азот, фосфор, калий, кальций, магний, олтингурут ва бошқалар) ва микроэлементлар (бор, марганец, рух, мис, молибден ва бошқалар) ҳамда витаминлар, углеводлар, фитогормонлар ёки уларни синтетик аналогларини сақлаши керак. Баъзи озуқа муҳитлари аминокислоталар, казеин гидролизати, ЭДТА (этилендиаминтетрасирка кислота) ёки уни натрийли тузи (бу туз темирни хужайрага киришига ёрдам беради) ва бошқа керакли моддалар сақлайди.

Каллус тўқима олиш учун, алоҳида ҳолларда озуқа муҳитига какос ёнғоғини (какос сути), каштан дарахтини эндоспермаси қўшилади. Карбон сувлар озуқа учун энг керакли компонентлар ҳисобланади. Бунга сабаб, кўп ҳолларда ажратиб олинган хужайра ва тўқималарни автотроф озикланишга қурблари етмайди. Карбон сув сифатида кўпроқ 2-3 % ли сахароза ёки глюкоза эритмасидан фойдаланилади.

Фитогормонлар хужайраларни табақасизланиши (дедифференцировка) ва хужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шу сабабли ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (хужайра бўлинишини кучайтирувчи) бўлиши шарт. Поя

морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар миқдорини камайтириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

Гормон сақламайдиган озуқа муҳитида шиш ва «ўрганган» тўқималар ўсади. Ҳар икки гуруҳ гормонларига ёки улардан бирортасига автономлик, бу ҳужайраларни ўзларини гормон синтез қилиш хусусияти билан боғлиқ.

Ауксин манбаи сифатида озуқа муҳитига 2,4-дихлорфенокси сирка кислота (2,4-Д), индоллил-3-сирка кислота (ИУК), L-нафтил сирка кислота (НУК) қўшилади. Яхши ўсувчи каллус олиш учун кўпроқ 2,4-Д дан фойдаланилади, чунки ИУК, 2,4-Д га нисбатан 30 маротаба кучсиздир.

Сунъий озуқа муҳитига қўшиш учун, цитокинин манбаи сифатида, кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП) ва зеатин ишлатилади. 6-БАП ва зеатин ажратилган тўқималарни ўсишига органогенезни индукциясига кинетинга нисбатан фаолроқ таъсир кўрсатади. Баъзи бир озуқа муҳитлар таркибига аденин ҳам қўшилади.

Ҳозирги пайтда жуда кўп сонли озуқа муҳитларнинг таркиби аниқ бўлсада, ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини *in vitro* шароитида ўстириш учун Т.Мурасига ва Ф.Скуга муҳитлари ишлатилади. Бу муҳитни таркиби биринчи маротаба 1962 йилда эълон қилинган ва у жуда яхши балансланган озуқа моддалари таркибига эга ва бошқалардан аммонийли ва нитратли азотни нисбати билан фарқ қилади (3.2-жадвал).

Қаттиқ озуқа муҳит тайёрлаш учун агар-аграр ишлатилади. Агар-аграр денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, макро- ва микроэлементлар эритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар қуюқроқ қилиб тайёрланади ва совуқ шароитда сақланади ҳамда керак бўлганда суюлтирилиб ишлатилади.

2-жадвал.

Ўсимликларни ажратиб олинган тўқималарини ўстириш учун ишлатилadиган озуқа муҳитларини таркиби

Озуқа муҳити компонентлари	миқдори, мг/л			
	Мурасига-Скуга	Гамборга	Шенка - Хильдебрандта	Грессхофф-Доу
NH ₄ NO ₃	1650	2500	2500	-
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300	-
KNO ₃	1900	-	-	1000
CaCl ₂ ×2H ₂ O	440	150	200	150
Mg SO ₄ ×7H ₂ O	370	250	400	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	130	-	-
KH ₂ PO ₄	170	-	-	-
Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3	20,0	37,3
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,95	27,85	15,0	27,8
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	-	150	-	90,0
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	5,0	3,0
MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3	10,0	10,0	10,0
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8,6	2,0	1,0	3,0

KI	0,83	0,75	1,0	0,75
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,25
CoU₂×6H₂O ?	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин HCl	1,0	10,0	5,0	-
2,4-дихлорфеннок-сирка кислотаси (2,4-Д)	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

Ўстириш шароити

Ўсимликлардан ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни яхши ўстириш учун ўстиришнинг маълум шартларига риоя қилиш керак. Кўпчилик каллус тўқималари ёруғликка эҳтиёжи йўқ, чунки уларни хлоропластлари бўлмасдан, гетеротроф озикланадилар. Баъзи – бир яшил рангдаги каллус тўқималар бундан мустасно. Баъзи бир ҳолатларда каллус тўқималар автотроф озикланишига қобилиятли эмас, буларни доимий ёруғлик шароитида ўстирилади, бу эса муваффақиятли морфогенез учун мажбурий шароитдир кўпроқ каллус тўқималар қоронғиликда сақланади.

Морфогенезга аниқланган тўқималар ёруғликга ўтказилиб, кейин 1000-4000 лк ёруғликда ўстирилади. Ажратиб олинган меристемалар ва уларни микрокўпайтириш ҳам ёруғликда ўтади. Ёруғ уйчани ёруғлиги 1000–10000 лк бўлиши керак ва ёруғликни кучи ўсимликни хусусиятларига боғлиқ. Ўстириладиган объектни фото даврини ҳам ҳисобга олиш керак.

Ўстириладиган хонада намлик 60-70% бўлиши керак. Ундан куруқроқ ҳаво озуқа муҳитини қуритиб юборади, агар пробирка пахтали тиқин билан беркитилган бўлса, озуқа моддаларини концентрацияси ўзгариб, ўстириш шароити бузилади.

Кўпчилик тўқималарни ўстириш учун мўътадил ҳарорат 25-26⁰С. Агар тропик ўсимликларни тўқималари бўлса 29-30⁰С да ўстирилади. Морфогенез индукция қилинганда ҳарорат 18-20⁰С гача туширилади. Одатда климатик камералардан фойдаланилади.

КАЛЛУС ТЎҚИМАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Умумий ҳолати

Ажратилган тўқималар культураси одатда каллусли ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированный) хужайралардан ташкил топган, тартибсиз

тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. **Каллус** - дегани қадоқ (қотиб қолган) деган маънони англатиб, *in vitro* шароитида алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо бўлиши мумкин.

In vitro шароитида каллус тўқима, асосан оқ ёки сарикроқ, жуда ҳам кам ҳолатларда оч-яшил рангда бўлади. Каллус хужайралар қариганда, тўқ қўнғир рангга кирадилар, бунга сабаб уларда фенол бирикмаларини тўпланиши билан боғлиқ. Вақт ўтиши билан феноллар оксидланиб, линонга айланадилар. Улардан қутулиш мақсадида озуқа муҳитига антиоксидантлар қўшилади.

Каллус тўқималар аморф бўлиб, маълум бир анатомик тузилишга эга эмаслар, аммо келиб – чиқиши ва ўстириш шароитига қараб ҳар хил консистенцияга (суюқ - қуюқ ва ҳ.к) эга бўладилар:

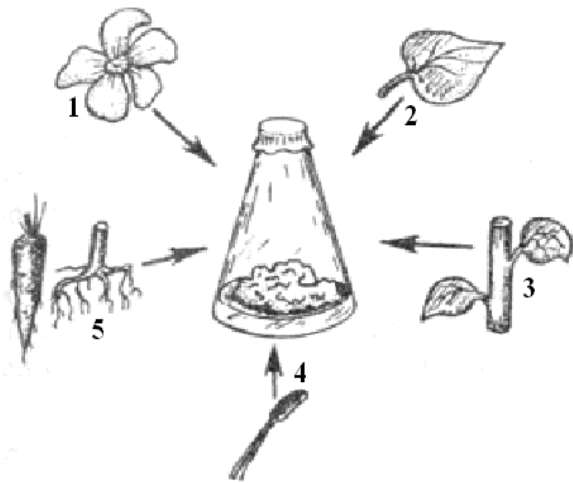
- **Биринчи** – уваланиб кетадиган, пўк ҳолатда кичик агрегатларга енгил майдаланиб кетадиган, кучли сувланган хужайралар;
- **Иккинчи** – ўрта зичли яхши намоён бўлиб турадиган меристемаали ўчоқлар;
- **Учинчи** – зич ҳолатда, унда камбий (ўсимлик псўтлоғи тагидаги бўлинувчан хужайралар) элементлари ва ўтказувчи тизим табақалашган (дифференциация) ҳолатда учрайди.

Ўсимлик хужайрасини табақасизланиши ва уни каллусга айланиши учун шарт бўлган шароит-бу озуқа муҳити таркибида икки фитогормонларни яъни ауксинлар ва цитокининларни бўлишидир. Ауксинлар хужайраларни табақасизланишини (дедифференциация) чақириб, уларни бўлинишга тайёрлайди, цитокининлар табақасизланган хужайраларни бўлинишига (трольифорция) олиб келади. Агар таркибида гормон сақламаган озуқа муҳитига поя, барг ёки илдизни бир қисмини тикиб қўйилса, хужайраларни бўлиниши амалга ошмайди ва каллус тўқима ҳосил бўлмайди. Бу табақалашган хужайраларни бўлинаолмаслиги билан боғлиқдир (3.1-расм).

Охирги босқични (фазани) характерли томони - хужайрани иккиламчи қобиғини қалинлашуви ва хужайрани бўлинишга бўлган қобилятини йўқотишидир. Дифференциацияга учраган хужайралар яна қайтадан бўлиниш қобилятига эга бўлиши учун, уларни дедифференциация бўлиши шарт, яъни хужайра худди меристемаа ҳолатига қайтиши керак. Табақаланган хужайраларни кўпайтириш тартибсиз, анархия шаклида ўсишга олиб келади ва оқибатда каллус тўқима ҳосил бўлади. Шундай қилиб, ихтисослашган хужайраларни каллус тўқималарга айланиши хужайра бўлинишини кучайтириш билан боғлиқ бўлиб, табақалаш жараёнида, хужайра бўлиниш қобилятини йўқотади.

Ҳар бир хужайранинг ўсиши уч босқичда ўтади:

- **бўлиниш;**
- **чўзилиш;**
- **табақаланиши (дифференцировка).**



**1-расм. Турли хил
эксплантлардан каллус
тўқимаси культураларини
олиш:**

- 1-гулбарг;
- 2-барг;
- 3-поянинг бир қисми;
- 4-гул чанги;
- 5-илдиз.

Озуқа муҳити таркибида цитокининларни бўлмаслиги тамаки ўсимлигини ўзак қатлами паренхимасида ҳужайра циклини тўсиб қўяди. Шунинг учун ҳам агар озуқа муҳити таркибида фақатгина ауксин бўлса, ҳужайра бўлинмайди ва тўрт кунлик даврдан кейин чўзилиб, ўсишга ўтади.

Ауксинларсиз, фақат цитокининларни ўзлари ҳам гормон сақламаган озуқа муҳитига ўхшаб, ўсимликни қаришига олиб келади. Тамаки ўсимлиги мисолида келтирилган далиллар бирга гормон сақлаган озуқа муҳитида каллусли тўқима ҳосил бўлишини барчасини тушунтира олмайди.

Бунга зид бўлган мисоллар ҳам бор. Масалан, буғдойни етилмаган куртакларида цитокининсиз 2,4-Д сақлаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ёки кунгабоқарни уруғ палласида цитокинин сақлаган, ауксин сақламаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ва ҳ.к. Кузатиладиган натижалар кўпроқ эндоген гормонларга, аниқроғи у ёки бу эксплантни ҳужайрасида сақланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статуси билан боғлиқ эканлиги исботланган.

Баъзи бир олимларни фикрларича, ҳужайрани бўлинишини ауксин ёки цитокинин эмас, балки полисахаридлар ва бошқа қандайдир индукторлар чақириши ва каллус ҳосил бўлишига олиб келиши мумкин.

Апексни асосий қисмида каллусли ўсишга ўтиш жараёни ҳужайра бўлинишини тўхташи билан бошланади. Лаг – фаза 24-28 соат давом этади. Бу давр мобайнида ҳужайра катталашиб, тўқималар шишади. Лаг фаза тугагандан кейин ҳужайра тез бўлиниб, каллус тўқима ҳосил қилади. Шундай қилиб, агар ихтисослашган ҳужайраларни дедифференциацияси, фитогормонлар таъсирида бўлинишни кучайиши (индукцияси) билан боғлиқ бўлса, бўлинадиган меристемаали ҳужайраларни дедифференциацияси бўлиниши тўхташи билан ҳужайрани ихтисосланиши ва фақатгина ундан кейин каллус ҳосил бўлишига олиб келувчи бўлинишни кучайиши билан боғлиқ.

Бир фитогормоннинг таъсир самараси, нишон тўқимани физиологик тавсифига қараб ҳар хил бўлиши мумкин.

Ҳужайрани *in vitro* шароитида дифференциацияланган ҳолатдан дидефференциалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол бўлинишга ўтиши, генларни фаоллигини ўзгариши билан бошланади (эпигеномли ўзгарувчанлик). Бир геннинг фаоллашуви ва иккинчисининг репрессияга учраши ҳужайрадаги

оксил таркибини ўзгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда ўзига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргнинг фотосинтез қилувчи ҳужайраларида оксиллар миқдори пасаяди. Икки паллали ўсимликларда дидефференциаллашган генларнинг репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон ўтади.

Дедифференциаллашган ҳужайраларни каллус тўқималар ҳосил бўлишига олиб келувчи тартибсиз кўпайишга ўтиши билан биокимёвий ва цитологик ўзгаришлар содир бўлади. Заҳирадаги моддаларни ишлатилиши ва ихтисослашган ҳужайра органеллаларини парчаланиши билан дедифференциалланиш бошланади. Дедифференциацияни индукциясидан 6-12 соат ўтгандан кейин ҳужайра қобиғи ғоваклашиб шишади, мустақил рибосомалар сони кўпайиб, Гольджи аппарати элементлари сони ҳам ошади. Бу ўзгаришлар бўлинишдан олдин бошланади.

Ўстиришга қўйишдан олдин, эксплантлар ҳужайрасининг метаболизмида ўзгаришлар содир бўлишини, у эса дедифференциация ёки травматик синтез билан боғлиқ бўлишини ҳисобга олиб қўйиш зарур. Бундай жараёнларни ажратиш мақсадида эксплантларни гормонлар сақламайдиган муҳитда 3-6 сутка давомида преинкубация қилиш тавсия этилади.

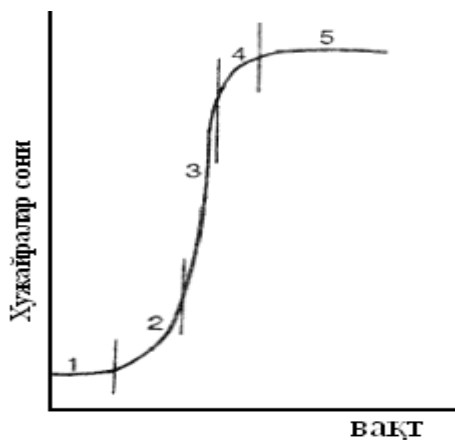
Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференциация ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференциацияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференциацияси билан аралаштириб юбормаслик керак.

Каллус ҳужайралари нобуд бўлиб қолмаслиги учун уларнинг бўлинишга бўлган қобилятларини йўқотмасликлари учун, эксплантларда пайдо бўлган бирламчи каллус, 4-6 ҳафтадан кейин янги тайёрланган озуқа муҳитига ўтказиб турилади. **Бу операцияни – пассирлаш деб аталади.** Ўз вақтида бу жараён ўтказиб турилса, каллус ҳужайралари ўн йиллаб ўз бўлиниш хусусиятини йўқотмаслиги мумкин.

Каллус ҳужайраларни ўсиш чизиғи 3.2-расмдан кўришиб турибдики, S-симон шаклга эга, ўсиши беш фаздан иборат:

- 1–латент ёки лаг-фаза - даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Ҳужайралар бу даврда бўлинишга тайёргарлик кўрадилар.*
- 2- логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси- энг кўп митотик фаоллик билан ва каллус культуранинг массасини ошиши ҳамда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан характерланади.*
- 3- тўғри чизиқли фаза - бунда ҳужайраларни ўсиш тезлиги доимийдир.*
- 4-ўсишни секинлашув фазаси бошланади - бу босқичда ҳужайрани митотик фаоллиги кескин пасаяди.*
- 5- ўсиш чизиғи (стационар) фазасида бир текис ҳолатга келади. Бу даврда ҳужайралар парчаланаяди, аммо ҳужайра сонини ошиши билан баробарлашади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кўтарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин ҳужайраларни*

деградацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларни сони ва массаси тобора камайиб бораверади.



2-расм. Каллус тўқималарини даврий ўстирганда ўсиш босқичининг эгри чизиғи.

Ўсиш босқичлари:

1-латент; 2-логарифмик; 3-чизикли; 4-секинлашиш; 5-стационар

Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги

In vitro шароитида каллусли ҳужайралар ўсимликлар организмидаги оддий ҳужайраларга хос бўлган кўплаб физиологик ва биокимёвий хусусиятларни сақлаб қолади. Улар, иккиламчи метаболитлар синтез қилиш қобилиятини йўқотмайдилар. Совуққа чидамлик хусусияти каллусли ҳужайраларда, ўсимликлардагидек қайтарилади. Бундай хусусият, тропик ёки субтропик ўсимликлардан олинган каллус тўқималарда бўлмайди. Каллусли тўқималарга фотодаврийлик реакцияси ҳам хос, бу фитохрон фаоллигини сақлаб қолинганлиги билан боғлиқдир.

Ўсимликларни нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори ҳароратга чидамлик, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлик ва ҳ.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарни нормал тўқималардан фарқли томонлари ҳам бор. Уларда специфик оксиллар пайдо бўлади ва умумий оксил миқдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қатнашадиган оксиллар камаяди ёки бутунлай йўқолади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузилганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли, каллусли ҳужайраларни ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда ўтади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал **Р.Гомре** томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа мухитига ўтказиб туриш ҳисобидан ҳозиргача яшаб келмоқда.

Очиқ тупроқда ўсувчи ўсимликга нисбатан, каллусли ҳужайраларни ҳужайра цикли узунроқдир.

Каллусли ҳужайранинг ўзига хос томонларидан яна бири-уларни ёшини ҳар хиллигидир (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш ҳужайралар (G- фазадаги), қари (G₂) ва S – фазалар иштирок этадилар.

Каллусли ҳужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал ҳужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар.

1938 йилда *Ромсторн* бундай хусусият меристемаатик хужайраларда ҳам борлигини кузатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган хужайралар учун хосдир. Каллус хужайраларни нафас олиш коэффиценти бирдан катта. Масалан нўхат каллус хужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

Бу нафас олиш билан бижғиш орасидаги нисбат, бижғишни кучайиш томонига сурилганлигини, яъни Пастер эффеқтини пасайишини кўрсатади.

Пастер эффеқти - деганда, бижғишининг кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.

Нафас олиш субстратлари ўзгармаган шароитда, нафас олиш коэффиценти кўпайиши, нафас олиш бижғишни тўхтата олмайганлигини ва ҳатто кислородли шароитда ҳам каллусли хужайраларда нафас олиш билан бир қаторда, углеводларни кислородсиз парчаланиши бижғиш жараёни содир бўлаётганлигидан хабар беради. Тартибсиз ўсишда углеводларни кислородсиз парчаланишига мисол қилиб, бўлинадиган хужайраларда этил спиртини тўпланишини кўрсатиш мумкин. Илмий адабиётларда бундай мисолларни кўплаб топса бўлади.

Каллус хужайраларни митохондриялари, меристема хужайраларга ўхшаб, жуда паст ривожланган, уларда кристаллар кам, бу эса аэроб нафас олишга таъсир кўрсатмасдан қолмайди. Пастер эффеқтини бузилиши кўпроқ ҳайвонларни шиш хужайраларида кузатилади. Бу ходиса *Варбург* томонидан аниқланган бўлсада ҳозиргача аниқ тушунтира олинганча йўқ. Пастер эффеқтини бузилиши оқибатида келиб чиқадиган анаэроб гликолиз (углеводларни кислородсиз парчаланиши), кислород иштирокида шишли хужайраларни углеводлар истеъмол қилишини кескин (19 мартабагача) ошириб юборади.

Каллусли хужайраларни нафас олиш характерини ўзгариши билан бир қаторда углеводларни кислородсиз парчаланишини кучайиши йўналишида, бўлинадиган хужайралар учун зарур бўлган пентозофосфат йўли томон силжиш намоён бўлади.

Каллус хужайралари генетикаси

Узоқ вақт каллусли хужайралар генетик бир хил деб ҳисоблаб келинар эди. Ўтган асрнинг 60-йилларида каллусли хужайралар генетик гетероген (кўпсонли) эканлиги аниқланди. Уларни бир хил эмаслиги энг аввало ҳар хил сонли хромосомалар сақлаши билан намоён бўлади. *In vitro* шароитида меристемаатик тўқималар генетик мўътадил бўладилар

Каллусли ва суспензион культураларда дастлабки ўсимликка хос бўлган қатор диплоид хромосомалар сақловчи хужайралар 3, 4, 5 ва ундан ҳам кўпроқ хромосомалар тўплами сақловчи полиплоидли хужайралар учрайдилар. Шулар қатори каллусли тўқималарда тез-тез анеуплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли тўқималарни қанчалик узоқ вақт ўстирилса, ўшанчалик улар плоидлиги билан фарқланадилар. Тамаки ўсимлигини каллусли тўқималарида тўрт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли хужайралар қолмайди. Барча хужайралар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб қоладилар. Бу эса

плоидликни ўзгариши хужайраларни ўстириш шароити таъсирида, энг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқача тушунтириш ҳам мумкин.

Полиплоид хужайралар қисқа лаг фазага эга бўлганлиги сабабли, уларни диплоид хужайраларга нисбатан бўлиниши тезроқ ўтади. Бунинг оқибатида, улар кейинги кўчириб ўтказиш жараёнларда устунликка эга бўлиб қоладилар. Ҳар ҳолда икки сабабни ҳам ўринли деб ҳисоблаш мумкин.

Плоидликни ўзгаришидан ташқари ўсимлик хужайра ва тўқималарини *in vitro* ўстирилиши, хужайрада хромосомали абберациялар ҳосил бўлишини чақиради. Бу эса ўстирилаётган тўқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (тўқималарни) ташқи кўриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги ўзгаради.

Ўстирилаётган хужайраларда, микроскоп остида кўринадиган хромосомали мутациялардан ташқари кўринмайдиган ўзгаришлар ҳам содир бўлиши мумкин. Бундай ўзгаришлар хромосомаларни бир қисмида ҳамда генларни тузилишида ҳам бўлиши мумкин. Генли мутациялар хужайраларни морфологияси ва физиологик-биокимёвий хоссаларини ўзгаришида намоён бўлади.

Ўстирилаётган хужайраларни генетик мўътадил эмаслиги сабаблари нималардан иборат? Бундай сабаблар бир нечта. Энг аввало – дастлабки материални генетик бир хил бўлмаганлиги (эксплантларни гетерогенлиги). Кўпчилик ўсимликларда табақалашган тўқималар, ҳар хил плоидли хужайраларга эга бўладилар ва фақатгина тўқимани онтогенези даврида фаол кўпаядилар, юқори меристемаалар, камбийлар ва бошқалар эса доимо диплоид ҳолатда қолади. Бошқа бир сабаб – бу тўқима ва хужайраларни узоқ муддат экилиши, ўз навбатида бундай шароитда улардаги генетик ўзгаришлар, жумладан, плоидликни бир хил бўлмаган ўзгариши содир бўлади.

Ўсимлик тўқималарини бир қисмини ажратиб олиб, уларни озуқа муҳитига ўтказишда бир бирига мос алоқаларни бузилиши ҳам хужайраларни генетик мўътадилликдан чиқишига олиб келади. Шунга ўхшаш натижалар озуқа муҳити таркибидаги фитогормонларни хужайранинг генетик аппаратида таъсири оқибатида намоён бўлиши мумкин. Каллус ҳосил бўлиши учун гормон сифатида албатта озуқа муҳити таркибида ауксинлар ва цитокининлар киритилади.

Бу моддаларни мутагенлик хусусияти эса кўпчилик олимлар томонидан исботланган. Энг кучли мутагенлик хусусияти эса кўпчилик озуқа муҳитлари таркибига кирувчи 2,4-Д препаратида кузатилган.

Цитокининлар хусусан кинетик хужайраларда полиплоидия содир бўлишига ёрдам берадилар.

Каллус хужайраларни генетик хилма-хиллиги, уларни ташқи муҳит таъсирига фитопатогенларга чидамли ҳамда серҳосил мутантлар олиш учун амалга ошириладиган селекцион ишларда фойдаланиш имкониятини яратади.

ГОРМОНЛАРГА БОҒЛИҚ БЎЛМАГАН ЎСИМЛИК ТЎҚИМАЛАРИ

Каллусли хужайралар фақат озуқа муҳити таркибида гормонлар бўлгандагина бўлинадилар. Аммо узоқ муддатда ўстирилганда, баъзан улар гормонсиз муҳитда ҳам ўсиш хусусиятига эга бўладилар, яъни ауксин ва цитиокнинларга нисбатан автоном бўлиб қоладилар. *Баъзан «мослашган» хужайралар томонидан яратилган тўқималарни кимёвий шишлар ҳам деб юритилади.* «Мослашган» тўқималар, шиш тўқималарига ўхшаб, кўп ҳолатларда нормал регенерация бўла олмайдилар ва фақат тератомлар ҳосил қиладилар. Илмий адабиётларда жуда кам бўлсада, улардан нормал регенерантлар ҳосил бўлганлиги ҳақида ахборотлар бор.

Шуни ҳам эслаб қолиш зарурки, барча каллусли тўқималарда, ўстириш жараёнида, баъзи бир культураларда 4-экишдан кейинроқ регенерация бўлган хусусият пасайиб боради, баъзи вақтларда эса умуман йўқолади. Қари кўчатларда регенерант – ўсимлик яратиш мумкин эмас.

Ҳозирча «мослашув» сабабларини аниқ жавоби йўқ. Балки, у хужайраларни табақасизланмайдиган ёки фаол пролиферация (хужайра ва тўқималарни кўпайиши йўли билан янгидан ҳосил бўлиши) ҳолатида ушлаб турувчи гормонларни хужайрага узоқ муддатда таъсир этиши билан боғлиқ бўлса керак, деган тахминлар бор.

«Мослашган» тўқималардан ташқари (кимёвий шишлар), бактериялар ва вируслар чақирадиган ўсимлик шишлари ҳамда ҳар хил ўсимликларда турлараро гибридларда пайдо бўладиган генетик шишлар ҳам маълум. Табиатда кенг тарқалган ва илмий изланувчиларда катта қизиқиш уйғотадиган шишлар – икки паллали ўсимликларда агробактериялар (*Agrobacterium tumefaciens*) томонидан чақириладиган шишлар ҳисобланади. Бундан ташқари ўсимликларда яна иккита ҳақиқий шишлар:- попук илдиз (*Agrobacterium rhizogenes* чақирадиган касаллик) ва пояли галл (*A.rubi* чақиради) учрайди.

Ўсимликларни «мослашган» ва шиш тўқималарини умумий хусусияти уларни гормонга эҳтиёжсизлигидир, бошқача айтганда ҳар иккала тўқима ҳам гормон сақламаган муҳитда ўса оладилар. Бу хусусият уларнинг каллусли тўқималардан фарқли томонидир. Маълумки, каллусли тўқималарни табақалашмаганлиги ва пролиферацияси учун озуқа муҳити таркибида гормон сақлаши шарт.

«Мослашган» тўқималарда худди шиш тўқималарга ўхшаб, ўз гормонлари синтез бўлади, шунинг учун ҳам улар гормонга муҳтожлик сезмайдилар. Гормонга тобе бўлмаган тўқималар ташқи кўринишидан каллусли тўқималардан фарқ қилмайдилар, уларни ягона фарқи гормон синтез қилиши билан намоён бўлади. Бу хусусияти “мослашган” шиш хусусияти учун умумий бўлсада, уларда бу вазифани ечиш йўли ҳар хилдир. «Мослашган» тўқималарда гормонга тобе бўлмаслик, гормонларни синтез қилишда иштирок этувчи ферментлар молекуласи синтезига жавобгар бўлган генларни фаоллигини ўзгариши натижасида содир бўлади. Шундай қилиб, ушбу ҳолатда ўзгариш эпигеномли характерга эга бўлсада, мутация имкониятларини ҳам эътибордан ташқарида қолдирмаслик керак.

«Мослашган» хужайраларда ўзгариш эпигеномли ёки генотипик асосга эга эканлигини аниқлаш учун хужайра-ўсимлик-хужайра қаторида гормонга муҳтож бўлмаслик хусусияти сақланиб қолиши ёки қолмаслигини назорат қилиш керак. Бунинг учун «мослашган» тўқимада регенерант олиниб, кейин регенерация қилинган ўсимликдан олинган эксплант бутунлай гормонсиз ёки гормонларни бирортаси бўлмаган муҳитда хужайра бўлинса, яъни гормондан автоном бўлса, гормонга муҳтожсизлик хусусияти авлоддан-авлодга ўтади, демак у генетик асосга эга деб айтиш мумкин.

Агар гормонсиз муҳитда хужайра бўлинмаса ва каллусли тўқима пайдо бўлмаса, яъни гормонга муҳтожсизлик наслдан-наслга ўтмаса, ўзгаришни эпигеномли характерга эгаллиги ҳақида хулоса чиқариш мумкин. Аммо, бу йўл билан фақатгина регенерация хусусиятини йўқотган «мослашган» хужайраларни текшириш мумкин, холос. Маълумки, кўпчилик «мослашган» хужайралар регенерацияга бўлган имкониятларини йўқотадилар, бу эса юқоридаги усулни гормонга муҳтожсизликни табиатини аниқлашни қийинлаштиради.

Шиш тўқималарда гормонларни синтези – ўсимлик ўтказилиши билан боғлиқ. Ўтган асрни 40-йилларида **Ф.Уайт**нинг ўқувчиси, **Браун** корончатогалли шиш тўқима культураси агробактерия йўқлигида (уларни юқори ҳароратда ўлдирилгандан кейин ҳам) ҳам шишлик хусусиятини сақлаб қолишини кузатган эди.

Гормон сақламаган сунъий озуқа муҳитида, бактерия сақламаган корончатли галл тўқимаси фаол пролиферацияни давом эттираолган. Бу тўқималар, оддий тўқимага қараганда юқори миқдорда ауксинлар ва бир неча цитокининлар сақлайдилар. Ўзи ўтказган тажрибалар асосида **Браун**, ўсимлик хужайралари *Agrobacterium tumefaciens* таъсиридан кейин қандайдир йўл билан шиш хужайраларга айланадилар - деган фикрга келган эди.

Агробактериялар ўсимлик хужайрасига **Tip** (*Tumor inducing principle*) киритади, у эса 36 соатда оддий хужайрани шиш хужайрага айлантиради деб тахмин қилинган эди. Кейинчалик **Tip** ДНК эканлиги ва агробактерияларни катта плазмидасида сақланиши аниқланди ва **Ti** - плазмида деб аталди. Онкоген фаоллик бактерия хужайрасидан **Ti**- плазмидани бутунлай ёки уни маълум бир қисмини ажратиб олинганда йўқолиши исботланган.

1977 йилда **Чилтон** ўзини шогирдлари билан корончатли галлни шишлари агробактерияларни **Ti**- плазмидасини маълум қисмини ўсимликни ядро ДНК сига киритиш натижасида пайдо бўлишини исботладилар.

Шундай қилиб, **Ti**- плазмидани сигменти (т-ДНК) хромосомага интеграция қилинади ва ўсимликни трансформацияланган (шиш) хужайрасини ирсий апаратини бир қисми бўлиб хизмат қилади. Агробактерияларни **Ti**-плазмидани т-ДНКсини ўсимликлар хромосомасига интергарцияси шиш пайдо бўлишига ва шиш хужайрасини сунъий озуқа муҳитида гормонга муҳтожиз равишда ўсишга олиб келади. Бу ҳар икки ҳодиса бир бири билан ўзаро узвий боғлиқ, чунки ауксин ва цитокининларни синтезини назорат қилиб турувчи генларни экспрессияси оқибатида гормонга муҳтожсизлик келиб чиқади ва у хужайраларни табақасизланишига ва пролиферациясига олиб келади.

Ti- плазмада ўсимликлардаги янги генларни табиий вектори (ташувчиси) бўлиб хизмат қилади. Агробактериялар томонидан индукция қилинган шиш хужайралар томонидан ауксин ва цитокининларни синтез бўлиш йўли, нормал ва «мослашган» хужайраларникига қараганда бошқачароқ. У оддийроқ ва қисқа. Мутагенлар ёрдамида т-ДНК молекуласида гормонал фаолликни ўзгаришини назорат қилиб турувчи қисмни (участкани) аниқлаш мумкин бўлди. Шишни ўсиши учун битта локус эмас, балки бир қатор генлар жавобгар эканлиги аниқланди.

т-ДНК ауксин ва цитокининлардан ташқари табиатда учрамайдиган янги синф аминокислоталар галли (опинлар) синтезини детерминация қилиши аниқланди. Бу моддалар шиш пайдо бўлишига сабаб бўлаолмайдилар, балки, улар ҳосил бўлган шиш тўқималарида синтез бўладилар. Шиш тўқималар бир неча кунлик бўлганларидан кейингина опинлар синтезини бошлайдилар, масалан, коланхоэда опинлар синтези, шиш индукцияси бошланган кундан 7-кунда бошланади.

Опинлар - аминокислоталар, ҳар хил кетокислоталар ва шакарларни ҳосилаларидир. Улар янги типдаги биологик фаол моддалар ҳисобланади ва фақатгина ўсимликларни корончатли галли тўқималарида учрайдилар, шунинг учун ҳам уларни корончатли галларни биокимёвий маркёри сифатида қараш мумкин. Опинлар агробактериялар учун озуқа модда ҳисобланадилар, аммо шиш тўқималар опинлар стерил шароитда агробактериялар бўлмаган шароитда ҳам синтез қилаверадилар.

Опинларни уч типни маълум: нопалин, актопин ва агропин. Агробактерияларни бир штамми октопин синтез қилувчи шишларни индукция қилса, бошқа штамми нопалин синтез қилувчисини индукция қилади.

Шундай қилиб, агробактериялар ёрдамида индукция бўлувчи «мослашган» ва шиш тўқималарни **биринчи умумий хусусияти**, гормон синтез қилиш билан боғлиқ бўлган гормонга муҳтожсизликдир. Галли шишларда бундай қобилият ўсимликларга бактерияларни бегона генларини киритилиши оқибатида келиб чиқади. Кимёвий (мослашган) шишлар хужайраларида бу хусусият гормонлар синтези учун жавобгар генларни депрессияси билан боғлиқ бўлса керак деб тахмин қилинади, аммо у мутация билан алоқадор бўлиши ҳам мумкин.

Иккинчи умумий хусусият, биринчисидан келиб чиқиб, агробактериялар билан индукция қилинган «мослашган» ва шиш хужайраларни фертил ўсимликни регенерация қилиш қобилиятини йўқотишидир. Галли шишлар кўпчилик ҳолатларда соғлом ўсимлик ҳосил қилаолмайдилар. Баъзида улар тератомлар (хунук, органларга ўхшаган тузилмалар) ҳосил қиладилар ва улар нормал ривожлана олмайдилар.

«Мослашган» тўқималар ҳам одатда нормал ўсимликга айланаолмайдилар, уларни хужайралари иккиламчи дифференциацияга ва морфогенезга бўлган қобилиятларини йўқотадилар. Аммо, баъзида, озуқа муҳити таркибини ўзгартириш орқали, «мослашув» чегарасини орқага суриш мумкин. Демак, узоқроқ пассаж қилинган культуралар тўқималаридан ҳам регенерация қилаоладиган ўсимлик олиш имкониятлари ҳам йўқ эмас.

ХУЖАЙРА СУСПЕНЗИЯЛАРИ КУЛЬТУРАСИ

Каллусни сувоқ озуқа муҳитига ўтказиб, автоматик равишда аралаштириш орқали ҳужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида, масалан, пектиназа ферменти ёрдамида тўғридан-тўғри эксплант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва ҳ.к) ҳам ҳужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, эксплант юзасида каллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан ҳужайра ва ҳужайра агрегатлари ажралади, оқибатда ҳужайра суспензияси олинади. 100 мл ҳужайра суспензияси олиш учун 2-3 г каллусли тўқима керак бўлади.

Ҳужайра суспензиясини тайёрлаш учун энг зарур шароит – бу доимий равишда аралаштириб ёки чайқатиб туришдир. Агар ҳужайра суспензияси қимирламай турса, ундан бўлиниш натижасида каллусли тўқималар ҳосил бўлади.

Суспензион ҳужайраларни бўлиниши ауксинлар ва цитокининлар, яъни каллус ҳужайраларни ўсиши ва индукцияси учун зарур бўлган гормонлар ёрдамида ҳимоя қилиб турилади. Шундай қилиб, суспензияли ҳужайралар каллус ҳужайраларни ўзгинаси бўлиб, уларда бундай ҳужайраларга хос бўлган барча хусусиятлар намоён бўлади.

Суспензия 2,4-Д сақлаган муҳитда ҳосил бўладиган пўкак ҳужайрадан яхшироқ ҳосил бўлади. Муҳит таркибидан кальций олиб ташланса, суспензия ҳосил бўлиши енгиллашади. Озуқага пектиназа ферменти аралаштирилса (бу фермент озуқа таркибидаги алоҳида ҳужайраларни бир-бирига боғлаб турувчи пекрат кальцийни парчалайди) суспензия янада енгилроқ ҳосил бўлади.

Биотехнологияда ҳужайра суспензиясидан иккиламчи метаболитлар олиш мақсадида фойдаланилади. Иккиламчи метаболитларни кўпчилиги доривор моддалар ҳисобланадилар ва ҳужайра биомассасини саноат миқёсида кўпайтириш ва ҳужайра селекциясида кенг ишлатилади. Бундан ташқари ҳужайра суспензиясидан алоҳида протопластлар олиш учун ҳам фойдаланилади.

Суспензион культуралардан иккиламчи метаболитлар продуценти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки оқова усулида очик ёки ёпиқ тизимда ҳужайраларни кўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпиқ тизимда ҳужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити киритилмайди, тизимда доимий режимда ўстирилганда эса озуқа муҳити тозасига алмаштириб турилади.

Даврий режимда ҳам, оқова режимда ҳам очик тизимда, ўстирилганда ҳужайралар озуқа муҳитида, уни (озуқа муҳитини) алмаштирилганда ҳам қолади. Аммо, очик тизимда ўстирилганда, озуқа муҳити алмаштирилганда (домий ёки даврий режимда) суспензион ҳужайрани бир қисми муҳит билан бирга ўтади.

Суспензион ҳужайралар билан ишлаганда уларни характеристикасини билиш шарт: тириклиги, ҳужайраларни суспензион культурада кўп ёки камлиги, агрегация даражаси, ўсиш тезлиги ва ҳ.к.

Ҳужайраларни тирик ёки тирик эмаслиги уларни бўяш (метилен ёки Эванс кўки) орқали аниқланади. Тирик ҳужайралар, ҳужайра мембранаси бўёқни ўтказмаслиги сабабли бўялмайди. Ўлик ҳужайра қобиғидан бўёқ тез ўтади ва шунинг учун ҳам кўк рангга бўялади. Ҳужайра суспензиясини асосий

кўрсаткичларидан бири, хужайра популяциясини калинлигидир. Хужайра сони Фукс–Розентал ҳисоб камерасида микроскоп остида мацерациядан кейин (хужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация қилувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли эритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, хужайраларни бириктириб турувчи ўртадаги пластинкани эритиб (гидролиз қилиб) юборади.

Яхши ривожланувчи суспензия, каллусли культурага ўхшаб, S- симон ўсиш чизиғига эга. Одатда, пассажни давомийлиги 14-16 кундан иборат. Бунда суспензиянинг қалинлиги 1 мл да 5×10^4 дан 5×10^6 хужайрагача ошади. Хужайра сонини кўпайиши, уларни қуруқ ва ҳўл массаси- суспензион культурани асосий ўсиш критериясини ташкил этади.

Суспензияни сифати, хужайраларни агрегация даражасига боғлиқ. Агрегатлар 10-12 хужайрадан кўп бўлмаслиги керак. Шунинг учун ҳам йирикроқ агрегатлардан қутулиш мақсадида суспензияни дока, найлон ёки метал филтрдан ўтказилади. Бу операция бир вақтни ўзида эксплантлар қолдиғидан ёки каллус тўқималарни бўлакчаларидан қутулиш имконини беради.

Иккиламчи синтез маҳсулотларини саноат шароитида олиш учун катта ҳажмдаги (20 м^3 ва ундан ҳам каттароқ) ферментёрлардан фойдаланилади ва хужайралар доимий режимда ўстирилади. Суюқликда ўстиришни энг кўп тарқалган режими хужайра суспензиясини ёпиқ даврий тизимда ўстиришдир. Суспензияни аэрацияси ва аралаштирилиши учун (качалка) тебраткичлардан фойдаланилади. Шунингдек, бу мақсадда механик ёки магнит аралаштиргич ўрнатилган ферментёрлардан, ёки барбатация (ҳаво ёрдамида аралаштириб туриш) дан ҳам фойдаланса бўлади.

Хужайра суспензиясида қимматбаҳо иккиламчи метаболитлардан ташқари янги ажойиб бирикмалар: компототецин, хиррингтонин каби антиканцерогенлар, ҳар хил пептидлар (протеаза ферменти ингибитори, фитовируслар ингибиторлари) ва бошқа бирикмалар синтез бўлиши ҳам кузатилган.

Шуни алоҳида таъкидлаш лозимки, хужайраларни бўлиниши оқибатида хужайра биомассасини кўпайиши ва иккиламчи метаболитларни синтез бўлиши ҳар хил вақтга тўғри келади. Иккиламчи метаболитлар синтез бўлишини максимуми, ўсишни стационар фазасига тўғри келади.

ЯГОНА ҲУЖАЙРАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Генетик ва физиологик изланишлар ҳамда хужайра селекцияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида хужайралар жуда катта аҳамият касб этади. Клоннинг олиниши ҳамда ягона хужайра авлодини олиниши каллусли хужайраларни генетик бир хил эмаслигини сабабларини аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген эксплант олинган тўқималарда эмас, балки алоҳида олинган хужайраларда олиб борилади.

Пропластлардан ажратилган алоҳида (ягона) гибрид хужайра кейинги бўлинишларида гибрид хужайрадан ташкил топган клон яратиш имконини беради. Бу эса изланувчиларни ишларини енгиллаштиради, чунки ажратилган

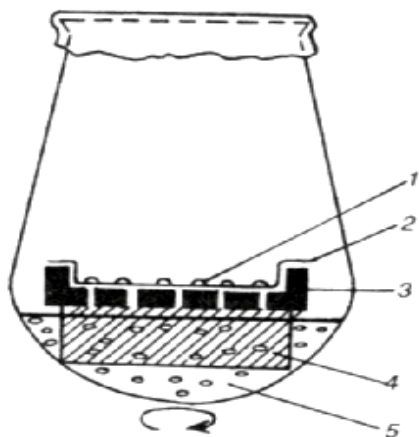
протопласт культураларда гибрид бўлмаган ҳужайралардан пайдо бўладиган янги ҳужайраларни алоҳида ажратиш каби машаққатли ишдан озод қилади. Бундан ташқари алоҳида ажратиб олинган ҳужайраларни протопластларини ўрганилганда соматик гибридизация жараёнининг ўзини кузатиш ҳам яхшироқ бўлади. Алоҳида (ягона) ҳужайралар ҳужайра суспензияларидан, ўсимлик тўқималаридан, масалан барг мезофиллидан уни ферментлар ёрдамида мацерация қилингандан кейин, алоҳида ажратиб олинган протопластлардан уларда ҳужайра қобиғи пайдо бўлганидан кейин ажратиб олинади.

Бир ҳужайрали фракция олиш учун баъзида суспензион культуранинг колбада 15-30 мин. тиндириб қўйиш кифоя бўлади. Бунда йирик агрегатлар чўкмага тушадилар, устки суюқликда эса фақат бир ҳужайрали культура ёки кичик агрегатлар бўладилар. Агар бу йўл билан бир ҳужайрали фракция олиш имконияти бўлмаса, ферментёр ёрдамида мацерация қилиш, сахароза градиентида центрифуга қилиш ёки ҳар хил элактранлардан ўтказиш усулларидан фойдаланилади.

Ягона ҳужайраларни ўстиришда бироз қийинчиликлар сезилади, чунки алоҳида ҳужайра каллусли тўқима ўсган шароитда яхши бўлинмайди. Ягона ҳужайраларни бўлинишига мажбур қиладиган махсус усуллар яратилган. 1960 йилда Джонсон «энага» усулини тадбиқ қилган эди. Бу усулда «энага» функциясини бир қисм каллусли тўқима бажаради ва у алоҳида ҳужайрани бўлинишига мажбур қилади ва уни алоҳида ҳужайрадан филтёр қоғози ёрдамида ажратиб олинади. Бундай шароитда («энага» ҳузурида) алоҳида ҳужайра бўлиниб, ҳужайрани индивидуал колонияси – **клон** ҳосил қилади.

Бошқа бир усул жуда кам миқдорда бой озуқа муҳитида алоҳида ҳужайраларни Купрак ликобчасида (уни ҳажми 20 мкл) микротомчида ўстиришга асосланган. Бу метод академик Ю.Ю.Глейба томонидан таклиф қилинган. Микротомчида соматик гибридизация жараёнида ягона ҳужайрани олиниши ва уни бўлинишини кузатиш жуда ҳам қулай.

Ягона ҳужайраларни бўлинишини кучайтириш учун «озиклайдиган қават»дан фойдаланиш мумкин. («Озикланадиган қават»- ягона ҳужайра олинган ўсимлик турини фаол бўлинувчи ҳужайра суспензияси) (3.3-расм.).



3-расм. Маккажўхорининг ягона ҳужайралари ва ажратилган протопластларини ўстиришда «энага» сифатида суспензион ҳужайралар культурасини ишлатилиши:

- 1—ҳужайра колониялари;
- 2—филтёр қоғоз;
- 3—алюмин элак;
- 4—пенополиуретан;
- 5—ҳужайра суспензияси

(Бу Дык Куанг, З.Б. Шамина, 1985).

Ҳужайрани бўлинишини муҳитни кондиция (меъёрига етказиш) ҳам тезлатади, бунинг учун унга (муҳитга) тез бўлинадиган ҳужайра культураси учун танланган озуқа муҳити қўшилади. Муҳитни меъёрига етказувчи фактор ҳужайра суспензиясининг ўсиш даврининг экспоненциал фазасида бактериал филтрдан ўтказиш орқали олинади. Моҳияти бўйича юқорида зикр этилган барча усуллар ҳам бўлинадиган ҳужайралардан ажраладиган меъёрига етказувчи фактордан фойдаланишга асосланган.

Ҳозирча бу факторни таъсир механизми ва уни кимёвий табиати аниқ эмас. Аммо, бу фактор иссиққа чидамли, сувда эрувчан, паст молекулали модда, ҳамда уни фитогормонлар билан алмаштириб бўлмаслигини айтиш мумкин. Шунингдек, бу модда тахминан 700 Дальтон молекуляр оғирлигига эга бўлган, рН 4-11 да мўътадил модда эканлиги ҳам аниқланган (Bellincampi, Morpurgo, 1987). Шундай қилиб, бу модда тоза кимёвий модда бўлмасдан, ҳужайрадан ажраладиган факторлар йиғиндиси бўлса ҳам ажаб эмас.

КАЛЛУСЛИ ТЎҚИМАЛАРДА МОРФОГЕНЕЗ

Ҳужайранинг ривожланишини табақасизлангандан кейин ўтадиган бир неча йўли маълум.

Биринчи йўл – бу бутун ўсимликни қайта регенерацияси, балким, ҳужайра, тўқима, органлар даражасида табақаланиш.

Иккинчи йўл - ҳужайрани қайта табақаланиш хусусиятини йўқолиши ва ўсимликни регенерацияси, мустаҳкам табақасизланиш, гормонсиз муҳитда ўсиш хусусияти, яъни шишига айланиш. Бундай хоссалар эски (қари) кўчат культураларга хос.

