

O'ZBEKISTON RESPUBLIKASI QISHLOQ VA SUV XO'JALIGI VAZIRLIGI

ANDIJON QISHLOQ XO'JALIK INSTITUTI

*«O'simliklar himoyasi va
karantini» kafedrasida*



**5410300 – O'simliklar himoyasi va karantini ta'lim yo'nalishi
talabalari uchun «Qishloq xo'jalik biotexnologiyasi» fanidan**

USLUBIY KO'RSATMA

Андижон-2013

Sizga tavsiya etilayotgan “*Kishlok xujaligi biotexnologiyasi*” fani bo’yicha uslubiy kursatma tasdiqlangan namunaviy dastur asosida yozilgan bo’lib, ushbu fanga doir asosiy tushuncha va ma’lumotlar qisqa bayon etilgan. Tabiiyki, undagi fikrlar fanni to’liq yoritmaydi. SHuning uchun fanni yanada mukammal egallash maqsadida sizga adabiyotlar ro’yxatini ham tavsiya etamiz.

Uslubiy kursatma talabalar, ilmiy xodimlar, o’qituvchilar va aspirantlar uchun mo’ljallangan.

TUZUVCHILAR:

«O’simliklar himoyasi va karantini»

kafedrasi dotsenti

SH.K.Aliyev

«O’simliklar himoyasi va karantini»

kafedrasi assistentlari

G’.G’.Parpiyev

A.A.Pattaev

R.S.Axmatxonov

TAQRIZCHILAR:

«O’simliklar himoyasi va karantini»

kafedrasi dotsenti

Q.X.Xushvaqtov

Uslubiy ko’rsatma «O’simliklar himoyasi va karantini» kafedrasining __ sonli yig’ilishida («__»_____ 200__ yil).

Agronomiya fakulteti uslubiy kengashining __ sonli yig’ilishida («__»_____ 200__ yil).

Institutning uslubiy kengashining____ sonli yig’ilishida («__»_____ 200__ yil) muhokama qilinib chop etishga tavsiya qilingan

KIRISH

Biotexnologiya fanining tez su'ratlar bilan rivojlanib borishi, talabalardan bu fanning bekiyos imkoniyatlarini chukur tushunib yetishni takozo etadi. Bu esa uz navbatida fanda kullaniladigan zamonaviy usullarni puxta egallash bilan uzviy boglikdir.

Ushbu kullanmaning maksadi kup kirrali kishlok xujaligi biotexnologiyasi fanining asosiy kismalaridan bulgan xujayra va gen muxandisliklari xamda usimliklarni usishi va rivojlanishini boshkarish bilan boglik bulgan usullar xakida talabalarga yullanma berishdir.

Albatta, fanni tezkorlik bilan rivojlanishi, yangi, tezkor xmda anik usullari ixtiro kilinishiga olib keladi. SHuning uchun xam ushbu kullanmani kishlok-xujaligi biotexnologiyasi fanining asos usullari deb karamok maksadga muvofik bulur edi.

Ushbu kullanma ilk bor uzbek tilida yozilganligi uchun xam ba'zi-bir kamchiliklardan xoli emas. SHu sababli uni tuzuvchilari - talabalarni, aspirantlarni, ilmiy xodimlar va professor-ukituvchilarni fikr muloxazalarini inobatga olishga tayyor ekanligini bildiradilar.

"^ishlok xujaligi biotexnologiyasidan amaliy laboratoriya mashgulotlari" ukuv amaliy kullanmasi biotexnologiya va unga yakin bulgan boshka soxalarda mutaxassislar tayyorlashda kullanma sifatida tavsia etiladi.

qiskacha lugat va kiskartmalar

2,4-D - 2,4 dixlor fenoksisirka kislota

ISK - indolil sirka kislota

NSK - alfa - naftil sirka kislota

GK - Gibberal kislota

Nekroz - xayotning tuxtaganligi

Steril - mikrobiologiya nukta nazaridan toza xolga keltirish

Plazmida - xromasomadan tashkaridagi DNK

DNK - Dezoksiribonuklein kislota

RNK - Ribonuklein kislota

Xloroplast - kobigsizlangan usimlik xujayrasi

Protoplast - kobigsizlangan mikrob xujayrasi

Endonukleaza - nuklein kislotalarni parchalovchi ferment

EDTA - etilen-diamin-tetrasirka kislota

mkl - mikrolitr

I. XUJAYRA MUXANDISLIGI

1 - Mavzu: Xujayra va tukimalarni sun'iy ozika muxitlarida ustirish texnikasi.

1 - ish. O'simlik xujayra va tukimalarini ustirish uchun ozika muxitini tayyorlash

Kerakli asbob-uskunalar: 1 litrli kimyoviy stakanlar (4 ta), boshlangich eritmalarni saklash uchun ogzi zich yopiladigan shisha idishlar (1 litrli 3 dona, 100 ml li 1 dona), penitsillin idishlari (10 dona), 1 - 10 ml li pipetkalar, texnik va analitik tarozilar, elektroisitgich, turli xil kimyoviy moddalar (4 - 5 jadvallarga karalsin).

Tushuntirish. Usimlikdan ajratilgan xujayra va tukimalar ustiriladigan ozika muxitda usimliklarga kerakli xamma makroelementlar: azot, fosfor, kaliy, kaltsiy, oltingugurt, magniy, temir va mikroelementlar: bor, rux, mis, kobalt, marganets, yod, molibden, shuningdek vitaminlar, uglevodlar, karbon suvlar, fitogormonlar bulishi kerak. Ba'zi bir ozika muxitlari tarkibida esa kazein gidrolizati va ayrim aminokislotalar bulishi kerak. Bundan tashkari, ozika muxiti tarkibiga, xujayralarning temirga bulgan extiyojini turli rN kursatgichlarda kondirish uchun EDTA (etilendiamin-tetrasirka kislotasi) yoki uning natriyli tuzi kiritilishi kerak. Ajratilgan xujayra va tukimalar ustiriladigan ozika muxitning asosiy tarkibiy kismini uglevodlar tashkil kiladi, chunki xujayra va tukimalar avtotrof oziklanish kobilyatiga ega emas. Kupigcha uglevod manbai sifatida saxaroza yoki glyukozaning 20-40 g/l eritmasi kullaniladi. Uglevodli ozika manbai sifatida polisaxaridlar ishlatilmaydi, chunki ba'zi tukimalar, asosan usmalar faol gidrolitik fermentlarga (amilaza va boshkalar) ega bulib, kraxmal eritmasi bor ozika muxitlarida usishi mumkin. Usish regulyatorlari xujayralar dedeffrentsirovkasi va xujayra tukimalari induktsiyasi uchun zarurdir. SHuning uchun kallusli tukimalar olishda ozika muxitlari tarkibiga auksin (xujayra dedifferentsirovkasini yuzaga keltiruvchilar) va tsitokinin (dedifferentsiyalangan xujayralarning bulinishini induktsiyalovchi) kiritish kerak. Poya morfogenizi induktsiyasida ozika muxiti tarkibida auksinning mikdori kamrok bulishi yoki umuman bulmasligi mumkin. Ikkala gormonlarga yoki ularning bittasiga nisbatan avtonomlik shu xujayralarning gormon ishlab chikarish kobilyatiga boglik. Auksin manbai sifatida ozika muxitlarda 2,4 dixlor fenoksisirka kislotasi (2,4-D) 110 mg/ml; indolil sirka kislotasi (ISK) 1-30 mg/l; a- naftil sirka kislotasi (NSK) - 0,1-2 mg/l kabilar ishlatiladi. Kupincha 2,4-D ishlatiladi. ISK 2,4 -D ga nisbatan 30 marta kam faollikka egadir. Kallusning rivojlanishi uchun kupincha auksinning yukori mikdori ishlatitadi, tukima keyingi kayta ekilganda auksinning mikdori bir necha marta kam bulganda xam tukima usishi davom etaveradi. Sun'iy ozika muxitlarida tsitokinin manbai sifatida kinetin, 6-benzilaminopurin (6-BAP) va zeatin (0,001-10 mg/l) kullaniladi. Tukimalarning usishida va organogenez induktsiyasida 6-BAP kinetinga nisbatan yukori faollikni namoyon kiladi. Ba'zi ozika muxitlari tarkibiga adenin kiradi.

Auksin va tsitokininlardan tashkari ba'zi ozika muxitlari tarkibiga gibberal kislotasi (GK) kushiladi. Ozika muxitida GKning bulishi shart bulmasa xam, ba'zi xollarda u izolyatsiyalangan tukimalarning usishini tezlashtiradi. Birlamchi kallus induktsiyasini va uning usish faoliyatini tezlashtirish uchun ozika muxitiga usimlik

ekstraktlari yoki sharbatlari kushiladi. Kokos suti - kokos yongogi suyuk endospermi usish tezligini oshirish xususiyatiga ega. Kattik ozika muxitni tayyorlashda dengiz suv utlaridan olinadigan polisaxarid, agar-agardan foydalaniladi. "Bacto agar" nomli bakterial agarda keraksiz kushimchalarning mikdori kamroq buladi. Bunday agarlarni kattik ozika muxit tayyorlashda tozalamasdan ishlatish mumkin. Odatda kattik ozika muxiti tayyorlashda 5-7% agardan foydalaniladi. Vaktdan unumli foydalanish uchun makro-, mikrotuzlar va vitaminlarning eritmaları yukori mikdorda boshlangich eritma xolda tayyorlanib, ularni kup marta suyultirib ishlatish mumkin. Kontsentrlangan eritmalar muzlatgichda saklanadi, vitaminli eritmalar minusli xaroratda saklanadi. Makrotuzlar eritmaları 10-20 marta kup mikdorda, mikrotuzlar eritmaları 100-1000 marta kup mikdorda, vitaminlar eritmaları esa 1000 marta kup darajali mikdorda tayyorlanadi. Xar-xil turlarga mansub usimliklar xujayralari, tukimalari va organlarini ustirishda turli tarkibdagi ozika muxitlaridan foydalaniladi. Kupincha Murasige-Skuga (1-jadval), Uayt (2-jadval), Gamborga (V-5) (3-jadval) ozika muxitlari ishlatiladi. Murasige-Skuga ozika muxitlaridan turli modifikatsiyalar bilan apikal meristemalar ustirishda va usimliklarni mikrokupaytirishda foydalanish mumkin.

Ishning borishi. Kartoshka va kulupnayning apikal meristemalarini ustirish uchun moslashtirilgan (modifikatsiyalangan) Murasige-Skuga ozika muxitlarini tayyorlash. Ozika muxitlari tarkibi 4-5 jadvallarga berilgan. Avvalo makro-, mikrotuzlar va vitaminlarning boshlangich eritmalarini tayyorlash kerak. Odatda, Murasige va Skuga ozika muxitlari kuyidagi birikmalardan tayyorlanadi.

1. NH_4NO_3 , KNO_3 , KN_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (MgSO_4 ni chukmaga tushishini oldini olish uchun, kizdirmasdan oxirida solinadi);
2. CaCl_2 eritmasi;
3. Temir xelati eritmasi (FeSO_4 va Na_2EDTA eritmasi birgalikda kaynagunga kadar kizdirilganda temir xelati xosil buladi);
4. Mikro elementlar eritmasi.

Boshlangich eritmalar uchun kerakli tuzlar mikdori va boshlangich eritmalarining ozika muxit uchun kerakli mikdorlari 1-jadvalda keltirilgan.

Murasige-Skuga buyicha boshlangich eritmalar tayyorlash

1-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismi		Kushimchalar
Makrotuzlar uchun boshlangich eritma	g/l	1 l ozika muxit uchun 50 ml boshlangich eritma olinadi.
NH_4NO_3	33	
KNO_3	33	
CaCl_2 (suvsiz)	8,8	
$\text{ek}_2\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13,8	
KN_2PO_4	3.6	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ yoki suvsiz	7.4	
Mikrotuzlar 100 ml boshlangich eritma uchun		1 l ozika muxit uchun 1 ml boshlangich eritma olinadi.
H_3BO_3	620	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230	
ZnSO_4	860	

KI	83	
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	25	
Cu SO ₄ 5H ₂ O	25	
CoCl ₂ 6H ₂ O	25	
100 ml boshlangich eritma uchun	mg	1 litr ozuka muxit uchun 5 ml boshlangich eritma olinadi.
Fe xelat	557	
EDTA	745	

Tayyorlangan eritmalarini ogzi zich yopiladigan idishlarga solib, kogoz yorlik yopishtirib, muzlatgichda saklash lozim. Temir xelati tuk rangli shisha idishda saklanadi. Vitaminlarning uta tuyingan eritmaları aolxida-aloxida tayyorlanadi va pentsillin idishlarida saklanadi. Eritmalar tayyorlash uchun vitaminlar un martalik ogirlikda ulchanib 10 ml suvda eritiladi. SHu eritmaning 1 ml mikdori 1 litr Murasige-Skuga eritmasini tayyorlash uchun yetarlidir. Endi boshlangich eritmalaridan foydalangan xolda keyingi darslarda kartoshka va kulupnay apikal meristemalarini ustirish uchun ozika muxitlari tayyorlash kerak. Ulchami 1 litrli kimyoviy stakanga saxaroza solib idishning yarmigacha distillangan suv kuyib isitiladi, saxaroza erigandan sung, xona xaroratigacha sovutiladi va unga makro-, mikrotuzlarning boshlangich eritmaları va vitaminlar kerakli mikdorda solinadi (1 jadval). Kartoshka apikal meristemasini ustirish uchun ozika muxitga aktivlangan kumir (4-jadval) va regulyatorlar: GK, kinetin, adenin solinadi. Gibberal kislotasi bir necha tomchi spirtga eritilib, ozgina suv kushiladi va ozika muxitga solinadi. TSitokininlar suvda yaxshi erimaydi, balki ishkori, kislota, etil spirti va etil efiri eritmalarida yaxshi eriydi. TSitokinin eritmaları tayyorlash uchun gormonlarga ozgina (3-5 ml) distillangan suv, 0,51 ml 0,1 N KOH kushib aralashtiriladi va eriguncha isitilib, sungra ozika muxitga solinadi. Sung albatta eritmaning rN i ulchanadi, rN kursatgichi 5,5-5,6 atrofida bulishi kerak. Eritma rN normaga tugri kelmagan xollarda ozika muxitga 0,1 M HCl eritmasidan kushiladi. Bir vaktning uzida boshka stakanga agar-agar eritiladi. Buning uchun suvda ivitilgan agar (7 g) elektroisitgichda tulik erigunga kadam kizdiriladi va xarorat 50° S ga tushguncha saklab turiladi. Sung agarni tuzlar, vitaminlar va saxaroza bilan birga idishga solib, eritmaning xajmini suv bilan 1 litrga yetkazish kerak. Ozika muxitini probirkalarga solib (taxminan 1/3 xajmda), probirkalar ogzi paxta tikinlar bilan yopiladi. Ozika muxitlari avtoklavda sterillanishi kerak.

2 - ish. Ajratilgan usimlik xujayralari va tukimlari tuplamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari.

Asbob-uskunalar va materiallar: 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta), distillangan suv uchun bir litrli kolba. Petri likobchalari, buyum oynalar, skalpel, pintsept, igna, doka xaltachalar (2 ta), sterilizator, natriy bikarbonatning 1% li eritmasi, Murasige-Skuga ozika muxitli probirkalar, avtoklav, kuritish shkafi, sovuk sterillash uchun 0,15-0,45 mkm teshikli filtrlar.

Tushuntirish. Ajratilgan organlar, tukimalar, xujayra va protoplastlarni ustirishning muxim shartlaridan asosiysi sterillikka katta ahamiyat berishdir. Sterillikni ahamiyati shundan iboratki, ajratilgan organlar, tukimalar, xujayralar va protoplastlarni ustirish uchun tayyorlangan sun'iy ozika muxitlarda mikroorganizmlar xam juda yaxshi usadi. Mikroorganizmlarning rivojlanishi ustirilayotgan xujayra va tukimalar uchun ikki yoklama xavf tugdiradi. Birinchidan, mikroorganizmlarning yashash faoliyati davrida ozika muxitlarning tarkibi sezilarli darajada uzgarib, belgilangan turgun sharoitda xujayraning usishi tuxtaydi. Ikkinchidan, usimlikdan ajratilgan tukima, xujayra va ayniksa protoplastlarni mikroorganizmlar osongina zararlaydi. SHuning uchun ajratilgan organ, tukima xujayra va protoplastlar bilan olib boriladigan tajribalar steril xonalar, bokslar yoki laminar-bokslarda olib boriladi. Bokslar, asboblar, idishlar, usimliklar, ozika muxitlari, paxta tikinlar va boshka ishga kerakli narsalar xammasi sterillanadi.