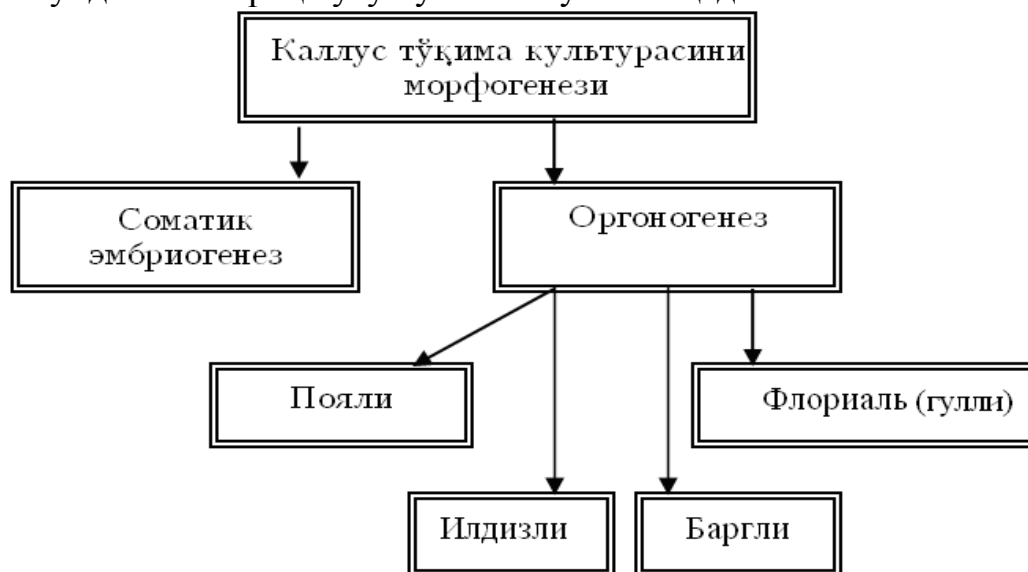
Учинчи йўл – каллусли ҳужайрани ривожланишини қариб, нобуд бўлиши билан тугайдиган нормал цикли. Бу ҳолатда ҳужайра иккиламчи табақаланишга учрайди ва бўлинишдан тўхтайдиган (ўсишни стационар фазаси). Аммо бундай табақаланиш морфогенезга олиб келмайди ва унда қариган каллус ҳужайралари хоссаларини мустаҳкамлайди.

Қишлоқ хўжалиги биотехнологияси учун энг қизиқарлиси бутун ўсимликни алоҳида ҳужайрасидан олинган тўқима культурасини регенерацияси ҳисобланади. Баъзида бу йўл алоҳида органлар ҳосил бўлиш орқали ўтади.

Каллусли тўқималар культурасида морфогенез деб ҳужайраларни ташкил бўлмаган массасидан тўлақонли структуралар ҳосил бўлишига айтилади. Морфогенезни икки асосий йўли маълум (3.4 -расм).

Тўқималар культурасини у органогенез сифатида (монополяр тузилишини, яъни алоҳида органларни ҳосил бўлиши) кўриш мумкин: илдиз, поя, камроқ флорал (гулли) ёки баргли ҳамда соматик эмбриогенез, кўринишида (соматик ҳужайралардан бифтоляр куртаксимон тузилмалар ҳолатида) кўриниши мумкин. Органогенезда дастлаб алоҳида органлар регенерация бўлади, кейин эса улардан бутун ўсимлик пайдо бўлади. Илдиз органогенези бундан мустасно.

Соматик эмбриогенез натижасида органогенездан фаркли ўлароқ, илдиз меристемааси ҳамда тепа қават меристемааларига эга бўлган куртак ҳосил бўлади ва ундан кейинроқ бутун ўсимлик ўсиб чиқади.



4 –расм. Каллус тўқима культурасини морфогенез типлари

Алоҳида олинган соматик ҳужайраларни ўз ривожланиш дастурини тўлиқ бажара олиши ва бутун ўсимлик организми ўсиб чиқиши учун асос яратиб бериш хусусияти, ўсимлик ҳужайрасини **тотипотентлиги** деб аталади. Ўсимликни ҳар қандай ҳужайраси бир хил потенциал имкониятларга эга, чунки барча керакли генлар тўпламига эга, демак, ҳужайра зиготага хос бўлган ривожланиш дастурига эга. Шунинг учун ҳам агар гул барги ҳужайрасидан ёки пояни ўзаксимон паренхима ёки ҳар қандай ҳужайра тўқималардан каллус олинганда умуман ҳужайрани ҳар қандай тўқимасидан бутун ўсимлик олиш мумкин. Аммо, тотипотентлик хоссалари ҳамма вақт ҳам намоён бўлавермайди, чунки ҳар хил типдаги ҳужайраларни потенциал имкониятлари бир хил намоён бўлавермайди. Улардан баъзи бирларида генлар кучли репрессия ҳолатида бўладилар ва шу сабабли ҳам тотипотентликни намоён бўлиши чегараланган бўлади.

Ўсимлик ҳужайраларида тотипотентлик ғояси биринчилардан бўлиб, 1902 йилда Г.Хаберлант томонидан илгари сурилган бўлсада, тажрибалар билан исботланган эмас эди. «Ўсимликни ҳар қандай ҳужайраси янги организм пайдо бўлишига асос бўла олади, фақатгина ўсимлик организми ҳужайрани ривожланиш потенциалсини босиб қўйган ҳолатдагина бундай бўлмаслиги мумкин» -деган эди Хаберлант. Ўсимликдан ҳужайрани алоҳида ажратиб олиш мана шу потенциалларни намоён бўлишига ёрдам беради.

Морфогенезни ҳужайра асосини цитодифференцировка ташкил қилади. Ўсимликни регенерацияси ҳужайрани иккиламчи табақаланишидан бошланади. Бунда, табақасизланган ҳужайра бошқатдан ихтисослашган ҳужайрани структураси ва функциясини эгаллайди.

Каллусли ҳужайраларни иккиламчи дифференцировкаси ҳар доим ҳам ўсимликни регенерацияси ва морфогенез билан тугалланавермайди. Баъзида у

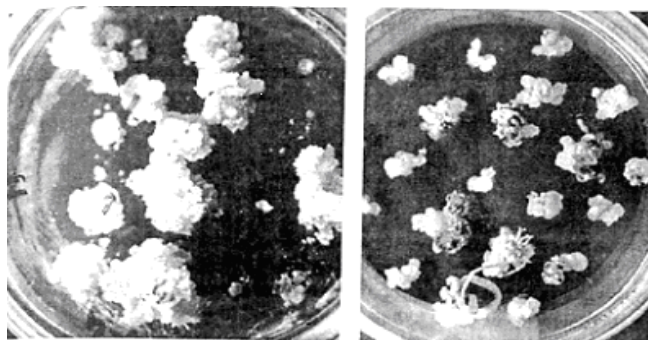
фақат тўқима ҳосил бўлишига олиб келади, холос (гистодифференция). Шу йўл билан каллусли хужайра флоэмли ёки ксилемли элементларга айланиши мумкин. Иккиламчи табақаланишга бошқа бир мисол бўлиб, табақасизланган фаол проферация қиладиган хужайрани – эски (қари) бўлинмайдиган каллусли хужайрага айланиб қолиши хизмат қилиш мумкин (ривожланишни стационар фазаси).

Барча кўринишдаги иккиламчи табақаланишдан энг катта қизиқиш уйғотадигани, бу морфогенездир, чунки у каллусли хужайрадан бутун ўсимлик яратиш имконини беради.

Табақаланиш ва морфогенезни асосида ҳар хил генларни бирин-кетин кўшилиши ётади, яъни хужайрани табақаланиши генларни табақалашган фаоллиги билан аниқланади. Структура генларини фаоллигини ўзгариши уларни дерепрессияси (уйғониши), репрессияси ёки амплификацияси (кўпайиши) билан боғлиқ. Бу жараёнда фитогормонлар катта роль ўйнайдилар. Каллусли тўқималарни морфогенезини бошқариш мумкин. Ўсимликларни алоҳида ажратиб олинган хужайраларини морфогенезга бўлган қобилятларига ҳам ички, ҳам ташқи факторлар таъсир кўрсатадилар.

Ички факторларга дастлабки ўсимликни қайси турга мансублиги, эксплант олинган орган, эксплантнинг ёши киради.

Ташқи факторларга эса, энг аввало озуқа муҳити таркиби, ҳарорат, ёруғлик (уни интенсивлиги ва фотодаврнинг узунлиги) киради. Морфогенезни энг кучли индуктори – озуқа муҳити таркибига кирувчи цитокинин ва ауксинларнинг ўзгариши ҳисобланади. ***Буни стимул ёки морфогенезнинг сигнали деб ҳам юритилади.*** Ауксинга нисбатан цитокининлар миқдори кўпроқ бўлганда, поя органогенези бошланади, тескари бўлганда эса (ауксин цитокининга нисбатан кўпроқ бўлганда) илдиз яхшироқ ривожланади (5-расм).



А

Б



В

5 расм.

Каллус тўқимаси морфогенетик реакцияси:

- А – пролиферация қилувчи каллус;
- Б – адвентив куртаклар;
- В - илдиз (ризогенез) ҳосил бўлиши.

Шуни ҳам алоҳида таъкидлаш лозимки, каллусли тўқималар культурасидан ҳосил бўлган илдиздан ҳеч қачон бутун ўсимлик ҳосил бўлмайди, пояли органогенезда эса дастлаб новда ҳосил бўлади ва уни кўпроқ ауксин сақлаган озуқа муҳитларига кўчириб ўтказилгандан кейин, ўзидан илдиз чиқаради ва бутун ўсимлик ҳосил қилади.

Ф.Скуг ва Е.Миллер, 1957 йилда ауксин ва цитокинин типдаги фитогормонларни балансидаги фарқ, бир томондан хужайрани табақасизланган ва ташкил бўлмаган прольиферацияга, иккинчи томондан эса, у ёки бу типдаги морфогенезни иккиламчи табақаланишини кучайишига олиб келишини таъкидлаб ўтган эдилар. Демак, ауксинлар ва цитокининлар, уларни бир-бирларига нисбатига қараб, ёки табақасизланиши ва каллусли ривожланишга ўтиш ёки табақаланиш ва каллусли тўқималар морфогенезини чақиритиши нафақат ўсишни бошқариш балки дифференцировка бошқаришга олиб келади. Шундай қилиб, озуқа муҳити таркибида:

Ауксин > цитокинин = илдиз → каллусли тўқима

Цитокинин > ауксин = поя → новда → илдиз → ўсимлик

Агар органогенезни ауксин ёки цитокининлар ёрдамида кучайтириш мумкин бўлса, соматик эмбриогенез- экзоген фитогормонларга умуман боғлиқ эмас. Одатда эмбриоген зоналар каллусли тўқималарда, каллус ҳосил қилиш учун ишлатилган озуқа муҳитида пайдо бўлади. Каллусли тўқималарда соматик куртакларни ривожланиши, озуқа муҳитидан табақасизлантирувчи фактор (2,4-Д ёки бошқа ауксинлар) олиб ташлангандагина бошланади. Ўсаётган куртак экзоген гормонларга муҳтожлик сезмайди, чунки уни ўзи гормон синтез қилиш имкониятига эга ва ўзини-ўзи гормон билан таъминлай олади.

Соматик эмбриогенезни гормонга муҳтожсизлиги, Хаберландт фикрига, кейинроқ эса Стэвард томонидан илгари сурилган «хужайрани ажратиш жараёнини ўзи, улардаги тотипотентликни намоён бўлишини кучайтиради, яъни морфогенезга ўткази» деган фикрига аргумент бўлиб хизмат қилади.

Шундай қилиб, морфогенез учун асосий стимул бўлиб, озиқа муҳит таркибидаги гормонларни бир-бирига нисбати ва ўсимлик хужайрасини организмдан ажратиб олиш хизмат қилади. Каллусли тўқималар культураси морфогенезида кўшимча стимул бўлиб, озуқа муҳити таркибига кўшилган кумуш нитрат, аммоний нитрат, баъзи-бир аминокислоталар (пронин, тирозин, баъзида серин), полиаминлар (путресцин ва спермидин) хизмат қиладилар.

Баъзи бир ҳолатларда морфогенез жараёнини манний ва сорбий ҳам кучайтиради. NO₃ ионлари каллус тўқималарда ҳосил бўлган тартибли структураларни ривожланишига таъсир кўрсатади, уларни индукциясини эса NH₄ иони кучайтиради. Гибберил кислотаси пояни ўсишини кучайтирса, абсциз кислотаси соматик куртакларни дифференциясини кучайтиради.

Шуниси қизиқарлики, юқорида келтирилган моддалардан баъзилари, масалан кумуш нитрати эски кўчатларни регенерация хусусиятини узайтиради.

Морфогенезни кучайтирувчи у ёки бу таъсир оқибатида каллусли хужайра детерминланган ҳолатига ўтиши керак бўлсада, уларни 400-1000 дан биттаси

регенерация йўлига ўтадилар холос. Демак, морфогенезга ўтиш учун индукторни бўлиши етарли эмас, балки хужайра унга жавоб беришга тайёр бўлиши керак. Морфогенезни стимулини қабул қилиш қобилияти **хужайрани компетентлиги** деб аталади. Олимларни фикрича хужайрани компетентлиги тасаддуф воқеялик, шунинг учун ҳам жуда кам учрайди. Шу муносабати билан ўзини компетентсизлиги туфайли морфогенез стимулини қабул қолаолмайдиган каллусли хужайралар хаёти тўғрисида савол туғилиши муқаррар.

Кўчатларда бу хужайралар бўлинишда давом этади ва кўпроқ гормонга муҳтожсизлик йўлига ўтиб олади. Аммо, каллус тўқималарни ҳаммаси ҳам ўзини ривожланишини гормонга муҳтожсизлик билан тугатмайди.

Морфогенезни янги маркерларини излаб топиш ишлари давом этмоқда. Меристемаатик ўчоқ хужайралари ва эмбрионидли структуралар ҳосил бўлишига бош бўладиган хужайралар каллусли хужайралардан РНК ва ДНК синтезини кучлиги билан фарқ қилади. Бу эса оксил алмашинувини ўзига хослиги билан боғлиқ. Оксил алмашинувини ўзгариши, табақасизланган хужайраларда ўтадиган жараёнларга ўхшаш бўлсада, уларни ниҳояси ҳар хил. Р.Г.Бутенконинг фикрича, реакцияни спецификаси (ўзига хослиги), макромолекулаларни синтезини умуман кучайиши билан эмас (бу пролиферацияни кучайтириш учун зарур), балки мана шу умумий фонда содир бўлаётган ноёб синтезлар ва бошқарувчи типга эга бўлган оксилларни пайдо бўлишини шарт қилиб қўйиши билан боғлиқ.

Каллусли культуралар тўқималарини морфогенезга ўтиши, нафас олиш метаболизмини ўзгариши билан олиб борилади. Умуман нафас олиш (CO_2 бўйича) кучаяди, аммо уни характери пентозофосфат йўлини кучайиши томон ўзгаради. Нафас олиш ферментларини фаоллиги ошади.

Биокимёвий ўзгаришдан кейин, хужайрани структурасида реорганизация (қайта тузилиш) бошланади. Хужайрани биокимёвий ўзгариши уни тузилишини ўзгаришидан олдин туради. Морфогенез йўлига кирган хужайраларда рибосомалар, митохондриялар сони кўпаяди, уларни ички тузилиши ўзгаради. Каллусли хужайраларда морфогенез жараёни синхронсиз ўтади ва узоқ давом этади. Бир вақтда каллусли тўқималарда тўлиқ тузилган структуралар ҳамда эндигина бу йўлга кирмоқчи бўлган хужайраларни ҳам кузатиш мумкин.

Меристематик учоқни хужайраларини ва глобуляр проэмбрионни синтетик фаоллигини ошиши, уларни озуқа муҳитидаги моддалар интиладиган аттрагир (озуқа муҳитини фитогормонлар миқдори кўпроқ бўлган органга йўлланттирувчи) марказга айланттириб қўяди. Бундай ҳолатда атрофдаги каллусли хужайралар емирилиб, ҳосил бўлган эмбрионидлар каллусли хужайралар массасидан осон тушиб кетади.

Каллусли хужайралар бир-бири билан плазмодесмалар орқали боғланмайди. Муртаксимон тузилмалар ёки меристемаатик ўчоқ пайдо бўлганда, хужайралар оралиғида қайтадан плазмодесмалар ёрдамида боғлар пайдо бўлади.

Морфогенезда ўтадиган ва каллусли хужайралардан ўсимлик пайдо бўлиши билан тугайдиган барча ўзгаришлар махсус генлар орқали бошқариб (назорат қилиб) турилади. Ҳозирги вақтда бир гуруҳ олимлар – морфогенезни белгиси полигенли бўлиб, бир неча хромосомалар билан назорат қилиб турилади, деб ҳисобласалар, бошқалари- бу белги иккита ядро гени билан аниқланади, деган фикрга келишган. Каллусли хужайраларни морфо-генетик фаоллиги генетик табиатга эга эканлигини ўзи, нима учун баъзи-бир ҳолларда каллусли тўқималардан у ёки бу генотипларни регенерациясини олиш мумкин эмаслигини тушунтириб беради. *In vitro* шароитида морфогенетик фаол генотипларни чатиштириш – регенерацион имкониятларни (қобилиятларни) ошишига олиб келиши мумкин.

ЎСИМЛИКЛАРНИ КЛОНАЛ МИКРОКЎПАЙТИРИШ

Уруғли ўсимликлар икки хил йўл билан: уруғдан ва вегетатив йўл билан кўпаяди. Бу иккала йўлни устиворлиги ҳам камчилиги ҳам бор. Уруғдан кўпайишнинг камчилигига энг аввало, олинган кўчатларни генетик хилма-хиллиги ва ювенил (уруғдан чиққан майсадан ёки вегетатив куртақдан репродуктив органлар ҳосил қилиш) даврининг узунлигини кўрсатиш мумкин.

Вегетатив кўпайишда она ўсимликни генотипи сақланиб қолади ва ювенил давр қисқароқ бўлади. Аммо кўпчилик турлар (энг аввало ёғоч ҳосил қиладиганлар) учун вегетатив кўпайиш муаммоси охиригача ўз ечимини топгани йўқ. Бунга асосий сабаблар қуйидагилар:

Биринчидан, кўпчилик турлар (навлар) ҳаттоки, ювенил босқичда ҳам вегетатив усулда керакли самара билан кўпаявермайди (эман, тилогоч, ёнғоқдошлар ва бошқалар);

иккинчидан, кўпчилик дарахтли ўсимликларни 10-15 ёшдан кейин, қаламча ёрдамида кўпайтириш мумкин эмас;

учинчидан, ҳар доим ҳам стандарт экиш материали олиш мумкин эмас (юқумли касалликлар тўпланиши ва ўтиши мумкин);

тўртинчидан, пайванд қилиш орқали катта ёшли (ёғочли) ўсимликларни кўпайтириш жуда ҳам қийин ва мураккаб;

бешинчидан, йил давомида бир хил генетик материални олиш учун ишлаб чиқилган технологиялар самарадорлигининг ўта пастлигидир.

Хужайра ва тўқималар культуралари соҳасида эришилган ютуқлар вегетатив кўпайишни тубдан янги бўлган усули клонал микрокўпайтириш (*in vitro* шароитида (пробиркада), жинсий бўлмаган йўл билан, ўсимликларни дастлабки нусхаси билан генетик бир хил бўлган навини яратиш) усулининг яратилишига олиб келди.

Бу усул асосида ўсимлик хужайраларигагина хос бўлган ноёб хусусият, тотипотентлик хусусияти, яъни ташқаридан келадиган таъсир орқали бутун ўсимлик организми ҳосил бўлишига туртки бўлиши ётади. Албатта, бу усулни бошқа анъанавий усуллардан устунлик томонлари жуда ҳам кўп: энг аввало бу устунликлар қуйидагича изоҳланиши мумкин:

- генетик бир хил экув материалнинг олинishi;
- меристемаа тўқималари культуралари ишлатилиши ҳисобига ўсимликларни вирусли ва бошқа юқумли касалликлардан ҳоли бўлиши;
- кўпайиши коэффициентининг юқорилиги (ўтчил ва гулли ўсимликлар учун 10^4-10^5 ; нинабаргли ўсимликлар учун -10^4);
- селекция даврининг қисқариши;
- ўсимлик ривожланишишни ювенил даврдан репродуктив фазага ўтишишни тезлашиши;
- анъанавий йўллар билан қийин кўпаядиган ўсимликларни кўпайтириши;
- ишни йил давомида ташиқил этиши имкониятларининг мавжудлиги ва кўчат материаллари ўстириши учун керак бўлган майдонни тежаши;
- ўстириши жараёнини автоматлаштириши имкониятлари ва ҳ.к.

Клонал микрокўпайтиришни дастлабки муваффақиятлари ўтган асрнинг 50-йиллари охирида француз олими Жорж Морел орхидея ўсимлигининг регенерантини яратганда эришилган эди. Бу муваффақиятга ўша вақтларда яратилган, *In vitro* шароитида ўсимликларни апикал меристемааларини кўпайтириш техникаси ўз ҳиссасини кўшган. Одатда олимлар бирламчи эксплант сифатида ўтчил ўсимликларни устки меристемааларидан фойдаланадилар, ва озуқа муҳити таркибини ўсимликни регенерация ва пайдо бўлиш жараёнларига таъсирини ўрганадилар. Худди шу мақсадда чиннигул, хризантема, кунгабоқар, нўхат, маккажўхори, қоқиўт ва бошқа ўсимликлар ўрганиб чиқилган эди.

Ж.Морель ўз тажрибаларида худди шундай қилиб, цимбидиум (орхидеялар оиласига мансуб ўсимлик)ни учки қисмини ишлатган. У ўсиб келаётган конуссимон кўринишдаги ва икки-уч барг олди элементларидан иборат бўлган ва ундан маълум шароитда куббали, юмалоқ-прокоримлар пайдо бўлишини кузатган эди.

Ҳосил бўлган (етилган) протокормларни бўлиш ва уларни кейин алоҳида мустақил равишда, янги тайёрланган озуқа муҳитида барг ва илдиз пайдо бўлгунча ўстиришга эришилган эди. Натижада Ж.Морель бу жараёни чегарасиз эканлигини ва шу йўл билан юқори сифатли генетик бир хил, вируссиз экув материални жуда ҳам кўп миқдорда тайёрлаш мумкинлигини кузатган эди.

Россияда клонал микрокўпайтириш профессор Р.Г.Бутенко номи билан боғлиқ. К.А.Темиряев номидаги ўсимликлар физиологияси институтида бу олима ўз шогирдлари билан, картошка, қанд лавлаги, чиннигул ва бошқа гулларни клонал кўпайтириш шароитларини ишлаб чиққан.

Мамлакатимизда бу усул илмий лабораторияларда синаб кўрилмоқда. Хусусан, Тошкент Давлат Аграр университети биотехнология кафедраси илмий лабораториясида картошкани клонал микрокўпайтириш усуллари орқали касалликларга, иссиққа, шўрланишга чидамли навларини яратиш бўйича илмий изланишлар олиб борилмоқда.

Шуни ҳам эслатиб ўтиш ўринлики, микрокўпайтиришдан фойдаланиш доираси жуда кенг бўлиб, кундан кунга янада ошиб бормоқда. Энг аввало бу *in*

in vitro шароитида ўсимликларни ёғочли турларини, нина баргли ва айниқса, йўқолиб кетаётган ўсимликлар ҳамда доривор ўсимликларни кўпайтириш мақсадида бу усулдан фойдаланиш катта самара бериши исботланган.

Ёғочли (дарахтларни) ўсимликларни тўқима культураси бўйича биринчи илмий ишлар 1920 йилларда чоп этилган бўлиб, француз олими Готре номи билан боғлиқ. Бу мақолаларда тилоғоч дарахти камбиал тўқималарини *in vitro* шароитида каллусогенезга имкониятлари (қобилиятлари) борлиги хабар қилинган. 1960 йилларда Матес деган олим биринчи марта осин дарахти регенерантини олишга эришган ва уни тупроққа экишгача етказган. Нина баргли ўсимликларни *in vitro* шароитида ўстириш узоқ вақт давомида тажриба сифатида ишлатилиб келинган. Бу нина баргли (ювенил) ҳамда қари ўсимликлар тўқималаридан ўсимлик етиштириш мақсадида фойдаланиш анча қийинчиликларга олиб келиши билан боғлиқ.

Маълумки, ёғоч ҳосил қилувчи дарахтлар, айниқса, нина баргли ўсимликлар жуда ҳам секин ўсадилар, қийин томир оладилар, жуда кўп миқдорда иккиламчи бирикмалар (феноллар, терпенлар ва бошқа моддалар) сақлайдилар, бу моддалар эса алоҳида ажратиб олинган тўқималардаги фенолаза ферментлари таъсирида оксидланадилар. Ўз навбатида фенолларни оксидланган маҳсулотлари одатда хужайрани ўсишини ва бўлинишини ингибирлайдилар, бу эса бирламчи эксплантларни нобуд бўлишига ёки ёғочли ўсимликлар тўқимасини регенерация имкониятларини пасайишига ва ёши улғайган сари секин-аста, бутунлай йўқолишига олиб келади. Аммо, қанчалик қийин бўлишига қарамасдан олимлар изланиш манбаи сифатида тез-тез ёғочли ўсимликларни тўқима ва органларидан фойдаланиб келмоқдалар. Ҳозирги вақтга келиб, *in vitro* шароитида кўпайтирилган ёғочли ўсимликлар сони 40 оилага мансуб бўлган 250 турдан ошиб кетган (каштан, дуб, қайин, заранг, тоғ тераги, толни тоғ тераги билан гибриди, сосна, арча ва ҳ.к.).

Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришни усуллари ва босқичлари

Клонал микрокўпайтириш жараёнини тўрт босқичга бўлиш мумкин:

биринчи – донор ўсимликни танлаш, эксплантларни ажратиш ва яхши ўсадиган стерил культура олиш;

иккинчи – микрокўпайтиришни ўзи, мериклонларни энг кўп (максимал) миқдорини олишга эришилган даврни ва шароитни танлаш;

учинчи – кўпайтирилган навдани илдиз олиши ва уларни тупроқ шароитига мослаштириш, керак бўлганда регенерант – ўсимликларни совуқ ҳароратда ($+2^0$, $+10^0$) сақлаш;

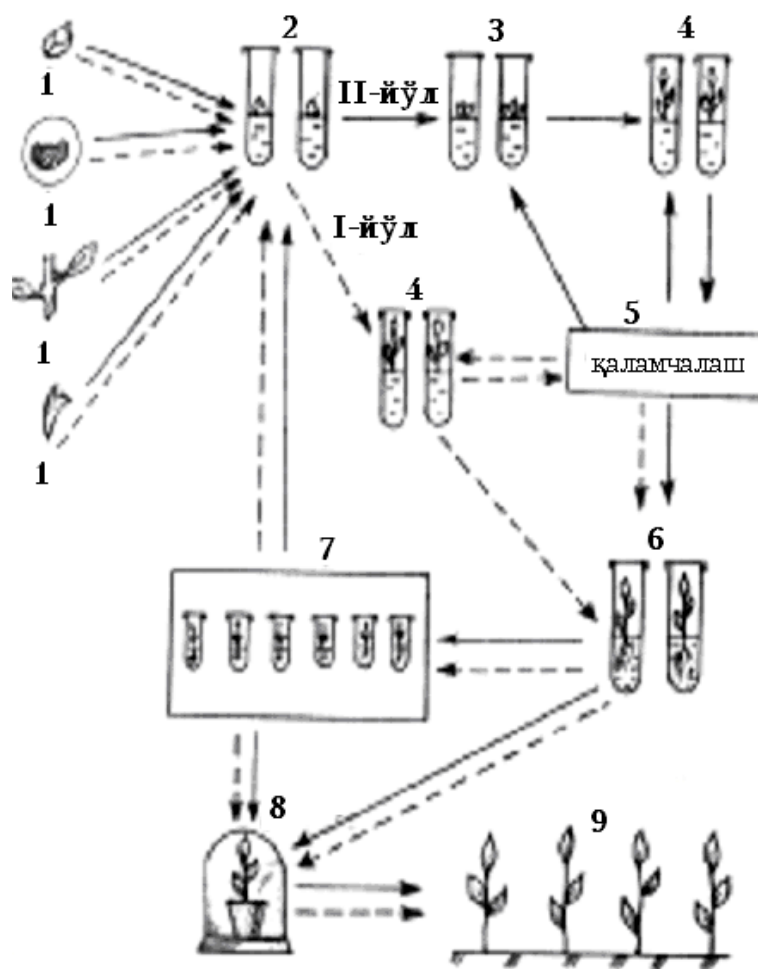
тўртинчи – ўсимликни иссиқхона шароитида ўстириш ва уларни майдонга чиқариб экиш ёки сотишга тайёрлаш (3.8-расм).

Клонал микрокўпайтиришни кўп усуллари маълум. Кўплаб муаллифлар эксплантларни ўстиришга шароитни морфогенез жараёнига таъсирини ўргана бориб, ўстириш шароитини ўзгаришига ҳар хил морфогенетик реакция

бўлишини кузатганлар, бу эса клонал микрокўпайтириш методларини янги классификациясини яратилишига олиб келди.

Илмий адабиётлардан маълум бўлган, ўсимликларни микрокўпайтириш услублари асосида, бу жараёни куйидаги йўллар билан амалга ошириш мумкин:

- ўсимликда бор бўлган меристемааларни ривожланишини жадаллаштириши (поя апекси, пояни куртаклари);
- эксплантлар тўқималарида тўғридан - тўғри адвентив куртаклар ҳосил бўлишини индукция қилиши;
- соматик эмбриогенезни индукция қилиши;
- бирламчи ва кўчат олувчи каллусли тўқималарда адвентив куртакларни табақалаштириши.



6-расм. Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш

1-йўл – бор меристемааларни ривожланишини фаоллаштириш усули;

2-йўл- эксплантда адвентив куртаклар ҳосил бўлишини индукция қилиш.

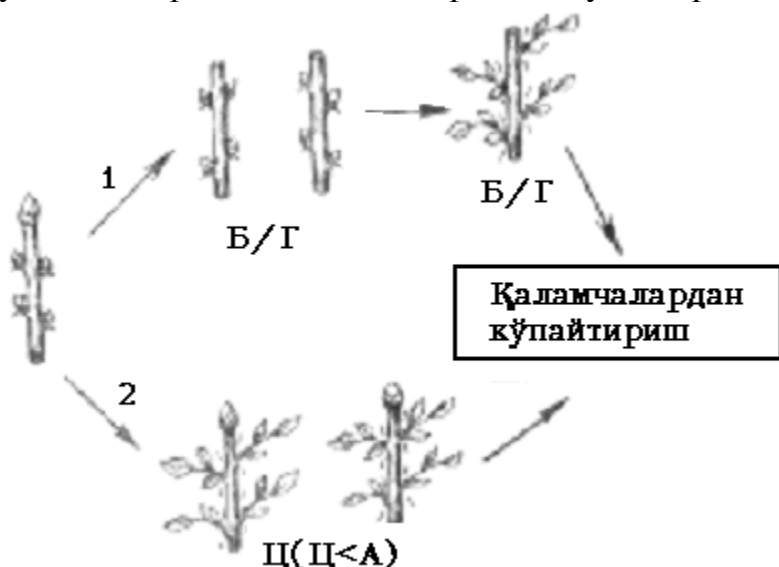
1-дастлабки эксплант танлаш; 2–стерил культура олиш; 3-бирламчи эксплантда, тўғридан – тўғри адвентив куртаклар ҳосил бўлиши; 4- куртакларни ўсиши ва микро навдаларни ҳосил бўлиши; 5–микронавдаларни кўпайтириш (қаламча); 6–микро новдаларни илдиз олиши; 7–регенерант ўсимликни паст ҳароратда сақлаш; 8–ўсимликларни иссиқхона шароитига ўтказиш; 9– регенерант ўсимликларни далага экиш.

Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришда ишлатиладиган асосий усул – бу ўсимликларда бор бўлган меристемааларни ривожланишини фаоллаштириш бўлиб, у апикал устиворликни олиб ташлашга асосланган (3.9-расм). Бунга икки йўл билан эришиш мумкин:

- *пояни тепа меристемаасини олиб ташлаш ва кейин навдани in vitro шароитида гормон сақламаган муҳитда микроқаламчалаш;*
- *озуқа муҳитига цитокинин таъсирига эга бўлган моддалар қўшиши (навдани ўсишини кучайтириш).*

Одатда, цитокинин сифатида – 6–бензиламинопурин (БАП), 6–фурфуриламинопурин (кинетин), ҳамда 2-изопентениладенин (2ip) ва зеатин ишлатилади.

Шундай йўл билан олинган навдаларни бирламчи она эксплантдан ажратилади ва қайтадан янги тайёрланган озуқа муҳитида ўстирилади. Ҳозирги вақтда бу усул қишлоқ хўжалик ўсимликларини вируссиз экув материалларини тайёрлашда кенг қўлланилади. Шу йўл билан қанд лавлаги, тамаки, хмель, топинамбур, помидори, картошка, бодринг, қалампир, ошқовоқ ва бошқа ўсимликларни соғломлаштирилган кўчатларини тайёрлаш йўлга қўйилган.



7-расм. Ўсимликларни бор меристемааларини фаоллаштириш усули билан кўпайтириш чизмаси:

- 1-тепа меристемаасини юлиб ташлаш йўли;
- 2-озуқа муҳитига цитокининлар қўшиш йўли
- Б/Г – гормонсиз муҳит;
- Ц-цитокининлар,
- А-ауксинлар.

Баъзи бир қишлоқ хўжалик ўсимликлари учун (масалан, картошка ўсимлиги) клонал микрокўпайтириш технологияси саноат даражасига кўтарилган. Ўсимликларда бор бўлган меристемааларни фаоллаштириш усулини ишлатилиши бир йилда бир дона картошка меристемаасидан 10^5 дона ўсимлик етиштириш имконини беради, бундай технология пробиркада микро туганаклар - қимматбаҳо вируссиз уруғлик яратишни ўз олдига қўйган (3.10-расм.).

Иккинчи усул – Бу эксплант тўқималарида тўғридан-тўғри адвентив куртаклар пайдо бўлишини кучайтириш (индукция қилиш). Бу усул ўсимликни ажратиб олинган қисмини қулай озуқа муҳитида етишмаган қисмини (органларини) ҳосил қилишига асосланган, шундай қилиб, бутун ўсимликни ренерация (ҳосил) қилиш.

Адвентив куртак ҳосил қилишни ўсимликни хоҳлаган органи ва тўқимаси (ажратиб олинган куртак, барг, поя, уруғпалла, илдизни бир қисми ва ҳ.к) асосида ташкил этиш мумкин.

Аммо, материал заҳарланмаган (юқумли касалликлардан ҳоли) бўлиши шарт. Бу жараён, одатда алоҳида цитокинин ёки уни ауксин билан аралашмаси (10:1 ёки 100:1) сақлаган озуқа муҳитида амалга ошади. Ауксин сифатида кўпроқ β -индолил-3-сирка кислота (ИУК) ёки α -нафтилсирка кислота (НУК) ишлатилади.

Бу микрокўпайтиришни энг кенг тарқалган усули бўлиб, шу усул билан илдиз мевали гуллар (нарцисса, лилия, гиацинт, гладиолус, лолақизғалдоқ); Brassica авлодига мансуб ўсимликлар (рангли карам) шунингдек пиёз, саримсоқпиёз, помидор ва бошқа бир қатор ўсимликлар кўпайтирилган (3.11-расм).

8-расм. Ўсимликларни *in vitro* шароитида бор бўлган меристемааларни ўсишини фаоллаштириш усули:

а – стахис; б – анор; в – картошка.

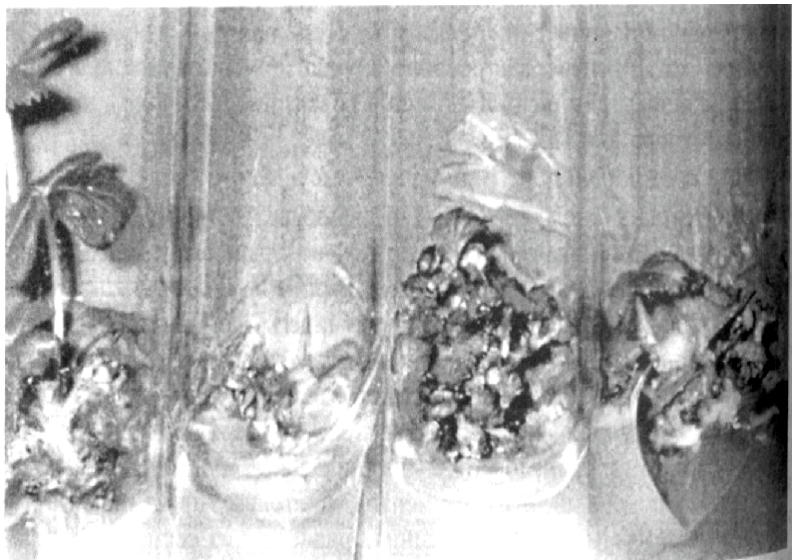


9-расм. Ўсимликларни адвентив куртакни индукция қилиш орқали кўпайтириш:

а- буғдой; б- орхидея; в- сосна.



Ер тутти (земляника) ўсимлигини апикалли меристемааларини ўстиришга асосланган клонал микрокўпайтириш технологияси ҳам яхши йўлга қўйилган (3.12-расм.).



10-расм. Ер тутини
клонал кўпайиши

а - микрокўпайишни ўзи;
б - адаптация бўлган
ўсимлик.

Ёш ва вирус билан касалланмаган, соғлом ўсимликни юқори меристемаасини ажратиб олиб, уни Мурасига ва Скугани модификация қилинган озуқа муҳитида ўстирилади. Озуқа муҳити 0,1-0,5 мг/л 6-бензиламинопурин (БАП) сақлаши керак. 3-4 ҳафта ўтгандан кейин меристемаа майсага айланади ва уни асосида адвентив куртаклар ҳосил бўла бошлайди, ҳамда тез ривожланиб, янги куртак соладилар. 6-8 ҳафта мобайнида куртакларни тартибсиз йиғиндиси (конгломерати) ҳосил бўлади. Бу куртаклар ривожланишни ҳар хил босқичида бўлиб, бир-бирлари билан боғловчи тўқималар орқали боғланган бўлади. Калта қаламчалардан барглар пайдо бўлади, уларни тагида эса янги адвентив куртаклар чиқа бошлайди.

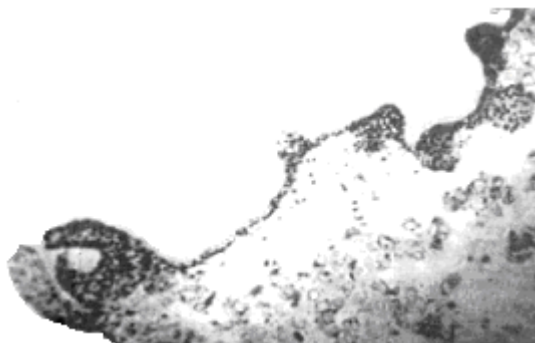
Мана шу куртакларни ажратиб олиб, янги озуқа муҳитига экилади. Цитокинин сақлаган муҳитда новдаларни прольиферацияси (кўпайиш орқали янги ҳужайра ва тўқималарни ҳосил бўлиши) давом этади, гормон сақламаган муҳитда эса 4-6 ҳафта давомида нормал ҳолатдаги, илдиз ва баргли ўсимлик ҳосил бўлади. Эксплантни морфогенетик фаоллиги 3-4 йил мобайнида сақланади. Шундай қилиб, битта ўсимликдан бир йилда бир неча миллион регенерант ўсимлик етиштириш мумкин.

Табиийки, изланувчиларни адвентив куртакларни келиб чиқиши, хусусан меристемаани табақаланишида қайси бир ҳужайра қавати иштирок этиши қизиқтиради. Ҳозирча бу масалада бир хил фикр йўқ. Масалан, Тран Тан Ван ўзини тамаки тўқималари билан олиб борган ишларида энг фаол тўқима эпидерма эканлигини, ундан озуқа муҳити таркибидаги гормон балансига қараб, куртак, каллус ёки илдиз чиқишлигини кўрсатиб берган.

Шунингдек, адвентив куртаклар меристемаатик ҳужайраларни юқори қатламидан пайдо бўлиши ҳам кўрсатиб ўтилган. Сосна дарахти мисолида адвентив куртакни уруғпалласини ва субэпидермал қаватларида пайдо бўлиши

кузатилган ва бу жараён сосна учун ишлатиладиган цитокининларга боғлиқ эмаслиги кўрсатиб ўтилган (11-расм).

Клонал микрокўпайтиришда қўлланиладиган учинчи усул. Соматик ҳужайралардан, ташқи кўриниши зиготали куртакчага ўхшаган куртаксимон структурани табақаланишига (дифференциация) асосланади. **Бу усул соматик эмбриогенез деб ном олган. *In vitro*** шароитида куртак ҳосил бўлишини ***in vivo*** (табиий) ҳолатдагидан фарқи шундан иборатки, соматик куртаклар, куртак қопчасидан ташқарида асексуал ривожланадилар ва ўзларини ташқи кўринишлари бўйича бир вақтни ўзида поя ва илдизни апикал меристемааларини ривожланиши кузатиладиган икки полярли тузумани эслатадилар.



11-расм.
**Эксплантни эпидермал ва
субэпидермал ҳужайра
каватида адвентив
куртакларни ҳосил бўлиши**

Стевардни тушунтиришича, соматик куртаклар ривожланишни уч босқичини ўтадилар: глобуляр, юраксимон, торпедосимон ва оқибатда майса бўлиб униб чиқади. 1950 йилларда сабзи ҳужайраларида биринчилардан бўлиб кузатилган бу кўриниш ҳозирги даврда ***Orchidaceae*** ва ***Rutaceae*** оилаларига мансуб бўлган, шунингдек, бошоқлиларни баъзи бирларини (буғдой, арпа) беда, редис, ток ва баъзи дарахтлар каби кўплаб ўсимликларни кўпайтириш учун ишлатилиб келинмоқда.

Тўқима культурасида эмбрионидларни пайдо бўлиши икки босқичда амалга ошади:

- *Биринчи босқичда ҳужайра эксплантлари озуқа муҳити таркибига солинган ауксинлар, энг аввало 2,4 – дихлорфеноксирка кислотаси (2,4 -Д) ҳисобидан эмбрионалга айланади.*
- *Иккинчи босқичда ҳосил бўлган ҳужайраларни эмбрионидларгача ривожланишига мажбур қилиш керак бу эса, озуқа муҳит таркибидаги ауксинларни миқдорини камайтириш ёки уларни бутунлай чиқариб ташлаш орқали амалга оширилади.*

Соматик эмбриогенезни тўғридан – тўғри бирламчи эксплантлар тўқималарида, ҳамда каллусли культураларда кузатиш мумкин. Шунинг ҳам таъкидлаб ўтиш лозимки, каллусли культуралардан клонал микрокўпайтиришда фойдаланиш камроқ самара беради, чунки шу йўл билан тайёрланган экув материаллари (кўчатлар) донор – ўсимликга нисбатан генетик турғун (мустаҳкам) бўлмайди. Кўпинча, каллусли ҳужайраларни суюқ озуқа муҳитида ўстирилганда, соматик эмбриогенез келиб чиқади ва энг қийин

операциялардан ҳисобланади. Бунга сабаб, ҳар доим ҳам ҳужайраларга хос бўлган тотипотентлик амалга ошавермайди.

НАЗОРАТ САВОЛЛАРИ

1. Ҳужайра биотехнологияси нима?
2. Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги рольини тушинтириб беринг?
3. Ажратиб олинган ҳужайра ва тўқималарни ўстириш техникасини изоҳлаб беринг?
4. Каллус тўқима нима? Унинг ривожланиш халқасини (циклини) тушинтириб беринг?
5. Каллусли ҳужайраларни ўзига хослиги нималарда иборат?
6. Каллус ҳужайраларининг генетикасини тушинтириб беринг?
7. Гормонларга боғлиқ бўлмаган ўсимлик тўқималарини ўзига хослиги, уни вазифа ва моҳиятини тушинтириб беринг?
8. Ҳужайра суспензиялари культураси нима ва у қандай олинади?
9. Ягона ҳужайралар культураси, уларнинг мақсад ва вазифалари нималардан иборат?
10. Каллусли тўқималар морфогенезини тушинтириб беринг?
11. Микрклонал кўпайтириш усуллари ва босқичларини айтиб беринг?

ТУПРОҚ МИКРОББИОТЕХНОЛОГИЯСИ АСОСЛАРИ

Тупроқ микроббиотехнологияси ва унинг вазифалари

Тупроқ ҳосилдорлигини ташкил этиш ва бошқаришда биологик омилларни ролини биринчилардан бўлиб, тупроқшунослик фанининг асосчилари В.В.Докучаев, П.А.Костўчев ва В.Р.Вильямсонлар баҳолаб берганлар.

Улар тупроқ ҳаётида биологик бирикмаларни роли жуда ҳам катта эканлигини исботлаб бердилар. Бу ғоя кейинроқ С.Н.Виноградский, Е.Н.Мишустин, М.М.Кононова, Д.Г.Звягинцев, В.Т.Емцев, Д.И.Никитин ва бошқа олимларни изланишларида ўз ривожини топди ва анча-мунча аниқлик ҳам киритди. Айниқса Е.Н.Мишустин, Д.Г.Звягинцев, В.Т.Емцев ва бошқалар тупроқ ҳосилдорлигида микроорганизмларни роли беқиёс эканлигини исботлаб бердилар ва шу туфайли микроббиокимё асослари тиклана бошланди.

Ҳозирги вақтда микроорганизмлар ўзларининг фаолияти ва массаси билан тупроқ ҳосилдорлигини белгилашда асосий роль ўйнаши аниқ бўлиб қолди. Шундай экан, ҳар хил қишлоқ хўжалиги тизимида тупроқ ҳосилдорлигини ошириш ва уни сақлаб туриш, бу жараёни бошқариш кўп маънода, тупроқда микробиологик жараёнларни бошқариш билан узвий боғлиқ.

Қишлоқ хўжалик экинларидан унумли ҳосил кўтариш жараёнини ва тупроқда микроббиокимёвий жараёнларни бошқариш қишлоқ хўжалик фанида янги йўналиш - тупроқ микроббиотехнологиясини пайдо бўлишига олиб келди. Бу йўналиш тупроқ шароитида микроорганизмлар таркибини ўрганиш ва бошқариш муаммоларига асосланган бўлиб, микроорганизмлар фаолиятини бошқариш ва улар томонидан олиб борилаётган метаболитик реакцияларни, қишлоқ хўжалик экинлари ҳосилдорлигини оширишга йуналтиришни тақозо этади.

Тупроқ микроббиотехнологияси фанининг асосий муаммоси тупроқда, айниқса ўсимликлар ризосфераси ва ризопланида ўтадиган микробиологик жараёнларни бошқаришдир. Бу муаммо, фақатгина маълум бир белгиланган шароитда, маълум таркибга эга бўлган микроблар ассоциациясини ташкил қилиш билан белгиланади.

Бу муаммоларни ечишни аниқ йўллари белгилаб олинган. У ҳам бўлса қуйидагилар билан белгиланади:

◆ агрономик аҳамиятли микроб ценозига ёки микроорганизмлар гуруҳига ташқаридан туриб таъсир қилишни бошқариш, яъни уларни кўпайиши, ўсиши, ривожланиши ва ўсимлик учун зарур бўлган ФФМ (антибиотиклар, фитогармонлар ва ўсимликни ўсишини бошқарувчи бошқа моддалар ва х.к.) ишлаб чиқаришини ташкил қила билиш;

◆ тупроқда микробларни ўсиши ва ривожланишини таъминловчи ўсимликлар иштирокида алмашлаб экишни ташкил қилиш ва шу туфайли микроббиокимёвий жараёнларни бошқариш;

◆ тупроқда микроббиокимёвий жараёнларни бошқаришда органик ва минерал ўғитлардан оқилона фойдаланиш;

- ◆ тупроқ мироорганизмларини азот ютиш ва фосфорли бирикмаларни эритиш қобилиятидан оқилона фойдаланиш;
- ◆ микробиологик жараёнларни тўлақонли ўтиши учун ҳар хил турдаги тупроқ мелиорациясидан фойдаланиш.

Тупроқ микроб ценози - биологик тизимдир

Табиатда содир бўладиган бир қатор муҳим воқеалар - биогеоценоз, тупроқдаги органик моддаларни минераллаштириш, уларни ҳаётий зарур биологик (модда алмашинуви) жараёнларда иштирокини белгилаш, микроб ценози (маълум шароитдаги микроорганизмларни таркиби ва фаоллиги) билан белгиланади.

Тупроқ микрофлорасини аниқлашда, уларни таркиби ва ўзига хослигини белгилашда, антропоген таъсирлар шароитида ўзгариши ва бошқа бир қатор шароитларда микробни тузилиши ва фаоллиги (функцияси) асосий белгиловчи омил бўлиб хизмат қилади.

Микроорганизмларни сони ва сифатини микроскоп остида, динамикада таҳлил қилинганда уларни доимий эмаслиги ва вақти-вақти билан ўзгариб туриши исботланган. Микроб массасини тез ўзгарувчанлик даври, мўтадиллашиб (стабилизация) бориши билан алмашиб туради. Бошқача қилиб айтганда бир вақтда микроб массаси тез ўзгаради, баъзи-бир вақтда эса ўзгармасдан туради ва х.к.

Тупроқнинг микроб ценози (таркиби) - бу биосферанинг ўзига хос реактив компоненти дир. Унинг юқори реактивлиги физиологик хилма-хиллиги, ўсиш тезлиги, полифункционаллиги, оқибат натижада эса модда алмашинуви, минерализацияланиши жараёнидаги беқиёс иштироки билан белгиланади.

Микроб ценози - микроблар классификациясининг катта бир бўлаги сифатида бир хил шароитда яшаб турган микроорганизмлар тўдасидир. Микроорганизмлар учун ўта зарур шароитлар: микроклимат, сув режими, тупроқнинг геологик тузилиши ва озиқа моддалари ҳисобланади. Шу ва бошқа омиллар ҳисобидан микроб ценози маълум биоценоздаги органик ва минерал моддалар трансформациясида ҳамда биологик ва нобиологик моддаларни биосферада ўзаро таъсирида иштирок этади.

Қисқа қилиб айтганда - микроорганизмлар доимий равишда ташқи муҳитга таъсир қиладиган ва унинг таъсири остида бўладиган тирик организмлардир.

Тупроқда микроб ценози хилма-хилдир. Е.Н.Мишустин уларни зимоген, автохтон, олиготроф, автотроф гуруҳларга бўлиб ўрганишни тавсия қилади. Бу гуруҳлар ўртасидаги алоқадорлик доимий ўзгариб туради ва кўп маънода тупроққа бўлган таъсир билан белгиланади. Д.Н.Никитин экотизимда олиготроф микроорганизмларни роли катта эканлигини, улар табиатда тарқалган энергияни тўплаш қобилиятига эга эканлигини эътироф этади.

Охириги йилларда тупроқдаги микроб биомассаси ҳақида кўпроқ фикрлар ёритиладиган бўлиб қолди. Бунга бир неча сабаблар бор, албатта. Д.Г.Звягинцев микроб массаси ва уни "айланиш" тезлиги, тупроқ хусусиятига боғлиқ (яъни - рН, намлик, ҳарорат, аэрацияга) деб ҳисоблайди. Т.В.Тарвис

тупроқда микроб массаси тўпланганда микроб билан ўсимлик орасида озика муҳити учун рақобат кетади деган фикрни илгари суради. Микроб биомассасини тез тўпланиши, уларни энергетик материаллар билан таъминланганлигига боғлиқ бўлиб, тупроқ унумдорлигидан хабар беради.

Азот ўзлаштирувчи микроорганизмларни таркиби, уларни энергетик ресурслари, физиологик фаоллиги, микроб массасининг миқдори, минерализация жараёни ва тупроқ унумдорлиги кўрсаткичи ҳақида маълумот беради.

Микроб массасини тўпланиши ва парчаланиши, тупроқдаги азот миқдорини ўзгаришига ва ўсимликни озикланиш шароитига тўғридан-тўғри таъсир этиб, тупроқ унумдорлигини ошишига хизмат қилади. Тупроқни ферментатив фаоллиги, яъни тупроқда яшовчи тирик организмларни ферментларини ўзига сорбция қилиш хусусияти ҳам диққатга сазовордир. Тупроқда боғланган (иммобилизация қилинган) ферментлар фаоллиги улар учун диагностик кўрсаткич бўлиб хизмат қилади. Тупроқда ферментларни учраши ва фаоллик кўрсатиши, тупроқни биологик фаоллиги ва унумдорлигидан хабар беради.

Микроб ценози - ўз-ўзини бошқарувчи биологик тизимдир. Бу тизимни мўтадил фаоллик кўрсатиши ҳар хил гуруҳга мансуб микроорганизмларни ривожланишига боғлиқ бўлади. Шу уринда, тупроқ доимий равишда ташқи муҳит таъсирига табиий ва антропоген таъсирга учраб туриши, бу эса унинг таркибий қисми бўлмиш микроорганизмларга ҳам таъсир кўрсатишини эсда тутмоқ лозим. Янги экологик тизимда микроорганизмлар фаоллиги ўзгариб, унинг имкониятлари тизимнинг динамик ривожи учун етарли бўлмай қолиши мумкин, Бундай шароитда, тупроқдаги микробобиокимёвий жараёнларни мўтадиллаштириш учун уларни йўналиш ларини ўзгартириш лозим бўлади.

Бундай имкониятлар, микроблар тизимининг ички имкониятларини чуқур таҳлил қилиш, уларни функционал хилма-хиллигини ўрганиш, гетеротроф микроорганизмларни фаоллигини чуқур ўрганиш орқали минералланиш ва гумус моддалари ҳосил қилиш жараёнларини таҳлил этиш каби бир қатор биокимёвий жараёнларни ўрганиш орқалигина амалга оширилади. Фақатгина, тупроқдаги микроорганизмлар гуруҳларини, уларни фаоллигини ўзгартириш орқалигина тупроқ унумдорлигини ва ўсимлик ҳосилдорлигини ошириш мумкин. Микроб гуруҳлари фаолиятини бошқариш тупроқ микроббиотехнологиясининг асосини, унинг мазмун ва моҳиятини ташкил қилади.

Тупроқда микроб ценозлари фаолиятини бошқариш, органик ва минерал ўғитлар, алмашлаб экиш

Тупроқдаги микроббиокимёвий жараёнларни фаоллигини ва тупроқ унумдорлигини оширишнинг асосий йўлларида бири органик ва минерал ўғитлардан фойдаланиш, нордон тупроқларни охаклантириш ва алмашлаб экишни тўғри йўлга қўйишдир.

Ўғитлар таъсирида тупроқ микрофлорасини ҳаётий режими ўзгариб боради. Дастлаб ўғитланган тупроқда микробиологик жараёнлар тезлашиб боради. Асосий физиологик гуруҳ микроблар билан бирга нитрофикация ва целлюлаза парчаловчи микроорганизмлар фаоллиги ошиб боради. Бу эса тупроқда аминокислоталар, ферментлар фаоллигини ошишига олиб келади. Узоқ вақт, сурункасига минерал ўғитлардан фойдаланган тупроқларда микробиологик жараёнлар сусайиб бораверади. Кўп йиллик кўзатувлар натижасида гунг ва минерал ўғитлардан баробар фойдаланганда тупроқдаги микробиологик жараёнлар узоқ вақт ошиб боргани кузатилган.

Минерал ўғитларни юкори меъёри тупроқдаги баъзи-бир физиологик гуруҳ микроорганизмларни, хусусан аэроб азот ўзлаштирувчи ва анаэроб сульфатредукция қилувчи гуруҳларни фаолияти сусайиб кетишига олиб келади.

Органик ўғитлардан алоҳида ва минерал ўғитлар билан бирга узоқ муддатда ишлатиш натижасида Л.А.Карягина шундай хулосага келади: "минерал ўғитларни тупроқ микрофлорасига таъсири бир қатор омилларга, хусусан ўсимлик вегетация даврининг оби-ҳавосига ҳам боғлиқ бўлади".

Шундай бўлишига қарамасдан, минерал ўғитларга нисбатан органик ўғитлар тупроқ микрофлораси ва унинг фаолиятига кўпроқ таъсир қилади. Аммонификация ва нитрофикация қилувчи бактериялар сонини ошиши, торф-гунг ва NPK (азот, фосфор, калий) биргаликда ишлатилганда кузатилган. Ўзбекистон шароитида ҳам, тупроқ турларига қараб, маҳаллий ўғит ва NPK биргаликда ишлатилса, ҳамда нордон тупроқлар ўз вақтида оҳаклантирилса мақсадга мувофиқ бўлар эди. Бундай шароитда тупроқда актиномицетлар сони ошиб боради. Ўғитлар таъсирида целлюлоза парчаловчи микроорганизмлар, шу жумладан микромицетлар сони ўзгариб бориши кузатилган. Ўсимликларни озикланиш режимини меъёрига келтириш (органик ва минерал ўғитлар комплексидан меъёрида фойдаланиш) тупроқдаги микроорганизмлар фаоллиги, уларни азотни органик бирикмаларини минераллаштириш фаолияти билан муҳофаза қилиб турилади.

Микробиологик жараёнларни бошқариш имконияти фақатгина органоминерал ўғитлар тизимидан тўғри фойдаланиш орқалигина амалга оширилади.

Тупроқка бундай таъсир, микроблар фаоллигини ошишига, хусусан ўсимлик илдиз тизимида микроблар фаолиятини ошишига олиб келади. Бу ҳолда, микроб массаси ошади, олиготроф микроорганизмлар фаоллиги, умуман тупроқ фаоллиги ошади. Тупроқ биодинамикасида кузатиладиган ўзгаришлар, биокимёвий жараёнларни кучайишига, органик моддаларни парчаланишига, умуман эса тупроқ унумдорлигини ошишига олиб келади.

Сурункасига бир ўсимликни экиш (монокультура ҳокимлиги) тупроқ микрофлорасини ўзгаришига олиб келади. Бундай шароитда микромицетлар, актиномицетлар, спора ҳосил қилувчи бактериялар сони кўпайиб, фаол микроорганизмлар, хусусан азотфиксаторлар камайиб кетади. Монокультура ҳокимлигидаги тупроқларда протеаза, амилаза, пектиназа, целлюлаза, оксидланиш-қайтарилиш реакциясини олиб борадиган ферментлар фаоллиги пасайиб кетади. Хусусан, гумус ҳосил бўлиш ҳамда тупроқдаги

полифенолларни парчаланишида иштирок этувчи полифенолоксидаза ферменти фаоллиги бутунлай йўқолиб кетади.

Ўсимликларни алмашлаб экиш тўғри ташкил қилинган тупроқларда ўсимликлар илдиз тизими билан узвий алоқада бўлган микроббиокимёвий компонентлар пайдо бўлади, бу эса биокимёвий жараёнларни ишлаб кетганидан хабардор қилади.

Тупроқни мелиоратив ҳолатини яхшилаш уни агрокимёвий хусусиятини тузатиш, хусусан, органик углерод ва гумин кислотасини умумий миқдорини оширишга олиб келади. Шунда азот ва углерод моддаларини трансформациясида қатнашадиган микроорганизмларни сони ва сифати яхшиланади.

Нитрификация жараёнини пасайтирувчи омиллар

Маълум бир шароитда тупроқда фаол ривожланиб келаётган нитрификация жараёни пасайтириш, фойдасиз минераллаш жараёнини тўхтатишда катта аҳамият касб этади. Тупроққа солинган нитрофикацияни пасайтиривчилар, шу жараённи олиб борувчи нитрификация қилувчи микроорганизмларни фаолиятини буғиш орқали, азотни аммиак формада тўпланишига олиб келади.

Бундай шароитда нитритларни нитратларга оксидлаш жараёни пасаяди, нитритларни ювилиши ва уларни газсимон моддаларга айлантирувчи денитрификация жараёни пасаяди, тупроқни нитрификациялаш қобилияти тўхтайдиган ёки жуда ҳам пасаяди. Нитрификация жараёнини пасайтирувчи бир неча препаратлар маълум бўлиб, шулардан бири, нитропирин-2-хлор-6-трихлорметил пиридин, бу препарат "N-Serve-24" номи билан маълум.

Препаратни 240 г/л ёгдаги эритмасини аммиакли ўғитлар билан (6 кг/га) тупроққа солинганда, нитрификация жараёнида қатнашувчи бактерияларни сони жуда ҳам камайиб кетгани тасдиқланган. Шунингдек, препаратни иккиламчи хусусияти аммонификаторларни ўсишини пасайтириши ҳам кузатишган (тупроқни 2-6 см қатламида). Шундай бир ҳолатда бу препарат бошқа тур ва туркумларга мансуб бактерияларга таъсир этмаган.

Тупроқ микроб ценозларини гербицидлар билан ўзаро таъсири

Тупроққа солинган гербицидлар ўзларини асосий вазифаси бўлган бегона ўтларни йўқотиш билан бирга, тупроқда амалга ошириш лозим бўлган биокимёвий жараёнларга ҳам салбий таъсир кўрсатади. Тупроқда яшовчи микроорганизмларни фаолиятини бузилиши (тупроқда органик ва ноорганик моддаларни, жумладан гербицид, пестицид ва бошқа ядохимикатларни тўпланиб қолиши) тупроқ унумдорлигини пасайишига олиб келади. Бундай ҳолларда, зудлик билан тупроқни ҳар хил цидлардан тозалаш, ундаги (тупроқдаги) микробиологик жараёнларни тиклаш лозим бўлади.

Тупроқда гербицидлар микроорганизмлар массаси билан ўзаро алоқага киради. Демак, гербицидларни йўқотиш шу тупроқдаги микроорганизмларни фаоллигига тўғридан-тўғри боғлиқдир.

Кўпчилик ҳолларда гербицид сепилган тупроқларда микроорганизмлар дастлаб камайиб кетади, 10-12 кун ўтгач, микроорганизмларни шу шароитга мослашуви (адаптация) бошланади. 1,5-2,0 ой орасида гербицид таъсири пасайиб, микробиологик жараёнлар тиклана бошлайди.

Микроорганизмларни тикланиш даври бир томондан шу шароитда яшаб турган микроорганизмларни мослашувига, иккинчи томондан эса гербицидларни хусусиятига боғлиқ. Айниқса гербицидлардан фойдаланганда уни ишлатиш мўтадиллигига риоя қилмаслик, тупроқни узоқ вақт давомида бутунлай ишдан чиқаришгача олиб келади.

Гербицидлар (ТХА-На, дикотекс, прометрин, симазин ва х.к.) билан тупроқни ва уни атрофидаги сув хавзаларини ифлослантирмаслик учун қуйидаги тадбирлардан фойдаланишни тавсия қиламиз:

◆ Гербицидлардан фойдаланган тупроқни намлигини 60% атрофида (сув режимини бошқариш йўли билан) ушлаб туриш лозим, чунки шу шароитда микроорганизмлар томонидан гербицидларни парчаланиши тезлашади;

◆ *прометрин ишлатилганда, уни парчаланиши суст кетишини эътиборга олмоқ лозим.*

◆ *прометрин ва симазинни юқори миқдори ишлатилганда, гербицидларни тупроқда қолган ва атрофдаги сувга ўтган миқдорини аниқлаб бориш лозим, чунки гербицидлар дренаж сувларига ўтиб ундаги илга ўтиб қолишлари мумкин.*

◆ *симазин ишлаб чиқариш ёки ундан кўпроқ меъёردа нитрификация жараёнини 20-45 кунга пасайтириши, ТХА-На эса нитрификация қилувчи бактерияларни фаоллигини ошириши ва нитратларни тўпланишига олиб келади.*

Тупроқ микроббиотехнологияси: - тупроқ шароитида микроорганизмлар массасини, уларни фаолиятини ўрганиш қишлоқ хўжалигини замонавий усуллар билан ривожлантиришда асос бўлиб хизмат қилиб келмоқда. Тупроқ микроббиотехнологияси ютуқлари асосида микроорганизмлар фаолиятдан тўғри ва оқилона фойдаланиш орқали тупроқ унумдорлигини ошириш, юқори сифатли, экологик тоза ва мўл маҳсулот етказишимиз мумкин.

СИМБИОТИК АЗОТФИКСАЦИЯДА БИОТЕХНОЛОГИЯНИНГ ГЕНЕТИК АСОСЛАРИ

Ўсимлик ривожини чеклаб кўядиган омиллардан бири азот етишмаслигидир. Озуқа сифатида азот етишмай турган бир пайтда ўсимлик азот билан ўралган ҳолатда бўлади. Маълумки, биз нафас олиб турган ҳавонинг қарийиб 80% ини молекуляр азот (N_2) ташкил этади. Аммо бу азотни ўсимлик тўғридан -тўғри ишлата олмайди. ×унки, молекуляр азотни организмга сўрилиши учун нитрогеназа деб номланувчи фермент фаолияти керак бўлади. Бу фермент барча эукариотлар сингари ўсимликларда ҳам учрамайди. Азот ютиш қобилияти фақатгина баъзи-бир прокариот организмларда учрайди, холос. Бундай организмлар ўсимликлар билан симбиоз ҳолатда яшаб, фаолият

кўрсатадилар. Азот ютиш тизимини сунъий (ташқаридан туриб) ташкил қилиш учун энг аввало симбиотик азотфиксация жараёнининг генетикасини яхшилаб ўрганиб чиқиш лозим бўлади.

АЗОТФИКСАЦИЯ ТИЗИМИНИНГ ХИЛМА-ХИЛЛИГИ ВА УЛАРНИНГ АСОСИЙ ХУСУСИЯТЛАРИ

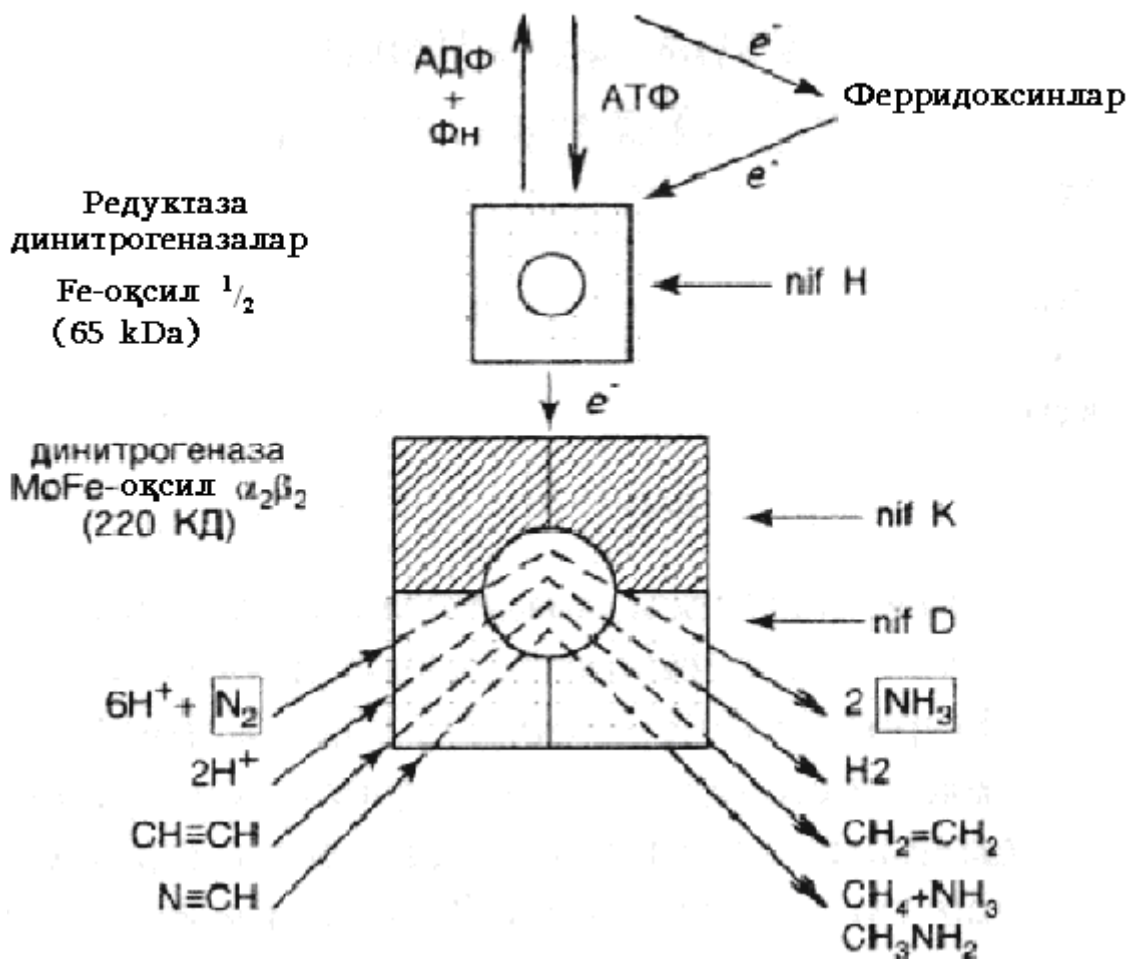
Азотфиксация хусусияти маълум бир таксонга мансуб микроорганизмларгагина хос эмас. Бундай хусусиятга деярли барча асосий гуруҳларга мансуб бўлган прокариотлар: грамманфий ва граммусбат эубактериялар, цианобактериялар, актиномицетлар ва архебактериялар эгалар. Кўпчилик азотфиксация қилувчи микроблар диазотрофлар ҳисобланадилар, чунки улар молекуляр азотни (N_2) ягона азот манбаи сифатида ишлата оладилар. Аммо баъзи-бир бактериялар молекуляр азотдан фақатгина ўсимликлар иштирокидагина фойдалана оладилар холос (*Rhizobium, Frankia*). Ниҳоят, бир қатор микроблар (*Azorhizobium, Anabaena, Nostoc*) ўзларида ҳам диазотрофия ҳамда ўсимликлар билан симбиозда яшаш хусусиятларини намоён этадилар.

Нитрогеназа реакцияси. Юқорида айтиб ўтилганидек, молекуляр азотни қайтарилиш реакцияси нитрогеназа ферменти иштирокида амалга оширилади (4.1- расм). Бу фермент уч хил типдаги оксилдан (α , β , γ) ва иккита: молибден-темир (MoFe) сақловчи ва темир (Fe) сақловчи кофакторлардан ташкил топган. Нитрогеназа икки суббирликдан иборат. Улардан бири катта-динитрогеназалар бўлиб таркибида MoFe-кофакторлари сақлайди (баъзан уларни II-компонент ҳам деб аташади). Иккинчиси эса кичик-динитрогеназалар редуктазаларидан иборат бўлиб, Fe-кофактори (I-компонент) сақлайди. Молекуляр азотни қайтарилиши уни (N_2) MoFe-кофактори билан ўзаро таъсири оқибатида (яъни динитрогеназада) амалга ошади. Редуктазаларни асосий вазифаси электронларни динитрогеназага узатиб туришдан иборатдир. Темир ионлари ҳар икки компонент таркибида, гемин (динитрогеназалар редуктазалари) ёки ногемин (динитрогеназаларда) шаклда учрайди.

Қанчалик мураккаблигига қарамадан нитрогеназа жуда ҳам паст бўлган субстрат спецификлигига эга. Бу фермент қатор уч боғли кўшбоғ сақлаган бирикмаларни қайтариш хусусиятига эга. Жумладан, 4.1-расмда акс эттирилганидек, бу ферментда ацетиленни этиленгача қайтариш хусусияти ҳам намоён бўлади.

Нитрогеназа ферментининг тузилиши: уч хил типдаги оксил (α , β , γ) катта динитрогеназа икки кофактор: MoFe Fe кичик динитрогеназа редуктаза

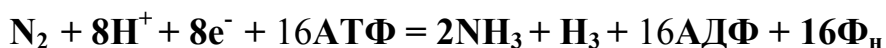
Хужайра метаболизми



12-расм. Нитрогеназалар функцияси ва тuzилиши

Баъзи бир чегараланишларга қарамасдан (ацетилен иштирокида нитрогеназани баъзи-бир хусусиятларини ўзгариши; ўсимлик билан микроб симбиозидида ацетиленни ўсимлик хужайраларининг физиологик хусусиятларига таъсири ва ҳ.к.) мана шу реакцияга асосланган ацетилен усули нитрогеназа ферментини аниқлаш билан боғлиқ бўлган генетик ва селекцион ишларда кенг қўлланилиб келинмоқда.

Қуйида нитрогеназа ферменти катализ қиладиган реакциянинг умумий кўриниши келтирилган:



Кўришиб турибдики, нитрогеназа реакцияси жуда кўп энергияга талабчан реакциядир. Нитрогеназа ва унга хизмат қиладиган ферментлар синтези ҳам (нитрогеназа оқсилларини ҳосил бўлишини назорат қилувчи коферментлар синтези, электронлар узатиш ва азотфиксация маҳсулотлари ассимиляцияси ва ҳ.к.) жуда катта энергия талаб қилади. Олимларнинг ҳисоб китобларига қараганда, 1 г азотни фиксация қилиш учун 100-200 г глюкоза сарфланиши керак экан. Шунинг учун ҳам микроблар фақат азот танқис бўлган ва энергия

етарли бўлган шароитдагина нитрогеназа ферментини синтез қилишлари мумкин.

Микроорганизмлар учун энг қулай ва фойдали энергия манбаи бўлиб, фотосинтез ва оксидланган фосфорланиш жараёнлари ҳисобланади. Аммо нитрогеназа ферменти эркин кислородга жуда ҳам сезгир бўлгани сабабли бу жараён қийинчилик билан ўтади. Маълумки, нитрогеназа ферменти жуда кам микдорда O_2 бўлган муҳитда ҳам ўз фаоллигини йўқотади. Шунинг учун ҳам азот тўпловчи микробларда нитрогеназани эркин кислороддан химоя қиладиган ва шу орқали керакли энергияни қабул қила оладиган хилма-хил механизмлар мавжуд. Масалан, симбиоз бўлмаган эркин яшовчи диазотроф микробларда, ёки нитрогеназани синтез қилувчи генлар анаэроб ёки микроаэрофил шароитларда фаоллашади (архейлар ва эркин яшовчи эубактериялар) ёки азотфиксация қилувчи бактериялар (ҳужайралар) қалин қобиқ ҳосил қилади, бу эса кислородни жуда ҳам секин ва кам ўтказди (цианобактериялар). Ўсимликлар ва микробларни симбиози жараёнида нитрогеназани кислороддан химоя қилиш вазифасини ўсимлик бажаради.

Нитрогеназанинг синтези ва етилиши мураккаб *nif* - генлар тизими орқали бошқарилади. Уларнинг кўпчилиги барча азотфиксаторлар учун умумийдир. Масалан, яхши ўрганилган энтеробактериялар *Klebsiella pneumoniae* да бу тизим *Z* транскрипцион бирликка бирлаштирилган, ягона кластерга йиғилган 25 гендан иборатдир. *nifH*, *nifD*, *nifK* генлари нитрогеназани γ , α , β оқсилларининг синтези учун жавобгардирлар. *nifM*, *nifS*, *nifU*, *nifY* (*nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV*) Mo-Fe кофактори синтезини назорат қилади. Булардан ташқари *Klebsiella* 2 та бошқарувчи генни, яъни *nifA*, *nifH*, *D*, *K*, ва бошқа генларни транскрипция қилувчи оқсил синтезини, шунингдек *nifL* генининг махсулоти кислород ёки боғланган азот иштирокида *nif*-генлар транскрипциясини пасайтиради.

Аммо баъзи-бир азотфиксаторларда *nifL* гени учрамайди ва унинг вазифасини бошқа генлар бажаради.

Ўсимликларнинг азотфиксаторлар билан симбиози

Микроблар орасида азотфиксация қилиш хусусиятларини белгилаб бераётган омиллардан бири, уларни бундай хусусиятлардан истисно бўлган ва шу боис азотга эҳтиёж сезган организмлар билан симбиозда ҳаёт кечиришга мосланишларидир. Симбиозга мухтожлик энг аввало бошқа организмлардан (ҳайвонлар эса бу жараёнларни ўзлари бажарадилар) ёки органик чиқиндилардан (замбуруғлар сингари) азотли махсулотларни ўзларига сингдириб ололмайдиган ўсимликларда сезилади ва улар ёрдамида амалга оширилади.

Ўсимликлар билан ўзаро алоқада, тўғрироғи ўзаро таъсирда бўлиш хусусияти архебактериялардан бошқа барча гуруҳ азотфиксаторлар учун хосдир. Ўсимликлар билан симбиозда яшаб азотни ўзлаштирувчи микроорганизмларни уч гуруҳга бўлиш мумкин: биринчи, ҳужайра ичидаги симбионтлар (*Rhizobium*, *Frankia*, *Nostoc*, *Gunnerra* билан симбиозда) иккинчи

Ўсимлик ичидаги лекин, хужайрага кирмайдиган микроорганизмлар (*Anabaena* ёки *Nostoc*, *Azolla* билан симбиозда); эндофит бактериялар *Accetobacter* ва *Azoarcus* ва ниҳоят учинчи, илдизда яшовчи ассоциатив диазотрофлар (*Azospirillum*, *Flavobacterium*). Азотфиксация жараёнида иштирок этувчиларни ўзаро таъсири куйидаги умумий стратегияни белгилайди:

биринчидан, микроб ўсимлик учун зарур бўлган азотли моддаларни синтез қилади ва уларни ўз хўжайини хўжайрасига етказиб беради, оқибатда ўсимликни азотли моддаларга эҳтиёжи камайганлиги ҳисобидан уларнинг имкониятлари ошади, ўсимлик соғлом ўсиб, ҳосилдорлиги ошади;

иккинчидан, ўсимлик микросимбионтга ўз бағридан “бошпана” (экологик имконият) ажратиб беради, оқибатда азотфиксация қилувчи микробларни бошқа гуруҳ микроорганизмлар (ўзлари яшовчи) билан рақобат қилишдан сақлайди, ҳамда азотфиксация қилиши учун сарфланадиган энергетик харажатларни қоплайди.

Азотфиксация қилувчи микроорганизмлар билан фототроф организмлар симбиозида икки фундаментал биокимёвий жараёнларни, яъни азотфиксация ва фотосинтез жараёнларини симбиогенлик (бир-бирига фойда келтириб яшаш) кучайиши кузатилади.

Аммо, симбиотик ўзаро таъсирни азот метаболитларининг фотосинтез махсулотларига алмашиш деб қараш унчалик аниқ бўлмас эди. Кўпгина ўсимликларни азотфиксация қилувчи бактериялар билан ўзаро таъсири жараёнида, ҳамкорларни (ўсимлик ва микроб) бир-бирларига жуда яқин (структуравий-функционал) тузилиши ва фаолият кўрсатиши кузатилади. Бу жараён ўсимлик ва бактерия генларини ўзаро бошқариш ва мувофиқлашган экспрессиясига асослангандир. Бу эса ҳамкор хужайралар фаолиятларини табақаланишига ҳамда улар орасида кучли бошқарув муносабатларини кузатилишига олиб келиши мумкин.

ДУККАКЛИ ЎСИМЛИКЛАР ВА РИЗОБИАЛ БАКТЕРИЯЛАР СИМБИОЗИ

Дуккакли ўсимликлар (*Fabaceae* оиласи) ва тугунак бактериялар (ризобийлар) ўртасидаги симбиотик муносабатлар организмлараро энг яхши ўрганилган тизимлардан бири ҳисобланади. Бу бир қанча сабаблар билан изоҳланади. Ризобиял бактериялар (*Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) факултатив симбионтлар ҳисобланиб, улар *ex planta* (ўсимликдан ажралган) ҳолатда ҳам ўса оладиган ва барча замонавий молекуляр-генетик усуллар билан тадқиқ этиш учун қулай манба бўлиб ҳисобланадилар.

Дуккакли ўсимликларни тугунаклари ўсимликларнинг бир қатор асосий вазифалари: сигнал жараёнлари ва генлар экспрессияси, хужайрани

табақаланиши ва органогенез, азот ва углерод алмашинувини таҳлил қилиш ва бошқа жараёнларни ўрганишда жуда ҳам қулай моделі бўлиб хизмат қила олади. Ниҳоят, энг муҳими дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактериялар симбиозини ўрганиш уларнинг катта амалий аҳамияти билан ҳам боғлиқдир: кўпчилик дуккакли ўсимликлар асосий қишлоқ хўжалик экинлари қаторига киради, уларнинг ҳосилдорлигини ошириш эса бугунги куннинг энг долзарб масалаларидан бири бўлиб ҳисобланади.

Ризобийлар билан ўсимликларнинг ўзаро муносабати, уларни юқори даражадаги спецификлиги (ўзига хослиги) билан тавсифланади (-жадвал).

Энг аввало, симбиоз муносабатларини фақатгина дуккакдошлар оиласига хослиги (биргина истисно сифатида дуккаклиларга мансуб бўлмаган *Parasponia* ўсимлигини (*Ulmaceae* оиласи) ризобийлар билан тугунак ҳосил қилиши), иккинчидан, кўпгина ризобиал бактериялар дуккакдошларнинг чегараланган ягона авлодига мансублиги (*R.galegae*, *R.leguminosarum bv.trifolii*), ёки таксономик жиҳатдан бирмунча яқин авлодлар (*R.meliloti*, *R.leguminosarum bv viceae*) доирасидагина содир бўлиши билан тавсифланади.

Дуккакли ўсимликлар билан ризобиал бактериялар ўртасидаги симбиознинг ривожланиши - мураккаб кўп босқичли бўлиб, у тўрт гуруҳ жараёнлардан иборат:

Биринчи, дастлабки (юқишдан олдинги) муносабат;

Иккинчи, тугунаклар морфогенези;

Учинчи, эндосимбионтлар тараққиётининг бошқарилиши;

Тўртинчи, тугунакларнинг азотфиксация аъзоси сифатида фаолият кўрсатишини ўз ичига олади.

Юқорида кўрсатиб ўтилган жараёнларнинг барчаси бактериялар томонидан ҳам, хўжайин-ўсимлик томонидан ҳам қатъий назорат остида туради.

Дастлабки (юқишдан олдинги сигнал) ўзаро муносабатлар

Ҳар қандай симбиотик муносабатларда ҳамкорлар ўртасида молекуляр сигналлар алмашинуви содир бўлади. Симбиознинг бошланғич босқичларидаги сигнал организмларнинг эркин ҳолатидан симбиотик муносабатга ўтишларини таъминлайди, биров кейинги боқичларда эса -метаболитик ва морфогенетик жараёнлар симбиознинг фаолият кўрсатишини таъминлайди.

Сигналлар кўпинча нишон-генлар транскрипцияси ва трансляцияси даражасида фаолият кўрсатади, бу эса симбиозни юксак организм генлари дифференциал экспрессиясини ўрганиш учун жуда қулай моделга айлантиради.

**Тугунак бактериялар ва дуккакли ўсимликлар муносабатларининг
спецификлиги**

Бактериялар	Ўсимликлар
<i>R.meliloti</i> ,	<i>Medicago</i> (беда), <i>Melilotus</i> (қашқарбеда), <i>Trigonella</i> (йўнғичқа)
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv.trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (себарга)
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv.viciae</i>	<i>Pisum</i> (рус нўхат, окбурчок), <i>Vicia</i> (вика), <i>Lathyrus</i> (нўхатак), <i>Lens</i> (ясмиқ)
<i>R.leguminosarum</i> <i>bv phaseoli</i> (<i>R.etli</i>), <i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i> (ловия)
<i>R.galegae</i>	<i>Galega</i> (козлятник)
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine</i> (соя)
<i>Mezorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> (лядвинец), <i>Lupinus</i> (люпин, бўри дуккаги)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i> (соя)

Сигналлар синтези ва ажралиши

Тугунак бактериялар ва ўсимликлар ўртасидаги симбиоз ризобийларнинг ўсимликларнинг флаваноидларига таъсирдан бошланади, бу эса бактерияларни вирулентлигини (***nod***, ***nodulation*** - инглиз тилидан- тугунак ҳосил бўлиши) генларини фаоллашишига олиб келади. Мазкур генлар назорати остида ризобийлар тугунаклар тараққиётининг бошланғич босқичларини жадаллаштирувчи липо-хито-олигосахаридлар ***Nod***-факторларини синтезлайди. Ҳозирги вақтга қадар ризобийларда 50 дан ортиқ вирулентлик генлари аниқланган. Улардан баъзилари барча ризобийлар учун “умумий” (тузилиши ва фаолияти бўйича бир хил) бўлса, бошқа бирлари ҳар бир тур ёки ҳар бир штамм учун ўзига хосдир. “Умумий” ***nod*** генлар (***nodA***, ***nodB***, ***nodC***) даги мутациялар симбиознинг дастлабки ривожланиш босқичи -илдиз тукчаларининг буралиши босқичининг бузилишига (ўзгаришларига) олиб келади. Хўжайинга хос генлар (***nodH***, ***nodP***, ***nodQ***, ***nodZ***) мутациялари натижасида одатда симбиотик муносабатларнинг сўнгги, инфекцион иплар ва тугунак меристемалари ҳосил бўлиши билан боғлиқ бўлган босқичлари бузилади.

Мазкур вирулентлик генлари гуруҳлари орасидаги асосий фарқлар уларнинг ҳар хил турга мансуб ризобийлар ўртасидаги кўчишида ҳам яққол намоён бўлади. Хўжайинга хос генларнинг кўчиши донор-штаммнинг хўжайин-ўсимлигида реципиент -штаммнинг тугунак ҳосил қилиш хусусиятига эга бўлишига олиб келади. “Умумий” ***nod*** генларнинг кўчишида бундай ҳолат кузатилмайди, агар реципиент ўзининг “умумий” ***nod***-генлари ўзгарган (бузилган) авирулент мутант бўлса, унда дастлабки она ўсимлик-хўжайинда тугунак ҳосил қилиш хусусияти тикланиши кузатилади.

Иккала гуруҳ генлари ҳам индуцибел ҳисобланадилар: уларнинг фаоллигини дастлаб ризобийларнинг ўсимлик ризосферасига тушган вақтидагина қайд этишга муваффақ бўлинган.

Бунда дуккакли ўсимликлар илдизлари ёки уруғларидан ажралиб чиқадиган флавоноидлар бактерия оксили **NodD** билан боғланади, у эса қолган **nod**-генлар (**nodD**- ризобийларнинг алоҳида мустақил ишлайдиган вирулентлик гени) транскрипциясини фаоллаштириш хусусиятига эга бўлади. **nodD**- гени транскрипцияни бошқарувчи генлар оиласининг вакили бўлиб, бу оилага жуда яхши ўрганилган **lysR** ва **araC** генлари ҳам киритилади. **NodD** оксида иккита домен: ДНК билан боғланадиган кучли консерватив N-қисм ва тахминларга кўра, флавоноидлар билан боғланадиган C-қисм мавжудлиги аниқланган. **NodD** оксили ризобиал хужайранинг флавоноидлар ўтадиган ички мембранаси билан боғланган бўлади. Улар билан муносабатга киришган **NodD** оксили ўзининг конформациясини ўзгартиради, натижада унда вирулентликнинг индуцибелў генлари промотор қисмида жойлашган консерватив кетма-кетлик “**nod-box**” билан боғланиш имконияти туғилади. Оқибатда мазкур промоторларнинг РНК-полимеразага ўхшаш қисмлари кўпаяди ва уларнинг транскрипцияси кучаяди.

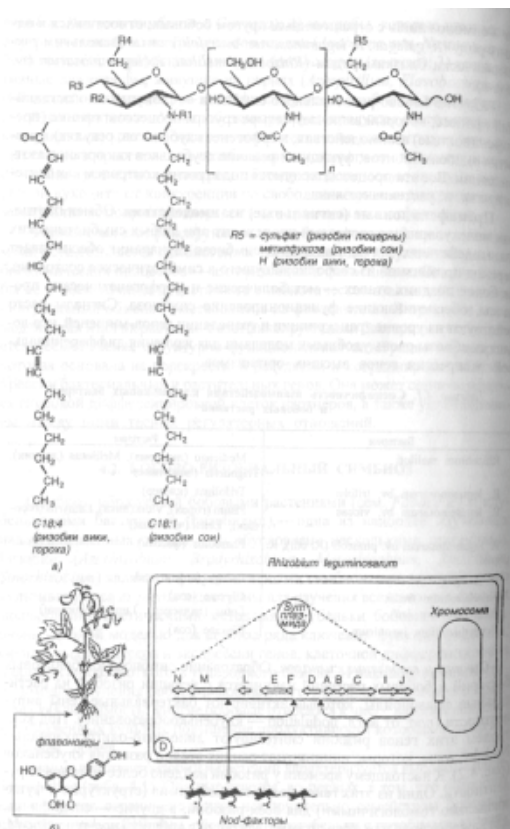
Вирулентлик генлари фаолиятининг охириги маҳсулоти **Nod**-омиллар бўлиб, уларни синтез қилиш қобилияти ризобийларнинг ноёб хусусиятидир. Бу омиллар N-ацетилглюкозаминнинг 3-6 қолдиғи ва 16-20 та углерод атомидан иборат бўлган тўйинмаган ёғ кислотаси радикалини сақловчи модификацияланган липо-хито-олигосахаридлардан иборат (4.2, а-расм). Мазкур омиллар биосинтези қуйидаги жараёнларни ўз ичига олади (4.3-расм):

1. *1-4-β-глицозидли боғлар ҳосил бўлиши билан кечадиган N-ацетилглюкозамин (NodM-оқсили назорати остида фруктозадан синтезланувчи) нинг полимеризацияси. NodC оқсили катализлайдиган мазкур реакция хитин олигомерлари ҳосил бўлишига олиб келади;*
- 2) *глюкозаминнинг «редукцияланмайдиган» қолдиқ қисмини R1 ҳолатда (NodB блоки томонидан катализланади) деацетилланиши ва ёғ кислотаси қолдиғини азот атомга бирикиши (NodA оқсили катализлайди);*
- 3) *ҳосил бўлган липо-хито-олигосахарид модификацияси (Nod – омилнинг пўстлоқ қисми); водород атомлари «редукцияланадиган» ва «редукцияланмайдиган» учларда турли хил радикал (фукозил, сульфат, метил, ацетил ва ҳ.к.) ларга жойлашади.*

Шуни таъкидлаш лозимки, Nod – омил биосинтезининг мазкур босқичлари Nod-генларнинг турли гуруҳлари томонидан назорат қилинади: пўстлоқ қисмининг синтези «умумий» Nod-генлар назорати остида бўлса, унинг модификацияси эса - хўжайинга хос генлар назоратида бўлади.

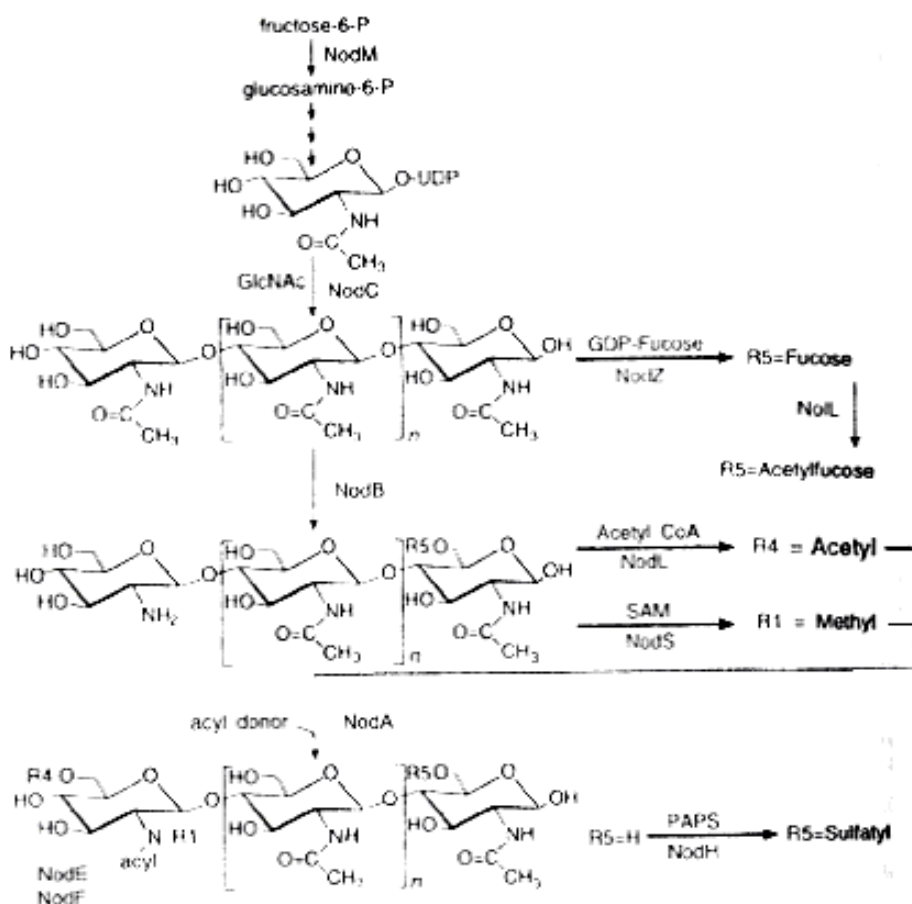
Nod-омилларнинг тозаланган жуда ҳам кам атиги 10^{-8} – 10^{-12} М миқдори симбиозни шаклланишининг дастлабки босқичлари: илдиз тукчаларининг буралиши; тугунак меристемаларини пайдо бўла бошлаши; баъзи дуккаклилар (беда) да эса ҳаттоки тугунаклар гистогенезининг бошланғич босқичлари каби жараёнларни жадаллаштиради.

Nod-омилларни 5-10 минут давомида *Vicia sativa* ўсимлигига таъсир этирилганда, 1 соатдан кейин содир бўладиган илдиз тукчаларининг деформациясига (шакл ўзгариши), 3 соат ўтгач эса, илдизнинг шимувчи қисмларидаги илдиз тукчаларининг ярмидан кўпроғининг шакл ўзгаришларига олиб келади. Nod-омиллар чақирадиган дастлабки биокимёвий реакциялар (инокуляциядан 10 минут ўтгач содир бўладиган), илдиз тукчалари хужайра мембранасининг қутбсизланиши (деполяризацияси) ва эпидермис хужайраларида ион оқимларининг модулланиши ҳисобланади.



12-расм.
 Тугунак бактериялар ва дукакли
 ысимликлар орасидаги ызаро
 сигналли тизим:

Шуни қайд этиш керакки, Nod-омиллар – бу барча симбиотик ўзаро таъсирларнинг аълоқаларининг ўзига хослиги (спецификлигини) маълум даражада аниқлайдиган сигналлардир. Бунда хўжайинга хос генлар назорати остида амалга ошириладиган Nod-омилларнинг модификациялари муҳим рол ўйнайди. «Редукцияланадиган қисм» да R6 ҳолатининг сульфатланиши қашқарбеда ўсимлиги ризобийлари (*R. meliloti*) учун хос бўлиб, у «гомологик» хўжайинда кечадиган бошланғич симбиотик реакциялар индукцияси учун зарур бўлади, сульфат гуруҳларнинг бўлмаслиги эса худди шу реакцияларнинг индукциясига сабаб бўлади. Сульфатланиш жараёнини амалга оширувчи **Nod H** оксилининг фаоллигини мутациялар оқибатида пасайиши *R. meliloti* бактериясини қашқар бедага нисбатан вирулентлигини йўқолишига ва вика ўсимлиги (*R. leguminosarum bv. viciae*) га нисбатан симбионтлик хусусиятига эга бўлган **NodH** генидан ажралган вирулентликни ҳосил бўлишига олиб келиши кузатилган.



13-расм.
Nod-омиллар
биосинтези:

- **GINAc** – N-ацетилглюкозаамин;
- **GDP-Fucose**-гуанозиндифосфо-фукоза;
- **Acetyl CoA** – ацетилкофермент А;
- **PAPS**– 3¹-фосфо-аденозин-5¹-фосфосульфат;
- **SAM**– S-аденозил-метионин.

Nod-омилларни модификацияларининг хўжайинга хослик белгисини назорат қилишдаги иштирокининг энг яхши ўрганилган томони бу – **NodX** гени катализлайдиган R6 ҳолатининг «редукцияланувчи қисм»ида ацелирланишидир. Бундай модификация нўхат ўсимлигининг тугунак бактериялари (*R.leguminosarum bv viciae*) га «афғон» нўхатларини зарарлаш (инфекциялаш) хусусиятини беради.