Laminar-boks sterilizatsiyasi. Laminarning ish olib boriladigan ichki yuzasi 70% li spirt bilan artiladi. Sung laminarga spirtovka, gugurt, 96% spirtli stakan, sterillangan idishlar, asboblar va sterillangan suvli kolba joylanadi. Meristemalar ajratishda laminarga binokulyar lupa xam kuyiladi. Ishlashdan oldin 2 soat davomida laminar boks bakteriotsid ultrabinafsha lampasi bilan nurlantiriladi. Ishlashdan ikki soat oldin laminarning ichki yuzasi 70% li spirt bilan yana artiladi.

Ish boshlashdan avval kullarni yaxshilab sovun bilan yuvib, spirt bilan artib, sterillangan xalat kiyib va ogziga steril nikob tutiladi.

Idishlarni sterillash. Idishlar kuritish shkaflarida kuruk issikda yoki nam bugda avtoklavda sterillanadi. Sterillashdan oldin idishlarni yaxshilab yuvib, kuritish kerak. Idish yuvish uchun turli idish yuvish vositalari va xromli (kaliy bixromatning sulfat kislota eritmasi) ishlatiladi. YUvilgan idishlarni distirlangan suvda chayib, kuritish shkafida kuritiladi. Sterillashdan avval xavodan infektsiya tushishining oldini olish uchun probirkalar, kolbalar ogzi paxta tikinlar bilan yopiladi va kogozga uraladi. Sungra idishlarni kuritish shkaflariga joylab 2 soat 160⁰ S da kizdiriladi. Bunday kizdirishda bakteriyalargina emas, balki ularning sporolari xam uladi. Kuritish shkafidagi xaroratni 175⁰ S dan oshirish mumkin emas, chunki paxta tikinlar sargayib ketadi, idishlar uralgan kogoz esa sinuvchan xolga kelib koladi. Avtoklavda bosim ostida bundan xam yaxshirok sterillashga erishish mumkin, chunki namli issiklikda kizdirilganda mikroorganizmlar va ularning sporolari yana xam yaxshi uladi. Turli xil stakanlar, Petri likobchalari, pipetkalar, distillangan suvli kolbalar avtoklav kilinadi. Idishlar folga yoki urash kogozlariga uralgan xolda 25-30 dakika 2 atmosferada avtolav kilinadi. Pipetkalarni avtoklav kilishda ularning yukori kismiga paxta tikib, aloxida-aloxida kilib uraladi.

Asbob uskunalarni sterillash. Asbob uskunalari, skalpel pintset, ignalar va xakozalar kuritish shkafida 12 soat davomida 140⁰S kuruk issiklikda yoki suvda kaynatib sterillanadi. Temirdan yasalgan asboblar avtoklav kilinmaydi, chunki nam bug ta'sirida ular zanglaydi va utmas bulib koladi. Ish boshlashdan avval va ish davomida asboblar chinni stakanlarga solinib, 96% li etil spirtida sterillanadi va spirtovka alangasida kizdirib olinadi. Spirtovka alangasida lantsetlar, pintsetlar va mikrobiologik ilmoklar kizdiriladi va steril kogozlar orasida saklanadi. Sterillangan asboblar fakt bir marta ishlatiladi, kayta ishlatilganda ular yana spirtida sterillanadi va alangada kizdiriladi. Igna va pakkilar spirtga solib sterillanadi.

Materillarni sterillash. Tajribada ishlatiladigan paxta, doka, paxta tikinlar filtr kogozlar, xalatlar va rumollar vatoklavda 2 atmosferada 25-30 dakika sterillanadi.

Usimlik materillarini sterillash. Uruglar, yukori meristemalar, usimlikning turli kismalaridan olingan tukima bulaklarini sterillash uchun turli sterillovchi eritmalaridan: sulemaning 0,1% li eritmasi, 1% li brom eritmasi, 13% li pergidrol, 3-6% li xloramin, diotsid, 10% li natriy gipoxloridning suvdagi eritmalaridan foydalaniladi. Ildiz mevalar, tuganaklar, usimliklarning yugon poyalari sovun va ishkalagich bilan okar suvda yaxshilab yuviladi, pustlogi shilinadi, (ildizlar va ildiz mevalar), distillangan suvda chayiladi va absolyut spirtga bir necha sekundga solib olinadi. Usimlik ob'ektlari sterillangandan sung, sterillovchi moddalardan tozalash uchun distillangan suvda kup marta chayilishi kerak. Ayniksa bromidli suv bilan ishlov berilgan usimlik materillarini diqqat bilan yuvish kerak chunki bromidning eng kam mikdori xam uruglarning usishini tuxtatib kuyadi. Brom bugi zaxarli bulganligi uchun, brom bilan sterillashda albatta tyaga shkaflaridan foydalanish kerak. Brom eritmasida fakat makka uruglarini sterillashda foydalanish tavsiya etiladi, loviya, kovok va boshkalar uchun - sulema ishlatiladi. Brom va sulema bilan sterillash vakti 10-15 dakikani, pergidrol bilan 30 dakikani tashkil kiladi. Meristemalar va usimliklarning xar xil kismalaridan olingan bulaklari ikki marta tezrok sterillanadi. Tukli uruglar (chigit) yukori kontsentratsiyali sulfat kislotasiga 5 dakika solinsa yaxshi sterillanadi. Pergidroldan uruglar osonrok yuviladi (steril suv 5-7 marta uzgartiriladi). Sulemadan sung suv 5-6 marta uzgartiriladi. Bromdan sung suv 12 soat davomida, yuvishning boshida xar 30 dakikada, sungra esa xar 3 soat davomida almashtirilib turiladi. Antiseptiklar bilan ishlov bermasdan, pomidor, olma, kovok, tamaki va dukkaklilardan steril uruglar olish mumkin. yetilish davrida bu usimlik uruglari gushtli, yogochli yoki danakli katlamlar orasida joylashgan buladi. Sog va zararlanmagan bu mevalar sovunli suvda va spirtga bir necha marta yuviladi. Sung aseptik sharoitda bulaklarga bulinadi, steril skalpel bilan uning ichidan uruglar olinadi va steril filtr kogozi solingan Petri likobchalariga solinadi.

Ozika muxitlarini sterillash. Ozika muxitlari bosim ostida (avtoklavda) bug bilan sterillanadi. Ozika muxitlari solingan probirkalar ogzi paxta tikinlar bilan yopilib stakanlarga solinib, urash kogoziga uraladi va 1 atmosfera bosimda 120° S da 20 dakika davomida avtoklav kilinadi.

Sovuk sterillash. Issiklikka chidamsiz organik suyukliklar, bakteriyalardan mayda teshikli (diametri 0,15-0,45 mkm teshikli) bakterial filtrlardan utkazish orkali tozalanadi.

Ishning borishi. Kartoshka va kulupnay apikal meristemalarini ajratish va ustirish uchun kerakli bulgan asboblar, idishlar, ozika muxitlari sterillanib olingan bulishi shart.

1. Petri likobchalari (2 ta), 500-700 ml li kimyoviy stakanlar (2 ta) va buyum oynachalar pishik kogozga uralgan xolda 160° S da 2 soat davomida kuritish shkaflarida sterillanadi.

2. Skalpel, ajratish ninalari, pintsetlar kuritish shkafida 140° S da 1 soat davomida sterillanadi va tayyorlangan asboblar laminardagi kogoz varaklari orasiga joylanadi.

3. Ogzi paxta tikinlar bilan yopilgan probirkalardagi ozika muxitlari 1 atmosfera bosimda 20 dakika davomida sterillanadi. Ozika muxitli probirkalar 10-20 tadan

stakanga solingan bulishi kerak. Bir vaktning uzida usimlik materiallari uchun doka xaltachalarni kogozga urab avtoklav kilinadi.

3 - ish. Steril usimtalar ustirish.

Material va asbob uskunalari. Soya, loviya, nuxat uruglari, steril Petri likobchalari, steril suvli probirkalar, steril pintset, doka kopchalar, 0.1% li sulema eritmasi, 96% li etil spirti, 2 ta steril kimyoviy stakan, steril suvli kolba va 2-4-D steril eritmasi (10 mg/l).

Tushuntirish. Steril usimtalar eksplantlar olish maksadida kallus yoki shish kulturalariga utkazish uchun ustiriladi. Kuyiladigan tajribaning maksadiga karab uruglar suvga yoki agarli ozika muxitiga ekiladi.

Steril usimtalardan foydalanishning ikki yuli mavjud:

- 1) Differentsial tukimalarni fitogormonlar tutuvchi ozika muxitlariga utkazib differentsialanuvchi va intensiv poliferatsiya natijasida kallusli tukimalar xosil kiluvchi eksplantlar olish:
- 2) Keyinchalik madaniylashtirish maksadida usimtalardan birlamchi kallus olish uchun ularni fitogormon tutuvchi ozika muxitiga steril sharoitda utkazish.