Маълумки, «Афғон» нўхатлари **Sym2** аллеллари бўйича гомозигот бўлганликлари сабабли мазкур бактериялар билан инокуляцияланишига мойиллиги бўлмайди. **NodX** генини сақламаган штаммларга бу генни кўчириб ўтказилганда, бу штаммлар ацетилланган **Nod**-омилни синтезлаш қобилиятига эга бўладилар ва «афғон» нўхати ўсимлигида тугунак ҳосил қила оладилар. Ўсимликларнинг **Sym2** генлари назорат қилувчи чидамлилигини енгиш хусусияти ризобийларга **R6** ҳолатини фукозилланишини белгилайдиган **NodZ** генини кўчириб ўтказилганда ҳам ҳосил бўлиши кутилмаган ходиса бўлди. Бу ген соя тугунак бактерияларидан ажратиб олинган бўлиб, у «афғон» нўхатларида ҳаттоки энг дастлабки симбиотик реакцияларни ҳам чақира олиш хусусиятига эга эмас.

Сигналлар рецепцияси ва процессинги

Nod омилларнинг синтези ва фенотипик самараси яхши ўрганилган, бунга сабаб, уларни бактериялар томонидан озуқа муҳитига ажралиб чиқиши ва шу туфайли, уларнинг фаолиятини *in vitro* тизимида осон моделлаштириш мумкинлигидир.

Бактериал сигналлар рецепцияси ва унинг ўсимликка узатилиши кетма-кетлигини ўрганиш бирмунча қийин ҳисобланади. *Nod*-омилларнинг рецептори сифатида ўсимликларнинг лектинлари қаралади.

Уларнинг симбиоздаги ролини ўрганишга бўлган қизиқиш 1970-йилларнинг охирларида янада ортди, бу даврга келиб илдиз тукчалари юзасига ризобиал хужайраларнинг адсорбцияланиши натижасида туганакларнинг ривожланиши, ризобий хужайралари ташқи сатҳидаги полисахаридларни дуккаклилар лектинлари билан ўзаро таъсири билан боғлиқ эканлиги аниқланди.

Симбиознинг ўзига хослигини, ўсимлик хужайралари ва бактерияларнинг ташқи структураларининг ўзаро комплементар таъсири асосида изоҳлайдиган «лектинли» назария 1980 йиллар бошида тақдим этилди. Турли хил дуккакли ўсимликларни, илдиз лектинларининг баъзи фракциялари синтезини назорат қилувчи генларни кўчириб ўтказилиши симбиотик хусусиятларнинг кенгайишига олиб келди.

Дуккакли ўсимликларни *in vitro* шароитларида *Nod*-омиллар билан ўзига хос боғланиш ҳосил қиладиган илдиз лектинлари фракциялари аниқланди ва уларни симбиоз муносабат ҳосил бўлишида ўта муҳим эканлиги кузатилди. Масалан, мазкур лектинларга қарши антитаналар билан ишлов берилган илдизларда тугунак ҳосил бўлмаслиги исботланди. Шунинг учун ҳам ўсимлик лектинлари *Nod*-омиллар рецепцияси тизимининг камида битта компонентларидан бири бўлиб хизмат қиладилар деган хулосага келинган.

Nod-омилларнинг тузилиши ва тугунак ҳосил бўлишининг ўзига хослиги ўртасидаги боғлиқликни изоҳлайдиган назариялардан бири ўсимлик хитиназалари таъсирига чидамлилиқни мазкур омиллар модификациялари белгилайди деган ғояни илгари суради.

Дуккаклилар илдизи бир қатор хитиназаларни (шунингдек хитиолигосахаридларни парчалайдиган бошқа хил литик ферментларни ҳам) синтезлаши аниқланди. Бунда:

- а) баъзи хитиназаларнинг синтези *Nod*-омиллар томонидан фаоллашиши,
- б) хитиназаларга чидамлилиқ *Nod*-омиллар тузилмасига боғлиқлиги кабилар келиб чиқди.

Юқорида мисол келтирилган *R. leguminosarum* bv *viciae* нинг «афғон» нўхати билан ўзаро таъсири шуни кўрсатадики, *Nod*-омилнинг ўсимлик хитиназаларига чидамлилиги R6 ҳолатнинг модификацияси натижасида қолдиқ қисмининг қайси бирига (ацил ёки фукозил гуруҳ) мансублигидан қатъий назар ортиши аниқланди.

Айнан шу мўътадилланиш R6-модификация қилинган сигналларни ҳосил қиладиган бактерияларнинг Sym-2 аллеллар кодлайдиган бардошлиликни енгишини белгилайди. Шунингдек, ўсимлик рецепторлари билан Nod-омилнинг ўзи эмас, балки литик ферментлар таъсири натижасида нишон-хужайраларда ҳосил бўладиган унинг процессинги махсулотлари ўзаро муносабатга киришиши эҳтимоли жуда юқоридир.

Симбиознинг тузилмавий асоси тараққиёти

Дуккакли ўсимликларнинг тугунаклари бир-бирлари билан ўзаро боғлиқ бўлган қатор комплекс вазифаларни бажариб, эндосимбионтлар учун экологик макон, шериклар ўртасида метаболитлар алмашинуви учун тузилмавий асос бўлиб, бактерияларнинг физиологик фаоллиги ва уларнинг сонини назорат қилишга хизмат қилади. Тугунаклар ўсимликнинг тараққиёт генетикасини ўрганиш учун ажойиб модель бўлиб ҳисобланади.

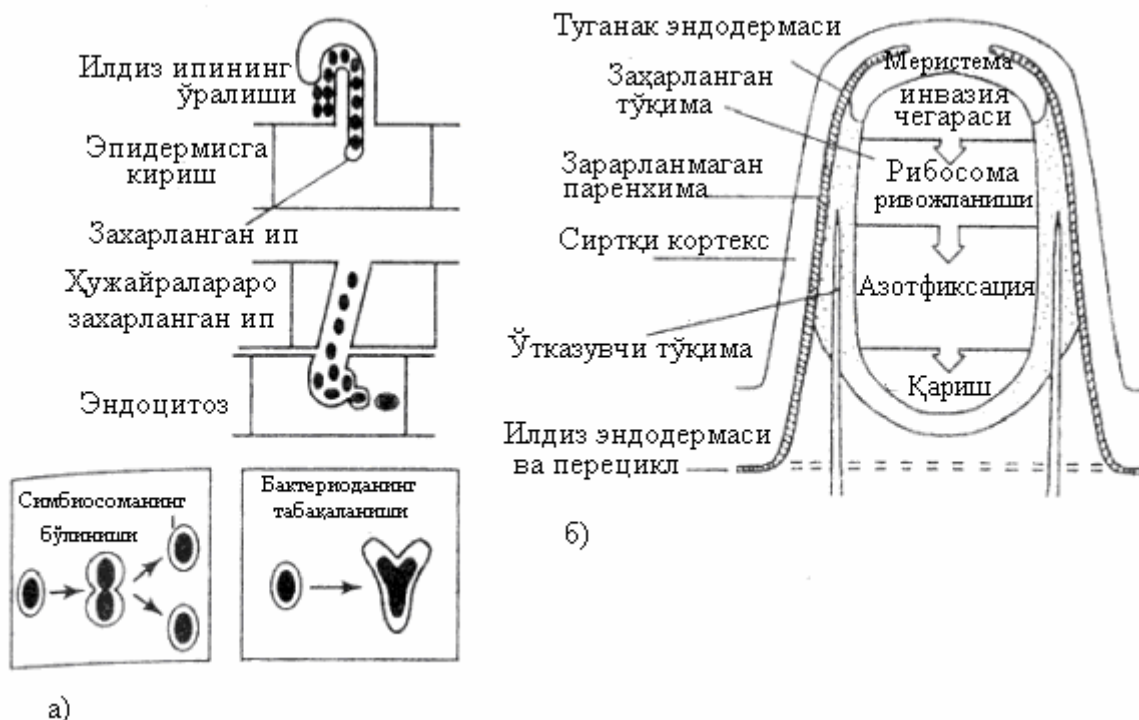
Тугунаклар тараққиёти, бошқа аъзолар сингари генларнинг дифференциал (ихтисослашган) экспрессиясини чақирувчи сигнал жараёнларига асосланади. Бироқ симбиоз муносабатларда бу жараёнлар ўсимликка шерик орқали тушадиган экзоген сигналлар билан боғлиқ, бу сигналлар таъсирини қатор ҳолатларда лаборатория шароитларида, шу билан бир қаторда *in vitro* тизимидан фойдаланиш орқали ҳам нисбатан осон ўрганиш мумкин.

Бундан ташқари тугунакларнинг ҳосил бўлиши ўсимликлар учун нормал ўсиш ва кўпайишда шартли бўлмаган, яъни факультатив ҳолат ҳисобланадики, бу ривожланиш жараёнининг генетик ўзгарувчанлиги тўғрисида кенг, батафсил маълумот олиш имконини беради. Тугунаклар морфогенези учун зарур асосий генетик маълумот симбиоз ўсимлик шериги геномида жойлашган.

Шунга қарамасдан, морфогенларнинг бир қисми ризобийлар геномида сақланади. Бу эса тугунаклар тараққиётини ўсимлик геноми тузилмасига аралаштирмаган ҳолда, ўсимлик аъзоси тараққиёти ирсий дастурини ўрганиш ва модификация қилиш имконияти мавжудлиги туфайли янада кенгроқ генетик таҳлил қилиш имконини оширади.

Тугунаклар морфогенези

Бу қисмда нўхат, себарга ва беда каби дуккаклиларга хос «нодетерминацияланган поя» типига мансуб анча муфассал ўрганилган тугунаклар мисолида симбиознинг структуравий асоси тараққиётини кўриб чиқамиз (4.4-расм).



14-расм. Нўхатнинг азот ўзлаштирувчи тугунагининг тузилиши ва ривожланиши
 а) эндосимбиотик компартментлар тизимининг асосий ривожланиш босқичлари;
 б) тугунакнинг гистологик тузилиши (недетерминированнўй тип)

Мазкур дуккакликларнинг зарарланиши илдиз тукчалари орқали бориб, илдиз тукчалари буралиб «соябон ушлагичи» шаклини олади (*hac* босқичи, инглиз тилида *hair curling*). Тукчаларнинг кескин буралиши билан бирга илдиз тукчаси хужайра қобиғининг гидролизи ва плазмолемманинг чуқур инвагинацияси содир бўлади, бу жараёнда ўсимлик хужайрасининг мембрана структуралари (Гольжи аппарати, эндоплазматик тўр) иштирок этади.

Шундай қилиб бактерияларнинг илдиз тукчаларни нофаол равишда эгаллаши ва тез орада микросимбионтни тўлиқ қамраб олиши кузатилади. Натижада бактерия хужайралари атрофида ўзига хос туннел – инфекция ипи (ИИ) ҳосил бўлиб, унинг деворлари ўсимлик хужайралари девори билан ўхшаш, ички бўшлиғи эса матрикс билан тўлган бўлиб, унинг ҳосил бўлишида иккала шерик ҳам иштирок этади (Inf босқичи, инглиз тилидан Infection thread formation).

ИИ тараққиёти билан бир вақтда тугунак меристемаси ҳосил бўлишига замин тайёрлана боради, у митоз жараёнлари реактивацияси, Nod-омил орқали индуцирланувчи кортекс хужайраларининг дедифференциацияси ва пролиферацияси (Ced босқичи, инглиз тилидан Cortical cell division) билан боғлиқ бўлади. Ҳосил бўлган тугунак примордийларида гистогенез жараёнлари бошланади (Ntd, инглиз тилидан Nodule tissue differentiation), унинг натижасида тугунакларнинг қопловчи, ўтказувчи ва азот тўпловчи тўқималари шаклланади. ИИ инокуляциядан 2-3 сутка ўтгач, илдиз тукчалари асосигача етиб боради ва кортексга ўтиб, ўсиб келаётган тугунак ичига кириб олади ва шу ерда ривожланиб, шохланади.

Эндосимбиоз тараққиётидаги асосий босқич бактерияларнинг ИИ дан ўсимлик хужайрасига ўтиши ҳисобланади, у эндоцитоз йўли билан амалга ошади (Ваг босқичи, инглиз тилидан Bacterial release). ИИ нинг ўсимлик хужайрасига ботиб кириш жойида вақтинчалик тузилмалар – инфекция томчилар шаклланиб, улардан бактерия сақловчи мембрана пуфакчалари ажралиб чиқади. Шундай қилиб бактериялар ҳеч қачон ўсимлик цитоплазмасида эркин жойлашмасдан, Гольжи аппарати ва эндоплазматик тўр иштирокида ҳосил бўлган «перибактероид» мембраналар ичида жойлашади, лекин улар алоҳида бактериал оксилларни ҳам сақлайдилар. ПБМ билан қопланган бактерия хужайраси (хужайралар тўплами) симбиознинг субхужайравий бирлиги – симбиосома ҳисобланади.

ИИ дан ажралиб чиққач, ризобийлар ўзларининг ўлчамларини ва таёқчасимон шаклини маълум вақтга қадар сақлаб қоладилар, шундан сўнг алоҳида шакл – бактероид шаклида (Вад босқичи, инглиз тилидан Bacteroid differentiation) ихтисослашадилар. Бактероидлар эркин яшовчи бактерияларга нисбатан анча йирик (3-5 баробар) бўлиб, уларнинг шакли себаргада шарсимон ва ноксимондан тортиб, нўхатда Y ва X симонгача бўлади.

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, бактерияларнинг ихтисослашуви уларнинг автоном ўсиши учун зарур бўлган кўплаб генларнинг репрессияси билан боғлиқ. Кўплаб муаллифларнинг фикрича, бу репрессия шунчалик чуқур давом этадики, бактероидлар шаклланган эркин яшайдиган тугунакларга айлана олмай қоладилар, тугунаклар нобуд бўлгач, улар ҳам нобуд бўладилар. Бактероидларда N_2 ни NH^+ га қайтарилишини катализловчи нитрогеназа, шунингдек нитрогеназа реакцияси учун хизмат қиладиган бошқа ферментлар синтези фаоллашади ва шундан сўнг атмосфера азоти ўзлаштирилиши жараёнлари (Nif, инглиз тилидан Nitrogen fixation) бошланади. Шундай қилиб, бактероидларни хўжайин ўсимликни боғланган азот билан таъминлаб берадиган ўсимликларнинг вақтинчалик органеллалари сифатида қараш мумкин.

Симбиосомаларнинг шаклланиши билан параллел бир вақтда ўсимлик хужайралари ихтисослашуви ҳам рўй беради. У ички ПБМ шаклланиши ва биосинтетик жараёнларда иштирок этадиган ички мембрана тузилмалари сони ортиши билан ифодаланади. Инфицирланган (зарарланган) хужайралар учун хроматиннинг транскрипцион фаоллашуви билан боғлиқ полиплоидизацияси ва деконденсацияси хосдир. Биокимёвий жиҳатдан уларнинг ихтисослашуви de novo бир қатор оксилларнинг синтези сифатида акс этади.

Кўрсатиб ўтилган жараён «нодетерминацияланган» типга мансуб мураккаб тузилган тугунакнинг шаклланиши билан тугалланади.

Унинг асосий тузилмалари:

а) молекуляр азотни ўзлаштирилиши кечадиган бактериялар билан зарарланган тўқима;

б) ўсимлик фотосинтатлари келиб тушадиган ва азотфиксация маҳсулотлари чиқиб кетадиган ўтказувчи толалар;

в) тугунакнинг ўсиши амалга ошадиган апикал меристема кабилар ҳисобланади.

Апикал меристема азотфиксация қилувчи тўқималарнинг доимий янгиланиб туришини таъминлайдики, унинг натижасида симбиознинг турли босқичларига мувофиқ зоналарга тугунакларнинг марказий қисмларини ихтисослашуви кузатилади.

Тугунаклар морфогенезининг асосий натижаси симбиотик шериклар (компаратментлар) нинг уйғунлашган тизимининг шаклланиши ҳисобланади, бу эса бактерияларнинг ҳужайралараро (инфекция иплари) шаклдан ҳужайра ичи (симбиосомалар) шаклига ўтишини таъминлайди.

Генетик таҳлил

Ҳозирги вақтда дуккаклиларнинг «симбиотик» генларини икки гуруҳи чуқур ўрганилмоқда. Биринчи гуруҳ генларини формал генетика усулларини қўллаш – симбиоз тараққиёти учун дефектли мутантларни таҳлил қилиш орқали аниқланади. Иккинчи гуруҳ генларни «тескари генетика» - симбиозда синтез бўладиган ген махсулотлари (оксиллар, мРНК) ни таҳлил қилиш усуллари орқали ўрганилади.

Тугунак ҳосил қила олмайдиган (Nod) ёки азотфиксация фаоллигини индуцирлаш хусусиятига эга бўлмаган ўсимлик мутантларини азотсиз муҳитда ўса олмаслик хусусиятига қараб танлаб олинади. Кўплаб дуккаклилар (нўхат, соя, беда, йўнғичка, ловия, нут, хашаки дуккаклилар, донник, себарга) да мутантларни қўллаш орқали симбиознинг ҳосил бўлиши ва фаолиятида бевосита иштирок этадиган 100 дан ортиқ генлар аниқланган (4.2-жадвал).

Симбиоз муносабат генетикасини ўрганишнинг қулай объекти ҳисоблаган – экиладиган нўхат (*Pisium sativum* L) да 40 дан ортиқ генлар аниқланган. Ўсимликларни тугунак ҳосил қилиш хусусиятига эга бўлмаслигини назорат қилувчи мутант аллеллар, камдан-кам ҳолларда, баъзи истисноларни инобатга олмаганда рецессив бўладилар.

Азотфиксация қилиш хусусиятига эга бўлмасликни назорат қиладиган аллеллар рецессив ҳам (нўхат, себарга, бедада) доминант ҳам (сояда) бўлиши мумкин. Симбиоз тараққиётига зарар келтирадиган мутантлар ўсимликларнинг морфологияси, ривожланиш тезлиги ва етилиши (фертилик) га таъсир кўрсатадилар.

Симбиознинг генетик таҳлиллари кўрсатишича, «ёввойи тип» даги тугунакларни ўрганиш натижасида аниқланган йирик босқичларни бирмунча майда («элементар») босқичларга бўлиш мумкин, уларнинг ҳар қайси кам микдордаги (ҳатто биргина) генлар билан назорат қилинади. Масалан, Itf босқичи 3 га бўлинади: Iti (инфекция ипи шаклланиши инициацияси), Ith (ипни илдиз тукчасидаги ўсиши), ва Itr (Иининг илдиз кортексидида ўсиши; Ваг эса икки босқичга: Itn (ИИнинг тугунак ҳужайралари ва тўқималаридаги тараққиёти ва Idd («Инфекция томчиси»нинг - ихтисослашуви).

Дуккаклиларнинг симбиотик генларини, уларнинг махсулотлари идентификацияси (кўпинча ўша махсулотларнинг ўзини) аниқлаш орқали уларни нодулинлар (агар улар тугунакларда *de novo* да фаоллашса) ёки Nst-генлар (илдизга нисбатан тугунакларда фаоллик сезиларли орта борса) деб

аталади. Мазкур генларни аниқлаш учун тугунак ёки стерил илдизларда синтезланадиган, ёхуд азотни ўзлаштирадиган ёки ўзлаштирмайдиган тугунакларда оқсил (РНК) спекторларини таққослаб ўрганилади.

4. жадвал.

Симбиознинг асосий босқичларини назорат қиладиган дуккакли ўсимликларнинг генлари

Тараққиёт босқичлари	Кодлар	Маълум босқични назорат қилувчи генлар (дуккаклилар турлари)*
Преинфекция (инфекция олди)		
Ризобийларнинг вирулентлик генларининг индукцияси	<i>NgI</i>	топилмаган
Илдиз тукчалари деформацияси	<i>Nac</i>	sym 8, sym 9, sym19, sym 30 Ps; rj=nodI (Gm); rnI (Ca) nn1, nn2 (Ms); syv 3 (Ma)
Тугунаклар морфогенези		
Инфекция типларининг шаклланиши	<i>Itf, Iti, Ith</i>	Sym 7, sym 14, sym 35 (Ps), sym I, sym 5 (Ma), r, t(Tr) Sym 2, sym 36 (Ps)
Кортикал хужайралар бўлиниши индукцияси	<i>Itr, ccd</i>	sym 5, sym 34 (Ps) sym 5(Ps)
Тугунак тўқималари ихтисослашуви	<i>Ntd</i>	sym 33 (Ps)
Ўсимлик цитоплазмасига бактерияларнинг эндоцитози	<i>Bar, Itn, Idd</i>	sym 33 (Ps), d, It, ic (Tr) sym 40 (Ps)
Бактероидлар ихтисослашуви	<i>Bad</i>	sym 31, sym 32 (Ps), in ₁ , in ₂ , in ₄ , in ₅ (Ms)
Эндосимбионлар тараққиётининг бошқарилуви		
Тугунак ҳосил бўлиши авторегуляцияси	<i>Aut</i>	Nod 3, sym 28, sym 29(Ps), sym 5(Vf), Nod(Pv), ntsI-nod 2(Cm)
Тугунаклар фаолияти		
Азот ўзлаштирилиши	<i>Nif</i>	Ўсимлик мазкур босқичда издан чиққан мутантлар Bar ⁻ , Bad ⁻ , ёки Nor ⁻ фенотипларига эга бўлади
Тугунаклар барқарорлиги	<i>Nop</i>	Sym 13, sym 25, sym 26, sym 27 (Ps)

*Ca – *Cicer areatinum* L., Gm – *Glycine max* (L.) Merr., Ma – *Melilotus albus* Medik, Ms – *Medicago sativa* L., Pv – *Phaseolus Vulgarus* L., Ps – *Pisum sativum* L., Tr – *Trifolium pratense* L., Vf – *Vicia faba* L.

Нодулинлар Nst генларни мос равишда «эртанги» (азотфиксация бошлангунга қадар фаоллашадиган) ва кечки (азотфиксация бошланиши билан ёки азотфиксация даврида фаоллашадиган) турларга бўлинади.

Кўпгина тугунакка хос оқсиллар учун субхужайравий (жойлашув) (ўсимлик хужайраси цитоплазмаси, бактериод олди мембранаси, инфекция ипи девори) ёки ферментатив фаоллик (кўплаб «кечки» нодулинлар) азотли ёки углеродли фермент алмашинувининг изоформаси ҳисобланади.

Уларнинг қаторига тугунак паренхималарида фаол синтезланадиган ENOD2 нодулини ва ИИ деворларида тўпланадиган ENOD12 ва ENOD5 ни киритилади (4.3-жадвал).

Эндоцитоз даврида синтез бўладиган нодулин N-26, ПБМ таркибига киради, у шериклар ўртасидаги регулятор ёки трофик омилларнинг транспорти учун зарур бўлса керак деган фикрлар мавжуд.

5-жадвал.

Дуккаклиларнинг эртаги нодулинлари

Генлар	Ўсимликлар	Нодулинларнинг тавсифи	Тугунаклар ичида жойлашуви	Тахмин қилинадиган фаолияти
ENOD2	Нўхат, соя, вика, беда, себарга	Хужайра деворининг экстенсинларига ўхшаган оқсил-гидроксиролин	Паренхима	Кислородли тўсиқнинг шаклланиши
ENOD5	Нўхат	Сигнал кетма-кетликларга эга ва пролинга бой бўлган домен (тузилма)	Инфекция иплари охирини сақловчи хужайранинг зарарланиш зонаси	Инфекцияда (зарарланиш) иштирок этиш
ENOD12	Нўхат, ловия, беда, мош, нут, дук-лар	Пролинга бой бўлган қисмларга эга	Инфекция зонаси	Инфекция иплари ва хужайра деворини қуриш
ENOD40	Соя, нўхат	Структураси жиҳатидан РНК-бошқарувчи (регулятор) ни эслатади	Ўтказувчи боғламларнинг перицикли	Гормонал мувозанатни аниқлаш (мувофиқлаш - тириш)

Тугунаклар таракқиётида фитогормонларнинг ролини ўрганиш жуда катта қизиқиш уйғотади. Аниқланишича, илдизларга ауксинлар транспорти

ингибиторлари билан ишлов бериш тугунаксимон тузилмаларнинг ҳосил бўлишига олиб келар экан.

Тугунак ўсишининг гормонал статусида иштирок этадиган ENOD40 нодулини ҳам аниқланган. Унинг вазифаси эндосимбионт таъсирида ўзгарадиган ауксин ва цитокининлар мувозанатини назорат қилиш билан боғлиқ бўлиб, у тугунаклар гистогенези ҳамда тугунакли примордийлар шаклланишида асосий ўрин тутуди. Шуни ҳам қайд этиш лозимки, кўплаб нодулинларнинг вазифаси тўғрисидаги гипотезалар олдиндан аниқланган оқсиллар билан аминокислота қисмларини солиштириш орқали таҳлил қилишга асосланади. Нодулинлар симбиоз тараққиётида айнан шу вазифаларни бажаради, деган тўғридан тўғри далиллар кўп ҳолларда ханузгача аниқланган эмас.

Эндосимбионтлар тараққиётини бошқариш

Симбиознинг структуравий (тузилмавий) асоси шерикларнинг бошқарувчилик ўзаро алоқалари билан боғлиқ бўлиб, уларнинг натижаси симбиотик тузилмаларнинг тараққиёти мувозанати, шунга мос равишда ризобийлар сони ва кўпайиш тезлигининг ортиши билан изоҳланади. Бундай регуляция жуда муҳим бўлиб, бактерияларнинг потенциал бўлиниш тезлиги ўсимликларга нисбатан анча юқоридир. Эндосимбионт микроорганизмларнинг назорат қилинмайдиган кўпайиши хўжайин орган учун кўп ҳолларда зарарлидир, унинг симбионтлар кўпайишини қатъий назорат қилиш хусусияти мутуалитик симбиознинг паразитизмдан фарқ қилишда муҳим асос бўлиб ҳисобланади.

Симбионтларни хўжайин организмнинг ҳимоя тизимлари билан ўзаро муносабати

Симбиознинг шаклланишида дуккакли ўсимликларга патоген микроорганизмлар кириши натижасида содир бўладиган сингари бир қатор ҳимоявий жараёнларни кучайиши кузатилади. Бу флавоноидлар, феноллар, хитиназалар, каллозалар, пероксидазалар ва бошқа биологик фаол моддалар синтезининг тезлашишидир.

Бироқ тугунакларда бу реакциялар патогенлар билан зарарланиш сингари кучли эмас, шунинг учун ҳам бу реакцияларнинг натижаси микроорганизмларнинг фаоллигини бутунлай тўхтатишда эмас, балки уларни метаболитик фаолликларини ҳамда кўпайиш жараёнларининг бошқарилувида кузатилади. Бу симбиотик тизимни ривожланиш жараёнида бактериялар билан ўсимликларнинг ҳимоя тизимлари орасида нозик ўзаро мувофиқлашган таъсири борлиги билан боғлиқдир.

Ўзаро муносабатларнинг мувозанатлашуви ризобийлардаги бир қатор генларнинг хўжайин ўсимлик ҳимоя тизими билан муносабатлари орқали ифодаланади. Мазкур генлардаги мутациялар симбиоз тараққиётини тўсиб қўяди, натижада одатдаги тугунаклар ўрнига «псевдо - ёлғон тугунаклар» ҳосил бўлади, улар бактерия хўжайралари ва инфекция ипларини сақламасдан,

шаклланмаган тўқималар билан тўлган бўлади (бундай мутантларнинг фенотиби *Nod⁺Inf⁻* белгилар билан белгиланади).

Хўжайин организм билан «муносабатни аниқлаш» га жавобгар бактерия генлари орасида энг яхши ўрганилганлари хўжайра сатҳидаги турли компонентлар – экзополисахаридлар ва циклик глюканлар синтезини кодлайдиган генлар ҳисобланади. Мазкур генлар бўйича мутантлар дастлаб колонияларни морфологиясиси ўзгаришлари, ҳамда, флуоресцияловчи бўёқ-калькофлуорни адсорбция қилиш хусусиятига эга бўлмаслиги бўйича танлаб олинган эди.

Ризобийларнинг анча чуқур ўрганилган, ўсимлик ҳимоя тизимлари билан ўзаро муносабатига жавобгар молекуляр бу - хўжайра сиртки компонентларидан бири - кислотали экзополисахарид ёки аукциноглюкан (ЭПС-1) ҳисобланади. Беда ўсимлиги ризобийлари (*Rhizobium meliloti*) да унинг синтези 20 дан ортиқ *exo*-генлар билан назорат қилиб турилади. Бу *exo*-генларнинг катта қисми мазкур бактерияларда мавжуд бўлган 2 та мегаплазмидаларнинг бирида кластер бўлиб жойлашади. Бир қатор *exo*-генларни бирламчи структураси ва уларни экспрессия механизми аниқланган бўлиб, бу ЭПС-1 синтезининг бир қадар тўлиқ чизмасини яратиш имконини беради. У ўз ичига:

- *олд авлоднинг шаклланиши,*
- *улардан мономерлар (саккиз моносахарид қолдиқларидан ташкил топган) синтези,*
- *уларнинг модификацияси (сукцинил, пирувил ва ацетил гуруҳларнинг бирикishi),*
- *полимеризация ва периплазмага кўчиб ўтиши каби жараёнларни ўз ичига олади.*

Тугунаклар ҳосил бўлишининг авторегуляцияси

Дуккакли ўсимликлар ҳимоя тизимлари орқали амалга ошириладиган симбиоз тараққиётининг бошқарилуви эндосимбионт микроорганизмлар ривожланишини назорат қилишда ўсимликларга ёрдам берадиган механизм турли туманлигини истисно этмайди. Шунингдек дуккакли ўсимликларгагина хос тугунак ҳосил бўлиши авторегуляцияси механизмлари катта қизиқиш уйғотадики, улар ўсимликларда ортиқча тугунаклар ҳосил қилишни олдини олади, бу эса ўз навбатида симбиоз жараёнида ҳамиша танқис бўлган энергияни тежаш имконини беради. Дуккакли ўсимликлар тугунак ҳосил бўлишининг бирмунча қатъий авторегуляция қилиш хусусиятига эгаки, у системавий характерга эга бўлиб, ер устки қисм воситасида амалга оширилади.

Кўплаб дуккаклиларда тугунак ҳосил бўлиши авторегуляцияси бузилиши бўйича мутантлар олинган. Уларни танлаб олишда ўта кўп тугунаклар ҳосил қилиш (*Nod⁺⁺*) фенотипик белгиси, яъни тугунакларни «ёввойи типга» нисбатан 2-10 баробар кўп ҳосил қилиш хусусиятига кўра танлаб олинади. Одатда бундай мутантлар дастлабки ўсимликларда симбиоз тараққиётини тўхтатадиган нитратларнинг юқори дозалари иштирокида кўплаб тугунаклар ҳосил қилади (*Nts*-фенотиби – Nitrate tolerant symbiosis). *Nod⁺⁺* мутантларда умумий

нитрогеназа фаоллиги (битта ўсимликка нисбатан ҳисобланганда) ошган бўлса, ўзига хос бўлган нитрогеназа ферментини фаолиги (тугунаклар массасига нисбатан) камайган бўлади.

Шуни ҳам таъкидлаш лозимки, кўплаб Nod^{++} мутантларда ўсимликларнинг ер устки массасининг пасайиши кузатилади. Бу энергиянинг катта қисмини жуда кўплаб азотфиксация қилувчи тугунакларга сарфланиши билан изоҳланади. Шундай қилиб, мазкур мутантлар мисолида эндосимбионтларнинг миқдорини назорат қилиш ўзаро муносабатнинг мутуалитик характерини сақлаб туришда муҳим шарт-шароит эканлиги ойдинлашади. Агар бундай назорат камайтирилса, гарчи асосий биокимёвий жараён, яъни симбиознинг асоси (N_2 нинг ўзлаштирилиши) бузилмасда, шерикларнинг ўзаро муносабати паразитизмга ўтиши мумкин.

Азотнинг ўзлаштирилиши

Симбиознинг яқунловчи босқичи, яъни ризобийларнинг фаол азот ўзлаштирилиши ва жараён махсулотини ўсимликка экспорти кўплаб дуккакли ўсимликларда бактерияларнинг эндоцитози ва бактериоидларнинг шаклланишидан сўнг бошланади. Бактероидларда нитрогеназа ферменти синтези фаоллашиб, у умумий оқсилнинг 30% ни ташкил қилиши мумкин. Бироқ нитрогеназанинг ҳосил бўлиши тугунакларнинг симбиотик азотфиксация жараёнини ифодалайдиган асосий, лекин ягона жараён эмас. Жараённинг бошқа хил аҳамиятлилари сифатида: нитрогеназанинг молекуляр кислороддан ҳимоя тизимини шаклланиши, нитрогеназа комплексини энергетик эҳтиёжларини қондириш ва азотфиксация махсулотлари ассимиляциясини кўрсатиш мумкин (4.4-жадвал).

6-жадвал.

Симбиотик азотфиксацияни таъминлайдиган асосий биокимёвий жараёнлар

Жараёнлар	Шерикларнинг хиссаи	
	Микросимбионт	хўжайин
Нитрогеназа жараёни биогенези	Нитрогеназанинг кофакторлари ва оқсиллари синтези (nif -генлар), регулятор каскади ($FixL$ J + $FixK$) шаклланиши	Нитрогеназа генларининг бошқарилиши эҳтимоли (турли ўсимликларда nif -генлар индукциясининг ўзига хослиги тўғрисидаги дастлабки маълумотлар мавжуд)
Нитрогеназанинг кислороддан ҳимояланиши	Икки компонентли регулятор тизими $FixL$ J ва транскрипцион активатор nif A	Леггемоглобин оқсили ва кислородли тўсик
Тугунак энергетик эҳтиёжларининг қондирилиши	Дикарбон кислоталар (dic -генларнинг) бактериоидларга транспорти, тугунакка хос цитохромоксидаза cbb_3 (fix NOPA, fix GHIS-генлари) нинг синтези	Кўп миқдордаги фотосинтат (сахароза) ларнинг тугунакларга томон транспорти, C-метаболизмнинг тугунакка хос изоферментлари синтези
Азотфиксация махсулотлари ассимиляцияси	Аммонийнинг ўсимлик хужайрасига экспорти (қисман аланин шаклида)	N-метаболизмнинг тугунакка хос изоферментлари синтези

Бу жараёнларнинг барчаси ўсимлик ва бактериялар билан бирга амалга ошириладики, бунда симбиознинг шериклари ўртасида структуравий ва функционал уйғунлашувни таъминланади.

Нитрогеназа комплексининг биогенези

Бошқа азот ўзлаштирувчи микроорганизмлар сингари ризобийларда, нитрогеназа оксид таркибини кодлайдиган *nif* НДК генлари, шунингдек унинг кофакторлари шаклланиши, синтезнинг бошқарилиши ва етилишини белгилайдиган бошқа хил *nif*-генлар мавжуд.

Ризобийларда ва симбиотик бўлмаган азотфиксаторларда нитрогеназа таркиби генлари транскрипцияси *nif* А генлари орқали фаоллашади.

Шу билан бирга ризобийларда симбиотик азотфиксация учун хос бўлган, яъни *fixL*, *fixJ* ва *fixK* генлардан ташкил топган бошқарув тизими аниқланган. *FixLJ* генлари икки компонентли регулятор тизими (*fixL* мембрананинг оксил-сенсори, киназа ва фосфатаза фаолликларига эга, *fixJ* –транскрипциянинг цитоплазматик фосфорилланган регулятори) ни кодлайдилар.

Бундай бошқарув тизимининг фаоллиги фақат микроаэрофил шароитларда амалга ошади, чунки *FixL* O₂ сенсори вазифасини бажарадики, бу эса фақат ген иштирокидагина амалга ошади. *FixK* оксиди C₂H₄-F₂ оиласига мансуб бўлган транскрипцион регулятордир.

Ризобийларда азотфиксацияни бошқарув тизими, нитрогеназанинг таркибий генларидан ташқари, *dctABD* (улар азотфиксация жараёнининг асосий энергия манбаи бўлган дикарбон кислоталарнинг бактероидларга транспортини кодлайдиган), *fix NOPQ* ва *fix GHIS* (бактероидларнинг нафас занжирида электронлар транспортини таъминлайдиган *cdd₃* типдаги бактероид цитохромоксидазаси синтезини кодлайдиган) генларнинг экспрессиясини ва геннинг биосинтезини назорат қиладилар.

Симбиотик бўлмаган азотфиксаторлар ризобиал тизими *nif*генларнинг боғланган азот билан репрессияси учун жавобгар, яъни *Klebsiedlанинг nifI* генига хос бўлган элементларни сақлайди. Бу тугунаклардаги азотни ўзлаштириш жараёни боғланган азот миқдори ошиқча бўлган шароитлардагина амалга ошиши билан боғлиқ, тугунакларнинг ҳосил бўлишини ва боғланган азот миқдори меъеридан ортиқ бўлганда азотфиксация жараёнини бошқаришни эса хўжайин-ўсимлик бошқаради.

Нитрогеназанинг кислороддан ҳимоя қилиниши

Тугунак фаолияти учун зарурий шароит унда анаэроб муҳитнинг сақлаб турилишидир, чунки бактериялар томонидан синтезланадиган нитрогеназа кислород таъсирида тез ва қайтмас даражада инактивацияланади.

Бироқ оксидланган фосфорилланишнинг юқори интенсивлигидагина анчагина кўп миқдорда энергия талаб қиладиган азотфиксация жараёни содир бўлади, унинг учун бактериал цитохромоксидазаларга O₂ нинг катта миқдори

келиб тушиши зарур. Иккала шериклар генетик тизимларининг мувофиқлашган фаолияти натижасида ҳосил бўлган «кислородли парадокс» масаласи ечилади.

Бактерияларда нитрогеназа синтезининг кислородга сезгирлиги FixLy ва Nif A генлари даражасида амалга оширилади. Ўсимликлар шунингдек «кислороддан ҳимояланиш»нинг азотфиксациядаги икки хил механизмига эга:

- а) тугунакларнинг қопловчи тўқималарида, яъни бу ерда кислороддан ҳимояловчи восита нўстлоқ ҳисобланади, кўп компонентли диффузион барьер:*
- б) кислородни боғлаб ва симбиосомоларга ташилишини таъминлайдиган гемоглобинсимон оқсил – леоглобин (у тугунакларнинг умумий оқсилларини 30%гача миқдорини ташкил этади).*

Узоқ вақт леоглобин синтезига симбиознинг молекуляр даражадаги яққол кўриниши сифатида қаралган. Дастлаб, леоглобинни полипептидли (глобин) қисми ўсимлик генлари, ген қисми – микросимбионт генлари билан кодланади деб, ҳисоблаб келинган.

Бу фикр ризобийларнинг азотфиксация қилиш хусусиятига эга бўлмаган мутантлари, яъни ген ёки унинг оралиқ шакли, аминолевулин кислотаси синтези дефекти тўғрисидаги маълумотларга асосланган эди. Бироқ, кейинги тадқиқотларни кўрсатишича, леоглобиннинг иккала қисми ҳам ўсимлик хужайралари томонидан синтезланар экан. Тугунакларда жойлашган бактериодлар ҳам гемни синтезлайди, лекин унинг азотфиксациядаги иштироки цитохромлар биогенези, яъни нитрогеназага электронлар транспортини таъминлашдангина иборат бўлади.

Дуккакли ўсимликларда леоглобин синтези бириккан бир нечта Lb-генлари оиласи иштирокида кодланади. Ҳозирги вақтда мазкур генларнинг структуравий – функционал ташкиллашуви ўрганилган: интрон – экзон структураси аниқланган, промоторлар кодлайдиган ва кодламайдиган участкаларнинг жойлашуви ўрганилган. Lb-генларнинг тугунакларга экспрессияси, кўп ҳолларда, иккала шерикларнинг регулятор сигналларига асосланади.

Бу ҳақда баъзи бактериал промоторларга гомологик ва сигнал молекулаларга нишон бўлиб хизмат қиладиган, ўсимликлар хўжайраларига бактериялардан келиб тушадиган мазкур генлар кетма-кетликларининг промоторларда бўлиши далолат беради.

Шунингдек, леоглобин генлари промоторлари билан муносабатга киришадиган, бактериал ДНКни боғловчи оқсилларни ҳам аниқлашга эришилган. Эндосимбиотик бактерияларда тугунаклардаги микроаэрофил шароитларга боғлиқ равишда интенсив нафас олиш (бусиз симбиотик азотфиксациянинг юқори фаоллигига эришиб бўлмайди) ва нитрогеназанинг фаол ишлаши каби жараёнларни мутаносиблаштириш муаммоси туради.

Бу ризобийларда тармоқланиб кетган электрон транспорт занжири борлиги туфайли таъминланадики, унда баъзи компонентлар аэроб шароит (explanta) да

ишласа, баъзилари анаэроб (микроаэрофил) шароитларда, шунингдек тугунакларда фаолият юритади.

Симбиоз учун бу занжирларда *fixNODA* ва *fix GHIS* генлари кодлайдиган цитохромоксидаза sw_3 муҳим роль ўйнайди. Бу генлардаги мутациялар симбиотик азотфиксацияни издан чиқаради, лекин эркин яшовчи бактерияларнинг нафас олиш фаоллигига таъсир кўрсатмайди.

Аммо, ризобийларни цитохромоксидазалар шаклланишини издан чиқарадиган мутациялари симбиотик азотфиксацияга таъсир ўтказмайди.

Азотфиксациянинг энергетик таъминоти

Симбиотик азотфиксациянинг асосий энергия манбаи ўсимликнинг ер усти қисмларида амалга ошириладиган фотосинтез жараёнидир.

Фотосинтатлар тугунакларда сахароза шаклида транспорт қилинади. Шундан сўнг ўсимлик сахароза катаболизмини анаэроб босқичи (гликолиз) ни амалга оширади, бу жараён натижасида нисбатан кўп бўлмаган миқдорда энергия ажралиб чиқади. Микросимбионтнинг улушига катаболизмнинг анчагина энергетик самарадор қисми – уч карбон кислоталар цикли (УКЦ) ни амалга ошириш тўғри келади.

Бактероидларга хўжайин – ўсимликдан тушадиган асосий углеводлар C_4 дикарбон кислоталари (асосан сукцинат ва малат) ҳисобланадики, улар УКЦ да бевосита иштирок этадилар. Шунинг учун бактериоидларнинг нитрогеназа тизими интенсив фаолияти бактериоидларга дикарбон кислоталарни ташилишини таъминлайдиган генлар билан маълум даражада боғлиқдир.

Бу жараёнда учта ген *dct A* (мембранавий сукцинат пермеазани кодлайдиган), *dct B* ва *dct D* (*dctA* транскрипциясини белгилайдиган, икки компонентли регулятор тизимни кодлайдиган) генлари асосий ўрин эгаллайди. *Dct B* оқсиги сенсор ҳисобланиб, у бактериоидлар мембранасига жойлашиб олиб дикарбон кислоталар мавжудлигига сезгирдир. *Dct D* гени эса *Dct A* гени промотори билан муносабатга киришиб, унга РНК-полимеразанинг ўрнашини осонлаштиради. Шуни таъкидлаш лозимки, дикарбон кислоталар транспорти тизими симбиотик азотфиксациянинг интенсивлиги миқдорини белгилайдиган «нозик нуқта»лардан биридир.

Бу ҳақда азотфиксациянинг фаоллиги ва симбиознинг самарадорлигини ризобийларга *dct*-генларини қўшимча нусхаларини киритиш орқали сезиларли даражада ошириш мумкинлиги далолат беради.

Тугунакларнинг энергетикаси хўжайин-ўсимлик томонидан C -метаболизмнинг тугунакка хос фермент изоформалари синтези туфайли таъминланади (4.5-расм).

Улар орасида сахарозани уридиндифосфат иштирокида гидролизлайдиган сахаросинтетаза (SS) марказий ўринлардан бирини эгаллайди. Соя тугунакларида SS сахаросинтетаза оқсиллари умумий миқдорнинг 3-4%ини ташкил этади. Гидролиз натижасида ҳосил бўлган гексоза (глюкоза ва фруктоза) катаболизм одатдаги йўли – гликолизга учрайди. Бунга альтернатив

бўлган пентозофосфатли цикл туганакларда иккиламчи даражада аҳамиятли бўлса ажаб эмас.

Тугунакларда азотфиксация миқдорини белгилайдиган асосий омиллардан бири тугунаклардаги углерод миқдори бўлганлиги учун фосфенолпируваткарбоксилазани (PEPC) катализлайдиган CO_2 нинг нофотосинтетик (қоронғудаги) ўзлаштирилиши муҳим аҳамият касб этади:

фосфенолпируват + CO_2 = малат

Бу реакция бактероидларга малат ва бошқа энергетик субстратлар таркибидан тушадиган углерод атомининг 25% ига яқин миқдори манбаси ҳисобланади.

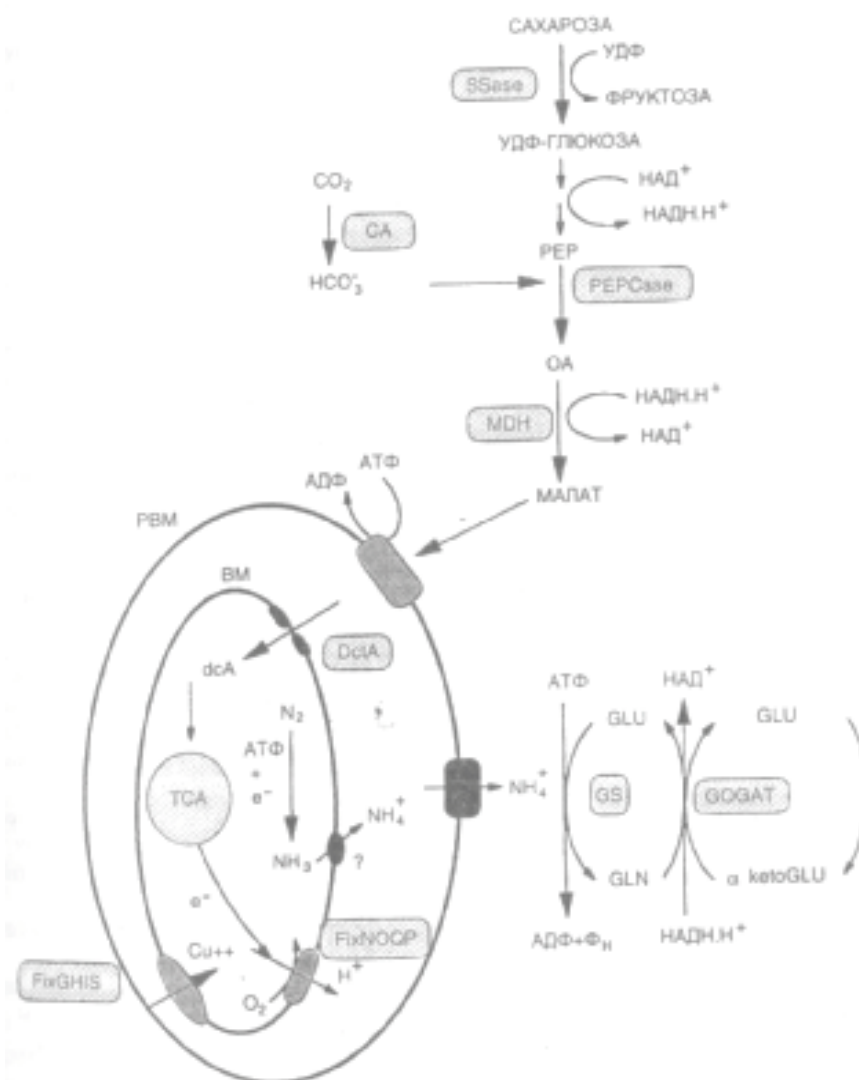
Шундай қилиб, PEPC фаолияти туфайли тугунакларда фаол кечадиган, нафас олиш жараёнида ажралиб чиқадиган карбон кислоталарнинг асосий қисми рециклга учрайди.

Ўзлаштирилган азотнинг ассимиляцияси

Тугунакларга тушадиган С-бирикмалари азотфиксация учун фақат энергия манбаи бўлибгина қолмай, балки фиксация қилинган азотнинг ассимиляцияси учун углеродли «скелет» вазифасини ҳам ўтайди. Азотфиксация жараёнида ҳосил бўлган аммоний бактероидлардан тугунакларга ўсимлик хужайралари цитоплазмасига эркин шаклда ёки аланин таркибида (бактериал аланин – дегидрогеназа фаоллиги натижасида ҳосил бўлади) келиб тушади.

Ўзлаштирилган азот ўсимлик хужайралари метаболизмига ўтади. Бунда азотнинг дастлабки ассимиляцияси (аммонийнинг хужайра мембранасига кириши), ўзлаштирилган (тугунаклардан илдизнинг ўтказувчи қисмига ўтадиган) азотнинг транспорт шакларининг ҳосил бўлиши ва ўзлаштирилган азотнинг транслокацияси (унинг ўсимлик турли аъзолари ўртасида қайта тақсимланиши) фарқланади.

Дастлабки ассимиляция ва фиксация қилинган азотнинг транспорт шакллари ҳосил бўлишида ўсимлик синтезлайдиган азотли алмашинувнинг тугунакка хос фермент формалари муҳим рол ўйнайди (4.5-жадвал).



8-расм. Азот ўзлаштирувчи симбиозлар ҳосил бўлишида ҳамкорлар метаболитик интеграцияси

6-жадвал.

Азотфиксация қилувчи тугунакларга хос ўсимлик ферментлари

Ферментлар	Ўсимликлар	Тугунакларда фаолликни оширадиган механизмлар
Углеродли алмашинув		
Сахаросинтетаза	Соя	Янги изо шакл (нодулин N-100) синтези
Малатдегидрогеназа	Бўри дуккаги, нўхат	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Алкогольдегидрогеназа	Беда	Тўрт хил янги изо шакл (нодулинлар) синтези
Лактатдегидрогеназа	Беда	Тўрт хил янги изо шакл (нодулинлар) синтези
Фосфоенолпируват-карбоксилаза	Нўхат, дуккаклар, ловия, беда, бўри дуккаги	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши

фосфофруктокиназа	Бўри дуккаги	Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Азотли алмашинув		
Глутаминсинтетаза	Ловия, беда, нўхат, соя	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
NADH га боғлиқ глутаматсинтаза	Ловия, бўри дуккаги	Янги изо шакл (нодулинлар) синтези ёки Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Asp-аминотрансфераза	Беда, нўхат, бўри дуккаги	Nst-шакллар синтезининг кучайиши
Gln га боғлиқ аспарагинсинтетаза	Бўри дуккаги, соя, беда, дуккакдилар, нўхат	Nst шак AS1 ва AS2 синтези кучайиши
Уриказа	Соя, ловия	Янги изо шакл (нодулин) синтези

Ўсимлик хужайраларида аммонийнинг бирламчи ассимиляцияси «глутаматсинтаза цикли» глутаминсинтетаза (GS) ва NADH га боғлиқ глутаматсинтаза (NADH-GOGAT) ферментлари назорати остида кечади. GS ловия ўсимлиги тугунак бактерияларидан ажратиб олинган бўлиб, молекуляр оғирлиги бир хил – 40 кД бўлган суббирликлардан ташкил топган октамер ферментдир. Бу ферментни учта изоферменти (GSN_1 , GSN_2 , GSL_2) аниқланган бўлиб, уларнинг иккитаси цитоплазмада, учинчиси зарарланган ўсимлик хужайралари пластидаларида жойлашган. Бунда фақат GSN_1 гина тугунакка хос изошакл (нодулин) ҳисобланади, аниқроғи унинг суббирликларидан фақат биттасидир. Тугунакка GS дан фарқли ўлароқ, глутаматсинтетаза циклининг иккинчи ферменти ўсимлик хужайралари пластидаларида жойлашган NADH-GOGAT ҳисобланади.

Шундай қилиб, тугунак бактериялар хўжайраларида глутаматсинтаза цикли ферментларининг тарқалиши, алоҳидаланиши (gs-цитоплазмада, NADH-GOGAT пластидаларда) аниқланган. Кўплаб маълумотларнинг кўрсатишича, фиксация қилинган азот ассимиляцияси миқдорини белгиловчи босқич айнан NADH-GOGAT томонидан катализланадиган реакция ҳисобланади. Энг самарали тугунакларда ҳам NADH-GOGAT ферментини фаоллиги юқори эмас. Кўпинча самарасиз тугунакларда мазкур ферментнинг фаоллигини (шунингдек, унинг М-РНҚсини ҳам) кўпинча аниқлашга муваффақ бўлинмаган. Тугунак ҳосил бўлишида индуцирланадиган беда ва нўхат тугунагининг индуцирланадиган NADH-GOGAT ферментининг молекуляр оғирлиги 200 кД дан ортиқ биргина молекула сифатида қайд этилган. Ловия тугунакларидан NADH-GOGATнинг иккита изоферменти синтезланиб, уларнинг биттаси тугунак-стимуловчи ҳисобланади.

Кўплаб дуккакли ўсимликлар (масалан, беда ва нўхат)да глутаминдан ташқари, мўътадил иқлим минтақаларида тарқалган да азотнинг ташиладиган шакли амидлар, асосан – аспарагин ҳисобланади. Бу дуккакдиларни «амидли» типга киритилади. Бошқа дуккакдилар (ловия, соя, вигна) да азотнинг ташилиши уреидлар аллатоин ва аллатоин кислота шаклида амалга оширилади.

Ўзлаштирилган азотнинг ассимиляция реакцияларини асосийлари симбиосомалар сақлайдиган хужайраларда кечади. Бунда аспартатнинг оралик махсулоти аспарагинни ҳосил бўлиш реакциясини катализлайдиган аспаратаминотрансфераза (ААТ) алоҳида роль ўйнайди. «Уреидли» тугунаклар метаболизмида уриказа ферменти муҳим аҳамият касб этади. У уреидлар биосинтезининг охириги этапларидан бири – пуринлар оксидланганда ҳосил бўладиган сийдик кислотасининг оксидланиши натижасида аллатоин ҳосил бўлишидир.

ЎСИМЛИКЛАРНИНГ ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАР БИЛАН СИМБИОЗ МУНОСАБАТЛАРИ

Азотни ўзлаштирувчи цианобактериялар бир қатор ўсимликлар, жумладан, ёпиқ уруғлилар, очик уруғлилар, қирққулоқлар, йўсинлар ва ҳатто бир хужайрали денгиз диатом сув ўтлари билан симбиоз муносабатга киришади.

Энг кўп ўрганилган эндосимбиозлар цетероцистали цианобактерия *Anabaena* (*Nostoc*) ва сув қирққулоғи *Azolla*, шунингдек, *Nostoc* нинг гулли *Gunnera* ва *Anthoceros* ўсимлиги билан муносабатидир. *Nostoc*- *Gunnera* симбиози хужайра ичи симбиозга мисол бўлса, қолганлари – хужайра ташқариси симбиозидир (*Azolla* да цианобактерия барг юзасида жойлашса, *Anthoceros* да талломнинг ички юзасидаги бўшлиқларда бўлади).

Микроорганизмлар боғланган азотсиз муҳитда ёруғликда ҳам (яъни минимал озук муҳитида автотроф С-ли озикланиш), қоронғуда ҳам (углерод манбалари мавжуд муҳит, яъни гетеротроф С-озикланиш) диазотроф ҳолда ўса олади. Бу симбиотик цианобактерияларда азотфикация билан боғлиқ жараёнларни генетик таҳлил қилишда кенг имкониятлар очади.

Ўсимликлар учун цианобактериялар билан муносабатда симбиозга боғлиқлик турли даражада ифодаланади: *Azolla* учун у облигат бўлса, *Gunnera* ва *Anthoceros* учун – факультативдир.

Азотни ўзлаштирувчи цианобактериялар билан симбиозларнинг баъзилари экологик ва қишлоқ хўжалик аҳамиятига эгадир. Шоли етиштиришда «*Azolla*-*Anabaena*» тизими азот манбаи сифатида юқори самарадорликка эгадир. «*Nostoc*- *Gunnera*» симбиозини эса дуккакли бўлмаган ўсимликларнинг катта ҳажми учун азотни ўзлаштиришда симбиотик муносабат ҳосил қилиш хусусияти бериш учун модель сифатида қараш мумкин.

Хужайра ихтисослашуви

Anabaena азотсиз муҳитга кўчириб ўтказилганда ипи бўйлаб тартибсиз жойлашган хужайраларининг 10% гетероцистларгача дифференцировкага учрайди. Бу хужайралар ҳажми жиҳатдан йириклашиб, цитоплазмага эркин кислород ўтишини тўсиб қўядиган қалин қобик билан ўралади. Гетероцисталарда фотосинтез жараёни бормайди, натижада азотни ўзлаштириш учун микроаэрофил шароит вужудга келади. Бу цианобактерияларга аэроб шароитларда ҳам азотни ўзлаштиришга имконият яратади.

*Anabaena*да гетероцисталарнинг шаклланишини назорат қиладиган генларнинг мураккаб тизими аниқланган. Улар орасида *hetR* гени кўпроқ ўрганилган бўлиб, унинг генактивацияси гетероциста ҳосил қилиш хусусиятининг йўқолишига олиб келади. *hetR* гени бўйича мутантлар азотсиз муҳит микроаэрофил шароитларда ўстирилганда азотни ўзлаштира олса, аэроб шароитларда ўзлаштира олмайдилар. Агар *hetR* генини кўп нусхали плазмидалар таркибида амплификация қилинса ёки «кучли» промотор таъсири остида унинг экспрессияси оширилса, аммоний тузлари мавжуд озуқа муҳитларида ҳам гетероциста ҳосил қилиши кучаяди.

Anabaena штаммига кўп нусхали *hetR* генини киритиш орқали қўшимча гетероцисталар ҳосил бўлмайдиган транспозон мутантларини олиш мумкин. Мазкур мутантларда транспозон инсерциялари *pat A* ва *patB* генларида жойлашган. *pat A* генидаги мутациялар хужайра ихтисослашуви жараёнларининг ноанъанавий бузилишларига олиб келади: гетероцисталар хужайра занжири охирларидагина ҳосил бўлади.

Ген мутациялари гетероцисталар ҳосил бўлишини тўхтатиб қўйишга олиб келади: агар *Anabaena* 7120 «ёввойи» штаммида бу ходиса азотсиз муҳитга олиб ўтилгандан сўнг 24 соат ўтгач бошланса, *patB* мутантларида 48 соат ўтиб бошланади. Бироқ мутант штаммларни азотсиз муҳитга бир неча марта экилгандан сўнг, ёввойи штаммига нисбатан гетероцисталарнинг умумий миқдори ортади. *patB* мутациясини *pat A* мутациялар (ёки *hetR* гени бўйича кўп нусхалиликни) бирга қўшилганда цианобактерия нобуд бўлади.

*Anabaena*нинг баъзи мутациялари нитрогеназани кислороддан ҳимоя қила олмайдиган морфологик жихатдан нормал гетероцисталарни ҳосил қиладди. Шунинг учун мазкур мутантларда микроаэрофил шароитларда азотфиксация қилиш хусусияти бузилмаган бўлса, аэроб шароитларда уни амалга ошириш мумкин эмас. Бу мутациялар ёрдамида гетероцисталар хужайра деворида гликолипидлар тўпланишини назорат қиладиган *hglB*, *-C*, *-D*, *-K* генлари оиласи аниқланган. Тахмин қилинишича, бу генлар O_2 нинг гетероцисталарга диффузияланишига тўсқинлик қилувчи, хужайра девори гликолипидлари таркибига кирадиган мой кислоталари синтезини кодлайдилар.

Молекуляр ихтисослашуви

*Anabaena*нинг азотфиксация қилишга ўтиши, CO_2 ни фиксациясини назорат қилувчи генлар репрессияси билан кузатилади, бунинг натижасида гетероцисталарда молекуляр O_2 ажралиб чиқиши камая боради. Бундан ташқари аммоний ассимиляцияланиши учун зарур азотли метаболизмнинг баъзи генлари (масалан, *glnA*) фаоллашади. Мазкур жараён натижасида ҳосил бўлган глутамин цианобактерияларининг вегетатив хужайраларига транспорт қилинади ёки хўжайин организмга ўтказилади.

Гетероцистали цианобактерияларнинг азотфиксация қилувчи тизимининг нодир хусусияти нитрогеназа синтезидан олдин *nif* генларнинг қайта қурилишидир. *Anabaena*нинг вегетатив хужайраларида нитрогеназа синтези амалга ошиши мумкин эмас, чунки *nif D* гени таркибида ДНК ўлчами 11 м.ж.н

бўлган бўлаги жойлашган. Бу бўлак эндонуклеазани кодлайдиган *xisA* гени сақлайди. Гетероцисталар дифференцирланишида эндонуклеаза бўлак (фрагменти)ни аниқ қирқиб ташлайди, шунинг учун *nifD* генининг яхлитлиги тикланиб, *xisA* гени экстрахромосома ҳолатига ўтади. Шунингдек, *xisA* гени *nifC* ва *fdxN* генлари оралиғида жойлашган ўлчами 55 м.ж.н бўлган яна бир ДНК бўлаги эксцизиясини белгилайди. Бунинг натижасида азотни ўзлаштирувчи гетероцисталарда учта алоҳида генлар гуруҳидан еттита гендан ташкил топган ва нитрогеназа комплексини кодлайдиган ягона оперон ҳосил бўлади.

Шуни ҳам қайд этиш лозимки, *Anabaena* гетероцисталарида *nif* генларнинг қайта қурилиши гетероцисталар морфогенезини назорат қилувчи генлардан маълум даражада мустақил равишда амалга ошади. *het R* гени бўйича мутантларда бу қайта қурилиш анаэроб шароитларда нормал кечадики, бу нитрогеназа фаоллиги индукцияси жараёнида ўз ифодасини топади. Ўз навбатида нитрогеназанинг структуравий генлари (*nif*ДНК) ни инактивацияловчи ёки ДНК (*xisA*) процессини издан чиқарадиган мутациялар, азотни ўзлаштириш хусусиятини йўқолишига сабаб бўлади, лекин азотсиз муҳитда гетероцисталарнинг шаклланиш хусусияти сақланиб қолади.

Симбиоз тараққиёти

Азотни ўзлаштирувчи цианобактерияларнинг ўсимликлар билан симбиози «*Nostoc-Gunnera*» тизими мисолида яхши ўрганилган бўлиб, мазкур системанинг ташкил топиши ҳар иккала шерик учун факультатив ҳисобланади. Бу организмларнинг ўзаро муносабати ўта ўзига хос эмас: *Gunnera*дан ажратиб олинган *Nostoc* штамлари нафақат шу ўсимлик, балки очик уруғли *Macrozamia*, печеночник – *Anthoceros* ва хатто *Peltigera* лишайниги билан ҳам симбиоз ҳосил қила олади. Шунингдек, *Nostoc*нинг барча изолятлари ҳам симбиотик тизимни ҳосил қила олмайдилар.

Цианобактериялар барг бандлари орасида жойлашган махсус безчаларда яшайди. Бу безлар папиллаларга эга бўлиб, уларнинг орасида ўсимлик тўқималари тубига олиб борадиган каналчалар мавжуд бўлади. Безчага цианобактерия штамми келиб тушиб қўшилиши билан иккала шерикларда бир қатор морфогенетик жараёнлар индуцирланади, улардан биринчиси безчалар тубига фаол кириб борадиган цианобактерияларнинг ҳаракатчан шакллари – гормогонийлар (гетероцисталар сақламайдиган кичик ҳаво вакуолаларидан ташкил топган (қисқа) калта ипчалар ҳосил бўлишидир.

Симбиотик безчалар ичига кириб борган цианобактериялар фаол кўпая бошлайди ва ўсимлик хужайраларини зарарлайди. Шерикларнинг ўзаро алоқаси кучли жойларда ўсимлик хужайра девори эриб кетиши (лизиси) кузатилади. Шундан сўнг эндосимбионтлар ўсимлик хужайраларига кириб олади, хужайра деворлари эса ўзининг яхлитлигини тиклайди.

Ўсимлик хужайралари ичида цианобактериялар гетероцисталарга қадар ихтисослашиб, уларда нитрогеназа фаоллиги индуцирланади. Эндосимбиотик цианобактерияларда гетероцисталар 60-80% гача хужайра ҳосил қилса, эркин яшовчиларда бу кўрсаткич 5-10% ни ташкил этади. Эркин яшовчи

цианобактерияларга хос ҳаракатсиз спора (акинетлар) ҳосил бўлиши Gunnerанинг симбиотик безчалари ичида кузатилмайди.

Gunnera билан симбиозда цианобактериялар нитрогеназа реакциялари натижасида ҳосил бўлган аммонийни ассимиляция қилмайди, балки уларни ўсимлик хужайраларига етказиб беради. Бу симбиотик тизимда (худди дуккаклилар ва ризобийлар ўртасидаги симбиоз каби) аммонийнинг бирламчи ассимиляциясини хўжайин амалга оширади.

АЗОТНИ ЎЗЛАШТИРУВЧИ СИМБИОТИК БИОТИЗИМЛАР ЭВОЛЮЦИЯСИ ВА ГЕНЕТИК АСОСЛАРИ КОНЦЕПЦИЯСИ

Ўсимликларнинг азотфиксаторлар билан симбиози ўсимлик микроорганизм муносабатининг энг кенг тарқалган ва чуқур ўрганилган шаклларида бири ҳисобланади. Ҳосил бўлган симбиозлар ўзининг асосига кўра икки томон учун ҳам фойдали (мутуалистик) бўлиб, бироқ баъзи шароитларда (муҳитда боғланган азот миқдорининг кўплиги, етарли бўлмаган озикланиш, генетик ўзгаришлар) бу муносабатдан паразитизмга ўтиши ҳам мумкин. Бундан ташқари дуккаклиларнинг ризобийлар билан муносабати механизмлари ўсимликлар билан фитопатогенлар муносабатига ўхшаш умумий босқичларга эга. Шундай қилиб азотфиксацияловчи симбиозларни ўрганиш Антон Де Бари таклиф этган симбиоз концепциясининг тўғри эканлигини тасдиқлайди. Бу олим «симбиознинг асосий белгиловчи хусусияти унинг «фойдали» ёки «зарарли» лигида эмас, балки шериклар орасидаги алоқанинг узоқ давом этишидадир» деб ҳисоблашни таклиф этган. Бундай ёндашув симбиотик тизимларни организмдан ташқари мўътадил комплекс сифатида, яъни бу тизимга кирган организмлар эркин яшаган ҳолатида эга бўлмаган янги экологик ва метаболитик имкониятларга эришадилар, деган қарашни юзага келтиради.

Икки хил типдаги азотни ўзлаштирувчи тизимлар – дуккакли-ризобиал симбиоз ва цианобактерияларнинг ўсимликлар билан симбиози генетик назорати тўғрисидаги маълумотларни таққослаб кўриб, бу муносабатларни тавсифловчи қатор умумий белгиларни кўриш мумкин (4.6-жадвал):

***Биринчидан,** симбиознинг иккала гуруҳи ҳам шерикларнинг сигнал муносабатига асосланади, сигналлар эса бевосита генлар экспрессиясига таъсир кўрсатади. Бунинг натижасида симбиотик тузилмаларнинг морфогенези ва ўсимликлар билан бактерияларнинг метаболитик юқори интеграциясига олиб келадиган шериклар генларининг мувофиқлашган бошқарилуви ва дифференциал экспрессияси кузатилади.*

***Иккинчидан,** ҳар иккала тизимда ҳам муносабатларнинг тизими – азотфиксация ва симбиоз тузилмалари тараққиёти турли ген тизимлари билан назорат қилинади ва уларни генетик усуллар орқали алоҳида-алоҳида таҳлил қилиш мумкин.*

Шу билан бирга кўриб чиқилган тизимлар орасида қатор фарқлар мавжудлиги ҳам равшандир. Биринчи фарқ шундан иборатки, цианобактериялар азотни тоза культурада фототрофлик билан мувофиқлаштирган ҳолда ўзлаштира, ризобийларнинг кўпчилиги тоза культурада азотни ўзлаштира олмайди, фототроф ҳам эмас.

Шунинг учун ҳам цианобактерияларда азотфиксация қилувчи хужайра шакли – гетероцист ҳосил қилиш махсус механизми мавжуд, унда фотосинтез амалга ошмайди, нитрогеназанинг ҳимояси эса қалин хужайра девори орқали таъминланади.

Цианобактерияларда гетероцисталарнинг ихтисослашувини таъминлайдиган мураккаб генлар тизими мавжуд, у диазотроф яшашга мосланиш орқали шаклланган бўлиб, бироқ симбиотик тизимда фойдаланилади.

Ризобийларда цитодифференциалланиш одатда фақат *in planta* ҳолатида амалга ошириб, нитрогеназанинг кислороддан ҳимояси билан боғлиқ эмас.

Азотфиксация қилувчи симбиозларнинг келиб чиқиши ва эволюцияси ҳақидаги масала қизиқдир. Сўнгги йилларда дуккаклиларнинг симбиотик генлари молекуляр структураси ҳақидаги маълумотлар бу масалага ойдинлик киритиш имкониятини берди. Масалан, **лядвинец** (*lotus japonicus*) да *nif* гени аниқланган бўлиб, ундаги мутациялар тугунакларнинг ҳосил бўлмаслиги (инфекция иплари ривожини тўсиб қўйилиши) га олиб келади, бироқ ўсимликларнинг бошқа аъзолари тараққиётига таъсир кўрсатмайди. Бу геннинг оксил махсулоти азот етишмаслиги (азотли очлик) шароитида гаметогенезни назорат қиладиган *Mid chalamy domonas* омилига гомологик бўлиб чиқди.

9-жадвал.

Азотни ўзлаштирувчи ўсимлик-микроб симбиоз муносабати икки хил типини у таққосланиши

Белгилар	Дуккакли ризобиял симбиоз	«Цианобактерия-ўсимлик» симбиозлар
Микроорганизмларга дастлабки ўсимлик сигналлари таъсири	Nod-генларнинг (ўсимлик флавоноидлари таъсири остида) фаоллашуви	Ҳаракатчан гормогонийларнинг шаклланиши
Микросимбионтларнинг цитодифференциаллашуви	Фақат ўсимликларда (бактероидлар)	Ўсимликларда ва тоза культурада (гетероцисталар)
Нитрогеназанинг кислороддан ҳимояланиши	Бактериялар билан (Nif A ва Fix J оксиллари) ўсимликлар билан (легоглобин, тугунак тўқималарида диффузион тўсиқ)	Фақат бактериялар билан (гетероцисталар)
Nif генлар ташкиллашувининг микробларни азотфиксацияга ўтиши билан ўзгариши	Аниқланмаган	Аниқланган
Ўсимликлардаги морфогенетик жараёнларни микросимбионт томонидан индукцияланиши	Пўстлоқ хужайралари митотик реактивацияси ёки дуккакли ўсимлик илдиз бошланғичининг тугунакка қадар ривожланиши индукцияси	Симбиотик безнинг ўсиши

Микросимбионтнинг диазотрофлик ва фототрофлик хусусияти	Одатда мавжуд эмас	Мавжуд
Симбиознинг иккала шериклар учун ҳам зарурийлиги	Иккала шериклар учун факультатив	Микроблар учун факультатив, хўжайин организмлар учун облигатив (Azolla) ёки факультатив (Gunnera)
Ўзаро муносабатнинг ўзига хослиги	Дуккакликлар оиласида чегараланган	Nostoc учун ер усти ўсимликлари турли типларини ўз ичига олади

Шундай қилиб, мазкур ген симбиотик тизимда эволюцион қадимги, яъни метаболитик стресс (азот етишмаслиги) таъсирида амалга оширадиган тараққиёт жараёнларини бошқариш вазифасини сақлаб қолганлиги аниқланди. Шунга ўхшаш турли нодулинлар ва Nst-оқсиллари синтези тизимлари ҳам эволюцияга учраган бўлиши мумкин.

Тугунаклар ҳосил қилмайдиган кўплаб ўсимликларда леггемоглобинни гомологлари аниқланган бўлиб, бу ген махсулотлари леггемоглобин сингари кислородни боғлаб олиб, унинг сенсори вазифасини бажаради.

Деярли барча нодулинларнинг гомологлари, шунингдек С- ва N- ли метаболизмнинг тугунакка хос ферментлари, тугунаклар ҳосил қилмайдиган ўсимликларда аниқланган ёки дуккаклик ўсимликларнинг ер устки қисмларида фаолият юритади.

Бундан келиб чиқадики, молекуляр генетик жиҳатдан симбиоз эволюциясини симбиоз билан боғлиқ бўлмаган функцияларни бажарадиган анцестрал генларни ўсимлик-микроб муносабатлари бошқарув тизимига жалб этувчи сифатида қараш мумкин.

Сўнги йиллардаги муҳим ютуқлардан бири азотфиксацияловчи симбиознинг арбускуляр микориза билан (АрбМ) узвий алоқасини аниқланиши ҳисобланади. Дуккакликризобиал симбиознинг тараққиёти ва АрбМ бир қатор «умумий» генлар орқали назорат қилинишини формал ва қатор молекуляр генетик усуллар ёрдамида кузатилган.

Бу симбиозлар гомологик ўсимлик махсулотлари, шу қаторда перибактероид ва периарбускуляр мембрана оқсиллари, шунингдек баъзи нодулинлар синтези билан давом этади. АрбМ ва тугунакларнинг ҳосил бўлиши билан ўсимликларни патогенлардан химояланишига хос реакциялар содир бўлиши алоҳида аҳамият касб этади. Аммо, бошқарув характериға кўра бу реакциялар бир-биридан фарқ қилади.

Бу эса микроорганизмларнинг антогонизамда фаоллигини пасайиши ва улар фаоллигини (микдорининг мутуализмдаги регуляцияси) регуляцияси билан боғлиқ бўлиши мумкин. АрбМ нинг бошқа типдаги ўсимлик-микроорганизм муносабатларига нисбатан қадимийлигини инобатга олиб, ўсимликларнинг дастлабки химоя воситаларидан бири *in planta* шароитида

эндомикоризали замбуруғлар ривожланишини бошқариш бўлган деб тахмин қилиш мумкин.

Ўсимликларнинг кейинги эволюцион ўзгаришлари натижасида бу тизимлар патогенлардан ҳимоя вазифаси, хатто азотфиксацияловчи симбионтларни қўллаб-қувватлашни назорат қилиш вазифасига эга бўлган бўлиши мумкин.

Тугунаклар ҳосил бўлиши ва АрбМ шаклланиши учун Умумий ҳолат, шунингдек, рецепция генлари ва замбуруғларни ҳужайра деворининг асосий компоненти хитин олигомерларига яқин бўлган ризобиал *Nod*-омилларининг процессинги бўлишлари ҳам мумкин. Тугунак ҳосил бўлишини фаоллаштирадиган *Nod*-омиллар, микоризацияни ҳам мўътадиллаштирадилар, дуккаклиларда *Nod*-омилларни парчалайдиган хитиназаларни синтези ризобийлар билан ҳам, АрбМ замбуруғлар билан ҳам индуцирланади.

Бу маълумотлар шуни кўрсатадики, ризобийлар ўсимликлар билан коэволюция жараёнида микоризали замбуруғлар сингари сигнал омилларни синтез қилишни «ўрганиб» олганлар.

Шундай қилиб, тугунаклар ҳосил бўлишини назорат қилувчи генетик тизимнинг сезиларли қисми ўсимликларнинг АрбМ замбуруғлар билан коэволюцияси даврида пайдо бўлган. Шунинг учун АрбМ ҳосил қилиш қобилиятини ўсимликларнинг азотфиксация қилувчи симбиозга мослашувдан олдинги асосий ҳолатлардан деб қараш лозим. Бироқ дуккаклилар ва ризобийлар коэволюцияси жараёнида ўзаро муносабатларнинг янги босқичлари пайдо бўлдики, (улардан энг аҳамиятлиси эндоцитоз ва автоном симбиосомаларнинг шаклланишидир), улар шерикларнинг чуқур функционал интеграцияси ва морфологик тизимларининг мураккаблашувини таъминлайдилар.

Симбиотик азотфиксациянинг барча тизимлари учун хос белги, мазкур жараённинг интенсивлиги иккала шериклар генлари орқали мувофиқлаштирилишидир. Шунинг учун азотфиксацияловчи симбиозларни яхшилаш, бошқа хил ўсимлик-микроб муносабат тизимлари сингари микроорганизм ва ўсимликлар ўртасида мувофиқлаштирилган ген муҳандислиги ва селекцион тадқиқотлар олиб боришни тақозо этади.

Ўсимликлар ва бактерияларнинг кучли интеграциялашган симбиотик генлари функциялари ташкиллашувини аниқламасдан туриб, симбиотик тизимни яхшилаш, хатто янги симбиозлар ҳосил қилиш тўғрисида сўз очиш мумкин эмас. Бу маълумотни инобатга олиб ўсимлик-микроорганизм азотфиксацияловчи тизимда максимал синергетик самарага эришиб бўлмайди. Ҳозирга келиб амалда самарадор микроорганизм ва дуккакли ўсимлик навларида оптимал бирга қўшилган вариантлари олинган.

Юқори специфик таниб олиш хусусиятини ҳосил қилиш ўсимликларни метаболитик ва ҳимоя тизимлари билан микросимбионтларнинг ўзаро мос келишини яхшилаш йўлида жиддий ишланмаларни ишлаб чиқиш талаб қилинади. Кўплаб симбиозларнинг катта энергия талаб қилишини инобатга олиб, ўсимликларни энергия билан таъминлаш тизимлари, биринчи навбатда

фотосинтез аппарати билан эндосимбионтларнинг муносабатини тартибга келтириш, оптималлаштириш масаласи долзарб масала ҳисобланади.

Бу борадаги фундаментал ва амалий муаммоларнинг ечими турли соҳа мутахассислари иштирок этадиган соҳалараро тадқиқотлар олиб боришни тақозо этади. Табиатдаги симбиотик тизимларни ўсимлик ва микроблар борасида юксак билим ва амалий кўникмаларга эга олимлар жамоаси – «илмий симбиози» фаолияти натижасида ўрганиш мумкин.

Бундай жамоаларнинг ташкил этилиши жуда муҳим вазифа бўлиб, унда замонавий фаннинг барча молиявий ва ташкилий имкониятлари ишга солиниши лозим бўлади.

Назорат саволлари:

1. Ўсимликлар билан симбиоз муносабатга кириш хусусиятига эга бўлган микроорганизмларнинг асосий вазифаларини тавсифлаб беринг.
2. Нитрогеназа комплексининг асосий хусусиятларини таърифлаб, унинг микроб-ўсимлик муносабати тизимидаги ўзига хосликларини кўрсатиб беринг.
3. Дуккакли-ризобиал симбиозда шерикларни таниб олишга хизмат қиладиган сигнал молекулаларнинг табиати қанақа?
4. +айси генетик тизимлар тугунак бактериялар ва ўсимликлар томонидан сигнал муносабатларни назорат қилади?
5. Дуккакли ўсимликларда тугунаклар ҳосил бўлишини назорат қиладиган генларнинг асосий гуруҳларини тавсифлаб беринг.
6. Нодулинларнинг тузилиши ва вазифаларини ўрганиш услубиятининг мазмуни нимадан иборат?
7. Дуккакли ўсимликлар ва тугунак бактерияларнинг С-ли ва N-ли метаболизм тизимлари интеграцияси механизмлари қандай?
8. Ўсимликда тугунак ҳосил бўлишини бошқариш механизмлари ва даражаларини таърифланг.
9. Ўсимликларнинг ризобийлар ва цианобактериялар билан симбиозлари ўртасидаги ўхшашлик ва фарқлар нималардан иборат?
10. Симбиотик азотфиксациянинг эволюцияси ва келиб чиқиши қандай йўллар билан амалга ошган бўлиши мумкин?
11. Азотни ўзлаштирувчи микроорганизмлар ва ўсимликларнинг симбиотик жуфтлари селекциясини симбиотик муносабатлар самарасига таъсири хусусиятлари.

БАКТЕРИАЛ ЎҒИТЛАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШ ТЕХНОЛОГИЯСИ

Қишлоқ хўжалик экинларини интенсив ҳолда кўпайтириш, тупроқда азот миқдорини камайтиради. Лекин (беда, соя, мош, нўхат, ерёнғоқ ва бошқалар) азот тўплаш қобилиятига эга бўлган дукакли ўсимликларни экиш, аксинча тупроқни азот бирикмалари билан бойитади ва ҳосилдорлигини оширади.

Улар тупроқни фақат азот билан бойитибгина қолмасдан, оқсилга бой илдиз ҳам ҳосил қилади. Дукакли ўсимликлар илдиз туганакларида бактерия мавжудлигини биринчи марта Лахман (1858 йил) ва Варонин (1866 йил)лар аниқлашган. Туганак ҳосил бўлиши ҳаво таркибидаги эркин азотни ўзлаштирувчи бактериялар таъсиридалигини М.Бейеринк (1888 йил) исботлади. У бу микроорганизмларни тоза культурасини ажратиб олди ва *Bacillus radicola* деб номлади. Тез вақтларда бошқа эркин азотни ўзлаштирувчилар ажратила бошланди. Ҳозирги вақтда жуда кўплаб прокариот микроорганизмларнинг азот ўзлаштирувчилар эканлиги маълум бўлди. Улар ичида симбиоз ва эркин яшовчи турлари мавжуд.

Туганак бактериялар хоссалари. Ҳозирги вақтда азот ўзлаштирувчи дукакли ўсимликлар илдизида ҳамкор (симбиоз) ҳолда яшаб, туганак ҳосил қилувчи бактерияларни *Rhizobium* ва *Bradyrhizobium* туркумига киритилган (“*rhizo*” грекча бўлиб илдиз маъносини беради ва *bio* -ҳаёт деганидир). Буларнинг турларини номланиши, қайси ўсимлик илдизида туганак ҳосил қилса, шу ўсимлик номи билан аталади. Масалан: *Rhizobium lupini* -люпин илдизида туганак ҳосил қилувчи бактерия, *R.trifolii* -клевер илдизида ва шунга ўхшашлар. Лекин бундай номлаш қандайдир даражада шартлидир. *Rhizobium* туркумининг айрим турлари кўп миқдордаги илдиз турларида ҳатто турли хил туркумдаги дукакли ўсимликларда туганак ҳосил қилиши мумкин.

Дукакли ўсимликлардан (уларни 1300 га яқин тури, 550 туркуми маълум) тахминан 1300 турида туганак ҳосил қилиши аниқланган. Туганак бактериялар тупроқда ҳам учрайди, лекин у ёки бу дукакли ўсимликлар илдизида фаол туганак ҳосил қилиши учун ўзига хос бўлган шароитни талаб қилади. Туганак бактерияларнинг хужайраси ёш культурада одатда таёқчасимон (0,5-0,9×1,2-3,0 мкм) шаклда бўлади.

Лекин айрим шароитларда овал шаклига, кокксимон, шунга ўхшаш ноксимон ва шохланган бўлиши ҳам мумкин. Шундай катта, кўпинча нотўғри шаклдаги хужайралар (бактероидлар) одатда туганакда кузатилади, кўпгина туганак бактерияларнинг ёш хужайраси ҳаракатчан перитрихли ҳолда жойлашган хивчинларининг мавжудлиги туфайли грамманфийдир.

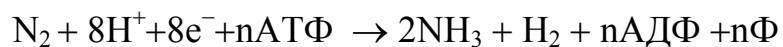
Улар захира махсулотлар сифатида поли-β-гидрооксибутират ҳосил қиладилар. Бўлиниш йўли билан кўпаяди. Туганак бактериялар тез (нўхат, клевер, беда, ловия, донли ва бошқалар ўсимликлар) ва секин ўсувчи (люпин, соя, ерёнғоқ ва бошқалар) бактерияларга бўлинади. Тоза культура ҳолатида углеводли ёки айрим бошқа органик моддалар бор муҳитда ўсади. Айрим штаммлари автотроф шароитда энергия манбаи сифатида молекула ҳолидаги водород мавжуд бўлган муҳитда ўсиш қобилиятига эгадир.

Яқин вақтларгача ҳамма туганак бактериялар молекуляр кислородли шароитда ўсади деб ҳисобланар эди. Лекин яқинда кузатилдики, туганак бактерияларнинг айрим штамлари анаэроб шароитда электрон акцептори сифатида нитрат мавжуд бўлган муҳитда ҳам ўсиш қобилиятига эга экан.

Турли хил турларининг ўсиши учун меъёрдаги ҳарорат 25–30⁰С дир, меъёрдаги рН кўрсаткичи кўпинча 6,8–7,0 бўлиши керак. Туганак бактериялар препаратини амалиётда қўлланилганда битта ўсимликка ишлов бериш учун зарур бўлган бактерия хужайралари миқдори анча катта (1 та уруғга 500 дан 1 млн. гача) бўлиши лозим, лекин илдиз тўқимасига санокли хужайраларгина ёпишади.

Бактерия ўзининг ўсимлигини (хамкорини) илдиз ўсимталарида жойлашган махсус глеикопептид - лектин моддаси ёрдамида билиб олади. Илдизда туганаклар пайдо бўлиши ўсимликда биринчи чин барг таракқий қилиши даврида кетади, ва бир йиллик ўсимликларда улар узок вақт фаолият кўрсата олмайди, туганакларнинг некрози ўсимлик гуллаши даврида бошланади. Бактериоид хужайраларининг бир қисми лизис бўлади, қолганлари майда кокклар кўринишида тупроққа тушади.

Туганак бактериялар томонидан ўзлаштирилган азот, бошқа прокариотлардаги каби аммиак ҳосил бўлишига олиб келади, ундан кейин аминокислоталар синтезланади. Бундан ташқари, азот ўзлаштириш жараёни кўпинча молекула ҳолдаги водородни ажралиши билан бирга кетади:



Молекула ҳолидаги азотдан аммиак ҳосил бўлишидаги ва молекула ҳолдаги водород ажраб чиқишидаги жараёнда икки компонентдан иборат нитрогеназа ферменти иштирок қилади. I–компонент- таркибида темир ва молибден бўлган оксил, II–компонент-эса таркибида фақат темир ушловчи оксилдир. Нитрогеназа ҳосил бўлиш ва унинг фаоллиги фақат анаэроб шароитдагина кетади.

Шу сабабли аэроб азот ўзлаштирувчилар, у ёки бу йўл билан уларни фаолият кўрсатишлари учун шароит яратиш керак. Туганак бактерияларда бу вазифани бажаришда туганакдаги леггемоглобин қатнашади, у қондаги гемоглобинга ўхшаб молекула ҳолдаги кислородни ўзига боғлаб олади ва қайтариб чиқаради.

Леггемоглобинни ҳосил бўлиши фақат туганакда кузатилади. Туганак бактерияларни амалиётда қўллашдан маълумки, туганак қанча қизғишроқ бўлса (леггемоглобинни мавжудлиги натижасида) шунча интенсив азот ўзлаштириш кетаяпти деймиз.

Туганак бактерияларнинг тупроқда азот мувозанатидаги роли. Азот ўзлаштирувчилар (азотфиксаторлар) тупроқда табиий ҳосилдорлик яратади ва инсоният кимёвий боғланган азот пайдо бўлгунга қадар ғаллачиликда, яйловлардан фойдаланишда бу муҳим элементни ўрнини тўлдиришда фақат микроорганизмлар фаолияти натижасига суяниши мумкин эди. Ҳозирги вақтда

тупроқни азот бирикмалари билан бойитишда азотфиксаторларни аҳамияти анча сезиларлидир.

Е.Н.Мишустин (1985) ҳайдаладиган ерларга тушадиган қуйидаги азот манбаларини келтириб ўтади (млн.т\йил):

Минерал ўғитлар	6,5
Органик ўғитлар	4,4
Дукакликларнинг қолдиқлари	1,4
Эркин яшовчи азотфиксаторлар	3,5
Атмосферадан ёғингарчилик орқали	1,3
Уруғлар орқали	0,9
Жами:	18,0

Бу миқдордан 9,0-12,0 млн.т атрофидаги азот ўсимликлар томонидан ўзлаштирилади. Дукакликлар, тупроққа 1,4 млн. т. атрофида азот туширувчилар, ҳақиқатда эса бу элементни бирмунча кўп миқдорда боғлайдилар, лекин у ҳосил билан бирга йиқилиб кетади. Туганак ҳосил қилувчи ўсимликларни атмосфера азотини фиксация даражаси маълумотини келтириб ўтамиз, бир йилда (кг/га):

<i>Беда</i>	<i>200-220</i>
<i>Клевер</i>	<i>150-200</i>
<i>Люпин</i>	<i>150-170</i>
<i>Соя</i>	<i>50-60</i>
<i>Нўхат</i>	<i>80</i>
<i>Ловия</i>	<i>40</i>
<i>Яйлов + дукакликлар</i>	<i>120</i>

Дукаклик ўсимликлар етиштиришда минерал азотли ўғитлар ишлатиш мақсадга мувофиқ эмас, ўсимликларни ўсишини бошланғич фазасида оз миқдорда (25-30 кг/га) бериш мумкин. “Биологик азот” (микроорганизмлар ёрдамида боғланадиган азот) ўсимлик томонидан тўлиғича ассимиляция қилинади. Минерал азотни бир қисмигина (50% дан ошмайди) ўзлаштирилади, қолган қисмлари эса ювилиб кетади ва денитрификация жараёнида (N_2 , N_2O , NO ҳолатда) ҳавога учиб кетади.

Бундан ташқари биологик азот атроф-муҳитни зарарли моддалар билан ифлослантормайди.

Туганак бактериялар асосида препаратлар тайёрлаш технологияси

1886 йилда Германияда Ноббе ва Гильтнер дукаклик ўсимликларни 12 тури учун туганак бактериялар аралашмасидан тижорат препаратини тайёрлашди. “Нитрогин” номини олган бу препаратни қўллаш дукакликларни ҳосилдорлигини бирмунча оширди, шунинг учун бу бутун дунё тадқиқотчилар

этиборини тортди ва ҳозирги вақтгача сақланиб келмоқда.

Туганак бактериялар препаратини АҚШ да (1886), Венгрияда (1898) ва Англияда (1906) тайёрлай бошлашди. Россияда туганак бактериялар препарати билан тажриба олиб бориш Л.М.Будинов (1907) ва кейин И.А.Макринов (1915) томонидан бошланди.

Туганак бактерияларни препаратларини тайёрлаш учун уларни дукакли ўсимликлар (нўхат дони, ловия ва бошқалар) қайнатмаси муҳотида ўстирилади. Қўшимча углеводлар -глюкоза, сахароза ёки бошқа углевод бирикмаларини, масалан: маннит қўшилса культура ўсиши тезлашади. Шунга ўхшаш агар-агар солиниб, агарли муҳит ҳозирги вақтгача туганак бактерияларни препаратини олиш учун (Болгария, Руминияда) қўлланиб келинмоқда.

Бу шаклда саноат асосида нитрогин ишлаб чиқариш, агар-агарнинг ноёблиги ва баҳосининг юқори эканлиги туфайли иқтисодий самара бермади. Бу масалада тупрокни (одатда боғлар тупроғини) субстрат сифатида фойдаланиш, нисбатан яхши натижа берди.

Стерилизация қилинган - тупроқ, сут шишаларига, флаконларга ва шу каби бошқа идишларга жойланади, туганак бактерияларнинг суюқ культураси юборилади. Лекин тупроқ нитрогинида бактерияларни юқори титрига эришиб бўлмайди. Шунинг учун кўп тажрибалардан кейин субстрат - ташувчи (бактерияни ўзига шимдирувчи) сифатида торфдан фойдалана бошланди. Торф захирасига эга бўлмаган мамлакатлар субстрат сифатида бошқа махсулотлардан фойдаланила бошланди.

Республикамизда Фанлар Академияси Микробиология институтида туганак бактериялар асосида “Бактериал ўғит” номи билан дукакли ўсимликларни ҳосилдорлигини оширадиган атроф муҳитни ифлослантормайдиган, юқори самарали препаратлар ишлаб чиқарилган ва амалиётда кенг қўлланилиб келинмоқда.

Бунда бактериянинг ёпиштирувчиси сифатида қуритилган балчиқ, сувўтлари аралашмасидан ва гўнгдан фойдаланилади.

Соя ўстиришда бир неча йил тажрибаларда синаб кўрилган, юқори самара бергани аниқланган. Бундан ташқари республикада захиралари етарли бўлган кўпгина азотли субстратлардан фойдаланиш бўйича илмий тадқиқот ишлари олиб борилмоқда ва амалиётда синаб кўрилмоқда.

Бактерияли ўғит тайёрлаш технологияси бир қанча босқичдан иборат:

- *Туганак бактериялар культурасини ўстириш ва сақлаш;*
- *Суюқ культура (инокулят) олиш;*
- *Субстрат-ташувчи тайёрлаш;*
- *Стерилизация қилиш;*
- *Инокуляция қилиш ва тайёр препаратни сақлаш;*
- *Ишлаб чиқаришини назорат қилиш;*
- *Амалиётдаги самарасини статистик таҳлил қилиб бориш.*

Нитрагин

Нитрагин – препарати *Rhizobium* туркуми бактерияларининг тоза культурасини сақловчи препаратдир. Туганак бактериялари – аэроб, кичик, спорасиз таёқчадир. Маълум бактерия штаммлари бир биридан ўсимлик билан симбиоз ҳолда атмосфера азотини ўзлаштириш фаоллиги билан фарқ қилади (фаол, кам фаол, фаол эмас). Буларнинг аниқ турлари атмосфера азотини фиксация қилиш қобилиятини фақатгина аниқ хўжайин–ўсимликдагина намаён қилади.

Россияда нитрагиннинг икки тури: тупроқли ва қуруқ препаратлари ишлаб чиқарилади.

Тупроқли нитрагинда туганак бактерияси культуралари стерил тупроқда ривожланади. Нитрагин ишлаб чиқариш технологияси етарли даражада самарали эмас, чунки бунда юқори сифатли препарат олиш имконияти йўқ.

Қуруқ нитрагин ўзида туганак бактериялар билан қўшимчаларнинг (торф, бентонит) биргаликдаги кукунини мужассамлаштиради. Тупроқли нитрагинга нисбатан қуруқ нитрагин препарати юқорироқ самарадорликка эгадир. Қуруқ нитрагин ишлаб чиқариш технологияси микробиологик ишлаб чиқариш технологиясидаги асосий характерли босқичлардан иборат (5-чизма).

Ҳар бир дуккакли ўсимлик тури учун мувофиқ туганак бактерия туридан ўстирилиб қуруқ нитрагин препарати тайёрланади. Агарли озиқада ўстирилган дастлабки туганак бактерия культурасидан экиш материални олиш учун уни суюқ озиқа муҳида 28–30⁰С ҳароратда 24–48 соат давомида ўстирилади. Суюқ озиқа муҳити таркиби бактерияни барча босқичларда ўстириш учун бир хилдаги таркибга эга бўлади: меласса, маккажўхори экстракти ва минерал тузлар (NaHCO₃, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, K₂HPO₄, темир тузи, молибден ва ҳ.к.).

Ўстирилган культуралар 1 мл да 8–10 млрд. хужайра сақлаганда уларни сифими 100–150 л бўлган ўстириш инокуляторларига экиш мумкин. Ўстириш 30⁰С ҳароратда доимий аралаштириш ва аэрацияда 18–24 соат давомида олиб борилади. Тайёр экиш материални 1 мл да 2 млрд. хужайра сақлайди ва шундан кейингина уни саноат ферментёрига экиш учун йўналтириш мумкин.