Usimtalarda kallusning paydo bulishi uchun fitogormonlar bulishi shartdir, shuning uchun ularni auksin va tsitokinin tutuvchi ozika muxitlarida ustirish lozim. Murtagida ozika moddalar zaxirasi kup bulgan uruglarni (nuxat, loviya va soya) auksinning suvli eritmasida xam ustirish mumkin. Kurtaklar 2,4-D eritmasida ustirilganda kallusning xosil bulish jarayoni tezlashadi.

Ishning borishi. Nuxat, loviya va soya usimliklaridan 20 ta xar xil soglom uruglar saralab olinadi. Ular oldin sovunli eritmada, sungra vodoprovod suvida va distillangan suvda yaxshilab yuviladi. YUvilgan uruglarni doka kopchalarga joylab 25 dakika 96% li spitrga solinadi, suvda yaxshilab yuvib 0,1% li sulema eritmasida 10 dakika sterillanadi va oxirida besh marta yaxshilab steril suvda chayiladi. Tajribalar laminar - boksda olib boriladi. Steril pintset bilan tagiga filtr kogoz solingan Petri likobchalariga 10 tadan urug solinadi va 10 ml steril suv kuyiladi. Nuxat, loviya va soya uruglari ustirishga tayyorlangan probirkadagi suv paxta tikinlar bilan yopilgan bulib, 20 dakika 2 atmosfera bosimda avtoklavda sterillangan bulishi kerak. Uruglar solingan Petri likobchalari 25⁰ S xaroratdagi termostatga kuyiladi. Ikki kundan sung (uruglar ungandan sung) Petri likobchalarning biridagi suv 2.4-D ning steril eritmasiga (10 mg/l) almashtirib kuyiladi. Bir xaftadan sung natijalar kuriladi va chizib olinadi (suvda va 2,4-D eritmasidagi usimtalar). 2,4-D eritmasidagi usimtaning kaerida kallus xosil bulganligi belgilanadi.

2 - mavzu. O'simliklarning klonli mikrokupayishi va sog'lomlashtirilgan virussiz ekish materiallari olish

4 - ish. Kartoshkaning apikal meristemasini ajratish va ustirish.

Material va asbob uskunalar. Kartoshka tuganagi, binokulyar lupa, skalpellar, ajratish ninalari, pakki, ushlagichli kiskichlar, steril ozika muxitli probirkalar (4-jadvalga karalsin).

Tushuntirish. Izolyatsiyalangan apikal meristemalar kulturasi, usimliklarni mikroklonal kupaytirish uchun ekiladigan virussiz materiallar olishda foydalaniladi. Virussiz material olish usuli kasal usimlikning usish nuqtasiga yunalishi bilan viruslarning mikdori kamayishiga asoslangan.

Odatda apikal meristema viruslardan umuman xolidir. Xususan viruslardan xoli apikal meristema faol bulinuvchan, uzunligi 0,1 mm, eni 0,25 mm bulgan konus shaklidagi xujayralardan iboratdir. Asosan meristemani jaroxatlarsiz bulaklarga ajratish kiyin bulganligi sababli, uni 1-2 barg primordiyalar (ulchami 100-250 mkm apekslar) bilan ajratib olinadi. Kartoshkaning faol soglomlanishini oshirish uchun yukori meristemalar usuli termoterapeya va kimyoterapeya bilan birgalikda olib borish ozika muxitlariga viruslarni ingibirlovchi moddalar kushilishiga asoslangan. Apikal meristemalardan ozika muxitda apikal kartoshkaning virussiz usimliklari olinadi, ular kupaytirilib, issikxonalarga kayta ekiladi va virussiz tuganaklar olinadi. Soglomlashtirilgan materialni tez kupaytirish uchun in vitro olingan tuganaklardan xam foydalanish mumkin.

Ishning borishi. Kartoshka tuganaklari 4-8⁰ S da saklanadi, sung korongulikda 2022⁰ S da ustiriladi. Meristemalarni bulaklarga ajratish ishlari bakteriotsid lampalar bilan sterillangan laminar bokslarda amalga oshiriladi. Ish boshlashdan avval ish joylari, stol, binokulyar lupalar va probirkali shtativlar spirt bilan aritib chikiladi. Bulaklarga ajratish uchun ishlatiladigan asboblar (pintsetlar, skalpel va ignalar) xar bir ajratishdan sung sterillanadi, buning uchun asboblar spirtga solinib, spirtovka alangasiga tutiladi. Nixollar meristemalarga ajratishdan oldin 3-5 dakika davomida 0,1% li diotsid eritmasida sterillanadi. Buning uchun nixollar kimyoviy stakanga solinib ustidan diotsid eritmasi kuyiladi. Keyin uch marta steril suvda chayiladi. SHuningdek 1-6% li kaltsiy yoki natriy gipoxlorid eritmasida yoki 0,1% li sulema eritmasida xam sterillash mumkin. Sterillangan nixollar Petri likobchasiga joylanadi va kurib kolmasligi uchun bir necha tomchi sterillangan suv solinadi. Nixolni bulaklarga ajratishdan oldin, bargni yukori va yon meristemalarni asta- sekinlik bilan yalangochlagan xolda uning uchidan yopkich barglar olib tashlanadi. Bu ishni binokulyar mikroskop ostida ajratish ignasi yordamida bajarish mumkin. 100-250 mk kattalikdagi boshlangich bargsiz meristema ushlagichga kistirilgan oddiy ingichka nina bilan bulaklarga ajratiladi. X,ar bir bargni yulishda aloxida sterillangan asbobdan foydalanish kerak.

Ajratilgan meristema ninaning uchida probirkadagi ozika muxit yuzasiga joylashtiriladi. Probirka ogzi va paxta tikin spirtovka alangasida sterillanib yopiladi va shtativga joylanadi. SHtativ probirkalar bilan tulgandan sung ozika muxit kurib kolmasligi uchun tselofan kalpokcha bilan yopib kuyiladi. Ozika muxiti sifatida avvaldan 1 mashgulot uchun tayyorlanib, avtoklavda 20 dakika 1 atm. bosimda sterillangan Murasige-Skuga ozika muxiti ishlatiladi. Oradan 2,3,4 xafta utgandan

sung meristemadan nixollarning rivojlanishi kuzatiladi va shu jarayon boskichlari chizib olinadi.

Material va asbob uskunalar. Kartoshkaning probirkadagi usimligi, modifikatsiyalangan va sterillangan Murasige-Skuga ozika muxitli probirkalar, steril skalpel, pintsetlar va Petri likobchalari.

Tushuntirish. Apikal meristemalardan olingan virussiz kartoshka usimliklari sun'iy ozika muxitlarida kupaytirilishi kerak. Kartoshkani kupaytirishning keng tarkalgan usuli bu probirkadagi kulturada usimlikning kalamchalanishidir. Buning uchun usimlik probirkadan olinadi, xar birida bargli poya va kultik kurtak bulgan bulaklarga bulinadi. Xar bir kalamcha Murasige-Skuga ozika muxiti solingan probirkalarga utkaziladi. Kalamcha yordamida kupaytirish novdaning usish nuktasini olib tashlash yuli bilan apikal ustunlikni kamaytirib, yon meristemalarning faollanishiga asoslangan. Kalamchani yon kurtagini ozika muxitiga utkazilganda undan novda usib chikadi. Keyingi kalamchalash xar 14-21 kundan sung olib boriladi. Bitta usimlikdan 5-8 kalamcha olinadi. 3 oy mobaynida kalamchalash yuli bilan 3-5 ming usimlik, 7 oy ichida esa kupayish koeffitsientini 1:30-40 mingga yetkazish mumkin. Sungra, soglomlashtirib ekiladigan materiallarni kupaytirishning keyingi boskichi, ya'ni issikxonalarda olib boriladigan boskichiga utiladi. Bunda probirkadagi usimliklar agarli ozika muxiti bilan birgalikda tuprokli tuvaklarga ekiladi. Usimliklar 3-7 kuni Knop eritmasi va Murasige-Skuga buyicha mikroelementlar bilan: 5 ml boshlangich eritmaning 1 x 100 kontsentratsiyali 1 ml suvdagi eritmasi bilan oziklantiriladi. 7-100 kundan sung usimliklar virussiz tuganaklar olish uchun, issikxonalarga doimiy joyiga utkaziladi va olingan xosil keyinchalik dalaga ekiladi.