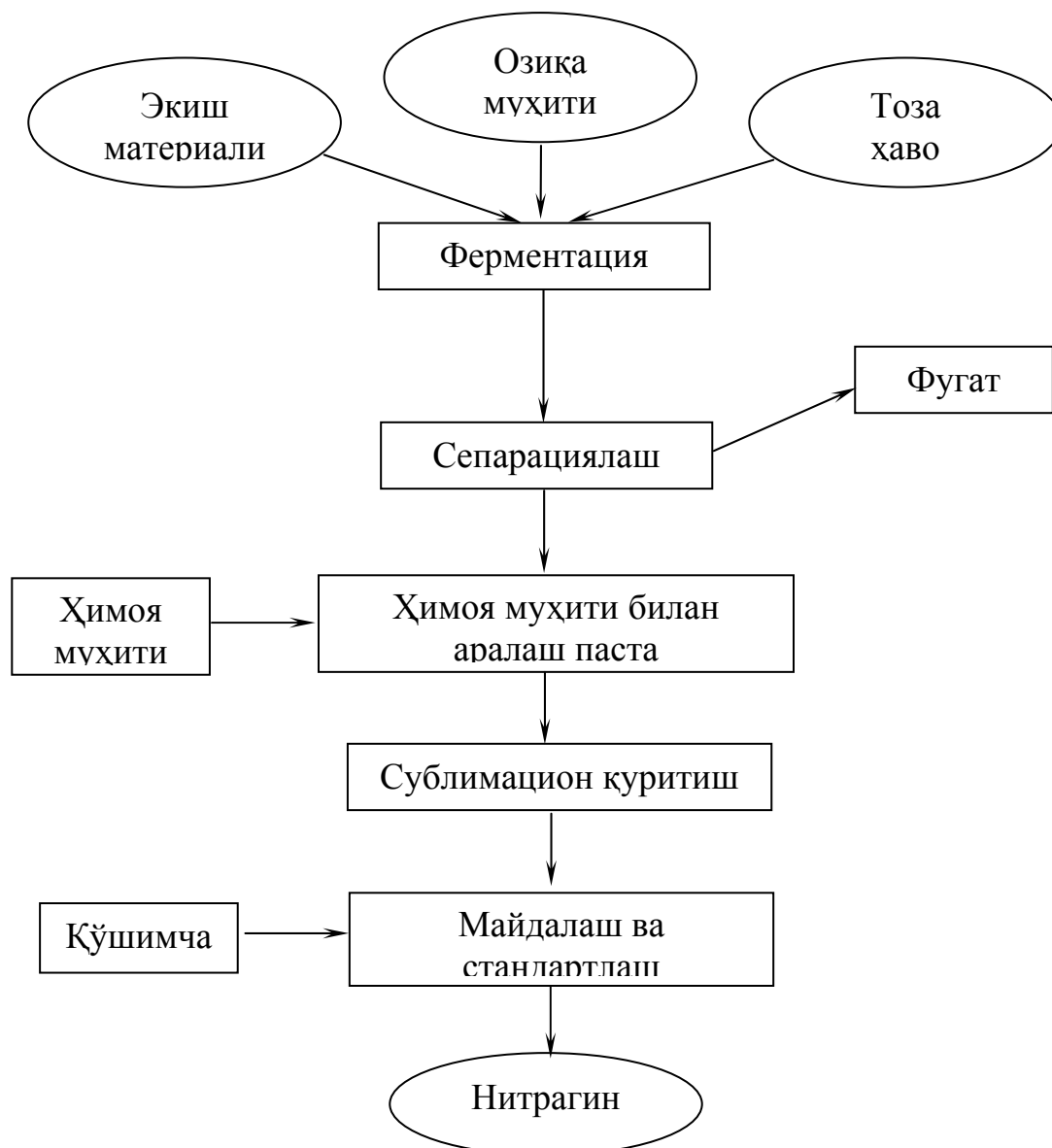
Ферментёрда ферментация жараёни 28–30⁰С ҳароратда интенсив аралаштириш ва аэрацияда 48–72 соат давомида олиб борилади. Ферментация жараёнидан кейин культурал суюқлик 1 мл ида 10 млрд. хужайра титри сақлайди. Ферментация жараёни тугаллангандан сўнг культурал суюқлик сепараторга узатилади.

Биомасса 70–80% намликдаги паста кўринишида олинади. Қуритишдан олдин паста, 20% меласса ва 1% тиомочевина сақловчи химоя муҳити билан аралаштирилади.

Биомассани сублимацион қуритиш -30–35⁰С ҳароратда, секинлик билан бериладиган 10–13 кПа босим вакуум остида амалга оширилади.

Қуритилган биомасса қўшимчалар (бентонит, каолин ва торф каби) билан шундай аралаштириладики, натижада 1 г. препарат 9–10 млрд. туганак бактериялар сақлаши лозим. Қуруқ нитрагин препарати полиэтилен қопчаларга

жойланиб, герметик беркитилади ва ҳарорати 15⁰С дан юқори бўлмаган жойларда сақланади.



14-чизма. Нитрагин ишлаб чиқаришнинг технологик чизмаси

Дуккакли ўсимликлар уруғи ерга экилмасдан нитрагин препарати билан бевосита ишлов берилади. Бундай ишлов бериш натижасида илдиздаги туганаклар ва шу билан бир вақтнинг ўзида ўсимликда азот миқдори ошиб ҳосилдорликнинг юқори бўлишини таъминлайди.

Азотобактерин

Азотобактерин – препарати ўзида атмосферадан азот ўзлаштириш қобилиятига эга бўлган тупроқ микроорганизмларидан бири *Azotobacter chroococcum* культурасини сақлайди. *Azotobacter* бактерияси аэроб ва спорасиз бўлиб тупроқда эркин яшайди. Ўғит сифатида ушбу бактерия тупроқда

тўпланганда тупроққа биологик фаол моддалар (никотин ва пантотен кислоталар, пиридоксин, биотин, гетероауксин, гибберлин ва бошқалар), ўсимлик ўсиши ва ривожланишини бошқарувчи моддалар, шунингдек, анисомицин гуруҳидан фунгицидли моддалар ҳосил қилади, улар эса баъзи бир ўсимлик ризосферасидаги зарарли микроскопик замбуруғларнинг ривожланишини чегаралаб туради.

Азотобактернинг барча турлар - қатъий аэроблардир. Бу микроорганизмлар озиқа муҳитидаги органик ва ноорганик бирикмалар кўринишидаги фосфорга ўта сезгир бўлиб, унинг юқори миқдори озиқада мавжуд бўлса жуда яхши ривожланади.

Фосфор етишмаганда уларнинг азот ўзлаштириш қобилияти ва ривожланиши кескин сусаяди. Азотобактерларнинг кўпчилик турлари эса муҳитда азот мавжуд бўлгандагина азот ўзлаштириш хусусиятларини намаён қиладилар. Культураларнинг азот ўзлаштириш қобилиятини аммиак пасайтиради, аммо молибден бирикмалари ва баъзан ванадий эса ошишига таъсир кўрсатади.

Микробиологик саноат асосида азотобактернинг бир неча турлари ишлаб чиқарилади: куруқ, тупроқли ва торфли.

Қуруқ азотобактерин олиш технологияси

Қуруқ азотобактерин ишлаб чиқариш технологияси нитрагин ишлаб чиқариш босқичларига жуда ўхшаш бўлганлиги учун баъзи бир фарқ қилувчи хусусиятларигагина тўхталиб ўтамиз.

Қуруқ азотобактерин ўзида қуритилган азотобактери хужайрасининг фаол культураси ва қўшимчани мужассамлаштиради. 1 г қуруқ препаратда 0,5 млрд. ҳаётчан хужайралар мавжуд бўлиши лозим. Ушбу культуралар *Rhizobium* хужайралари ўстириладиган суяқ озиқа муҳитида ўстирилади. Бунга қўшимча сифатида темир сульфат, марганец, шунингдек, молибден кислотаси мураккаб тузлари қўшилади. Ўстиришда рН муҳити 5,7-6,5, аэрация эса 1 ҳажм ҳаво 1 ҳажм озиқага 1 минутда берилади.

Ферментация жараёни культура ўсишининг стационар фазасигача олиб борилади, чунки шу фазада хужайрадан биологик фаол моддалар ажралади ва культурал суяқликда қолади. Бунда туғиладиган хафв шундан иборатки, уларнинг хужайрадан кўплаб чиқиши оқибатида тупроққа тушгандан сўнг, хужайранинг атмосфера азотини ўзлаштириш хусусияти йўқолиши мумкин. Биологик фаол моддалар тўлиқ ёки қисман хужайрани қуритиш жараёнида йўқотилади, бироқ анабиоздан чиққан азотобактернинг ҳаётчан хужайраларида яна биологик фаол моддалар ҳосил қилиш хусусияти тикланади.

Қуритилган культура зарур қўшимчалар билан стандартланади ва полиэтилен қопчаларга 0,4-2 кг дан қадоқланади. Қопчалар герметик ҳолатда 15⁰С ҳароратдан ортиқ бўлмаган ҳароратли хоналарда 3 ойгача сақланади.

Торфли ва тупроқли азотобактерин олиш технологияси

Бу турдаги азотобактерин препарати ўзида, қаттиқ озиқа муҳитида ривожланган фаол азотобактер культурасини намоён қилади ва 1 г. препаратда 50 млн. дан кам бўлмаган ҳаётчан хужайраларни сақлайди.

Уларни тайёрлаш учун серхосил тупроқ ёки яхши уваланадиган торфдан нейтрал муҳит реакцияси билан фойдаланилади. Экиш учун олинган қаттиқ субстратга 2% гача оҳак ва 0,1% суперфосфат қўшилади. Олинган аралашма 500 г. дан 0,5 л. ҳажмли шиша идишларга жойланади ва 40-60% ҳажмда сув билан намланиб, оғзи пахта тиқин билан ёпилади ва стерилланади.

Экиш материали 2% гача сахарозалар ва минерал тузлар сақловчи агарли озиқа муҳитида тайёрланади. Культуралар 27⁰С ҳароратда 3-5 кун атрофида ўстирилади. Жараённинг тугалланганлиги агар сиртини жигарранг, шилимшиқ масса қоплаганлигига қараб баҳоланади. Олинган экиш материали агар сиртидан стерил ҳолатда сув билан ювиб олинади ва тайёрланган субстратга ўтказилади. Шиша идишларга солингандан сўнг яхшилаб аралаштирилади ва 25-27⁰С ҳароратда термостатда сақланади. Ўстириш жараёни 1 г. тупроқ ёки торфда бактериялар миқдори 50 млн. бўлгунча давом эттирилади. Бу усулда олинган препарат ўз фаоллигини 2-3 ойгача сақлайди.

Азотобактерин препаратларидан фосфор ва микроэлементлар сақловчи (молибден, ванадий, бор ва х.к) серхосил тупроқда фойдаланиш тавсия этилади. Азотобактерин уруғ, кўчатлар ва компостлар бактеризацияси учун қўлланилади. Бунда ўсимлик илдизи озикланиши ошиб, бошоқли, техник ва сабзаот культураларида ҳосилдорлиги ошади.

Куруқ азотобактердан фойдаланиш усули экиш материали хусусиятига боғлиқ бўлади. Бошоқлилар уруғига куруқ препаратни суркаш механик усулда 1 гектарга етадиган уруғга 100 млрд. хужайра ҳисобида амалга оширилади.

Картошка, сабзаот кўчатларининг илдиз тизимига эса препаратнинг сувли суспензияси сепилади. Бунда 1 гектарга етарли суспензия меъёрини тайёрлаш учун препарат (300 млрд.хужайра) 15 л. сувда суюлтирилади.

Фосфобактерин

Фосфобактерин - *Bacillus megaterium var. phosphaticum* микроорганизми спораларини сақловчи бактериал ўғитдир.

Бу бактериялар мураккаб фосфоорганик бирикмалар (нуклеин кислоталар, нуклеопротеидлар ва х.к.) ва қийин ўзлаштириладиган минерал фосфатлар (пирофосфатлар, полифосфатлар)ни ўсимлик ўзлаштиришига қулай ҳолатга айлантириб бериш хусусиятига эгадир. Бундан ташқари, биологик фаол моддалар ишлаб чиқарадилар (тиамин, пиридоксин, биотин, пантотен ва никотин кислоталар, В₁₂-витамины ва х.к.), булар эса ўсимликлар ўсишини бошқаришда, айниқса дастлабки ўсиш босқичларида катта аҳамият касб этади.

Фосфобактерин фосфор ўғитлари ўрнини эгалламайди ва уларсиз таъсир ҳам этмайди. Препаратнинг асосий самарадорлиги ўстириш хусусияти билан белгиланади. *Bacillus megaterium var. phosphaticum* морфологик хусусиятига

кўра кичик, граммусбат, аэроб спора ҳосил қилувчи таёқчалари ўлчами (1,8-2,0)×(5-6) мкм бўлади. Хужайра катта миқдорда фосфор бирикмаларини сақлайди. Бу хужайралар дастлаб ҳаракатчан битта таёқча бўлиб ривожланиши охирида 0,7×1,2 мкм ўлчамдаги эндоспоралар ҳосил қилади.

Бу микроорганизм асосида олинадиган препарат асосан спорадан ташкил топади, шунинг учун ҳам ўстириш технологияси ҳам спора ҳосил қилишга қаратилгандир. Бироқ фосфобактерин ишлаб чиқариш технологияси нитрагин, азотобактерин каби препаратлар ишлаб чиқариш технологиясидан кам фарк қилади.

Фосфобактерин олиш технологияси

Bacillus megaterium var. phosphaticum культураси барча босқичларини саноат асосида ўстириш, суюқ озика ичига экиш орқали амалга оширилади.

Дастлабки лиофиллаб қуритилган культура қуйидаги таркибли озика муҳитида ўстирилади (% ҳисобида):

1-озика муҳити таркиби	2-озика муҳити таркиби
Маккажўхори экстракти - 1,8; Меласса - 1,5; Аммоний сульфат - 0,1; Оҳак - 1; Сув - қолгани сувдан иборат.	Маккажўхори уни - 2; Меласса - 1,5; В-комплекси (D-витамини ишлаб чиқаришнинг қолдиғи) - 2; Калий фосфат (икки алмашили) - 0,01; Кальций карбонд - 0,3; Қолгани сувдан иборат.

Ўстириш ферментёрда қатъий асептик шароитда, доимий аралаштириш ва спора ҳосил қилиш жараёнигача аэрацияда олиб борилади. Жараённинг асосий кўрсаткичлари: ҳарорат 28-30⁰С, муҳит рН 6,5-7,5, ўстириш давомийлиги 1,5-2 кун.

Биринчи озика муҳитида ўстирилганда тайёр культурал суюқликда хужайра титри 1 мл. да 2,7-3 млрд. спора, 2-озика муҳитида эса 1 мл. да 4,3 млрд. спорани ташкил этади.

Ўстириб олинган хужайра биомассаси центрифугалаш орқали алоҳидаланиб, пуркаб қуритгич мосламада 65-70⁰С ҳароратда 2-3% намлик қолгунча қуритилади. Қуритилган споралар кўшимча (каолин) билан аралаштирилади. Бу усулда тайёрланган препарат 1 граммида 8 млрд. дан кам бўлмаган хужайраларни сақлайди. Улар 50-500 г. дан намликни сақлаб турадиган, герметик қопчаларга жойланади. Фосфобактерин, азотобактерин ва нитрагиндан сақлашга бўлган чидамлилиги билан фарқланади. Булар 1 йил сақлангандан сўнг хужайранинг ҳаётчанлигини йўқотиши 20% дан ошмайди.

Саноат асосида фосфобактерин ишлаб чиқаришда шундай омил борки, бу бактериял ўғит олишда культуранинг фаголизиси ва ўсмайдиган споралар

ҳосил бўлишига сабаб бўлади.

Культуралар фаголизиси шу билан изоҳланадики, бир томондан *Bacillus megaterium* штаммлари бактериофаглар таъсирига жуда сезгир ва фаголизис натижасида зарарланган культура нобуд бўлади, иккинчи томондан эса дастлабки культура ўзига ўзи мутаген ҳисобланади яъни ўзида маълум шароитда фаоллашадиган профаг сақлайди.

Комплекс корхоналарда фаголизисга қарши курашиш учун ишлаб чиқаришнинг барча босқичларида ўстиришнинг асептик шароитини ушлаб туриш, фагга чидамли штаммларни саралаш ва селекция қилиш ҳамда культуранинг ўсишига таъсир қилмайдиган миқдорда органик кислоталар тузини озикага қўшиш (одатда 0,075-0,1% атрофида) каби чора тадбирлар қўлланилади.

Ўсимлик уруғини препарат билан ишлов беришда механик усулдан фойдаланилади, бунда фосфобактерин ва қўшимча нисбати 1:40 ни ташкил этади. Картошка туганагига мўтадил ишлов берилиши учун эса 15 г. препарат 15 л. сувда суюлтирилади. Бу миқдор 1 гектар ерга етадиган экиш материалга сарфланади.

Фосфобактерин қўлланилиши ҳосилдорликни 10% ва ундан ҳам ортиқроқ оширади.

Текшириш саволлари:

Бактериал ўғитлардан фойдаланиш тарихи ҳақида маълумот беринг.

Туганак бактериялар хоссалари нималардан иборат?

Туганак бактерияларнинг тупроқдаги азот мувозанатидаги роли нималардан иборат?

Туганак бактериялар асосида препаратлар тайёрлаш технологияси қандай босқичлардан иборат?

Нитрагин препарати ишлаб чиқаришнинг технологик чизмасини изоҳлаб беринг.

Азотобактерин ишлаб чиқаришда қандай продуцентлардан фойдаланилади?

Нитрагин нима мақсадда қўлланилади?

Фосфобактерин ва азотобактерин нима мақсадларда қўлланилади?

Фосфобактерин ишлаб чиқаришда қандай микроорганизмлардан фойдаланилади?

ЭНТОМОПАТОГЕН ПРЕПАРАТЛАР ИШЛАБ ЧИҚАРИШ БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

Бактериал энтомопатоген препаратлар

Ҳозирги вақтда ўсимлик зараркунанда ҳашаротларига қарши кўплаб микроорганизмлар мажмуаси ажратиб ўрганилган ва булар асосида микроб биопрепаратлари тайёрлашнинг илмий асоси яратилган. Саноат асосида кўплаб препаратлар ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда кенг қўлланилмоқда.

Шундай препаратларни тайёрлаш учун бактериялар, замбуруғлар ва вируслардан фойдаланилади. Препаратларни ишлаб чиқариш технологияси ҳам хилма хилдир. Уларни ишлаб чиқаришда микроорганизмларнинг физиологияси ва биокимёвий хусусиятлари ҳамда препарат нима мақсадда қўлланилиши эътиборга олинади.

Микроб препаратларини ишлаб-чиқаришда қуйидаги бир неча талаблар қўйилади:

- уларнинг спецификлиги, фақат маълум турдаги зараркунандаларга таъсир қилиб фойдали хашаротларга беэиёнлиги;
- юқори самарали таъсир кучига эга бўлиши;
- ишлаб чиқариш ва қўллашнинг қулайлиги;
- одам ва ҳайвонларга нисбатан хавфсиз бўлиши;
- препаратнинг фойдали хусусиятларининг узоқ сақланиши;
- унинг яхши намланиши ва эритмасининг барқарорлиги;
- ўсимлик баргига ва бошқа органларига ёпишқоқлиги ва у ерда узоқ вақт сақланиши ва хаказо.

Дунёда 50 га яқин ўсимликларни зараркунанда хашаротлардан химоя қилиш учун микробиологик препаратлар яратилган. Шулардан кўпчилик препаратлар спорали энтомопатоген *Bacillus thuringiensis* бактерияси асосида ишлаб чиқарилади.

Бактериялар - энг катта ва кенг тарқалган микроорганизмлар гуруҳи ҳисобланади. Буларнинг ичида *Bac.thuringiensis* энтомопатоген бактерияси катта аҳамиятга эгадир. Бу бактерия биринчи мартаба XIX асрнинг 60-йилларида ипак куртининг касалланганида Пастер томонидан кўзатишган. У уни одатдагидан бошқа ядро ҳосил қилувчи, куртларда касаллик кўзғатувчи бактерия сифатида ёзади ва унга *Bacillus bombicis* деб ном беради.

Кейинги вақтларда аниқланишича у ядро эмас, балки оксил кристалли-эндотоксин эканлиги аниқланган. 1911 йил Берлинер бу бактерия хақида тўлиқ маълумот берди ва уни *Bacillus thuringiensis Berliner* деб Тюринг (Германияда) вилоятининг номи билан атади, чунки у тегирмон капалагидан (*Ephistia kuchniella*) ажратиб олинган эди. Кейинчалик бу бактериянинг намунавий штаммларидан айрим хусусиятлари билан фарқ қиладиган кўплаб штаммлар ажратилди.

Бу бацилла бошқа бир қанча энтомопатоген бактериялар қатори *Bacillaceae* оиласига киради. *Bacillus* туркуми таёкчасимон, спора ҳосил қилувчи,

граммусбат турларни бирлаштиради, кўпчилиги ҳаракатчан (хивчинлари мавжуд) факультатив ва облигат (хақиқий) аэроблардир. Кўпчилиги тупроқда тарқалган. *Bacillus thuringiensis* ўзининг кўпчилик хоссаси жиҳатидан *Bac.cereus* га яқиндир. Шунинг учун улар бир гуруҳга бирлаштирилади. Сунъий яратилган муҳитда ва хашорат ичида яхши ривожланади.

Bacillus thuringiensis га қизиқиш йилдан йилга ортмоқда, чунки бактерия жуда кўп муҳим хусусиятларга эга: тез кўпаяди; жуда кўплаб озика муҳитларида спора ҳосил қилади; вегетатив ўсиши тугагандан сўнг, фақат спора ҳосил қилибгина қолмасдан, зараркунанда хашоратларни нобуд қиладиган асосий қурол–кристалл ҳолдаги эндотоксин ҳам синтез қилади.

Бу бактериянинг айрим штаммлари кристалл ҳолдаги эндотоксиндан ташқари ўзининг ўсадиган муҳитига юқори ҳароратга чидамли β–экзотоксин ва ферментлар чиқаради. Булар хашоратлар учун ўта зарарлидир.

Бу бактерия турли хил технологик монупуляцияларга чидамли, сепарацияга, вакуум-буғлатишга, қуритишнинг турли хил усулларига, субстрат-ташувчилар (бактерияни ўзига бириктириб турувчи восита) билан аралаштиришга ва бошқаларга қулайдир. Қуритилган ҳолатда тайёр препарат ўзининг дастлабки хусусиятини йўқотмасдан бир неча йилларгача (1–10 йилларгача) яхши сақланади.

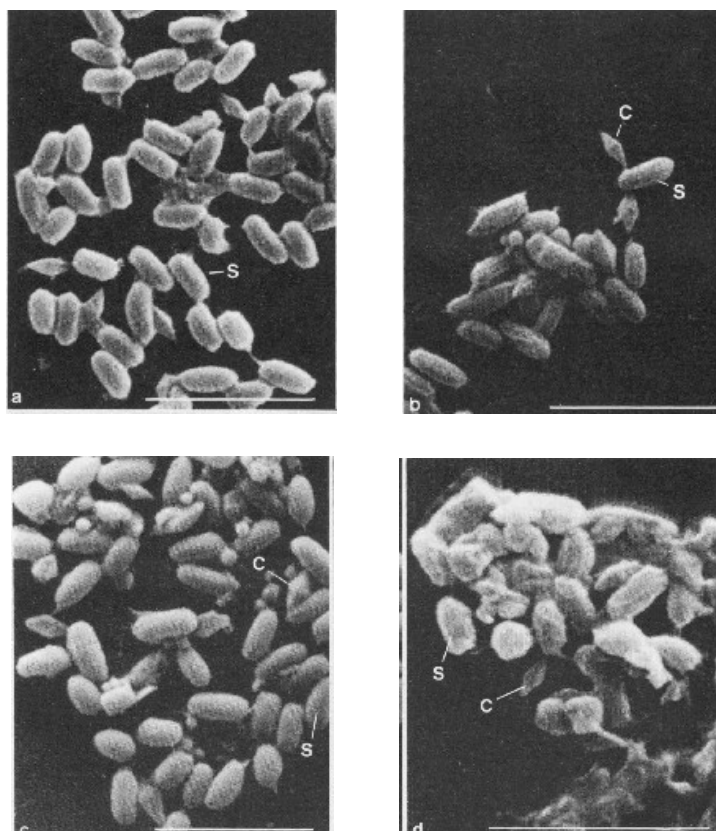
Bacillus thuringiensis нинг ҳамма кўрсатилган сифатлари уни ўсимликларни зарарли хашоратлардан сақлаш воситаси сифатида биринчи ўринга чиқарди.

Энтомопатоген бактерияларда вирулентлик ва фермент фаоллигининг боғлиқлиги ва штаммнинг юқори вирулентликка эга бўлишида С-фосфалипаза ферменти алоҳида ўрин тутиши аниқланган.

Bac.thuringiensis бактериясининг махсус С фосфалипаза билан патогенлик хусусияти орасидаги боғлиқлиги ўрганилган ва С-фосфолипаза *Bac.thuringiensis* бактерияларининг энтомоцид таъсирида асосий фактор ҳисобланади деган хулосага келинган. Бу ҳақда Болгариялик олимлар А.Иванов ва бошқалар (1990) ўз тадқиқотларида *Bac. thuringiensis* бактерияларининг С-фосфолипаза ажратиши, унинг специфик хусусияти ва п-нитрофенил-фосфорилхолинни гидролизлаши ва энтомопатоген хусусияти тўғрисида маълумот беришган.

Ү–экзотоксин- бу токсиннинг табиати ҳозиргача тўлиқ аниқланмаган. Бу токсин *entomocidus* культурасида учрайди (*Bac.thuringiensis* VI серотип).

Кристалл оксилли δ–эндотоксин – ёки жуфт спорали кристалли эндотоксин бактериянинг спора ҳосил қилиш жараёнида хужайранинг бир қисмида спора шакллангандан сўнг ҳосил бўлади, ҳосил бўлган кристалл тўғри саккиз қиррали кўринишга эга бўлади. Кристалларни синтез қилиш культуранинг стационар фазасида тахминан уч соат давомида кечади.



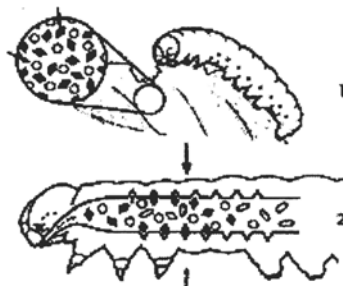
14-расм. *Bacillus thuringiensis* энтомопатоген бактерияси ҳосил қиладиган спора (s) - кристаллари (с) шакллари (Н.А.Хўжамшукуров, 2002 й)

Ҳужайрада турли кўринишдаги бир нечта кристаллар ҳосил бўлиши мумкин (тўғри бипирамидал, ромбсимон, кубсимондан овалсимонгача).

Уларнинг ўлчамлари 0,5×1,3 дан 1×3,5 мкм гача ва ҳаттоки субмикроскопик кўринишигача кичрайиши мумкин. Улар органик эритмаларда эримайди, бироқ спорадан ажралиши мумкин, рН кўрсаткичи юқори ишқорий (рН–11,5 дан юқори) шароитда яхши эрийди ва қайтарувчи ишқорий буфер иштирокида (рН 7,9–9,5) уларнинг эриш даражаси ортади. Кристаллар 100⁰С ҳароратда 30–40 минут қиздирилганда ўзининг заҳарлилик хусусиятини йўқотади.

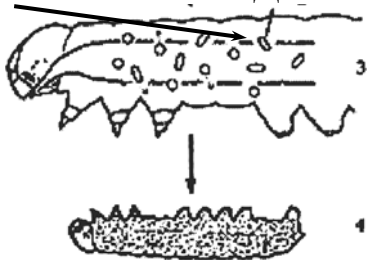
Илмий адабиётларда қайд қилинишича кристаллар оқсиллардан тузилган бўлиб уларнинг аминокислоталар таркиби турли штаммларда бир -бирига жуда яқиндир. Кристалл оқсиллар кимёвий табиатига кўра споралар қобиқларининг оқсили билан яқиндир. Адабиётларда споралар ҳужайра қобиғида ортиқча ишлаб чиқарилган оқсилдан ҳосил бўлади деган назариялар ҳам мавжуд.

Дунёда ушбу препаратларни ишлаб чиқаришнинг 20 га яқин саноат шакллари яратилган, буларни ҳаммасининг асосида *Bac.thuringiensis* нинг у ёки бу турлари ётади. Асосан саноат асосида қуйидаги турлардан фойдаланилади: *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis, kurstaki, galleriae, dendrolimus, israelensis*.



КРИСТАЛЛ ТОКСИНЛАРНИНГ ОРГАНИЗМГА СЎРИЛИШ ЖАРАЁНИ

СПОРАЛАР РИВОЖЛАНАДИ



ХАШАРОТНИНГ НОБУД БЎЛИШИ

15-расм. Спора-кристалларнинг таъсир механизми

Мамлакатимизда, Республика Фанлар Академияси Микробиология институтида, профессорлар Қ.Д.Давранов ва Т.Ю.Юсуповлар раҳбарлигида *Bac.thuringiensis* ни маҳаллий штаммлари асосида биопрепарат ишлаб чиқариш технологиясининг илмий асоси яратилди. Н.А.Хўжамшукуров томонидан биринчи мартаба колорадо кўнғизи личинкаларига қарши *Bac.thuringiensis* энтомопатоген бактериясининг мутант штаммлари асосида “Биокристалл” инсектицид биопрепарати яратилди ва препаратнинг дастлабки партиялари лаборатория ва дала шароитларида синовдан ўтказилиб муваффақиятли деб топилди.

Россияда эса, бу препаратнинг 10 дан ошиқ хиллари ишлаб чиқарилмоқда ва амалиётда кенг қўлланилмоқда. Мисол тариқасида “энтобактерин” номи билан *Bac.thuringiensis var.galleriae* бактерияси асосида саноатда биринчи марта кукун кўринишида препарат тайёрланган. Препарат таркибида 30 млрд/г спора, шунча миқдорда кристалл ҳолидаги эндотоксин ва ёпиштирувчи қўшилмалар (каолин) мавжуд. Тангача қанотли хашоратларнинг кўпгина турларига қарши курашда самарали фойда беради: карам ва шолғом оқ капалаги, карам куяси, ботқоқ капалаги, мева куяси ва бошқалар.

Ичакда таъсир қилувчи препарат озиқа билан хашоратнинг организмига кириб, уни захарлайди, хашоратда экзотоксин таъсирида вужудга келадиган фалажлик уйғотади, ичак тизимининг бир бутунлиги бузилади, кейин споралар гемолимфаларга киради у ерда ўсади, хужайра кўпая бошлайди ва сепсис бошланади, натижада хашорат нобуд бўлади. Энтобактерин одам ва иссиққонли ҳайвонларга, балиқ, асалариларга ва энтомофагларга таъсир

қилмайди, лекин ипак қуртига хавфлидир.

Препарат эритмаси ўсимликга сепиш йўли билан қўлланилади, 2–5 кг/га микдорда 300–1500 л/га махсус пуркагич мосламалар ёрдамида, катта майдонларга самолёт ёрдамида ҳам сепилиши мумкин. Энтобактеринни қўллашнинг мўтадил ҳарорати 18–32⁰С дир.

Шунга ўхшаш турли хил номлар билан бир қанча препаратлар бутун дунёда ишлаб чиқарилмоқда ва ўсимликларни зараркунанда хашоратларига қарши курашишда амалиётда кенг қўлланилиб келинмоқда. Масалан: дендробациллин, битоксибациллин (БТБ), БИП-биологик инсектицид препарат, гомелин, лепидоцид, бактокулицид, дипел, бактоспеин ва бошқалар.

Bac.thuringiensis бактерияси асосида тайёрланган биопрепаратлар юқори самарадорликка эга. Бу препаратлар барчаси ***Bac.thuringiensis*** бактерияси штаммлари асосида тайёрланган бўлиб, хашоратлар турига таъсири, препаратни тайёрлаш технологияси, самарадорлиги ва бошқа бир қанча хусусиятлари билан бир-бирларидан фарқ қилади.

Энтобактерин ишлаб чиқариш технологияси

Микроб патогенларини суюқ озикада ўстириш энтомопатоген бактериялардан максимал хужайралар олиш ёки токсинлар тўплашга асослангандир.

Бактериал энтомопатоген препаратлар ишлаб чиқаришни энтобактерин мисолида кўриб чиқамиз.

Энтобактеринни ишлаб чиқариш технологияси хоҳлаган микробиологик ишлаб чиқаришдаги суюқ озика ичида ўстириш жараёнида кечадиган барча босқичларни ўзида мужассамлаштиради (4–чизма):

- *Экиш материали олиш;*
- *Озика муҳити тайёрлаш ва стериллаш;*
- *Ҳавони стериллаш;*
- *Ферментация;*
- *Културал суюқликни қуюқлаштириш;*
- *Препаратни қуритиш ва қадоқлаш.*

Экиш материални олиш. Энтобактерин ишлаб чиқариш учун дастлабки культура ***Bacillus thuringiensis*** ҳисобланади. Ишлаб чиқаришга тадбиқ этилган штамм завод лабораториясида унинг софлиги, махсулдорлиги, културал суюқликда вирулентлиги ва фаг сақлаш каби хусусиятлари назорат қилинади. Экиш материали олиш учун туби айлана бўлган 3 л сифимли колбаларда культура ўстирилади. Ўстириб бўлингандан сўнг экиш материали 1 мл да 1,7 млрд. спора сақлаши лозим.

Барча босқичларда ачитки полисахаридли озика муҳити куйидаги таркибда қўлланилади (%):

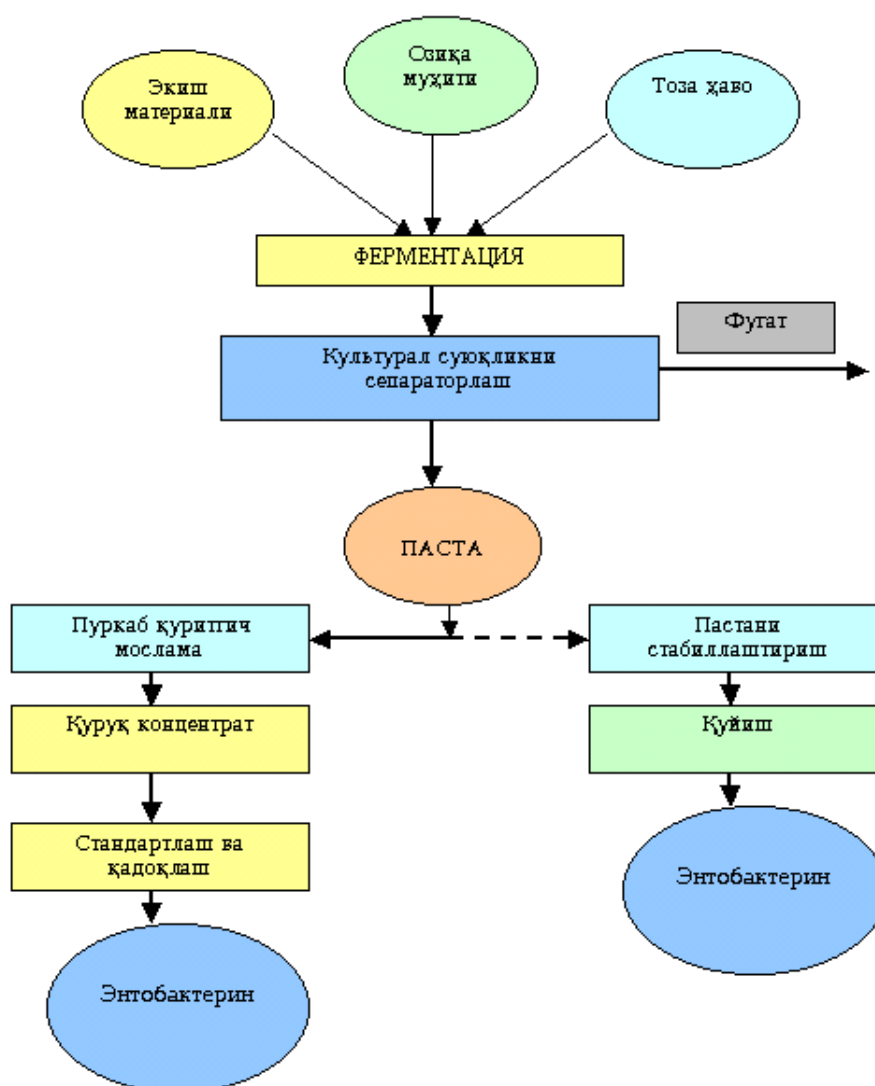
- *Озика ачтқиси – 2–3;*
- *Маккажўхори уни – 1–1,5;*

➤ *Кашалатли ёғ (кам эмас) – 1.*

Озиқа муҳитини тайёрлаш ва стерилизация қилишда одатдаги усуллардан фойдаланиш мумкин. Колбаларда олинган экиш материали экиш ускунасидаги озиқа муҳити ҳажмига нисбатан 0,05% миқдорида экилади. Ушбу ускунада культураларни ўстириш 28–30°C ҳароратда узлуксиз аралаштириш ва аэрацияда олиб борилиши ҳамда ускуна босими 0,14 – 0,15 Мпа бўлиши лозим.

Ўстириш давомийлиги 35–40 соатни ташкил этади. Экиш материали ишлаб чиқариш ферментёрига берилиш олдидан унда ёт микрофлора ёки фаглар мавжудлиги қатъий равишда текширишдан ўтказилади.

Ферментация. Ферментаторга солинган экиш материали экиш ускунасидаги технологик жараёнлар асосида ўстирилади.



2-чизма. Энтобактерин ишлаб чиқариш технологиясининг чизмаси

Ўстириш жараёни 35–40 соат давом эттирилади. Ўстириш жараёни культурал суюқликда эркин спора кристаллар миқдори 5–10% ни ташкил этганда яқунланади. Культурал суюқлик 1 мл да 1 млрд. спора сақлаши лозим.

Культурал суюқликни қуюқлаштириш. Махсус йиғгичларда тўпланган

культурал суюклик сепараторга йўлланади. Сепараторда йиғилган паста 30 минут давомида махсус тўплаш жойида аралаштирилади ва унинг спора сақлаши, вирулентлиги, фаг мавжудлиги ва намлиги текширилади. Одатда 1 м³ культурал суюклик сепаратордан ўтказилганда 100 кг паста чиқиши лозим. Пастанинг намлиги 85% бўлиб, тахминан 1 граммида 20 млрд. споралар титрини сақлаши керак.

Қуритиш ва энтобактеринни тайёр махсулот шаклида олиш. Паста мувофиқ назоратлардан ўтказилгандан сўнг пуркаб қуритиш мосламасига йўналтирилади. Қуритишдан сўнг препаратнинг намлиги 10% дан ошмаслиги лозим. 1 м³ культурал суюкликдан 12–13 кг куруқ препарат чиқади. Препарат 1 граммида 100–150 млрд. споралар титрини сақлайди. Уни стандартлаш учун кўшимча сифатида каолин қўшилади ва полиэтиленли алмаштирилдиган тегишли кўрсатмалар кўрсатилган этикеткалар ёпиштирилган тўрт қатламли крафт–қопчаларига 20 кг дан жойланади.

Тайёр энтобактерин препарати 1 граммида 30 млрд. дан кам бўлмаган споралар титри ва шунча миқдорда кристаллар сақлайди. Ушбу препарат боғ, томорқа ва иссиқхонада учрайдиган 60 дан ортиқ зараркунанда хашаротлар турларига қарши самарали ҳисобланади. Зараркунанда билан зарарланган ўсимликка энтобактерин препарати сувли суспензия кўринишида 0,5–1% миқдорида зараркунанданинг фаол озикланиши олдиан пуркаб сепилади. Хашаротларнинг асосий қисми 2–10 кунлари нобуд бўлади. Энтобактерин препарати ҳозирда паста кўринишида ҳам ишлаб чиқарилмоқда. Бу ҳолда ишлаб чиқариш куруқ препаратга нисбатан бир қадар арзон ва қулайдир. Культурал суюкликдан олинган паста, унга аниқланган миқдорда стабилизатор–карбоксиметилцеллюлоза (КЦМ) қўшиладиган махсус идишга йўналтирилади.

КМЦ молекулалари спора ва оксилли кристалларни сорбция қилади ва бунинг натижасида уларнинг бир-бири билан маълум нисбатда жойлашиши ва тарқалишини таъминлайди. Стабилизатор қўшиладиган вақтда пастага узоқ вақт сақланишини таъминлаб берадиган турли хил консервантлар ҳам қўшилади.

Фаголизисга қарши курашиш. Энтобактерин ишлаб чиқариш технологиясида асосий қийинчилик, бошқа энтомопатоген препаратлар ишлаб чиқаришдаги каби фаголизисга қарши курашишда пайдо бўлади. Фаг–бу бактерияни нобуд қилувчи вирусдир. Унинг таъсир этиш механизми хўжайин–бактерияда ДНК синтезини тўхтатади ва натижада бактерия нобуд бўлади. Фаг ривожланишини чегаралаб ташлаш хусусиятига эга бўлган турли хил бирикмалар – антифаг факторларини қўшиш фаголизисга қарши курашишнинг бир усули ҳисобланади. Бундай бирикмаларни олиш жуда қиммат бўлганлиги учун кенг миқёсда қўлланилмайди. Яна бир усул бу фагга бардошли штаммлардан фойдаланиш ҳисобланади, аммо бунда ҳам кўп меҳнат талаб қиладиган генетик ва селекция ишларини бажариш лозим бўлади.

Замбуруғлар асосида олинадиган энтомопатоген препаратлар

Замбуруғли энтомопатоген препаратлар зарарли хашаротларда микоз касаллигини туғдириш орқали уларнинг нобуд бўлишига олиб келади.

Энтомопатоген бактериялар ва вирусларга нисбатан замбуруғлар куйидаги ўзига хос хусусиятларга эга :

- нобуд бўлиш овқат ҳазм қилиш йўллари орқали эмас, балки бевосита кутикула орқали руй беради;
- хашаротлар ўзининг гумбой ва имаго ривожланиши фазасида нобуд бўладигани, бу бошқа микроорганизмлар билан бўладиган ўзаро муносабатларда кузатилмайди;
- замбуруғлар нисбатан тез ўсиши ва жуда катта репродуктив қобилиятига эгаллиги билан характерланади, энтомопатоген фаоллигини пасайтмасдан спора ҳолатида узоқ вақтгача табиатда сақланиши мумкин;
- айрим хашаротлар турларин нобуд қилишда юқори даражада специфик бўлиб, бинобарин уларнинг вирулентлиги сезиларли даражада ишлатиладиган замбуруғларни штаммига боғлиқ бўлади.

Замбуруғли препаратнинг хашаротга таъсири спораларнинг тана бўшлиғига тери орқали киришидан бошланади. Хашарот танасига тушган замбуруғ спораси ўсиб гифага айланади, кейин мицелийга, қайсики улардан гифали таначалар энтомопатоген замбуруғларнинг инфекцияли бирлигини ташкил қилувчи копидиялар ажралиб чиқади.

Копидиялар ўсиб чиққандан кейин то хашаротлар нобуд бўлишигача бўладиган оралиқ вақт хашаротлар катта-кичиклигига қараб 2–8 суткагача давом этиши мумкин.

Beauveria авлодига мансуб замбуруғлардан препаратлар олиш уларнинг ***B.bassiana vuill*** (60 дан ортиқ турдаги хашаротларни нобуд қилади) ва ***B.tenella Del.*** (10 дан ортиқ турдаги хашаротларни нобуд қилади) турлари асосида саноат миқёсида препаратларни ишлаб чиқаришга асосланган.

Ҳозирги пайтда ***B.bassiana(Bals).Vuill.*** ни гафолицети конидиоспорасини ташкил қилувчи замбуруғли энтомопатоген препарат-боверин ишлаб чиқариш кенг йўлга қўйилган.

Тайёр ҳолдаги бу препарат оқ ёки кремсимон кўринишидаги порошок бўлиб, 1 гр. препаратда 1,5 дан 6 млрд. гача конидиоспоралар мавжуд. Споралар билан бир қаторда боверин фаоллиги замбуруғда синтез қилинадиган токсин- боверицин билан ҳам белгиланади. Бу препаратни қўллаш дехқончиликда қўлланиладиган кимёвий препаратларни 90% гача қисқартиришга имкон беради. Шу билан бирга препарат инсонлар, иссиқ қонли ҳайвонлар учун зарарсиздир.

Боверинни саноат асосида олиш учун ишлаб чиқариш штаммини ҳам суяқ озикада, ҳам қаттиқ озика муҳитида ўстириш мумкин.

Конидиоспоралар ишлаб чиқаришда технологик-иқтисодий кўрсаткичлар суяқ озикада ўстириш билан қаттиқ озика юзасида ўстириш усулларида деярли

ўхшаш бўлади.

Бироқ, конидиоспораларни суюқ озика фазасида ўстириш орқали олиш оддий иш эмас, бунинг ўзига хос техник ноқулайликлари мавжуд.

B.bassiana Vuill замбуруғини суюқлик усули орқали ўстирилганда улар вегетатив кўпайиб, ҳаво конидиоспоралардан фарқ қилувчи гонидия (бластоспора, цилиндраспора) деб номланувчи гифали тана ҳосил қилади.

Ҳашоратларга таъсири юзасидан гонидиялар, конидиялардан қолишмайди, аммо ишлаб чиқариш шароитида гонидиялар асосида юқори фаолликка эга препаратлар олиш имкони йўқ, чунки улар конидийларга нисбатан қуритиш босқичидаги юқори ҳароратга ўта даражада сезгир ва чидамсиздир. Анъанавий юқори ҳароратда пурқаб қуритгич мосламаларда боверин ишлаб чиқаришда препаратлар қуритилганда 90% гонидиоспора ва 20–50% конидиоспора нобуд бўлади. Шунинг учун қуритилгандан сўнг споралар яшовчанлиги ва уларнинг вирулентлигига кўра боверин ишлаб чиқаришда эътибор конидиоспора миқдорини максимал даражада олишга йўналтирилган.

B.bassiana Vuill замбуруғини суюқ озикада ўстириш орқали конидиоспора олиш муаммоси озика муҳити ва ферментация шароитини танлаш муаммоси ҳал қилинганда ечилди.

Суюқ озикада ўстириш усули орқали боверин олиш технологияси

Бу усулда боверин олиш қатъий асептик шароитда олиб борилади. Бунда энг асосий ва зарур босқичлардан бири бу экиш материални олиш технологиясини танлаш ҳисобланади.

Агарли косякларда Сабур ёки пиво суслоси озика муҳитларида сақланаётган табиий штамм дастлаб колбаларда 25–28⁰С ҳароратда 3–4 кун мобайнида суюқ озика муҳитида аралаштиргичда ўстириб олинади. Олинган конидиоспоралар лиофилизация усулида қуритилади. Бундай экиш материални 1 йилгача ўзининг яшовчанлиги ва вирулентлигини йўқотмасдан сақлаш мумкин.

Ферментёрга озика муҳитига экиш материални экиш икки босқичда: дастлаб культураларни колбаларда ўстириб олиш, кейин инокуляторда ёки тўғридан тўғри инокуляторда ўстириш. Орқали олиб борилади Асосий ускунада экилганда экиш материали озика муҳитининг 2–10% нисбатда ҳажмни ташкил этиши талаб этилади. Саноат асосида ўстиришнинг барча босқичларида бир хил озика муҳити, таркиби ва ҳарорат турли хил штаммларга мувофиқ равишда қўлланилади.

Озика муҳити таркибида одатда: (%) лизирланмаган озика ачитқиси–2; крахмалл–1; натрий хлор–0,2; марганец хлор–0,001; кальций хлор –0,005 миқдорда бўлади.

Озика муҳитига барча компонентлар солингандан сўнг, озика муҳити рН кўрсаткичи 4,5–5,6 гача бўлиши кузатилади. Спорали экиш материални ўстириш 25–28⁰С ҳароратда 25–28 соат мобайнида олиб борилади.

Ўстиришнинг давоми шу ҳароратда асосий ферментёрда 3–4 кун олиб борилади. Замбуруғларни экиш мосламасида ва ишлаб чиқариш ферментёрларида ўстириш доимий аралаштириш ва доимий бир хил аэрация шароитида олиб борилади. Бунга сабаб фойдаланилаётган штаммга боғлиқ ҳолда ҳаво ўзлаштирилиши кескин ўзгариб туради: бир минутда озика муҳити 1 ҳажмдан 2,5 ҳажмгача ўзгариши мумкин.

Асосий мосламада ишлаб чиқаришда озика муҳити аминли азот сақлаши катта таъсир кўрсатади, унинг етишмаслиги культуранинг ўсиш тезлигини кескин секинлаштиради ва конидиоспоралар ҳосил бўлиш фоизини пасайтириб, гонидий ҳосил бўлишини кескин ошириш қобилиятига эга. Озика муҳитида аминли азотнинг мўътадил миқдори 10–15 мг фоиз ҳисобланади.

Суюқликда замбуруғни ўстиришнинг биринчи 1–1,5 суткаси давомида озика ачитқиси тўлиқ лизис бўлади, замбуруғ эса бу вақтда ўзининг барча ўсиш фазаларини босиб ўтган бўлади (мицелиалли, гонидиалли, конидиалли). Озикада оксил маҳсулотлари сақланиши конидий ҳосил бўлишининг бир қадар яхшиланишини таъминлайди. Замбуруғни тўлиқ вояга етиши яқунланганда мицелий лизиси ва конидий тўпланиши таъминлашга олиб келадиган максимал даражада ферментлар ажратади.

Культурал суюқликда конидиоспоралар ҳосил бўлиши продуцент-штамм табиати ва уни ўстириш шароитига боғлиқ ҳолда 1 мл да 0,3 дан 1,3 млрд. гача ўзгариб туриши мумкин.

Бунда бу культура 90–92% конидиоспора, 3–5% миқдорда гонидий ҳосил қилади, мицелий тўлиқ бўлмайди. Тайёр культурал суюқлик сепарация ёки фильтрация усулида чўктирилади.

Фильтрлангандан кейин 70–80% намликдаги, 6–8 млрд. спора титри бўлган паста олинади ва у юқори ҳароратда пуркаб, қуритиш мосламасига ўтказилади. Қуритилган споралар кичик заррачасимон кукун кўринишда 10% намликда бўлиб 1 граммда 8×10^9 гача ҳужайра титри сақлайди.

Олинган кукуннинг ЛК₅₀ кўрсаткичи аниқлангандан сўнг (летал миқдори, тест-ҳашоратни 50% нобуд қилиши зарур) мувофиқ равишда каолинда стандартланади. Тайёр препаратга баъзан кўшимчалар ёпишувчи хусусият беради.

Замбуруғни юза қисмга экиш усули орқали боверин олиш технологияси

Боверин олишнинг яна бир усули замбуруғнинг спорали қатламини юза қисмга экиш орқали олинадиган технологияга асосланади. Бу бир қадар узоқ вақт ва кўп меҳнат талаб қилади, шунинг учун ундан фойдаланиш чегаралангандир.

Қуйида биз бу усулнинг ишлаб чиқариш ва кичик ишлаб чиқаришдаги баъзи бир асосий кўрсаткичлари билан танишиб чиқамиз.

Замбуруғни юза қисмга экиш ҳам суюқ ва ярим суюқ озикага экишдагидек амалга оширилади, бу озика муҳитида замбуруғ жуда яхши ўсиш тезлигини намоён этади. Уни микробиологик ишлаб чиқариш спорали қатлам олинган

босқичида якунланиб, кейин ажратилади, қуритилади, майдаланади ва мувофиқ микдордаги кўшимчалар билан стандартланади.

Боверинни ишлаб чиқаришда юза қисмига экиш усуллари бир-биридан фарқ қилади:

- *Замбуруғни стерилизация қилинмаган суюқ озиқа муҳитга экилади, аралаштирилади ва аэрация ҳосил қилинади;*
- *Стерилизацияланган қаттиқ ва суюқ озиқа муҳитига экилади, аралаштирилмайди ва мажбурий аэрацияланади;*
- *Аралаш усулларда замбуруғ қатлами ўстирилади.*

Биринчи икки усул асосида ўстирилганда замбуруғ қишлоқ хўжалик қолдиқ маҳсулотлари турли хил ўсимлик субстратларида жуда яхши ўсади.

Замбуруғ ривожланиши учун мўътадил ҳарорат 18–28⁰С атрофида бўлиб, жанубий туманларда замбуруғни мавсумий ўстиришда об–ҳаво ҳароратига мос равишда амалга оширилади.

Замбуруғни стерилизация қилинмаган суюқ озиқа муҳитида, аралаштирмасдан ва мажбурий аэрация ҳолатда ўстиришда озиқа муҳити стерилизацияланмасдан, оддийгина қайнаш даражасигача қиздирилади ва ёғоч каркасларга (идиш) куйилиб устига юпка полиэтилен клёнка ёпилади. Озиқа 35–40⁰С гача совутилади ва қуруқ споралар экилади. Каркасларнинг усти полиэтилен клёнка билан ёпилади ва замбуруғ экилган спорали қатлам ҳосил бўлгандан сўнг у ажратиб олинади.

Озиқа муҳити сифатида барча қайнатмалардан, масалан қанд лавлаги, картошка, ошқовоқ ва ғалла ундан фойдаланиш мумкин.

Замбуруғни стерилланган қаттиқ ва суюқ озиқа муҳитида аралаштирмасдан ва мажбурий аэрацияда, стерилизацияда, озиқа муҳити алоҳида стерилизация қилинади, қаттиқ- суслар - агар, картошка, сабзи, маккажўхори, тарвуз пўстлоғи, баъзан буғдой дони ва маккажўхори 40 минут давомида 112⁰С да, шакар сақловчи 7 % гача, қанд сақловчи суюқ суслар 20 минут давомида 110⁰С да ҳароратда стерилизация қилинади.

Стерил субстратга қуруқ споралар ёки уларни суспензияси экиладиган материал бир хил ҳолатда тарқатилади ва 18–23⁰С ҳароратда сақланади.

Қаттиқ субстратда конидиоспоралар ҳосил бўлиши 12–15 кун охирларида тугалланади.

Замбуруғ культуралари субстрат қолдиғи билан бирга стеллажларда 25–28⁰С ҳароратда қуритилади. Олинган тайёр препарат кукун ҳолига келгунча майдаланади. Суюқ субстратларда 7–10 суткадан кейин спора ҳосил кўзатилади, 18–25 суткада эса ҳосил бўлган спорали юпка қатлам ажратилади. Уни шишада қуритилади, ажратилади, майдаланади ва торф ёки талък билан аралаштирилади.

Бу ҳар иккала усулни ҳам маҳаллийлаштириш мумкин. Бундай ишлаб чиқариш цехларида 1 ойда 1 граммада $1,5 \times 10^9$ спора бўлган 750–800 кг препарат тайёрлаш мумкин.

Ишлаб чиқаришга қулай бўлган усул замбуруғ қатламини комбинирланган

усулда ўстириш ҳисобланади. У қуйидагиларни ўзига бирлаштиради:

- *галлада оналик культурасини олиш;*
- *колбаларда 12–17 соат давомида суюқ озиқа муҳитида инокулятни ўстириш;*
- *Ферментёрларда аралаштириб, мажбурий аэрацияда 22–28 соат давомида ўстириш ва вегетатив культураларни тўплаш;*
- *кюветаларга культурал суюқликларни қўйиш ва спорали қатламда ҳосил қилиб ўстириш;*
- *спорали қатламни қуритиш ва миқдорлаш;*
- *препаратни каолин билан стандартлаш.*

Замбуруғни ўстириш учун таркибида: (%) меласса–6; маккажўхори экстракти–1%; $MgSO_4$ –0,05%; K_3PO_4 –0,2 сақловчи озиқа муҳитидан фойдаланилади.

Ўстириш 24–26⁰ С да олиб борилади. Гонидий титри инокулят босқичида 1 мл экиш мтериалида 0,5–2 млн.ни ташкил этади.

Инокулянт миқдори ферментёрларга экилаётганда озиқа муҳити ҳажмининг 2-4 % ини ташкил этиши зарур.

Тайёр культурал суюқликнинг 1 млда 50–100 мл ҳужайра титри бўлади. Қатламда ўстириш учун кюветалар вертикал камералардан ташкил топган бўлади (ҳар бири 35–70 донадан). 25–26⁰С ўстирилади 16–18 соатдан кейин юпқа қават ҳосил бўлиши кўзатилади, 3-4 суткадан кейин спора ҳосил бўлиши, 4-5 суткадан сўнг тўлиқ конидий ҳосил бўлиши бошланади.

Бу даврда қатлам ажратилади ва қуруқ кюветкага жойлаштирилиб, қопқоғи ёпилади ва 2-3 кун миқдорлаш учун қолдирилади. Шундан кейин улар ажратилади ва 28⁰С ҳароратда қурилади.

Қуритилган спора қатлами полиэтилен қопчаларга жойланиб, 18–20⁰С ҳароратда қуруқ жойларда сақланади.

Боверин тайёрланишидан аввал тайёр спорали материал шарсимон идишда майдаланилади ва қатор элаклардан ўтказилади. Тайёр материалнинг титри аниқланади ва 15-20 минут давомида зарур каолин миқдори билан аралаштирилади. Тайёр препаратнинг 1 граммида 1,5 млрд.дан кам бўлмаган конидиоспоралар бўлади.

Барча амалга оширилган босқичлар 11–12 кунни эгаллайди, шундан инокулят олиш учун–1 кун; ферментёрда ўстириш -1–1,5; шкафларда ушлаш--5 ; қатламни дозалаш–2; қатламни қуритиш 2–3 кунни ташкил этади.

Боверин қайрағоч барг кемирувчи зараркунандалари, шунингдек олма, шарқий мевахўр ва ўрмон зараркунандаларига қарши қўлланилади.

Боверинни картошка ўсимлигидаги колорадо кўнғизига қарши қўллаш самарали фойда беради. Препаратга кимёвий инсектицидлар қўшиб қўллаш 100% барча ёшдаги личинкаларни 100% гача нобуд қилади. Бовериннинг сарф меъёри 1 гектарга 1–2 кг бўлади. Ўсимликларга препарат пуркаш орқали сепилади. Кимёвий препаратлар билан аралаштириш, препаратни қўллашдан 2 соат олдин амалга оширилади.

Вирусли энтомопатоген препаратлар

Ҳамма энтомопатоген препаратлар ичида вирусли препаратлар хўжайин хашаротга нисбатан ўзининг ўта спецификлиги билан характерланади. Улар одатда бир турдаги хашаротларгагина таъсир кўрсатади.

Уларнинг бу яққол тор доирадаги таъсирининг ўзи бу препаратларнинг инсон, флора ва фауна учун безарарлигини кўрсатади. Вируслар ўзларининг ноқулай ташқи таъсирларига (ҳарорат, намлик) ўта чидамли бўлиб, улар хашаротлардан ташқи ҳолатда ҳам 10–15 йилгача ўз таъсир кучини йўқотмайди.

Хашаротнинг вируслар билан касалланиши уларнинг овқатланиши орқали юз беради. Хашарот ичакларига тушган вирусли танача ишқорли рН да парчаланишни бошлайди. Эркинликка чиққан вирионлар ичак деворлари орқали хужайраларга ўтиб, ядроларда вируслар репликацияси руй беради. Бўш вируслар бошқа хужайраларни ҳам зарарлай бошлайди ва оқибатда хашаротлар личинкаларининг нобуд бўлишига олиб келади.

Вирусларнинг фарқланувчи белгилари шуки, улар фақатгина тирик тўқималардагини кўпая олади. Бу эса ўз навбатида саноат миқёсида вирусли энтомопатоген препаратларни ишлаб чиқаришда бир мунча қийинчиликлар туғдиради, чунки вирусларни кўпайтириш технологияси жараёнида фақатгина тирик хўжайин-хашаротлардан фойдаланиши талаб этилади.

Ҳозирги пайтда 3 хил вирусли энтомопатоген препаратларни ишлаб чиқариш йўлга қўйилган: вирин-ЭКС(карам қуртига қарши), ЭНШ (ток ичак қурти касалига қарши), АББ (амерака оқ капалагига қарши).

Ҳар қандай вирусли препаратни ишлаб чиқариш хўжайин-хашаротни уларнинг физиологик соғломлигини таъминловчи сунъий озиқа муҳитида ўстиришдан бошланади. Маълум бир ривожланиш фазасида (одатда кўнғиз даврида) хашаротлар овқатига вирусли суспензия кўшиш йўли билан улар зарарлантирилади. Бунинг учун инокулят олдиндан бир қанча касалланган личинкалардан олиб тайёрланади.

Хашаротлар зарарлангандан сўнг унинг тўқимасида максимал вируслар тўпланишини таъминловчи қатъий аниқ шароитда сақланади.

7–9 кундан кейин нобуд бўлган ва чалажон личинкалар йиғилади, 33–35⁰С да улар қуритилади, механик усулда тўқималар йиғиндиси - тана майдаланади. Олинган массага физиологик эритма ёки дистилланган сув 1 кўнғизга 1 мл ҳисобида қўйилади, майдаланиб суюлтирилган тўқима филтрланади.

Ишлаб чиқариш препарати вирин-ЭКС полиэдралари филтратни центрафигура усулида чўктириб олинади. Чўкма минимал миқдорда дистилланган сувда суюлтирилади ва 1 мл дан 1 млрд. гача полиэдрлар титри бўлгунча стерилланган глицерин қўшилади.

Тайёр препарат флаконларга бир ёки бир неча гектарга етарли миқдордаги меъёрда жойланади. Ушбу технология инокулят сарфи билан таққосланганда полиэдрлар миқдорини 5-10 минг марта ошириш имкониятини беради. Битта кўнғизда ўртача 36 млрд.гача полиэдрлар унинг қуруқмас оғирлигининг 30% ини ташкил этувчи 36 млрд.гача полиэдрлар олиш имконияти мавжуд.

Ишлаб чиқаришда вирин-ЭНШ препарати филтратига лактоза қўшилади аралаштирилгандан сўнг суспензия ҳажмининг 4:1 нисбатида ацетон қўшилади.

Тиндирилгандан сўнг устки қисм суюқлиги тўкилади чўкма эса ацетон тўлиқ учиб кетгунча қуритилади. Тайёр препарат формасини тайёрлашда қурук чўкма қўшимчалар - каолин ёки бентонитга 1 граммлари 1 млрд. полиэдрлар титрини олишгача аралаштирилади.

Препаратнинг ёғли формаси чўкмани дастлаб стерил 50% ли глицерин эритмасида 1 мл да полиэдрлар титри 2 млрд. - бўлгунча деспиргирлаш йўли билан тайёрланади, кейин стерил ҳолда соляр мойи ҳажми микдоридида қўшилади, аралаштирилади ва флаконларга қўйилади.

Текшириш саволлари:

Энтомопатоген препаратларга қўйиладиган талаблар нималардан иборат?

Бактериал энтомопатоген препаратлар ишлаб чиқариш тарихи ҳақида нималарни биласиз?

Bacillus thuringiensis энтомопатоген бактерияси ҳақида маълумот беринг?

Бактериал энтомопатоген препаратлар таъсир механизми қандай кечади?

Энтобактерин ишлаб чиқариш технологияси қандай босқичлардан иборат?

Энтобактерин препарати олишда қандай продуцент ва озика муҳитидан фойдаланилади?

Замбуруғли энтомопатоген препаратларнинг афзалликлари нималардан иборат?

Замбуруғли препаратларнинг асосини қандай продуцентлар ташкил этади?

Замбуруғли препаратлар таъсир механизми ҳақида маълумот беринг?

Суюқ озика муҳитида ўстириш орқали боверин олиш технологияси ҳақида маълумот беринг?

Замбуруғларни озика муҳити сиртида ва озика муҳити ичида ўстиришнинг бир биридан афзаллик ва ноқулай томонлари ҳақида нималарни биласиз?

Вирусли энтомопатоген препаратларнинг таъсир механизми ҳақида маълумот беринг.

Вирусли препарат продуцентларини ўстириш қандай амалга оширилади?

ЧОРВАЧИЛИКДА БИОТЕХНОЛОГИЯ

ҚИШЛОҚ ХЎЖАЛИК ҲАЙВОНЛАРИНИНГ КЎПАЙИШИНИ БИОТЕХНОЛОГИК НАЗОРАТ ҚИЛИШ

Ҳайвонлар кўпайишининг эндокрин назорати

Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини кўпайиш биологиясини ўрганиш, айниқса эндокринологияда охириги 30-35 йил мобайнида эришилган муваффақиятлар бу жараёнини биотехнологик усуллар ёрдамида бошқариш имкониятларини яртади.

Ўтган асрни (XX аср) биринчи ярмида ҳайвонларнинг кўпайиш физиологиясини ўрганишда эришилган энг катта муваффақият гипофиз безини олдинги қисмини вазифаларини аниқланиши бўлди, десак хато бўлмайди. Бу соҳани ўрганиш натижасида яратилган бир қатор янгиликлар гипофиз безининг олдинги қисмида организмда ўтадиган қарор биологик жараёнлар тўғридан – тўғри ёки унинг бошқа органларга таъсири орқали бошқариб турилишини исботлаб берди. Бугунги кунда жинсий безларни ривожланиши ва уларни функцияси гипофизбезини олдинги қисмида синтез бўладиган гонадостимуляторли хусусиятига эга бўлган гормонлар (туркум ҳужайраларини секрециясини бошқариб турувчи гормонлар) билан боғлиқ эканлиги тасдиқланган.

Сут эмизувчиларни гипофизини олдинги қисмида жинсий безларни фаолиятини бошқариб турадиган 3 та гормон ишлаб чиқарилади. Булар: фолликулаларни мутадиллаштирувчи гормон (ФМС), лютеинлаштирувчи гормон (ЛГ) ва пролактин ёки лютеинотроп гормон (ЛГТ), бу гормонни фақатгина кемирувчи ҳайвонлардагина лютеинотроп (етилган тухум ҳужайрасини тухум фоликуласидан чиқишини чақирилиши) таъсир кўрсатиши аниқланган.

Уруғлангандан кейинги дастлабки 6-8 кунда сигирларни қонида ЛГ миқдори унча юқори бўлмайди. Кейин бу кўрсаткич доимий равишда кўтарилиб боради. Бу жараён ЛГ ни гипофизда ошиб бориши билан параллел равишда содир бўлади. Аммо бу гармонни тўпланиш тезлиги гипофизда сигир қонидаги миқдорга нисбатан баландроқ бўлади. Гипофизда ЛГ ни тезроқ тўпланиши, ёки уни миқдорини гипофизда ошиб бориши энг аввало организмнинг биологик талабидан келиб чиқиб, етилган тухум ҳужайраларини чиқиши билан боғлиқ. Демак етилган яъни уруғланган тухум ҳужайрани тухум фолликуласидан чиқиши олдида гипофиздаги ЛГ миқдоримаксимумга кўтарилади. Гипофиздан ажраладиган иккинчи-гонадотроп гормон ФМГ ни миқдори ҳам фолликуллари етилиши билан бир вақтда содир бўлади.

7-10 кунларда ЛГ ни секцияси (ажралиши) 60-80 минутда қайтариладиган пульсимон шакилга ўтиб, буғоз бўлган сигирларда тухум ҳужайраларини чиқиш олдидаги ҳолатга, буғоз бўлмаганларида эса унчалик кўп бўлмаган кўтарилиш сезилади.

Илмий адабиётларда. Барча ҳайвонларда қўшиладиган кунда, баъзиларида эса бу кун аввалроқ ҳам ЛГ миқдорини ошиши кузатилгани ҳақида баён этилган.

Қўйларнинг қонларида ЛГ и чиқиш цикли қўшилишдан кейинги дастлабки 12-16 соатда бошланиб, 8-10 соат давом этади. Бу даврда унинг миқдори дастлабки миқдордан 30-50 маротаба ошади. Тухум ҳужайраларини чиқиши ЛГ миқдори энг юқоринуктага чиққандан сўнг 21-26 соатлар орасида содир бўлади.

Ўтган асрнинг иккинчи ярмида гипофизни гонадотропик (жинсий гормонларни секрециясини бошқариб туриш хусусияти) хусусиятини (вазифасини) назорат қилиб турувчи, гонадотропик-ризлинг (ГН_РГ) гормони очилди. Гипофизнинг бу хусусияти қуйдагича амалга оширилади: гипоталамуснинг нерв толалари охиридан нейрогормонал моддалар ажралиб гипофизар оёқчалар орқали гипофизнинг олдинги қисмидаги сиусларга узарилади ва шу туфайли гипо физар ҳужайраларни секреция қилиш фаолиятига таъсир кўрсатади. Нейросекретор ҳужайралар ҳам нерв ҳам эндокрин фаолиятга эга бўлганликлари туфайли гипоталамусда бошланғич нерв импульсларини эфферент занжирларни гумарал қисмига томон бошқариб юборилади.

Бугунги кунда ГН_РГ ўнта аминокислотадан ташкил топган декапептид эканлиги ва барча ҳайвонларда бир хил эканлиги аниқланган. ГН-РГ нинг мураккаб бўлмаган структуравий тузулишга эга булиши ва уни барча ҳайвонларда бир хил бўлиши тез орада уни кимёвий синтез йўли билан олишга имкон яратди. Россияда сурфагон номи билан ГН-РГ ишлаб чиқарилади ва у ҳайвонларда тухум ҳужайраларни ажралишини бошқариш мақсадида ишлатилади.

XX асрда яратилган улкан илмий ишламалардан яна бири – простагеалдин F-2 а лютеолитик факторнинг очилишидир. Кўпгина олимлар томонидан ҳайвонлар бачадонини олиб ташлангандан кейин ҳам узоқ вақт давомида сариқ тана (жёлтое тело) сақланиб қолиши кўзлаган. Бу эса бачадонда литик факторлар фаолият кўрсатиб туришларидан гувоҳлик беради.

Лютеолизин тухумдон венасидан, унга яқин ўтган тухумдон артериясига қайтарма ток механизми бўйича ўтиши ва артериал қон орқали тўғридан – тўғри тухумдонга тушиши аниқланган.

Сигирлар, чўчқалар ва қўйлар бачадонидан простогендин F- 2а тўлқинсимон шаклда чиқарилиб турилади. Бу тўлқинни ҳар бири бир неча соат давом этади. Сариқ тананинг тазазули (регрессияси), одатда простогендин F-2а ажралиш бошлангандан сўнг 2 сутка ўтганда бошланади, қўшилишга талаб эса сариқ тана таназзулидан 24-48 соат ўтгач намоён бўлади.

Ҳайвонларнинг жинсий давр (цикл) ини бошқариш

Бир гуруҳ ҳайвонларни қўшилишга интилиш даврини бошқариш усули - қўшилишни бир-бирига мос равишда олиб боришдир. Бу эса чорвачиликни ривожлантириш учун катор қулайликлар яратади. Энг аввало сунъий уруғлантириш даврини анчага қисқартиради. Бу эса қўшилишга кетадиган

вақтни қисқартиришга, шу туфайли меҳнат ҳақини камайтиришга олиб келади. Бундан ташқари, бу усул тухум ҳужайраларини етилишини аниқ вақтини белгилашга имкон яратади, қўшилишга иштиёқ бўлиш-бўлмаслигига қарамасдан, сунъий уруғлантиришни маълум бир вақтда ўтказиш имконини беради. Оқибатда уруғни эскириб қолишдан асрайди, ҳайвонларни урчитиш билан боғлиқ бўлган сарф-харажатларни иқтисод бўлишига олиб келади.

Ҳайвонларда қўшилишига бўлган иштиёқни уйғотиш ва етилган тухум ҳужайраларни тухумдон фолликуласидан бир-бирига мос равишда чиқаришда икки асосий ёндошиш маълум:

- **Биринчиси** – сариқ тана фаолиятини тўхтатиш ёки уни бутунлай олиб ташлашга асосланган. Натижада барча гуруҳ ҳайвонлар жинсий даврнинг фолликуляр фазасига бир вақтда кирадилар ва шу туфайли бир вақтда қўшилиш иштиёқда бўладилар. Бу мақсадни амалга ошириш учун юқорида келтириб ўтилган. Омил лютеолитик фактор простагландин $F_{(2a)}$ (ПГФ-2 α) дан кенг фойдаланилади.
- **Иккинчи ёндошиш** – фолликулларни ривожланиши секинлаштиришга асосланган бўлиб, бунда лютеин фаза даврини сариқ таналар регрессияси амалга оширмагунча, сунъий равишда чўзиб турилади. Секинлаштирувчи формакологик препаратни таъсирини тугаши, фолликулларни ўсиб, ривожланишига олиб келади ва бир вақтни ўзида фолликуляр фаза даврига ва нихоят бир-бирига мос равишда қўшилишга иштиёқ ва ёрилган тухум ҳужайраларни фолликуллардан ажралишига олиб келади. Бунинг учун фармакологикагент сифатида прогестерон ёки унинг синтетик аналоги прогестагендан фойдаланилади. Бу препаратларни қабул қилган барча ҳайвонларда, даврнинг қайси фазасида бўлишларидан қатъий назар бир неча кун орасида қўшилишга интилиш пайдо бўлади.

Йирик шохли ҳайвонлар. Сунъий урчитиш (уруғлантириш) натижаларига таъсир этадиган яккаю-ягона омил бу қўшилишга интилтиришдир. Қўшилишга интилиш –18-24 кун орасида қайтарилиб туриладиган сигир ёки ғуножини қисқа жинсий талабидир. Агар сигир тухум ҳужайраси етилиб, тухумдон фоликулидан ажралиб, тухум (уруғ) ўтказгич воронкага тушганда, у тез ва тўлиқ уруғланади («қочади»). +очишга интилиш ўтгандан кейин 10-14 соат ўтганда кейин етилган тухум ҳужайралари фоликуллардан ажралади ва бу жараён ўртача 18 соат давом этади. Сперматозтидлар тухум ҳужайралари билан қўшилиш қобилятига эга бўлгунга қадар, бир неча вақт улар сигирни жинсий йўлида бўлиши керак, (бу жараён фан тилида «Капацитация» деб аталади) лигини эътиборга олсак уруғланиш овуляциядан бир неча соат олдин содир бўлади.

Демак, урчиш сифатли ўтиши учун уруғланиш қўшилишга интилиш даврининг кейинги 2/3 қисмида амалга ошиши мақсадга мувофиқ бўлади. Бу эса сигирларни қўшилишга интилиш даври бошлангандан кейинги 24 соатни ташкил этади. Қўшилишга ҳоҳиши бўлган сигирлар ёки ғуножинларни ташқи кўриниши ҳам ўзгариб, улар тез ҳаракатчан, буқалардан қочадиган (чопадиган)

аҳволга тушиб қоладилар. Уруғланишни оптимал вақтини аниқлаш учун қуйидаги 5.1-жадвалда келтирилган маълумотлардан фойдаланиш мумкин.

9-жадвал

Сигирларни уруғланиш даври

Қўшилишга интилиш олдидаги давр	Қўшилишга интилиш билан ҳаракатсизланиш рефлeksi намоён бўлиш вақти	Фолликулларда етилган тухум хужайраларини ажралиш даври (овуляция)	Тухум хужайра ҳаётининг давом этиш даври	
6-10 с	18 с	10-14 с тухум хужайраларни ажаралиши	6-10 с	
уруғланиш учун вақтли	уруғланиш мумкин	уруғланиш учун энг яхши вақт	Уруғланиш мумкин	Уруғланиш вақтидан ўтган

Юқорида айтиб ўтилганидек, уруғланишга (қўшилишга) интилиш даврини бир-бирига мос қилишни асосий йўлларида бири сарик тана фаолиятини даврини қисқартиришдир. Бу мақсадда, йирик шохли ҳайвонлар учун простагландин препаратлари ишлатилади.

Жинсий давр циклини дастлабки кунларида (1-5 кунлар) яъни сарик тана пайдо бўлмаганда простагландинни фойдаси бўлмайди. Агар сарик тана жинсий циклини охирида ўз фаолиятини йўқотса, (18-21 кунлар) бунда ҳам простагландинлардан фойда йўқ.

Агар сигир ёки ғуножинларда сарик тана ҳосил бўлган кунлар (асосан жинсий циклининг 6-17 кунлари) простагландинюборилса, у сарик таналарни регрессиясини (парчаланишини) чақиради, оқибатда молларда қўшилишга иштиёқ пайдо бўлади ва овуляция дориланганидан кейин 2-5 кун ичида содир бўлади.

Одатда простагландиндан бир ёки икки маротаба фойдаланилади. Простагландинлардан бир маротаба укол қилинганда жинсий циклдан 4-5 кун ўтган бўлса, у барча ҳайвонларда қўшилишга интилиш ҳисини уйғотади. Сигирларда қўшилишга интилиш уколдан кейин 48-72 соат ўтгач, овуляция эса қўшилгандан кейин тахминан 20-24 соат ўтганда содир бўлади. Шундай қилиб, бир маротабалик уколдан кейин уруғланиш мумкин сарик тана ҳосил бўлган молларни 2-3 кун мобайнида, қўшилишга интилиш бошланганда амалга ошириш мумкин.

Простагландин икки маротаба укол қилинганда, уколлар ораси 11 кунни ташкил этиши керак. Иккинчи уколдан 5 кун ўтгач 90-95 % молларда қўшилишга интилиш пайдо бўлади. Ҳайвонларни, одатда бир маротаба простагландин қабул қилгандан кейин 60-72 соатдан кейин, икки маротаба укол қабул қиладиган бўлса 72 ва 96 соатдан кейин уруғлантириш тавсия этилади. Шунини ҳам этиб ўтиш лозимки, иккинчи уколдан кейин 76-80 соат ўтгач, сигирларда қўшилишга ҳоҳиш уйғонмаган бўлса ҳам уларни уруғлантириш мумкин. Кўпчилик вақтларда, протогландин бир марта укол қилинган сигирларда 32-38 кундан кейин, икки маротаба укол қилинганларида эса 20-26

кундан кейин қўшилишга иштиёқ қайтарилади. Қўшилишга интилишни қайтарилиш даврини режаланиши ва уни қисқа вақт орасида аниқланиши уруғлантиришга кетадиган сарф харажатларни камайишига олиб келади.

Қўшилишга интилишни бир-бирига монан ўтказишга иккинчи ёндошиши, жинсий циклни лютеин фаза (босқич) даврини узайтиришга асосланган бўлиб, бу мақсадда йирик шохли ҳайвонлар учун прогестерон ёки унинг ҳосилалари ишлатилади. Шундай препаратлардан бири Синхромат-Б. Бу препаратдан фойдаланиш қуйидагича амалга оширилади: энг аввало сигирни кулоғи терсининг ташқи томони тагига норгестамет (уни таркибида синтетик прогестагаен бўлади) киритилади, (инплантация қилинади)кейин мушак орасига 3 мг норгестамет ва 6мг эстрадиол валериант юборилади. 9 кундан кейин кулоқ териси тагига қўйилган инплантат олиб ташланади. Оқибатда, барча ҳайвонлар 24-36 соат орасида қўшилишга интиладилар.

Инплантат олиб ташлангандан кейин 48-54 соат орасида сигирларда қўшилишга иштиёқ уйғонмаса ҳам уларни уруғлантириш мумкин бўлади.

Қўшилишга иштиёқ уйғонишни яна бир йўли ҳайвонлар жинсий органларига ичига прогестерон шимилтирилган маҳсус ускурма ўрнатиб қўйишдир. Бу усул Россияда кенг қўлланилади ва ускурмани ПРИД деб номланган. ПРИД ҳайвонга 6 ёки 7 кун қўйиб қўйилади. Қўшилишга интилишни бир-бирига монан қилибўтказиш мақсадида, ускурмани олиб ташлашдан 1-2 кун аввал простогландин F-2 а ёки уни аналоглари укол қилинади. ПРИД олиб ташлангандан кейин 3000 М.Е СЖК укол қилинса ҳам яхши натижа кўрсатади.

Қўйлар. Қўйларни сариқ танаси ҳам қорамолларга ўхшаб, қиладиган таъсирига маълум даврдагина сезгир халос. Сарик танани ёши уни уч кундан кам, яъни жинсий циклнинг 4-куни бўлганда парчаланиши (регрессияси) простогландин F2а ёки унинг аналоглари (100 мкг JCF 80996) бир маротабагина укол қилинганда содир бўлади. Шу сабабли, агар простогландин бир маротаба укол қилинганда совлиқларни фақатгина 65% дагина қўшилишга иштиёқ туғилиши мумкин. Шунинг учун ҳам совлиқларга орадан 8-9 кун ташлаб икки маротаба простагландин билан укол қилиш тавсия этилади. Икки марта простагландин қабул қилган совлиқлар да қўшилишга иштиёқ 38-40 соатда, Лгнинг энг юқори миқдори 50 соатда, овуляция – 73-74 соатдан кейин содир бўлади.

Қўшилишга мойилликни бир-бирига мослаб чиқаришнинг яна бир йўли совлиқларни жинсий органлари ичига прогестаглар (кронол 30-45 мг) шимитилган ускурма ўрнатишдир. Бундай ускурмалар 14-16 кунга қўйилиб, ундан асосий мақсад ўтовдаги барча қўйларни бир вақтда жинсий циклнинг фолликуляр босқичига келтиришдир. Ускурма олиб ташлангандан кейин кўпчилик совлиқларда қўшилишга интилиш 24-72 соатдан кейин, яъни ускурма олингандан кейинги кунга тўғри келади. Ускурма олинаётган вақтда 350-750 шартли бирликда СЖК юборилса, қўшилишга иштиёқни бир-бирига монанлиги янада ошади ва бу жараён тезлашади.

Совлиқларга гормонал препаратлар бериш қуйидагича амалга оширилади: урчитиш фаслида жинсий органлар ичига флюгестерон аустат – ФГА,

кронолон, медроксипрогестерон ацетат МАП ёки прогестагенларни бошқа ҳосилалари эритмасида шимтилган усқурма 14 кунга қўйиб қўйилади. Усқурмаларни чиқариб олаётган вақтда 500 ш.б. СЖК укол қилинади. Шундан кейин 2 кун ичида совлиқлар қўчқорга келадилар. Бу жараёндан ўтган қўйлар агар июн ёки июл ойида уруғланган бўлсалар уларни 60 % дан кўпроғи қўзилайдилар. Табиий уруғлантирилганда 10 та совлиққа 1 та қўчқор бўлиши ва қўчқорлар совлиқларга юқоридаги ташкилий масалалар тугагандан 48 соат ўтгандан кейингина қўйилишлари шарт.

Отлар. Бойталларга (урғочи от) 1,25-10 мг простагландин F_{2a} бир маротаба ёки 300-600 мкг простагландин JSJ 79939 ни аналогларидан бирдан икки маротаба укол қилинганда қўшилишга интилиш уч кун орасида чақирилади (сарик таналар ҳосил бўлганда укол қилинган бўлса). Сигирга ўхшаб байталларни сарик танаси ҳам 5 кунликгача простогландинлар таъсирида намойил бўлиб туради. Шунинг учун ҳам жинсий циклни дастлабки 4 кунда қилинган простагландинни таъсири бўлмайди. Байталларда қўшилишга мойиллик ҳар хил бўлганлиги сабабли простагландин уколдан 3 кун орасида қўшилишга интилишни бир-бирига мос равишда ўтишини таъминласада, овуляция жараёни унчалик аниқ ўтмайди (7-12 кун уколдан кейин). Шунинг учун ҳам овуляция ўтиш даврини камайтириш мақсадида қўшилишга иштиёқ бошлангандан 2 ёки 3 кун ўтгач ХГ ёки ГН-РГ инъекция қилинади.

2000-3000 шартли бирликда ХГ препаратини вена қонига юборилганда, 36-48 соат орасида 90 % байталларда овуляция бошланади, шу муносабат билан бир марталик қўшилишга иштиёқ давридаги қочирилган байталларни сони 2,7 дан 1,8 гача қисқаради ва буғоз бўлган байталлар эса 50 дан 56 % гача ошади.

ҲУЖАЙРА БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

Эмбрионларни трансплантацияси

Қишлоқ хўжалик ҳайвонларини сунъий қочириш усулларини яратилиши ва уларни қўлланиши ҳайвонлар генетикасини яхшилаш соҳасида катта ютуқларга эришишга олиб келди. Бу ҳамда ҳайвон уруғини (сперматозоидларни) музлатилган ҳолда узоқ вақт сақлаш усулларидан фойдаланиш бир эркак ҳайвондан бир йилда ўн минглаб насл олиш имкониятини яратди. Шу орқали зотли ҳайвонлардан унумли фойдаланиш муоммаси ечилди.

Маълумки ананавий йўл билан бир урғочи ҳайвон ўз умрида давомида атиги бир неча авлод олиш мумкин холос. Урғочи молларни авлод қолдириш имкониятларини пастлиги ва авлодлар орасидаги даврни узунлиги (масалан қорамол 6-7 йилда авлод қолдиради) чорвачиликда генетик жараёнларни чегаралаб кўяди. Бу муаммони ҳал қилишни олимлар, эмбрионларни трансплантация қилиш усулидан фойдаланиш билан боғлиқ деб билади. Бу усулни асосий моҳияти шундан иборатки, генетик соғлом ва ҳар томонлама етук бўлган сигирлар, ҳомиласи кўтариб юришдан ва ўзболасини озиклантиришдан озод этилади. Бундан ташқари тухум ҳужайраларини умумий миқдорини кўпайтириш мақсадида, бундай молларни рағбатлантиралади ҳам (озуқани сифатлироқ ва кўпроқ беришдан тортиб, ҳар хил касалликларнинг олдини олиш учун керак бўладиган дори-дармонларгача). Уругланган тухум ҳужайра маълум вақтдан кейин зотли сигирдан олиниб, зоти пастроқ бўлган молларга ўтказилади ва унда ривожланади.

Эмбрионлар трансплантацияси технологияси қуйидаги асосий босқичларни ўз ичига олади:

- *суперовуляция чақириш донорни сунъий уруглантириш;*
- *эмбрионларни ташқарига чиқариб олиш (жарроҳлик ёки ножарроҳлик йўллари билан);*
- *ажратиб олинган эмбрионларни баҳолаш уларни сақлаш (узоқ вақт ёки қисқа вақт);*
- *бошқа молга ўтказиш.*

Суперовуляцияни (урғочи молларда гормонлар ёрдамида кўплаб овуляция чақириш) тезлатиш. Сут эмизувчиларни ургочилари кўплаб (ўн минглаб) жинсий ҳужайралар билан тугиладилар. Улардан кўпчилиги фолликулаларни шикастланиши оқибатида ўлиб кетадилар. Аммо ўлаётган фолликулаларни барчаси гонадотроп таъсирига сезувчан бўлганлиги сабабли улар етиладилар. Урғочи молларни фолликуляр босқичда гонадотропинлар билан укол қилинганда ёки лютеин босқичда простаглоидни F₂а ёки унинг аналоглари ёрдамида сариқ таналарни регрессияни кучайтрилганда кўплаб овуляцияга ёки бошқача айтганда суперовуляцияга олиб келади.

Йирик шохли хайвонлар

Йирик шохли хайвонларда суперовуляцияни куло мўтадиллаштирувчи гормон (ФМГ) ёки СЖК (байтални қон зардоби-сыворотка крови жеребой кобали) дан жинсий циклнинг 9-14 кунларидан бошлаб фойдаланилади. Орадан 2-3 кун ўтгандан кейин хайвонларга простагландин F₂ унинг аналоглари юборилади. Бундан асосий мақсад саритана регрессиясини чақиришдир.

Сигир ва гуножинларда тана полиовуляцияни кучайтириш мақсадида кўплаб гормонлардан фойдаланиш йўллари синаб кўрилган. Улардан энг кўп ишлатиладиганлари 2,5-3,0 минг бирилкга эга бўлагн СЖК дан фойдаланишдир. Маълумки, байталларга юборилган СЖК ни ярим ҳаёт даври 6 кунни ташкил этиб, гистеректомия усули ёрдамида СЖКда 2 та комплекс борлиги аниқланган бўлиб, улардан бирини ярим ҳаёт ўтиш даври 40,0 – 51,2 соат, иккинчисиники 118,4-129,4 соатдир.

СЖК нинг бу хусусияти хайвонларда суперовуляция вақтида бир маротаба юбориш билан чегараланиш имкониятини берсада, узоқ вақт таъсири натижасида тухумдон фаолиятига салбий кўрсатади. Шунини ҳам эслаб ўтиш лозимки, салбий таъсир нафақат кўшилишга мойиллик давридан аввалроқ, бу даврдан кейин ҳам намоён бўлиши мумкин. Бу эса, организмда жинсий гормонларни нормал меъёрини ўзгаришига айниқса уларни бир-бирларига нисбатини ўзгаришига олиб келади.

СЖКнинг бундай салбий таъсирини олдини олиш ҳамда суперовуляция даврида олинадиган эмбрионларни сонини кўпайтириш ва уларни сифатини яхшилаш мақсадида кейинги вақтларда гонадотропинга қарши антителадан фойдаланиб келинмоқда.

Сигирларни кўшилишга мойиллик даврида, 3000 ш.с СЖК (10 кунда цикли) ва 37,5 мг простагландин F_{2a} (12 кун), моноклонал антителалар ёки кўйнинг СЖК қарши антителаса юборилганда овуляцияга учрамаган фолликуллар сони камайиб 1,7 ва 2,7 назоратдаги 6,5% фолликуллар ўрнига ва уруғланиш назоратдаги 60% ўрнига 80% кўтарилиб кетганлиги кузатилган. Антитардоб юборилган сигирлар қонида тезда эргостеронлар миқдори кескин камийиб кетиши, ҳамда бу кўрсаткич эмбрионларни ажаралиб олмагунча бир хил туриши назоратдаги хайвонларда эса эрогстеронлар миқдори кўшилишига мойиллик даврида асосий кўрсаткичдан камаймаганлиги ҳамда кўшилишга иштиёқ ўтиши билан яна кўтарилиши кузатилган.

Сигирларда полиовуляцияни мутадиллаш мақсадида СЖК дан ташқари гипофиз гонадотропинларидан ҳам фойдаланилади. Бу мақсадда тозаланган ФМГ ёки уни ЛГ билан аралаштириб фойдаланилади. Аммо, бу гормонлар СЖК дан фарқли ўлароқ, 4-5 кун давомида 2 маротаба укол қилинади.

Донор - сигирларга гормонлар юбориш қуйидагича келтирилган чизма асосида олиб борилади (5.2-жадвал).

Сигирларга гонадотропинлар юбориш чизмаси
(В.Хансел ва Б.А.Хилва, 1985)

Укол кун	ФМГ		F2a	
	миқдори, мг	вақти соат	миқдори, мг	вақти соат
1	6	7; 18	-	-
2	4	7; 18	-	-
3	2	7; 18	10	7
4	2	7; 18	12	12; 18

Бунда сигирларда қўшилишига интилиш простагландин F2a юборилгандан кейин 40-50 соатдан сўнг бошланади. Уруғлантириш ундан 12-24 соат ўтгандан кейин амалга оширилади. Эмбрионлар жарроҳлик ишлатмасдан уруғлангандан кейин 7,0-7,5 кун ўтгач ажратиб олинади.

Гормон қабул қилган ҳайвонлар овуляция даври (вақти) кўпайиши муносабати билан, уларни уруғлантириш технологияси ҳам ўзгаради. Авваллари сигирларга бир неча доза сперма юбориш йўли билан уруғлантириш тавсия этилган эди. Одатда 50 млн. тирик сперматозоид юбориб, қўшилишга мойиллик туғилгандан кейин 12-20 соат ўтгач уруғлантириш қайтарилган. Кўп йиллик илмий назоратлар оқибатида, яхши уруғлантириш учун бир доза сперматозоид ҳам етарли, фақат у сигирларда қўшилишга иштиёқ уйғонгандан 24 соат ўтгандан кейин юборилиши лозим.

ҚЎЙЛАР

Қўйларда суперовуляция чақириш асослари йирик шохли ҳайвонларникига ўхшаша: СЖК ёки ФМГ жинсий циклни лютеин босқичининг охирида (11-13 кун) юборилади ёки циклни лютеин фазасида простагландин юборилади. СЖК 1кг вазн оғирлигига 20-45 ш.б. (шартли бирлик) ёки ҳар бир совуққа 2000 ш.б. юборилади. Масалан, простагландинни аналогли простенол СЖК юборилганидан 24-72 кун ўтгач 100 мкг миқдориди жинсий циклни тўртинчи – ўн учинчи кунлари орасида юборилади. Простагландин укол қилингандан 2-4 кун ўтгандан кейин совлиқларда қўшилишга мойиллик бошланади. ФМГ икки кун давомида миқдорини камайтириш (6,5-3,2 мг) кунига икки мартабадан укол қилинса, мақсадга мувофиқ натижаларга эришилади.

ОТЛАР

Байталларда суперовуляция чақиришни фаол усули яратилганича йўқ. Аммо, бир неча мартаба эмбрион ажратиб олиш (ҳар бир жинсий циклда бир мартаба) унчалик машаққатли иш эмас.

ЧЎЧҚАЛАР

Чўчқалар кўп уруғли ҳайвон бўлганликлари учун, кўп сонли эмбрионларни гормонлар юбормасдан ҳам олиш имконияти бор. Аммо, гормон қабул қилган чўчқаларда овуляциялар сони кўпайишини унутмаслик керак.

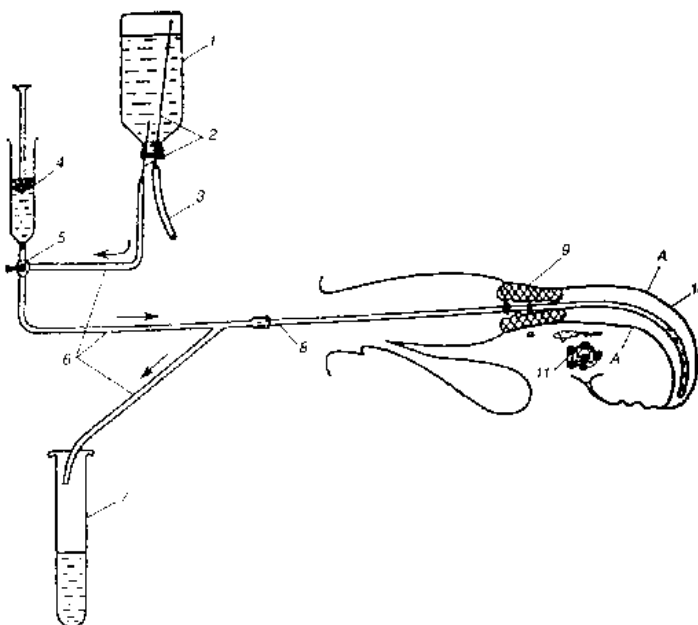
ЭМБРИОНЛАРНИ АЖРАТИБ ОЛИШ

Йирик шохли ҳайвонларда эмбрионлар тухум йўлидан бачадонга қўшилгандан кейин 4-5 кунлар орасида келиб тушади (овуляциядан 3 ёки 4 кун ўтгач), аммо суперовуляцияга учраган сигирларнинг тухум йўлида эмбрионлар 7 кунгача қолиб кетиши мумкин. Шу сабабли, эмбрионларни тухум йўлидан ёки бачадон шохларидан ажратиб олишлик, уларни ҳаракати билан аниқланади.

Эмбрионларни жарроҳлик йўлидан фойдаланмасдан ажратиб олиш фақатгина бачадон шохлари мумкинлигини эътиборга олиб, уларни фақатгина қўшилишга мойиллик бошланганидан 5 кун ўтгач ажратиш тавсия этилади.

Жарроҳлик усули билан эмбрионларни ажратиб олиш жуда яхши кўрсаткичларга эга бўлган бўлсада, ишлаб чиқариш шароитида бу усулдан фойдаланиш иқтисодий жиҳатдан қимматга тушиб кетади.

Эмбрионларни жарроҳлик бўлмаган йўл билан ажратиб олиш қуйидагича амалга оширилади (5.1-расм).



15-расм. Қорамол бачадонини ювиш чизмаси:

Шишадиган қадама (манжет) сақловчи эгилувчан катетер жинсий органдан бачадон бўйини орқали бачадон шохларига киритилади. Қадама шиширилганда бачадон шохидан чиқиш йўли бекилади. Катетер икки каналли бўлганлиги сабабли бачадон ичига юборилган суюқликни ташқарига оқиб чиқиш имконини яратади. Агар катетер бир каналлик бўлса, ювадиган суюқлик бир неча (5-8) мартаба юборилади ва кейин суюқлик бачадон шохидан оқиб чиқади. Ҳар икки ҳолатда ҳам 200-300 мл Дюльбекко яратган фосфат буфери эритмасидан фойдаланилади.

Эмбрионларни ажратиб олишни энг оптимал вақти қўшилишга интилиш ўтгандан кейинги 6-8 кун чунки ёш бластоцитлар жуда паст ҳароратда музлатиш (195%) га чидамли ва юқори натижа билан жарроҳлик бўлмаган йўл

билан бошқа хайвонга ўтказилиши мумкин. Донор-сигирдан бир йилда 6-8 мартаба фойдаланиш ва 3-6 эмбрион ажратиб олиш мумкин.