Ishning borishi. Laminarda probirkadan kartoshka usimligi Petri likobchasiga olinadi, xar birida bargi va kultik kurtagi bulgan poya bulaklariga bulinadi. Barg tagidagi poya kismi barg ustidagi poya kismidan 2-3 marta kichik bulishi kerak. Ish davomida sterillikka katta axamiyat berilishi lozim. Kalamchalarni modifikatsiyalangan Murasige-Skuga ozika muxiti probirkalarga olib ekiladi. Bunda, mikroorganizmlar tushishining oldini olish uchun probirka ogzi va paxta tikinlar spirtovka alangasida sterillanadi. Kalamchali probirkalar rasmi chizib olinadi va yoruglik kamerasiga kuyiladi. Novdaning rivojlanishi 7-14 kundan sung kuzatiladi va usimlikning rivojlanishi boskichlari chizib boriladi.

5 - ish. Kulupnayning apikal meristemalarini ajratish va ustirish.

Kulupnayning mikroklonal kupayishi.

Material va asbob uskunalar. Kulupnay stolonlari, steril ozika muxitli probirkalar (5-jadval), steril Petri likobchasi, skalpel, igna, spirtovka, gugurt, 96% li etil spirti, sulemaning (0,1% li) suvdagi eritmasi, doka xaltachalar, 1 litr steril suvli kolba va 2 ta steril kimyoviy stakan.

Tushuntirish. Kulupnay apikal meristemalari tarkibida kinetin (0,5-1 mg/l) mikdori yukori bulgan ozika muxitida ustirilganida, shu gormon ta'sirida yukori meristemaning apikal dominatligi pasaytirilib, yon meristemalarning faollashuvi yuzaga keladi. Natijada, meristemal kupol va 1-2 ta barg primoydiylaridan iborat izolyatsiyalangan, yukori kismini ozika muxitiga joylashtirilganidan taxminan ikki xaftadan sung ochilayotgan barg asoslari okarib kattalasha boshlaydi va tez orada

ularning kultigidan rivojlanib kelayotgan kurtaklardan barglar kurina boshlaydi. Eksplantlar 1-2 oydan sung turli xil va turli kattalikdagi barglari rivojlangan konglomeratlarga aylanadi. Xosil bulgan kurtaklar bir-biridan oson ajraladi, yangi ozika muxitiga utkazilganida yangi kultik kurtaklarni yuzaga kelishi davom etadi va shu bilan birga ildiz xosil kilmasdan usish nuqtalari sonining kupayishiga olib keladi. Kurtaklar ildiz xosil kilishi uchun auksin tutuvchi ozika muxitiga utkazilishi kerak.

Ishning borishi. Kulupnay stolonlari sovunli suvda yuviladi sung vodoprovod va distillangan suvda chayiladi. Kulupnay stolonlari barglari asosida joylashgan kultik kurtaklari skalpel bilan ajratiladi. Bu ishni laminardan tashkarida bajarish mumkin. Kolgan ishlarning xammasi laminarda olib boriladi. Kurtaklar doka xaltachalarga solinib, 0,1% li sulema eritmasida 6-10 dakika sterillanadi. Sung xaltachalarni ipi orkali tortib olib 5-6 marta steril distillangan suvda yuviladi. Buning uchun 6 ta steril suvli stakanlar bulishi shart emas, chunki ular laminarda kup joy egallaydi. Buning uchun ikkita stakan bulishi yetarli, kurtaklar solingan xaltachalar stakandagi suvga tushiriladi va bir necha dakika davomida chayiladi, sung suv ikkinchi stakanga tukiladi va kolbadan steril suv solinib xaltachalar bir necha marta chayiladi. Sterillangan kurtaklarni xaltachalardan Petri likobchalariga olib, meristemalar ajratiladi. Buning uchun buyum oynasiga kuyiladi va 9 marta kattalashtiruvchi mikroskop ostida kuriladi. Kurtakni koplovchi kupgina barg burtiklaridan ajratish ninasi bilan ushlab turib, skalpel bilan tozalanadi va 1-2 barg primodiylaridan iborat meristemal kupol ajratib olinadi. Sungra u skalpel bilan probirkadagi ozika muxitiga utkaziladi (5-jadval). Probirka ogzi va paxta tikin spirtovka alangasida sterillab yopiladi. Probirkalar tselofan bilan yopilib 25⁰ S xaroratdagi klimatik yoruglik kamerasiga kuyiladi. Turt xaftadan keyin xosil bulgan konglomerat kuzatiladi va rasmi chizilib olinadi. Xosil bulgan kurtaklar soni aniklanadi. Ulardan kulupnayni mikroklonal kupayishida ildiz xosil bulish induktsiyasi ishida foydalaniladi.

6 - ish. Kulupnayning mikroklonal kupaytirishda ildiz xosil bulish induktsiyasi.

Material va asbob uskunalar. Kulupnay kurtaklari konglomerati bulgan ozika muxitli probirka, steril ozika muxitli probirka, steril pentsit, skalpel, Petri likobchasi, spirtovka, , 96% li etil spirti, gugurt, steril suvli stakan.

Tushuntirish. Kulupnay apikal meristemalarini tsitokinin (6-BAP) saklovchi ozika muxitlarida ustirilganida, kultik meristemalarining faollashuvi natijasida 1 ta yukori meristemadan kupgina poya kurtaklari xosil buladi, usish nuqtasi chuziladi va yangi barglar xosil buladi. Ammo bu ozika muxitida kurtaklardan ildizlar xosil bulmaydi. Kulupnayning mikroklonal kupayishi uchun kurtaklar tarkibida auksin bulgan ozika muxitiga utkazilishi kerak.

Ishning borishi. Tajriba uchun kulupnay apikal meristemasi 3-4 xaftalik kulturasi olinadi. Steril sharoitda laminar yoki boksda probirka tikinlari olinib, spirtovka alangasiga tutiladi va steril pintset yordamida kulupnay kurtaklari konglomeratlari olinadi. Konglomerat asosi ortikcha agarli ozika muxitidan tozalanadi, steril suvda yuviladi va steril Petri likobchasiga solinadi. Konglomerat skalpel yordamida aloxida-aloxida kurtaklarga bulinib, ildiz xosil kilish uchun tayyorlangan ozika muxitli probirkalarga ekiladi. Probirkalar ogzi va paxta tikinlar spirtovka alangasida sterillanib yopiladi va tselofanga urab xarorati 20⁰ S, namligi

60% va yoritilishi 10000 lyuks bulgan yoruglik kamerasiga joylanadi. Bir xaftadan sung natijalar kuriladi va chizib olinadi. Ildiz xosil bulishining boshlangich davri belgilanadi. Keyingi kuzatishlar kurtaklarni ildiz xosil kilish uchun kayta ekilgandan 1 oydan sung olib boriladi. Bu vaktga kelib usimliklarni nosteril sharoitda ekish mumkin buladi. Bunday usimliklar odatda, torf va kum (3:1) solingan kuti yoki tuvaklarga ekilib, polietilen plyonkali klpok ostiga kuyiladi.

3 - mavzu. Kallusli tukima kulturasi 7 - ish. Tamakining uzak parenximasidan

kallusli tukima olish va ustirish.

Material va asbob uskunalar. Gullash davridagi yetuk tamaki usimligi, distillangan suvli kimyoviy stakan, paxta, 96% li etil spirti, 0,1% li sulema yoki diotsid eritmasi, steril suvli 4 ta stakan, steril doka xaltachalar, steril skalpel, Petri likobchasi, Murasige va Skuge steril ozika muxitli kolbalar.

Tushuntirish. Kallus bu dedifferentsiyalangan xujayralardan iborat shakllanmagan massa. Kallusning xosil bulishi va usishi auksin xamda tsitokinin guruxlariga mansub bulgan fitogormonlar tomonidan nazorat kilinadi. Ixtisoslashgan tukimaning differentsiatsiyalangan xujayralari auktsin ta'sirida dedifferentsirov- kani yengadi, tsitokininlar ta'sirida esa faol bulinishga utib, kallusli tukima xosil kiladi. Ikki pallali usimliklar kalluslari, fitogormon tutuvchi turli sun'iy ozika muxitlarida turli organlar eksplantlarida: aseptik usuvchi uruglarda, poya va ildiz bulaklarida, izolyatsiyalangan parenxima bulaklarida, tuganak tukimalarda, izolyatsiyalangan poya murtagida, bargda oson xosil buladi. Tamaki poyasi uzagidan kallusli tukima olish uslubi Skuga va Butenko laboratoriyalarida ishlab chikilgan.

Ishning borishi. Tamakining gullash vaktida poyasining yaxshi rivojlangan, yogochlanmagan uzagidan (2-3 bugin oraligidan) bir kismi kesib olinadi. Ular 5 sm uzunlikdagi bulaklarga bulinib, avval sovunli suvda sung vodoprovod va distillangan suvda yuviladi. YUvilgan bulaklar distillangan suvli stakanga solinib, suvning yuziga suzib chikmasligi uchun ustiga paxta yopiladi (poyaning yuvilgan kismi doimo vertikal xolatda turishi kerak). Sungra ular ozika muxitga utkazish uchun laminarga olinadi. Sterillash uchun tamaki poyalari 96% li etanol bilan aritiladi, doka xaltachalarda 0,1% li sulemaning suvli eritmasiga 10-15 dakikaga yoki diotsid eritmasiga 25 dakika solinadi. Sung 5 marta 5 dakikadan distillangan suvda yuviladi. Poyaning urta kismidan uzak tukimasi olinib steril Petri likobchasiga solinadi. Steril skalpel bilan atrofdagi tukimalar olib tashlanadi. Tozalangan uzak floema va kambiy kislardan xoli bulishi kerak. TSilindr shaklidagi uzak Petri likobchalariga skalpel bilan 2-3 mm li bulaklarga bulinadi va 100 ml li kolbalarga solingan Murasige-Skuga agarli ozika muxiti yuzasiga joylashtiriladi. Kallus tukimalarining rivojlanishi uchun kolbalar 26⁰ S li termostatga joylanadi. Uch xaftadan sung tajriba natijalari kuzatiladi va chizib olinadi.

8 - ish. Soya urugpallasidan kallus tukimasi olish va ustirish.

Material va asbob uskunalar. 2-3 kunlik steril soya usimliklari, steril Petri likobchasi, skalpel, pintset, Miller ozika muxitli 100 ml li kolba yoki 20 ml li probirkalar (8-jadval).

Tushuntirish. Kallus tukimasini sterillanmagan usimliklarning turli kismlaridan, masalan tamaki poyasi uzagidan, sabzi ildiz mevasidan shuningdek steril sharoitda ustirilgan usimlik usimtalaridan yoki usimliklardan olish mumkin. Keyingi xolda kallus olish texnikasi ancha soddaroq bulib, materialni oldindan sterillashni talab kilmaydi. Mazkur ishda soya urugpalla usimtalaridan kallusli tukima olish imkoniyatlari kursatilgan.

Ishning borishi. Petri likobchasi yoki probirkadagi soya usimtalari laminarda steril Petri likobchasi yoki buyum oynasiga olinib skalpel yordamida usimtalardan urugpalla ajratib olinadi va 4x4x2 mm li kubiklarga bulinadi. Pintset yordamida ularni 100 ml li tagi yumalok kolbalarga yoki 20 ml li probirkalarga (tarkibida 0,5 mg/l kinetin bulgan Miller ozika muxiti solingan) joylashtiriladi (6-jadval). Uch xaftadan keyin tajriba kuzatiladi va urugpallalarda xosil bulgan kallus tukimasining rasmi chizib olinadi.

9 - ish. Sabzi ildiz mevasidan kallus tukimasi olish va ustirish.

Material va asbob uskunalar. Sabzi ildiz mevasi, probka, steril skalpel, pintset, Petri likobchasi, kogoz varagi. Uayt ozika muxitli steril Petri likobchasi.

Tushuntirish. 1939 yili birinchi bulib Gorte tomonidan sabzi ildiz mevasidan kallusli tukima olingan. Bu tukimalar yangi ozika muxitga kayta-kayta ekilishi sababli uzok vakt usishda davom etgan. Ustirish uchun olingan sabzi ildizmevasi parenximasining ksilema va floema tukimalari uzining bulinish va usish xususiyatlarini yukotmagan. Kallus birlamchi va ikkilamchi meristemalar atrofida, shunigdek shu meristemalar yonida joylashgan yoki ikkilamchi ildiz tukimalari parenximalarida xosil bulgan. Kallus xosil bulish jarayoni eksplantning ulchamiga boglik. Eksplant kancha yirik bulsa, xujayralar tuplami shunchalik murakkab va xilma- xildir. Natijada kallus paydo bulishida asosiy tukima va kallus xosil kiluvchi xujayralar orasida murakkab munosabatlar yuzaga keladi. Birlamchi eksplantning ulchami odatda 5-10 mm, ogirligi 20-100 mg buladi. Kupgina tukimalar fiziologik polyarlikka egadir. Buning natijasida kallus eksplant tomonida ya'ni usimlikning ildiz kismiga yunalgan joyda faol rivojlanadi. bu xolni sabzi ildizi bulaklaridan kallus olishda inobatga olish kerak va ularni agarga apikal tomoni bilan joylashtirish kerak.

Ishning borishi. Eksplantlar olish uchun sabziningsoglom ildiz mevalari tanlab olinadi, ishkalogich bilan sovunlab yuviladi, keyin vodoprovod va distillangan suvda yuvilib sterillash uchun 96% li etanolga 5 dakika solinadi. **Steril suvda chayilmaydi.** Sterillangan kogozlar orasida sabzi ildizmevasining yukori bulagi kesib olinadi va steril probkabur bilan tukimadan tsilindrlar kesib olinadi. Sabzi ildizmevasi eksplanti ksilemali va floemali parenxima va kambydan iborat bulishi kerak. Ajratilgan tsilindrlar Petri likobchasiga joylanadi, 5 -10 mm li xalkalar kesiladi. Keyin sabzi xalkalari pintset yordamida Uayt ozika muxitli Petri likobchalariga joylanadi va termostatga 25⁰ S da ustiriladi. Uch xaftadan keyin natijalar kuzatiladi va xosil bulgan kallusning rasmi chizib olinadi.

10 - ish. Bada barglaridan kallus tukimasi olish va ustirish.

Material va asbob uskunalari. Bedaning probirkadagi steril usimligi, MV-5 ozika muxitli steril probirkalar (3-jadval), steril skalpel, pintset, Petri likobchasi, spirtovka, gugurt, 96% li etanol.

Tushuntirish. Usimlikning turli kismalaridan shuningdek yashil barglaridan xam kallus tukimalari olish mumkin. Birok yashil barglardan kallus olishda ularni yoruglikda ustirilganda, dedifferentsirovkadan keyin xosil bulgan kallus tukimasi uzining yashil rangini va fotosintez kilish xususiyatini yukotadi. Tukimalarning zararalanishi xujayra dedifferentsirovkasini va kallusogenez kobiliyatining yuzaga kelishiga olib keladi, shuning uchun barglarni ozika muxitiga joylashdan avval kallusning xosil bulishini yaxshilash uchun tomirlari kesiladi.

Ishning borishi. Laminar yoki boksda, sterillikka rioya kilgan xolda probirkadagi beda usimligi olinib, brglar ajratiladi va Petri likobchalariga joylanadi. Uchtalik barglar skalpel bilan bargchalarga ajratiladi, barg yuzasi bulab tomirlar bir necha joydan kesiladi Agarli V-5 ozika muxitli Petri likobchasiga yoki probirkalarga joylanadi. Uglerod manbai sifatida ozika muxitiga saxaroza (30 ml) solinadi, rN 6,0 gacha yetkaziladi. MV-5 ozika muxitining tarkibiy kismalaridan tashkari (3 jadval), 2,4-D fitogormoni, 8,0 mg/l kinetin, 0,5 mg/l HCK, 250 mg/l ammoniy nitrat va temir xelati uch marta kupaytirilgan (111 mg/l Na₂ EDTA, 84 mg/l FeSO₄ 7H₂O olinadi) mikdori solinadi. Ozika muxiti probirka yoki kolbalarda avtoklav kilinadi va Petri likobchalariga solinadi. Eksplantlarni utkazishdan avval kondensatlarni yukotish uchun ularni 3-5 kun 26⁰ S darajali termostatda saklanishi lozim. Eksplantlar ozika muxitiga utkazilganidan keyin yoruglik kamerasiga joylanadi va uch xafta doimiy yoruglikda inkubatsiya kilinadi (kamera xarorati 26⁰ S, nisbiy namligi 95-100% bulishi kerak). Zarur bulgan namlikni saklab turish uchun probirkalar yoki Petri likobchalari joylashgan patnisning urtasiga stkanda suv kuyib ustini polietilen plyonkasi bilan yopish kerak.

Bir xaftadan keyin eksplantlar kuzatiladi va rasmi chizib olinadi. Odatda 7-10 kundan keyin ular yashil rangini yukotadi va kallus tukimasining rivojlanishi kuzga tashlanadi (avval kesmalar atrofida, sung bargning butun yuzasi bulab). Uch xaftadan sung yaxshi rivojlangan kallusni kurish mumkin.