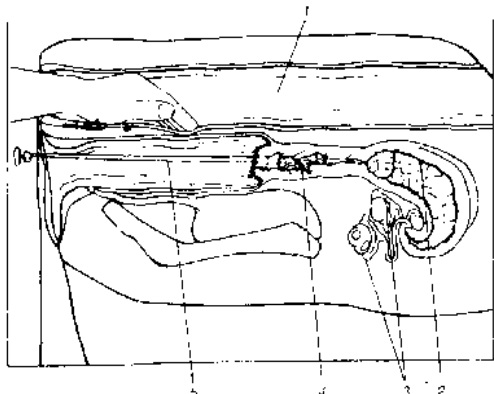
Қўй ва чўчқаларнинг бачадони бўйнидан бачадон шохига катетер ўтиши жуда қийин бўлганлиги сабабли, ножарроҳлик усулидан фойдаланиш мумкин эмас. Аммо, бу хайвонларда жарроҳлик усулидан фойдаланиш жуда ҳам осон. Чўчқаларда овуляциядан кейин 40 соат орасида 1-,2-, 4 та эмбрионни уруғ йўлидан ажратиб олади. Бунинг учун шиша идишчаларни (каюла) бачадон шохининг тепа қисмидаги кичик тешикча орқали ичкарига қўйилади (истмус). Шиша идишчалар орқали 20-30 мл ювадиган суюқлик юборилади ва суюқликни тухум йўлини ампуляр охиридан Петри ликобчасига йиғиб олинади. Эмбрионларни ажратиб олиш учун бачадондан уруғ йўли ва бачадонни юқори шохи ювилади. Бачадан шохи қисиб турилиб, унга шиша идишча қўйилади. Одатда ювиш учун лактат, пируват ва хўкиз зардобидан олинган **олобумин** сакловчи Дюльбекко буферидан фойдаланилади. Чўчка эмбрионлари қўшилишгандан кейинги 12-кунгача ажратиб олинишлари мумкин. Одатда 95% гача эмбрионлар ажралади. Бир йилда бир дона чўчкадан 3-4 мартаба эмбрион олиш мумкин.

Совлиқлардан эмбрионлар ажратиб олиш учун уруғ йўлини ампуляр охирига шиша ёки полиэтилендан ясалган конюла киритилади ва бачадон шохидан уруғ йўлига қараб ювилади. Эмбрионлар ажралиш фаоллиги 80% ни ташкил этади.

Эмбрионларни кўчириб ўтказиш

Эмбрионларни жарроҳлик йўли билан кўчириб ўтказиш билан бир қаторда ножарроҳлик йўлидан фойдаланиш ҳам кенг ривожланган (5.2-расм).

Пайета деб аталадиган махсус идишчага янги тайёрланган озиқа муҳити сўриб олинади, (суюқликни баландлиги 1,0-1,3 см), кейин 0,5 см ҳаво сўрилади ва 2-3 см ҳажмда эмбрион сакловчи асосий муҳит сўриб олинади. Кейин яна 0,5 см ҳаво ва озиқа муҳити 1,0-1,5 см сўрилганда бу идишча Касса номи билан аталган катетерга ўрнатилиб, 37⁰С лик термостатга солиб қўйилади. Кейин орқа чиқарув тешигидан назорат қилиш орқали (расмга қаранг) катетер бачадон бўйинчаси орқали секинлик билан бачадон шохига юборилади (5-7 см ичкарига киритилади). Катетерни штокини босиш билан пайета ичидаги суюқлик эмбрион билан биргаликда бачадон шохига юборилади.



16-расм.
Сигирларда жарроҳликсиз
эмбрионларни кўчириб
ўтказиш чизмаси:

Эмбрионларни кўчириб ўтказишни самараси донор (эмбрион берувчи) билан реципиент (эмбрион қабул қилувчи) ҳайвонларда қўшилишга бўлган иштиёқни бир-бирига мос равишда, монанд келишига боғлиқ. Айниқса йирик шохли ҳайвонларда ҳомиладор бўлиш сони мана шу монандлик вақтида эмбрион кўчиришга боғлиқ.

Эмбрионларни бачадонни ҳар икки шохига юбориш катта самара беради. Бу усулдан эгизаклар олишда кенг фойдаланилади. Эгизак олиш учун 7 кунлик эмбрионларни уруғланган ҳайвонларнинг қарама-қарши турган сариқ тана сақловчи тухумдонига юбориш керак.

Байтолллар учун эмбрионларни жарроҳлик бўлмаган йўл билан ўтказиш усули ҳам яратилган. Бу усулнинг самарадорлиги овуляциядан кейинги 6-8 кунларда эканлиги тасдиқланган. Юқорида таъкидлаб ўтилганидек, совлиқларда ва чўчқаларда эмбрионларни кўчириб ўтказиш фақат жарроҳлик йўли билан амалга оширилади. Реципитентларда ҳам донорларда амалга оширилган ишлар бажарилади. Эмбрионларни ривожланиш босқичига қарарб, улар ёки уруғ йўлига ёки бачадонга ташланадилар.

Совлиқдан, қўшилишга бўлган иштиёқни 1-4 кунлари ажратилган эмбрионлар уруғ йўлига, каттароқ ёшдагилари эса тўғридан-тўғри бачадонга ташланадилар. Кўчириб ўтказилган эмбрионларни тутиб қолиш самараси 70-75% ни ташкил этади.

Чўчқа эмбрионлари бачадонни бир шохидан иккинчисига ўтиб юриш хусусиятига эга бўлганлиги сабабли, уларни битта шохга кўчириш етарлидир.

2-5 кунлик эмбрионни кўчириб ўтказилганда, уни тутиб қолиш самараси 60-70 % ни ташкил этади. Кечроқ ўтказилган эмбрионлар чўчқаларда самара бермайди. Шунинг учун 2-4 кунлик эмбрионлардан фойдаланиш тавсия этилади.

Эмбрионларни сақлаш

Эмбрионларни трансплантация қилиш йўлларидадан фойдаланиш, уларни ажратиб олгандан то бошқа ҳайвонга ўтказгунча ўтадиган даврда самарали сақлаш йўллари яратишни талаб қилди.

Ишлаб чиқариш шароитида, одатда эмбрионлар эрталаб ажратиб олиниб, кечки пайт реципиент ҳайвонга ўтказилади. Мана шу вақт орасида эмбрионларни сақлаш учун ҳар хил модификацияга учраган ёки йирик шохли ҳайвонларни эмбрионал зардоби сақлаган фосфатли буфердан фойдаланилади ва уй ҳароратида ёки 37⁰С да сақланади.

Изланишлар йирик шохли ҳайвонларни эмбрионларини *in vitro* шароитида 24 соатгача, тутиб қолиш хусусиятларини ўзгартирмасдан ўстириб туриш мумкинлигини кўрсатди. 24 соат давомида ўстириб турилган чўчқа эмбрионини кўчириб ўтказилганда, унинг тутиб кетишида ўзгариш бўлмаганлиги кузатилган.

Эмбрионларни яшашга чидамлилигини маълум маънода уларни ҳароратини ҳайвон ҳароратидан пасайтириш орқали ошириш мумкин. Эмбрионларни совуққа чидамлилиги ҳайвон турига боғлиқ.

Совуққа айниқса чўчка эмбрионлари чидамсиздир. Ҳозирча минус 10-15⁰С сақланган чўчка эмбрионларини яшаб кетиши кузатилмаган.

Ривожланишни бош босқичида йирик шохли ҳайвонларни эмбрионлари ҳам 0⁰ дан паст ҳароратга чидай олмайдилар. Аммо, кейинги босқичга ўтган, (масалан морула ёки бластоцист) эмбрионлар паст ҳароратга чидамлилар.

Совлиқларни эмбрионлари ёшларидан қатъий назар (бир-икки хужайралик босқичдан то бластоцистгача) 0⁰С гача бўлган совуққа яхши чидайдилар. Эмбрионларни сақлаш ҳароратини 37⁰С дан 10⁰С ва 0⁰С ҳароратда ушлуб турилиши, уларни ривожланишини тўхтатади, аммо модда алмашинуви жараёнлари 5-6 сутка давомида сақлашни таъминлайдиган ҳолатда амалга ошиб турадилар.

Эмбрионларни кўпроқ муддатга сақлаш учун нафақат уларни ривожланишини, балки бутун модда-алмашинуви жараёнларини тўхтатиш лозим бўлади. Бундай ҳолат -195⁰С ёки ундан ҳам паст ҳароратда намоён бўлади, холос.

Кейинги вақтларда амалга оширилган илмий изланишлар натижасида йирик шохли ҳайвонларни эмбрионларини музлатиш ва эритиш тезлиги орасидаги оптимал нисбатаини аниқлашга олиб келди. Масалан, агар эмбрионларни секин (1⁰С /млн) жуда паст ҳароратгача совутилса, (-50⁰ дан паст) ва кейин суюқ азотга ўтказилса, у жуда секин (25⁰С/мин ёки ундан ҳам секинроқ) эритишни талаб қилар экан. Бундай эмбрионларни тезлик билан эритиб юбориш, уларни осмотик парчаланишигача олиб келар экан. Агар эмбрионлар секин (1⁰С/мин), аммо фақат -25⁰С ва 40⁰ гача музлатилса ва кейин суюқ азотга солинса, уларни тез (ҳатто 300⁰ С/мин) эритса ҳам бўлар экан. Бу ҳолатда қолган сув суюқ азотга ўтказилиши билан шишасимон ҳолатга ўтиб қолиши кузатилган.

Бундай ҳолатларни очилиши, сигирлар эмбрионларини музлатиш ва эритишни осон йўллари топишга олиб келди. Масалан, эмбрионларни худди шунингдек спермани ҳам ҳайвонларга транслантация қилишдан олдин илиқ сувда 35⁰С да, 20 секунд давомида эритиб ишлатиш мумкин.

Музлатилган ва кейин эритилган (муздан туширилган) эмбрионлар муваффақият билан бир босқичда, уч музлатилган пайтда (идишчани ўзида) суюлтирилиши мумкинлиги ҳам исботланган.

Бу усулни асосий моҳияти қуйидагилардан иборат музлатиб эритилган эмбрионлар бир босқичда музлатилган криопротекторлар эритмасидан, масалан, 1,5 м глицеринни фосфатли буфердаги аралашмасдан хужайра ичига кириш имконияти (хусусияти) бўлмаган (масалан, сахароза) гипертоник эритмага ўтказилади. Бу эса эмбриондан криопротекторларни (ҳимоя муҳитлари) аста-секин осмотик борабарликни бузмасдан чиқишига олиб келади (0,02 мл 1,5 м глицерин).

Ҳаво пуфакчалари ёрдамида пайетани 3 бўлмага бўлинади: биринчисида– криопротекторлар эритмаси; иккинчисида– криопротектор эритмасидаги

эмбрион; учинчисиди – эритувчи (1,08 м сахароза). Музлатиб, эритилгандан кейин пайеталар тебратиб аралаштирилади. Кейин пайетадаги эмбрион но жаррохлик йўли билан реципментга ўтказилади. Бу усул музлатиб – эритилган эмбрионларни сунъий уруғлантириш сингари ишлари имкониятини беради. Эмбрионларни эришини бир ва кўп босқичли усуллар билан эритишни таққослаб ўрганилганда ҳар икки усул бир хил натижа бериши кузатилган.

Шундай қилиб, йирик шохли ҳайвонларни эмбрионлари ривожланишни дастлабки кунларида совуққа жуда сезгир бўлиши, аммо кейинги босқичларда айниқса бластоциста босқичида совуққа чидамлилиги ошиб бориши аниқланган. Чўчкалар эмбрионлари ривожланиш давридан қатъий назар совуққа чидамсиз эканлиги улар 10-15⁰С фаолиятини тўхтатиши кузатилган. Йирик шохли ҳайвонлар, қўйлар ва отларнинг эмбрионларини морулалар ва бластоцистлар босқичларида -196⁰С гача музлатиш мумкинлиги кузатилган ва шундай эмбрионлардан авлодлар олинган. Ҳозирча бу усулдан йирик шохли ҳайвонларни кўпайтириш мақсадидагина фойдаланиб келинмоқда.

Тухум ҳужайраларни ҳайвон организмдан ташқарида уруғлантириш

Уруғлантириш тизимини яратиш ва сут эмизувчилар эмбрионларини ҳайвон организмдан ташқарида (*in vitro*) тезроқ ривожланиш босқичларини белгилаб бериш вазифалари улкан илмий ва амалий аҳамиятга эга бўлиб, ҳайвонларнинг кўпайиш самарадорлигини оширишга хизмат қилади.

Организмдан ташқарида (*in vitro*) уруғлантириш тизими, уруғланиш жараёнида яъни эркак ва аёл қўшилиши жараёнида содир бўладиган биокимёвий ва физиологик факторларни ўрганиш учун бебаҳо аналитик инструмент бўлиб хизмат қилади. Фақатгина организмдан ташқари уруғланиш тизимини ўрганиб чиқиш, қишлоқ-хўжалик ҳайвонларида ген ва ҳужайра мухандислиги усулларида фойдаланиш, бу усулларни мана шу соҳага тадбиқ этиш имкониятини яртади. Маълумки, ген ва ҳужайра мухандислиги бўйича изланишлар олиб бориш учун эндигина пайдо бўлган (энг дастлабки ёшдаги) эмбрионлар керак, бу эса фақатгина жаррохлик йўли билан тухум йўлидан ажратиб олинмоғи лозим. Юқорида таъкидлаб ўтганимиздек, бу ҳам машаққатли иш, ҳамда ҳар доим ҳам эксперимент учун зарур бўлган даражадаги ёш ҳомилани (зародиш) беравермайди. Бунинг устига, қишлоқ хўжалик ҳайвонларининг кўпайишини гормонал бошқаришни бугунги кунда ўрганадиган усуллар овуляция вақтини аниқ назорат қилиш имконини бераолмайди, оқибатда эмбрионларни тажриба учун керакли бўлган ривожланиши фазасида, керакли миқдорда ажратиб олиш катта муоммоларни келтириб чиқаради.

Ҳужайра ва ген мухандислиги усуллари эмбрионлар билан узоқ вақт организмдан ташқарида тажрибалар олиб боришни таққоза этади. Кўрсатиб ўтилган барча муоммоларни, сут эмизувчи ҳайвонларни тухум ҳужайрасини организмдан ташқарида чатиштириш (уруғлантириш) тизимидан фойдаланиш муваффақиятли ҳал қилиб бера олади.

Сут эмизувчиларни тухум хужайраларини *in vitro* чатиштириш куйидаги асосий босқичларни ўз ичига олади: ооцитларни етилиши, сперматозоидларни капацитацияси, чатиштириш ва зародишларни (эмбрионларни) дастлабки ривожланиш босқичида танлаб олиш.

Ооцитларни *in vitro* етилиши

Сут эмизучи ҳайвонларни, жумладан йирик шохли ҳайвонлар, қўйлар, чўчқаларнинг тухумдонидидаги жинсий хужайраларни кўпчилиги, юқори даражадаги генетик микониятларга эга бўлиб, мана шу ҳайвонларни кўпайиш имкониятларини белгиловчи беҳисоб манба ҳисобланади. Улар генетик ривожланишни белгилашда овуляцияга нисбатан анча юқори туради. Ҳайвонларнинг кўшилишга иштиёқ пайдо бўлган даврда чиқадиган ва овуляцияга учрайдиган ооцитлар сони тухумдондаги ооцитларнинг бир қисмини ташкил қилади холос. Ҳолган ооцитлар тухумдонлигида атрезияга (парчаланани) учрайди. Шундай вазиятда ўз-ўзидан савол туғилиш муқаррар. Нима учун тухумдон ичида қолган ооцитларни қандайдир йўллар билан чиқариб олиб, уларни организмдан ташқарида чатиштириш мумкин эмас? Ҳозирча ҳайвонларда йиғилган барча ооцитларни ҳаммасини чиқариб олиш усули яратилган бўлсада, уларни бир қисми фолликулаларидан ажратиб олиниб, етилтирилиб, *in vitro* уруғлантириш учун ишлтилади.

Куёнлар фолликулалари ажратиб олиниб, культурал муҳитга солинганда ооцитлар мейозини (хромосомалар сонини редукцияга ва генларни рекомбинацияга олиб келувчи, жинсий хужайраларни бўлиниш жараёни) ўз-ўзидан қайта тикланиши. Биринчилардан бўлиб, 1935 йилда Г.Пинкус ва Н.Энзман томонидан кузатилган эди.

Фолликуллардан ооцитлар ажралиб чиққанда, шунингдек овуляциядан олдинэндоген ЛГ чиқарилганда, ооцитлар мейотик тормозланган ҳолатдан чиқиб, зардишлар пуфакчалари ёрилиб кетишига олиб келади. Йирик шохли ҳайвонлар организмда зародиш пуфакчалари ЛГ чиққанидан 5 соатлар ўтганга ёрилади ооцитлар метафаза I ҳолатига 12 соатдан кейин, метафаза II ҳолатига эса 24-25 соатдан кейин етадилар. Организмдан ташқарида ҳам зародиш пуфакчасининг ядро мембранаси, йирик шохли ҳайвонларда 5-6 соатдан кейин юқолади, 12 соатдан кейин хромосомалар метафаза I ҳолатига, 20-24 соатдан сўнг эса метафаза II ҳолатига етади.

Сигирлар, қўйлар ва чўчқаларни ооцитларини мейотик етилишида кўринадиган турлар орасидаги фарқ 5.3-жадвал да кўрсатилган.

Тухумдон фолликулаларидан ажратиб олинган ооцитларни кўпчилигида мейоз қайтарилиб, метафаза II босқичига етилсада, уларни уруғланиши зародишларни тўлақонли етилишига олиб келаолмайди. Бунга асосий сабаб ооцитларни яхши етилмаслигидир. Сабаблардан яна бири ооцитлар *in vitro* етилганда, улани цитоплазмасида эркак пронуклеин ташкил бўлиши ва ривожланишини назорат қилувчи фактор етарли ҳосил бўлмаслиги билан боғлиқ бўлса ажаб эмас. Олимларни фикрларича ооцит цитоплазмасида эркак пронуклеуси етилишини чақирадиган фактори ҳосил бўлиши учун мейотик

етилиш бошлангандан кейин энг ками 6 соат давомида ооцитларни фолликулла ичида нормал ривожланишини таъминлайдиган шароит бўлиши шарт экан.

11-жадвал

Овуляция олдидан чиқадиган гонадотропинларга жавобан ҳар хил турдаги ҳайвонлар ооцитлари ядросида мейоз босқичида намоён бўладиган вақтинча кўрсаткичлар (Хантер, 1980)

Ҳайвонлар тури	Тезлаштирилгандан кейинги яширин давр, соат	Мейотик етилиш босқичлари, соат			
		Метафаз а I	анафаз а	теофаз а	Метафаза II
Сигир	10-12	14-21	22	23	24
Қўй	10-11	12-20	21	22	24
Чўчка	17-18	26-34	35	36	37

Бу фикр мейознинг ҳар хил босқичидаги фолликуллардан ажратилган чўчка ооцитларини *in vitro* шароитида уруғлантириш буйича кўйилган тажрибаларда ўз тасдиғини топган. Ривожланиш босқичини кўтарилиши билан фолликуллардан ооцитлар ажратиб олиш нуқтасида зародишларни нормал уруғланиш коэффиценти ошган:

- зародишларни пуфакча босқичида – 31,7 %;
- диакинез босқичида – 51,6 %;
- метафаза I босқичида эса 78,2 % уруғланиш содир бўлганлиги кузатилган.

Сут эмизувчиларда мейоз уйғотиш учун атероид гормонлар талаб қилишмаслиги, улар фақатгина ооцитларни нормал физиологик ҳолатда туриши учун зарур эканлиги аниқланган.

Маълумки, фолликуляр хужайраларда ишлаб чиқариладиган стероидли гормонлар ва бошқа бир қанча факторлар, ооцитларни пишиб етилишига ижобий таъсир кўрсатади. Шу муносабат билан ооцитларни фолликуляр хужайралар билан бирга ўстирилиши уларни нормал уруғланиши ва кейинчалик эмбрионал ривожланишини кучайтириши мумкин деган фикрга келинган. Фоликуллар ичидги кўпгина ходисаларни жумладан стеродлар ва оксил моддалар биосинтези гонадотроп гормонлар томонидан бошқариб турилади. Шунинг учун ҳам ооцитларни фолликуллар ичида ёки фолликулярли хужайралар билан биргаликда ўстирилганда, озика муҳит таркибида гонадотропинлар бўлиши шарт.

Соматик (фолликуляр) ва жинсий хужайралар орасида тўғридан –тўғри алоқа бўлишини шартлигига бир қатор сабаблар мавжуд. Фолликулярли хужайралар ооцитлар озикланишида катта роль ўйнайдилар. Улар ооцитларни энергетик субстратлар билан таъминлаб турадилар, аминокислотларни нуклеотидларни ва фоллипирларни баъзи –бир олдинги авлодларини ооцида ўтказишда қатнашадилар, ядрога ва баъзи бир оксилларни тўғридан-тўғри синтез бўлишига йўл-йўриқ кўрсатувчи сигналларни тиклайдилар. Юқорида қайд этиб ўтилганидек, ооцитларни етилиши учун зарур бўлган йўл-йўриқ

кўрсатувчи сигналлар, инициациядан кейинги дастлабки 6-8 соат ичида жуда зарурдир.

Ҳозирча фақатгина йирик шохли ҳайвонлар ооцидларини *in vitro* етилтириш ишлаб-чиқариш шароитида ишлатилиб келинмоқда холос. Ооцидлар сигирларни тухумдонидан сўйилгандан кейин ёки тириклигида хафтасига 1-2 маротаба ювиб олиш мумкин. Биринчи ҳолатда ҳайвон сўйилгандан кейин, тухумдонлари олиниб, лабораторияга махсус контейнерлар ёрдамида 1,5-2,0 соат орасида етказилади. Лабораторияда тухумдон икки маротаба янги тайёрланган фосфатли буфер билан ювилади. Ооцидлар диаметри 2-6 мм бўлган фолликуллардан, тухумдондан сўриб олиш ёки уни пластинкаларга ўхшатиб кесиш йўли билан ажартиб олинади. Ооцитлар 10 % сигир қони зардоби сақлаган (кўшилишга мойиллик кўрсатган сигир қони) ТСМ 199 муҳитида йиғилади, кейин икки маротаба ювиб ташлаб *in vitro* ҳолатида етиштирилади.

Охирги вақтда тирик сигирларнинг тухумдонларидан ультра товуш ускуналар ёки лапароскоп ёрдамида ооцидлар ажратиб олиш усуллари ихтиро қилинган. Бунинг учун битта сигирни диаметри 2 мм дан кам бўлмаган фолликулларидан хафтасига 1-2 маротаба ооцитлар сўриб олинди. Ўртача 1 та ҳайвондан 5-6 та ооцит ажратиб олиш мумкин. 50 % дан камроқ ооцитлар *in vitro* шароитида етилтиришга яроқлидир.

Ооцитлар миқдорини камлигига қарамасдан, бу мақсадда ҳайвондан кўп маротабалаб фойдаланиш мумкинлигини ҳамда олинган ооцитларни келиб чиқиши ҳақидаги ахборотларни аниқлигини эътиборга олган ҳолда *in vitro* шароитида урулантириш усулини истиқболли усуллардан деб ҳисоблашга асос бўла олади. Ажратиб олинган ооцитлар 24 соат орасида пишиб етилади. Ооцитларни *in vitro* шароитида етилтириш учун ишлатиладиган буферни таркиби: 20 % байтал қонидан ажратилган зардоб сақлаган ТСМ 199 муҳити ва унга кўп бўлмаган миқдорда антибиотиклар (50 ед. пенициллин, 50 мкг стрептомицин 1 мл муҳитга).

Ооцитлар фолликуллардан 500 хд. да 5 минутдан икки маротаба центрифуга қилиш орқали ажратиб олинади. Чўкмага тушган ҳужайралар юқоридаги муҳитда суспензия қилиниб, етилишга қўйилади. Ооцитлар ва гранулёзли ҳужайраларни ҳамкорликда 38,5⁰С да 5% CO₂ атомосферасида 2 мл муҳит сақлаган Петри ликобчасида ўстирилади.

ВЕТЕРИНАР МЕДЕЦИНАДА БИОТЕХНОЛОГИЯ

Ҳайвонларда касаллик даражсини ўсиб кетиши ҳар доим ҳам бир ёки икки сабаб туфайли эмас, балки бунга қатор факторлар билан боғлиқ бўлиши, улар орасида эса мамлакатга четдан келтирадиган озиқа маҳсулотларини сифати ҳам бўлиши мумкин. Озиқ-овқат ва ҳайвонлардан олиндиган барча маҳсулотлар мамлакатга киришдан олдин давлат чегара назоратидан ўтказилади. Уни чегара ветеринар назорат пункти аэропортда, темир йўл вокзалларида, автомобил йўлларида амалга оширмоқлари лозим. Ўзбекистонда қатор Европа мамлакатларида содир бўлиб турган эпизоотия касалликлари учраганчалик йўқ.

Бундай касалликларни келиб чиқишига асосий сабаб, кўпчилик эпизоотия касалликларини, масалан йирик шохли ҳайвонларда лабсимон энцефалопатия яхши ўрганилмаганлиги сабабли, унга диагноз қўйиш жуда ҳам қийинлигидир.

Ветеринария – санитария қоидаларига асосан Ўзбекистонга киритиладиган озиқа моддалари ва озиқага қўшимчалар шу маҳсулотларни ишлаб чиқаришга экспорт қилувчи мамлакат маркази давлат хизмати томоидан руҳсат этилган корхоналарда ишлаб чиқарилиши ва доимий равишда уларни назоратида бўлиши керак.

Йирик шохли ҳайвонларнинг лабсимон энцефалопатия касаллиги прион табиатли касалликларга киради. Прионлар одам ва ҳайвон бош миясида нейродегенератив ўзгаришлар чиқаради. Прион касалликларни трансмиссив лабсимон энцефалопатия касалликларига киритишади. Бу касалликлар узок муддатли инкубацион даврга эга бўлиб, (баъзида 30 йилгача), секин ўтади чанг шамоллаш белгилари ва мумун жавоби бўлмаган ҳамда фақат ўлим билан тугайдиган касалликлар сафида туради. Бу касаллик Буюк британияда эпидемияга айланиб кетиб, миллионлаб ҳайвонларни ўлимига сабаб бўлган.

Шунинг учун ҳам бу касалликни мамлакатга кириб келишини олдини олиш мақсадида Россия 1989 йилдан бошлаб Буюк британиядан гўшт маҳсулотлари (консерва, қорамол сут маҳсулотлари, тирик қорамол, сперма, эмбрионлар, гўшт ва гўшт суяк уни ва бошқа озиқалар) ни харид тақиқлаб қўйилган. Мол гўштини Европада ҳамкорлик мамлакатларидан реэкспорт қилиш ҳам ман этилган. Юқумли касалликларга қарши курашни энг асосий йўлларида бири-бу вакцинациядир. Бошма-бош вакцинация қилиш орқали оспа бутунлай йўқотилган, кутуриш, яшур ва бошқа касалликлар кескин қисқарган. Ўз вақтида вакцинация ўтказиш катта иқтисодий самара беради. Ананавий вакцина препаратлари кучсизланган ёки бутунлай фаолиятини йўқотган касал кўзғатувчилар асосида, ҳар хил озиқа муҳити иштирокида, аниқ бўлган ёки янги яратилган технологиялар асосида ишлаб-чиқарилади.

Замонавий биотехнология кўплаб вакциналар вариантларини ишлаб чиқаришни режалаштирган, аммо улар орасида катта қизиқиш уйғотадиганлари: рекомбинат вакциналар ва вакцина антигенлардир. Ҳар иккала вакциналар ҳам ген-муҳандислик усулларида фойдаланиб яратилади. Рекомбинат вакциналар тайёрлаш учун одатда яхши ўрганилган қорамолларда оспа чақирадиган вирусдан фойдаланилади (оспа вакциналар). Оспа вирусининг ДНК сига ҳар хил касалликни чақирадиганларга қарши иммуноген оксиллар кодловчи бегона генлар киритилади: грипп вирусининг гемагмутинини ва герпес вирусининг генкопротеин Д, гипатет В вирусининг сиртқи антигени, молярия антилени ва х.к.ли орқали олинган вакциналарни устунлик томони шундаки, ДНК участкаларини бирлаштириш асосида. Ҳар хил патогенларга қарши поливалент препаратлар яратиш мумкин. Бу эса ҳайвонларни бир вақтни ўзида ўша регионга хос бўлган кўплаб юқумли ва хавли касалликларга қарши эмлаш имкониятини беради.

Вакцина антигенлар касал кўзғатувчиларни генини *E. coli*га ачитқиларга, хашоратлар ёки сут эмизувчилар тўқималарига клонлаш орқали тайёрланади. Ҳозирги вақтда гепатитнинг HBS – вирусини сиртқи антигени (зардоб

гепатити), яшур вирус қобиғидаги оксил VPI – генлари клонланган. Яшур вирус бир неча серобип ҳолатида учрайди. Оксил мухандислиги усуллари ёрдамида бир оксил антиген доирасида ҳар хил серотипларнинг имуноген компопентларини тузилди.

Вакцина антигенлар сақлаш ва ташишга чидамли, ишлатилиши нисбатан содда, жуда кам миқдорда оксил сақлагани учун аллергиялик хусусияти ҳам ўша паст, инфекция касаллик чақирмайди. Аммо, ҳозирча уларни имуногенлиги пастлиги учун биров муомма пайдо бўлиб турибди. Бунга сабаб, вакцина касал қўзғатувчини иммунитет ҳосил қилиш учун зарур бўлган барча компопентларини сақламаслигидир. Масалан, вирус ҳужайрани тарк этаётиб, кўпинча уни мембранасига «ўраниб» олади. Манашу мембрананинг ген мухандислиги йўли билан олинган оксилда йўқ бўлган компопентлари, имуноген ҳоссаларга эга бўлишлари мумкин. Вакцин-антигенларни имуногенлигини кўтаришни, вакциналарни иммобилизация қилиш, ёки уларни липосомаларга киритиш, уларга адьювантлар (мутадиллаштирувчи моддалар) қўшиш орқали амалга ошириш мумкин.

Биотехнологик изланишларни кўп йўналишлари тиббиёт ва ветеринария муоммоларини ечиш билан боғлиқ. Олимлар янги авлод антибиотикларини яратиш устида тинмай меҳнат қилмоқдалар. Бунга сабаб, ҳозир ишлатилиб келаётган антибиотикларга кўпчилик касал қўзғатувчи микроорганизмларни ўрганиб қолганлиги, уларни заҳарлилиги, баъзи бирларини аллергиялик хусусияти ва бошқа камчиликларидир.

Бу муоммони ечишда қуйидаги йўналишларда изланишлар олиб борилиши лозим:

- янги продуцентларни синаб кўриш, катта миқдорда антимикроб агентлар синтез қиладиган микроорганизмларни танлаш ва ўрганиш;
- антибиотикларни заҳарлилигини пасайтириш мақсадида уларни кимёвий модификация қилиш (масалан, узоқ вақтлардан буён оғир микозга қарши ишлатилиб келинаётган амфотерицин В, буйруқда қайтариб бўлмайдиган бузилишлар чақиритиши аниқланган, амфотерицинни метил эфири камроқ токсинликга эга бўлиши билан бирга замбуруғга қарши хусусиятини йўқотмаган; пенициллинлар ва цефалоспоринларни ҳар хил иммобилизация қилинган ферментлар ёрдамида модификация қилинган, ўзларидан фаолроқ ҳосилалари олинган).
- антибиотикларни молекулаларини ташиқ қиладиган алоҳида фрагментларни синтез қилмайдиган мутант штаммларни олиш ва уларни ишлатиш, бундан фрагментларни аналоглари (ёки антибиотикларни аналоглари) озиқа муҳити таркибига киритилади, микроорганизмлар бу аналогларни биосинтез учун ишлатади, оқибатда модификация қилинган антибиотиклар синтез бўлади;
- ген мухандислик усуллари ишлари микроорганизм геномига антибиотикларни модификация қилишда қатнашадиган ферментлар ҳақида ахборот киритиш, масалан: антибиотикларга метил гуруҳи киритиш учун метилаза ферменти керак бўлади ва х.к;

- *хужайра мухандислиги усулларидан фойдаланиб, гибрид антибиотиклар яратиш; (масалан шакарлар агликонини янги комбинациялари) ва х.к.*

Маълум бўлган антибиотикларни биосинтезини самарадорлигини кўтариш ҳам биотехнология фанининг долзарб масалаларидан бирidir. Олимлар ва мутахассисларни продуцент штаммларни индуцирланган мутагенез ва кўп босқичли танлаш бўйича олиб борган изланишлари яхши натижаларга олиб келган. Масалан, пенициллин синтез қилувчи *Penicillium* ни штаммининг самарадорлиги юз маротабадан кўпроқ оширилган. Антибиотиклар биосинтезида «муаммолик жойларни» генларини клонлаш ёки биосинтетик ферментларни ягона оперонда кодлашган мумкинлиги маълум маънода истиқболлар очади.

Истиқболли йўналишлардан яна бири антибиотикларни капсулаланган ҳолатда ишлаб-чиқариш, уларни липосомал шакллари уларни организмни керакли қисмига етказиши ва ўша жойда ўз таъсирини кўрсатади, демак уларни иккинчи даражали таъсири камаяди ва самарадорлиги ошади. Бундай ишланмалар бошқа доривор моддалар учун ҳам фойдалидир. Масалан, калазар – лейшманиялар чақирадиган касаллик бўлиб, уни даволашда ўта заҳарли бўлган сурьма препаратлари ишлатилади. Бу препаратларни даволаш миқдори (дозаси) инсон ҳаёти учун заҳарли. Липосома таркибига киритилган сурьма тўғридан-тўғри касалланган органларга қораталоқ ва жигарга олиб келинади, шу туфайли одатдагидан камроқ миқдорда бўлсада, самаралироқ таъсир кўрсатади.

Антибиотиклар ўрнига инсон организмга уларни продуцентлари – касаллик қўзғатувчисининг антогонистлари юборилиши мумкин. Бундай усуллар М.И.Мечников ишларидан бошланган бўлиб, у йиринг чақирувчи микробларга қарши сут ачитувчи бактериялардан биринчи бўлиб фойдаланган эди. Тишларни кориесини келиб чиқишидан оғиз бўшлиғида яшовчи бактерия *S.mutans* катта роль ўйнайди, уни оғизга киритилганда ўзидан коррозив кислоталар чиқаради ва шу туфайли ёввойи штаммларни сиқиб чиқаради.

Юқорида таъкидлаб ўтилганидек, чорвачиликни ривожлантиришда қишлоқ хўжалик ҳайвонлари орасида кўплаб учрайдиган юқумли касалликларни олдини олиш, бу мақсадда тирик рекомбинант вакциналар ва ген мухандислик усуллари билан яратилган вакцин – антигенлардан, фойдаланиш (бундай касалликларни моноклонал антителалар ва ДНК) РНК – проба орқали эрта диагностика қилиш катта аҳамиятга эга.

Ҳайвонларни маҳсулдорлигини ошириш мақсадида ҳозирги вақтда микробиология саноати замбуруғлар, бактериялар, ачиткилар ва сув ўтлари асосида қимматли озиқалар ишлаб чиқармоқда. Бир хужайраликларни юқори миқдорда оқсил сақловчи биомассаси қишлоқ хўжалиги ҳайвонларида яхши сўрилади. Масалан, 1 т ачитки озиқаси – 400-600 кг чўчка гўшти, 1500 кг гача парранда гўшти, 25-30 минг дона тухум бериши ва 5-7 тонна буғдойни иқтисод қилиш имконини яратади. Буни жуда катта аҳамияти бор, чунки бутун дунёда 30 % қишлоқ хўжалик майдони ҳайвонлар ва паррандаларга озиқа етказишга ажратилган.

Озиқ- овқат саноатида, озиқа маҳсулотларини қайта ишлаш ва сақлашни янги усулларини яратиш, озиқа қўшимчалари олиш (масалан, микроорганизмлар синтез қиладиган биополимерлар, аминокислоталар, ҳушбўй ҳид ва таъм берадиган моддалар), бир ҳужайраликлар синтез қиладиган оқсиллардан фойдаланиш ва озиқа маҳсулотларини қайта ишлашда ферментлардан фойдаланиш ва х.к. иқтисодиётни кўтаришга хизмат қиладиган қўшимча омиллардир.

Шунингдек, диагностикани такомиллаштириш учун ферментлардан фойдаланиш, мураккаб дори-дармонлар яратишда ферментлардан фойдаланиш (масалан, стероидлар), янги антибиотиклар синтез қилиш ва улардан ҳайвонларни юқумли патологиясида фойдаланиш ҳам катта фойда келтирадиган соҳалардир.

Ҳозирги вақтда тобора кенгайиб бораётган ветеринария тиббиётида вакциналардан фойдаланиш уларни ген муҳандислиги усуллари асосида замонавий шаклда рақобатбардош қилиб чиқаришни саноат асосида йўлга қўйиш ҳам катта аҳамият касб этадиган биотехнологик жараёнлардан биридир. Аммо, бу усулни ишлатилиши куйидаги сабабга кўра мураккаблашган: маълумки, ҳар қандай типдаги антигенли детерминантларни иммуногенлик активлиги қанчалик намоён бўлиши учун уларни антител билан ўзаро таъсирини кўп ёки камлигини белгилаб берувчи омил антитела томонига қараган сиртқи қисми ҳисобланади. Бошқача қилиб айтганда вирус оқсилларини иммуногенлик ва антигенлик хоссалари уларни иккиламчи, учламчи ва тўртламчи структураларига боғлиқдир. Айни мана шу далил субъектиницаларни мунлик фаолияти камроқ бўлишига асосий сабабдир, чунки субъектиницаларда энг керакли антиген детерминантлар жойлашган бўлади.

Яқинларгача, вирус ва бактерияларни юзали оқсилларини синтез қилишни энг афзал йўли микробиологик синтез деб ҳисобланар эди. Шу йўл билан ўзига хос мувоффақиятларга ҳам эришилди (Рекомбинант ДНК олишни кўзда тутилмоқда). Вирус генларини бактерияга экспрессия қилинди (гемагглютинин, грипп, яшур ва бошқа вируслар оқсиллари).

Аммо, бактериялар ҳужайраларнинг рекомбинантли плазмидаларида синтез бўладиган қобикли оқсилларни бирортаси ҳам субъектиница типидеги вакцина бўла олмади. Шундай бўлишига шубҳа билан қарайдиган олимлар сони ошиб бормоқда. Бу бактериялар тизимда синтез бўладиган вирус оқсиллари ўзларининг иммуногенлик хусусиятлари ва маҳсулотни миқдори билан эукариотлардаги синтез олдида самарасиз эканлиги билан тушунтирилади. Бугунги кунда яшурга қарши синтез қилинган, табиатан олигопептид бўлган вакцина кенг қўлланилиб келинмоқда. Бундай вакциналар умуман хавфсиздир. Улар иккинчи даражали таъсирга эга эмаслар, фақатгина уларни ишлаб чиқариш баҳоси жуда ҳам қиммат. Вирусларни бир неча хил ва серотипларига нисбатан полиантигенли детерминантларни ген муҳандислик йўли билан синтез қилиш истиқболлироқ кўринади. Антиген детерминантлар уларни ташувчи оқсил молекуласига антитела билан учрашуви таъминланадиган ҳолатда жойлашишлари керак. Бу вазифа бажарилиши қийин бўлмаган вазифалар

сирасига кириб, у оксил молекуласини эриган ҳолатида иккиламчи ва учламчи структураларини аниқлаш усуллари орқали ечилади. Бундай ҳолатда оксилларни иммуногенлик активлиги, уларни мультимер агрегатлар ҳосил қилиш имкониятлари билан боғлиқ бўлмайди. Оксилларни иммуноген хусусияти албатта уларни бирламчи структураси билан аниқланган бўлади. Шундай бўлганда ген-мухандислиги усуллари билан ишлаб-чиқарилиши бошлаб юборилган иккинчи авлод вакциналарни микроорганизмлар тизимида ҳам тайёрлаш технология нуктаи назаридан мумкин бўлиб қолади.

Фақат мана шу йўналиш билан сунъий вакциналар яратиш имкониятлари чегараланиб қолмайди. Вирусларни нейтрализация қилувчи антителаларни пайдо бўлиши учун жавобгар антиген детерминантлар кўпчилик вирусларда бирламчи структураси ўзгарувчанликга молик бўлган оксилларни муайян қисмларида жойлашган бўлади. Шунинг учун ҳам вируснинг бир серотипига қарши тайёрланган вакцина, шу турга мансуб бўлган, аммо бошқа серотипли вируслардан яхши ҳимоя қилаолмайди.

Аммо, ҳайвонларни оксилни ўзгармайдиган қисми билан иммунизация қилинганда, организмда оксилни кам ўзгарувчан қисмига қарши антитела ҳосил бўлади. Бундан фарқли ўлароқ бутун вирус ёки антиген детерминантлар сақловчи, ажратиб олинган оксил билан иммунизация қилинганда бундай ҳодиса кузатилмайди. Бу феноменни механизми ҳозирча номаълум. Бу жараённи механизмини очилиши кенгрок таъсир спектрига эга бўлган вакциналар яратилишига хизмат қилса ажаб эмас. Гриппнинг А ва В вируси қобиғида жойлашган оксилнинг консерватив (ўзгармайдиган) участкаларига қарши антитела шу серотипларни барчасини нейтрализация қилаолади. Мана шу технологияни йўлга қўйилиши кенг таъсир спектрига эга бўлган вирусга қарши вакциналар яратилишига олиб келади деган фикрлар мавжуд.

Оксил молекуласида иммуноген бўлмаган участкаларни борлигини тушунтирувчи умумий назария ҳамда «жим турган» аммо «гапиришга» имконияти бор участкаларни иммуногенлигини оширувчи бир қатор тадбирлар ишлаб чиқилган ҳозирги вақтда ҳайвонларни бир қатор юқумли касалликларини (яшур, қутуриш, ичкетиш ва бошқа вирусли касалликлари) олдини олувчиген-мухандислик, вакциналари яратилган. Шунингдек бактериялар чақирадиган инфекцияга қарши препаратлар ҳам ишлаб чиқарилмоқда. Масалан, А+Шда стафилококклар учун захарли бўлган оксил топилган. Маълумки, стафилококклар йирик шохли ҳайвонларда мастиб (сут безларини шишиши) чақирадилар. Лаборатория текширувлар бу оксил бир неча минут орасида таъсир қилиш ҳамда антибиотикларга чидамли бўлиб қолган ҳужайраларни ўлдиришини кўрсатган. Келажакда, кўп валентлик ген-мухандислик вакциналарни яратиш ва ишлаб-чиқиш, кўп маънода шу йўл билан хусусиятлари олдиндан белгиланган оксиллар яратиш муаммоларини ечишдек фундаментал тадқиқотларни натижаси сифатида амалга оширилиши мумкин.

Касал қўзғатувчиларни молекуляр гибридизация усуллари орқали аниқлашда рекомбинант ДНК дан фойдаланиш мумкин. Бу усул юқумли касалликларни тез ва аниқ диагностика қилиш, шу касални ташувчи

ҳайвонларни аниқлаш имкониятини яратади. Бу усул асосида радиактив моддалар ёки биочиплар билан белгиланган (мечоннўй) ДНК зондларини ишлатиш, кейин зондларни касаллик кўзғатувчисини олиб ҳайвон тўқималарини нусхалари билан гибридизация қилиш ётади. Бу усул айниқса бекилган (аниқ бўлмаган) инфекцияларни хламидиозлар, секин инфекциялар ва х.к. аниқлаш учун жуда бебаҳодир. ДНК асосидаги молекуляр зондлардан фойдаланиш хусусиятлари бир-бирларига яқин бўлган юқумли касалликлари кўзғатувчиларини аниқлаш имкониятини яратади.

Тиббиётдаги каби, ветеринария фанида ҳам авлоддан мерос ўтадиган касалликлари давомида ген-терапия усулларида фойдаланиш истиқболлари бор. Қимматбаҳо ҳайвонларни геномини сунъий ўзгартириш албатта амалга оширилмоғи лозим. Бундай технологияни принципиал чизмалари ҳозирги вақтда тиббиётда синаб кўрилмоқда. Маълум миқдордаги соғлом тўқималарни (геномли соғлом) кўчириб ўтказиш ижобий натижаларга олиб келиши муқаррар. Бундай шароитлар ҳозирги вақтда тиббиётда текширилиб, синовлардан ўтказилмоқда. Шунинг билан бир қаторда олимлар ва мутахассислар олдида ҳайвонларда трангенез технологиясини такомиллаштириш, генетик чидамли ҳайвонлар яратиш ва уларни ҳар хил инфекцион касалликларга юқори даражада чидамли бўлган турларини яратишдек улкан вазифалар турибди.

Шундай қилиб, ветеринар тиббиётда биотехнологиядан энг аввало генетик муҳандислик усулларида кенг фойдаланишни кенг имкониятлари ётибди. Бундан бош мқсад чорвачиликни санитария аҳволини яхшилаш, инсон ҳаёти учун хавф туғдирмайдиган чорва маҳсулотлар яратишдир.

Назорат саволлари:

1. Ветеринар биотехнологияни ривожланиш истиқболлари.
2. Янги авлод вакциналари тайёрлашда ишлатиладиган биотехнологик ва бошқа усуллар қандай?
3. Биотехнологик йўл билан ҳайвонларни юқумли касалликлардан сақлаш асослари нималардан иборат?
4. Ҳайвонларни юқумли касалликларга чидамлилиги оширишда ишлатиладиган ген муҳандис усуллари.

Адабиётлар

1. Бабаев А.А. – Биотехнология. М., Наука, 1984.
2. Беккер М.Е. – Введение в биотехнологию. М., Пищевая промышленность, 1978
3. Бич Г., Бест Д., Брайерли К и др. Биотехнология, Принципым приложения. М., Мир, 1988.
4. Варфагомев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология. Кинетическая основы микробиологических процессов М., Вўсшая школа, 1990.
5. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. М., Изд-во МГУ, 1989.
6. Еликов П.П. Основы биотехнологии. С.п.б. Иф. «наука», 1995.
7. Давранов К, Хўжамшукуров Н. Умумий ва техник микробиология. Тошкент изд.-во ТашГАУ, 2004.
8. Контере В.М. Теоритические основы технологии микробиологических производств. М., «Агропромиздат», 1990.
9. Основы биотехнологических процессов. Ч. 1992.
10. Тутов И.К, Ситьков В.И. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов – Ставрополь, 1997.
11. Физические основы испособы микрофльтрации и ее применение в технологии производства ветеринарных иммунобиологических препаратов Ч. IV. «Микрофльтрация» (Воронин Е.С, Тихонов И.В и др) М., МГАВМи Б.им.К.И. скрябина, 2000.
12. Красота В.Ф., Завортяев Б.П. и др. Биотехнология в животноводстве. М., Колос, 1994.
13. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. – Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов. М., Россельхозакадемия, 2000.
14. Сергеев В.А. – Вирусные вакцины. Киев., Урожай, 1993.

МУНДАРИЖА

Кириш	4
Биотехнология фанининг моҳияти ва вазифалари	4
Ўзбекистонда биотехнологиянинг ривожланиш тарихи	12
Ген муҳандислигининг моҳияти ва вазифалари	20
Хужайра ва тўқималар биотехнологияси (ўсимликшунослик асосида) Хужайра биотехнологияси	23
Ажратиб олинган хужайра ва тўқималарини ўстириш техникаси	26
Озуқа муҳити	28
Ўстириш шароити	30
Каллус тўқималар культураси	30
Каллусли хужайраларни ўзига хослиги	34
Каллус хужайралари генетикаси	35
Гормонларга боғлиқ бўлмаган ўсимлик тўқималари	37
Хужайра суспензиялари культураси	40
Ягона хужайралар культураси	42
Каллусли тўқималарда морфогенез	43
Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш	49
Тупроқ микроббиотехнологияси асослари	58
Тупроқ микроббиотехнологияси ва унинг вазифалар	
Тупроқ микроб ценози - биологик тизимдир	59
Тупроқда микроб ценозлари фаолиятини бошқариш, органик ва минерал ўғитлар, алмашлаб экиш	61
Нитрификация жараёнини пасайтирувчи омиллар	62
Тупроқ микроб ценозларини гербицидлар билан ўзаро таъсири	63
Симбиотик азотфиксацияда биотехнологиянинг генетик асослари	64
Азотфиксация тизимининг хилма-хиллиги ва уларнинг асосий хусусиятлари	64
Ўсимликларнинг азотфиксаторлар билан симбиози	66
Дуккакли ўсимликлар ва ризобиял бактериялар симбиози	68
Дастлабки (юқишдан олдинги сигнал) ўзаро муносабатлар	69
Сигналлар синтези ва ажралиши	69
Сигналлар рецепцияси ва процессинги	74
Симбиознинг тузилмавий асоси тараққиёти	75
Туғунаклар морфогенези	75
Генетик таҳлил	78
Ўсимликларнинг цианобактериялар билан симбиоз муносабатлари	92
Азотни ўзлаштирувчи симбиотик биотизимлар эволюцияси ва генетик асослари концепцияси	95
Бактериал ўғитлар ишлаб чиқариш технологияси	101
Энтомопатоген препаратлар ишлаб чиқариш биотехнологияси	111
Чорвачиликда биотехнология	125
Хужайра биотехнологияси	131