11 - ish. Steril kartoshka usimligi poyasidan kallus olish va ustirish.

Material va asbob uskunalari. Probirkada steril kartoshka usimligi, steril pintset, skalpel, matrascha yoki Petri likobchasi, spirtovka, stakanda spirt, kartoshka kallusini olish va ustirish uchun steril ozika muxitli (9 jadval) kolba yoki probirka, parafilm varagi, kaychi va gugurt.

Tushuntirish. Fitogormonlar tutuvchi ozika muxitga utkazilgan kartoshka poyasi parenxima tukimalari zararlangedan sung, xujayralar dedifferentsiyaga uchraydi va bulinishga utib nodifferentsiyalangan tukima, ya'ni kallus xosil kiladi. Kallusni usimlikning turli organlaridan, xususan kartoshkaning poya tukimalaridan, bargidan, tuganagidan, ildizidan, changdonidan olish mumkin. Kuyida steril kartoshka usimligi poyasidan kallus olishni kurib chikamiz

Ishning borishi. Laminar ichki yuzasi spirt bilan aritiladi. Steril usimlik solingan probirkani spirt bilan aritib, spirtovka alangasida sterillanadi. Probirkadagi steril usimlikni steril pintset bilan steril matraschaga olamiz, ung kulda skalpel, chap kulda pintset bulishi kerak. Pintset yordamida usimlikni ushlab turib, skalpel bilan poya kismlarining bugin oraligidan 5-10 mm uzunlukda kesamiz. Kallus xosil bulishi uchun poya eksplantlarining bir necha joyidan skpel bilan shlib chikamiz. Ozika muxitini agari eriguncha kizdiramiz va $37-40^{\circ}$ S gacha sovutamiz. Kolba ogzini ochib, spirtovka alangasida kizdirib olamiz, ozika muxitini Petri likobchalariga solamiz. X,ar bir likobchaga taxminan 15-30 ml ozika muxiti solinadi va 10-15 dakika kotiriladi. Bitta Petri likobchasiga 10-20 tacha tiralgan poya eksplantlari agarli muxit yuzasiga pintset bilan salgina botirib joylanadi, Petri likobchasi kapkogi bilan yopilib, ikki kavat parafilm bilan koplanadi va xarorati $22-25^{\circ}$ S, namligi 70% bulgan yorugliksiz klimatik kameraga joylanadi. Uch xaftadan keyin natijasi kuruladi va xosil bulgan kallus rasmi chizib olinadi.

4 - mavzu. Kallus tukimasi kulturasida ikkilamchi differentsirovka va morfogenez. Regenerant usimlik olish.

12 - ish. Kallus tukimasini yangi ozika muxitga kayta ekish

Material va asbob uskunalar. Kartoshka, beda va jenshen kallus tukimalari, agarli steril ozika muxitli probirkalar, steril pintset, skalpel, Petri likobchasi, spirtovka, gugurt va 96% li spirt.

Tushuntirish. Kallus tukimasi usishining egri chizigi S-simon xarakterga ega Y boshlangich lag-fazalar, logarifmik usish fazasi, ya'ni xujayraning faol bulinish fazasi, sekinlashgan usish fazasi, turgun faza va degradatsiya fazalaridan iborat. Kallus tukimasi bulagining bulishi va usish xususiyatini saklab kolish uchun yangi ozika muxitga utkaziladi. Xujayra bulinish jarayonini davom ettiruvchi bu muolaja yangi ozika muxitga kayta ekish deyiladi. Bu xolatni chegaralanmagan mikdorda davom ettirish mumkin. Lekin tukimani kup marta yangi ozika muxitga kayta ekilganda, kallus xujayralari bu xolatga "kunikib" kolishi mumkin, bu esa gormonlarga nisbatan avtonomlikning yuzaga kelishi yoki kallus xujayralarining butun usimlikni regeneratsiya kilish kobilyatini susayishiga olib kelishiga sabab buladi.

Ishning borishi. Sterillikka rioya kilgan xolda probirkadagi kallusni Petri likobchasiga utkazish, nekrozlangan kislmlardan va agarga yopishib kolgan kislmlardan tozalanadi. Kallusli tukimani teng bulaklarga bulib va aseptik sharoitda steril ozika muxitli probirkalarga utkaziladi. Tukimani yangi ozika muxitga utkazish kuyidagicha amalga oshiriladi, chap kulda ozika muxitli probirka buladi, ung kul bilan uning tikini ochiladi, probirka ogzi spirtovka alangasida tutiladi, chap kulning bush barmoklari bilan Petri likobchasi kopkogi ozgina ochiladi va ung kuldagi pintset bilan kallus tukima bulaklari yangi ozika muxitli probirkaga utkaziladi. Pintset bilan bulaklar agarga ozgina botirib kuyiladi, probirka ogzi va paxta tikin alangaga tutilib yopiladi. probirkalarning yukori kismi tselolofan bilan uraladi, probirkalar xarorati 25° S, namligi 60% bulgan termostatga 3-4 xaftaga kuyiladi. Belgilangan vaktning oxirida natija kuzatiladi va kallus tukimasi rasmi chizib olinadi.

13 - ish. Kallusni kayta ekish va kallus tukimasining usish xususiyatlarini aniklash (kartoshka misolida).

Material va asbob uskunalar. Petri likobchasidagi kallus, steril pintset, skalpel, Petri likobchalar, torsion tarozilar, spirt, spirtovka va gugurt.

Tushuntirish. Kallusni kayta ekish (usish intensivligiga bogliq xolda) xar 3-6 hafta olib boriladi. Ustirish tsikli odatda turt haftaga tugri keladi. Bu vakt ichida kallus tukimasi usishining egri chizigini aniklash uchun 4-5 marta (xar 5-7 kunda) kallusning ogirligi ulchanadi. X,ar bir ulchash paytida xar biridan 5-7 ta eksplpntlar bulgan 3 ta Petri likobchasi olinadi. Egri chizikni tugri tuzish uchun boshdan boshlab kallusli 20 ta Petri likobchasi olinishi kerak (xammasi bulib 100 tortma). X,ar bir tortma 100-150 mg dan bulishi kerak. Usish tafsilotlaridan tashkari, kallusning rangi va konsistentsiyasi belgilanib boriladi. Naviga karab kartoshka kallusining rangi ok, sarik, kulrang va och-kungir buladi, kallusning eskirishi bilan rangi tuklanadi. Konsistentsiyaga kura kallus zich va puk buladi. Puk kallus tezrok usadi va suspenziya xosil kilishga moyil buladi. Zich kallus esa morfogenez uchun kullaniladi. Odatda, kallusning initsiatsiyasi uchun auktsinning ozika muxitdagi mikdori, usish me'yorini ushlab turishdagiga nisbatan bir muncha kuprok buladi. Masalan, ozika muxitiga kallusning initsiatsiyasi uchun 6 mg/l 2,4-D solinsa, usishning bir me'yorda ushlab turishga 3 mg/l 2,4-D solinadi.

Ishning borishi. Parafilm olinib, kallusli Petri likobchasi ochiladi. Kallus pintset bilan steril Petri likobchasiga olinadi va skalpel bilan 100-150 mg li bulaklarga bulinadi. Torsion tarozi ichki kismi spirt bilan aritiladi, pallasini pintset bilan ushlab spirtga solinadi va spirtovka alangasiga yengil tutiladi. Steril sharoitda tortib olingan kallus tukimalari Petri likobchalariga 5 bulakdan solinadi va konditstsiyona kuyiladi. Uch haftadan keyin kallusning ogirligi steril sharoitda ulchanadi.

Usish kursatkichi (indeksi) passaj oxiridagi vazni aniklanadi: passaj boshidagi vazni.14 - ish. Kallus tukimalari kulturasida poya organogenezi induktsiyasi (kartoshka misolida).

Material va asbob uskunalar. Probirkalar, morfogenez uchun ozika muxitli kolbalar, uzun pintset, steril matrascha, probirka yoki Petri likobchasidagi kartoshka kallusi, spirtovka va gugurt.

Tushuntirish. Usimlik xujayralari totipotenlik xususiyatiga ya'ni somatik xujayralardan butun usimlik regeneratsiya kilish xususiyatiga egadir. Poya organogenezi induktsiyasi uchun kallusni tsitokinin mikdori yukori bulgan muxitga utkaziladi, keyinchalik usimlikning ildizlanishi auktsinning yukori mikdorida tezlashtiriladi. Morfogenez induktsiyasi va usimlikning regeneratsiyasi murakkab kup poganali jarayondir. Kartoshkada bu jarayonni bir necha boskichlarga bulish mumkin: yashil meristemali maydonlar induktsiyasi, apekslar paydo bulishi, regenerant usimlikning shakllanishi, regeneratning turgunlanishi. Kallus tukimasi kanchalik yosh bulsa, ya'ni tukima olinganiga kancha kam vakt utgan bulsa uning regeneratsiyalanish kobilyati shunchalik yukori buladi. Kartoshkaning turli navlari morfogenezi induktsiyasi va usimlik regeneratsiyasi uchun olingan ozika muxitlarning tarkibi bir-biridan fark kiladi, fakft tsitokininlarning yukori mikdori bir xilligi umumiydir (zeatin yoki BAP). Morfogenez induktsiyasi uchun ozika muxitning tarkibi 11 jadvalda berilgan.

Ishning borishi. Probirkadagi kallus matraschaga olinadi, 5x5 mm ulchamdagi bulaklarga bulib morfogenez induktsiyasi uchun muljallangan muxitli probirkalarga solinadi. Probirkalarni paxta tikinlar bilan yopib, 20-25⁰ S, 10 ming lyuks yoruglikka va 70% namlikka ega bulgan klimatik kameraga kuyiladi. Bir xaftadan keyin globulalarning paydo bulishini, 3-5 xaftadan keyin och yashil meristemal zonalarining xosil bulishi kuzatiladi. Daftarga xar bir kallusdagi apekslar soni yoziladi. Apekslar kichik nixollarga aylanadi. Bitta eksplantida unlab nixollar xosil bulishi mumkin. Ular 10 mm balandlikka yetganda, kallusdan olib ildiz otishga muljallangan ozika muxitga ekiladi 5-10 kundan keyin ildizlarning paydo bulganligi kuzatiladi.

15 - ish. Beda barglari kallus tukimalarida poya organogenezi va somatik embriogenez induktsiyasi. Regenerant-usimliklar olish.

Material va asbob uskunalar. Beda bargidan olingan kallus tukima kulturasini, MV steril ozika muxiti solingan 50 ml li kolba, steril Petri likobchasi, skalpel.

Tushuntirish. Dedifferentsiatsiyalangan kallus xujayralarining ikkilamchi differentsirovkaga utishi va kallus tukimalarida shakllangan strukturalarning xosil bulishi ozika muxitdagi gormonlarning nisbatiga boglik. TSitokininning mikdori auksindan kup bulishi poya organogenezi induktsiyasiga yoki somatik embriogenezga olib keladi. Auktsinning mikdori tsitokinindan kup bulishi esa kallus tukimalarida ildizning xosil bulishiga ildiz organogeneziga olib keladi. Beda kallus tukimasi tarkibida 0,2 mg/l BAP bulgan ozika muxitga kayta ekilganda, kurtak va embrioidlar paydo bulishi induktsiyasi yuzaga keladi. Morfogenez induktorlari ta'siridan 2-3 xaftadan keyin kalluslarda 0,5-2,0 mm li yashil kurtaklar va embrioidlar rivojlana boshlaydi. Kayta ekilgandan bir necha kundan keyin kallusning rangsiz yuzasida yashil nuktalar paydo buladi. Embrioidlar asosan bedaning tetraploid navlari va gibridlarda xosil buladi, kurtaklar esa kupincha diploid formalarda shakillanadi. Ba'zan esa kurtak va embrioid bir vaktning uzida bitta kallusda rivojlanishi mumkin. Regenerat usimliklar olish uchun xosil bulgan yosh nixollar va embrioidlar gormonsiz ozika muxitga ekiladi va 2-3 xaftadan keyin ulardan usimlik rivojlanadi. Ba'zida usimlikning normal rivojlanishi va buzilishini kuzatish mumkin (kallusning xosil bulishi, ildiz yoki nixlarning kuprok rivojlanishi, turli organlarning yugonlashishi). Bunday xollarda materialni gormonsiz ozika muxitga kayta utkazish va uning taribiga kiruvchi xamma komponentlarning mikdorini ikki marta kamaytirish kerak. Usimlikning tukima kulturasida xamma regeneratsiya jarayonlarning utishiga (barg eksplantidan to regenerantgacha) taxminan ikki oy vakt ketadi.

Ishning borishi. Beda bargidan olingan kallus tukimasini BAP (2mg/l) kushilgan yangi MV-5 ozika muxitga kayta ekish. Bu ozika muxit meristemal va embrional tipdagi kallusli tukima xujayralarning rivojlanishini tezlashtiradi, keyinchalik esa ulardan kurtaklar va embrioidlar shakillanadi. Kayta ekilgan kallus yoruglik kamerasida (6 soat yoruglikda) inkubatsiya kilinadi. Uch xaftadan keyin yashil kurtaklar va embrioidlarning rivojlanishi kuzatiladi. Natijalar chizib olinadi. Olingan embrioid va kurtaklar regenerant usimlik olish uchun ishlatiladi. Buning uchun ularni sterillikka rioya kilingan xolda gormonlarsiz, agarli V-5 ozika muxitga kayta ekiladi va yoruglik kamerasida inkubatsiyalanadi. Bitta 50 ml li kolbaga 25 ml ozika muxiti

solinadi va unga 4-6 ta kurtak yoki embrioid ekiladi. Uch haftadan keyin natijalar kuzatiladi va chizib olinadi. Nixollar va usimtalarning xosil bulishi, regenerant usimliklarning shakllanishi belgilanadi.

5 - Mavzu. Suspenziyali kultura

16 - ish. Kartoshka kallusidan suspenziyali kultura olish.

Material va asbob uskunalari. Kartoshka kallusi, suyuq ozika muxitli kolba (13 jadval), steril pintset, skalpel, Petri likobchasi, spirtovka va gugurt.

Tushuntirish. Suspenziya steril sharoitda, ma'lum tarkibdagi suyuq ozika muxitda usuvchi, yakka xujayralar va agregatlardir. Suspenziyali kulturadan model sistema sifatida ikkilamchi metabolizm jarayonini, fermentlar sintezini va genlar ekspressiyasini urganishda foydalanish mumkin. Xujayra suspenziyasi kimmatli biologik faol moddalar manbai (masalan, dori-darmonlar) xisoblanib, xujayra selektsiyasida boshlangich material bulib xizmat kiladi. Suspenziyalarni ustirishning turli xil usullari mavjud: tebratgichda kolbalarda va fermentyorlarda. Suspenziya usishi uchun asosiy sharoitlaridan biri ozika muxitning doimiy tebratgichda aralashtirilishi va chaykatib turilishidir, bu kulturaning aeratsiyasini vujudga keltiradi. Odatda suspenziya tukimalaridan olinadi.

Ishning borishi. Kallusli Petri likobchasidagi puk kallus bulaklari steril pintset bilan boshka steril Petri likobchalariga olinadi, och rangdagi kismalari ajratib olinib suspenziya uchun tayyorlangan steril ozika muxitli kolbalarga solinadi. Suyuklikka nisbatan kallusning mikdori kuyidagicha: 100 ml suyuq muxitga 3-5 gramm kallus solinadi. Suspenziyaning mikdori kolba xajmining 10-20% ni tashkil kilishi kerak. Masalan, 500 ml li kolbaga 50-100 ml suspenziya solinadi. Kolbaning ogzi paxta dokali tikin, tselofan, folga bilan yopiladi va 3-4 haftaga tebratgichga kuyiladi (birinchi ekishning me'yoriy muddati).

17 - ish. Xujayraning yashash kobilyatini va suspenziyaning agregatsiyalanish darajasini baxolsh.

Material va asbob uskunalari. Suspenziyali kolba, pipetka, rezina nok, pentsillin idishchasi, kuk evans yoki kuk metil buyogining 0,1% li eritmasi, buyum oynachasi, yopkich oyna, shisha tayokcha, Garaeva kamerasi va mikroskop.

Tushuntirish. Suspenziya yakka xujayra va agregatlardan (xujayralar tuplami) iborat bulib, birgalikda kulturalanuvchi birlik deb ataladi. Xujayra va agregatlarning yashash kobilyati maxsus buyoklarda buyalishiga karab aniklanadi. Tirik xujayralar buyalmaydi, ularda tsitoplazmaning xarakati kurinib turadi. Ulik xujayralarga buyok singib, ular tuk kuk rangga buyaladi. Kuyidagi konuniyat mavjud: agarda agregatdagi xujayralarningyarmi (50%) yoki kuprok mikdori buyalmasa, ular tirik xisoblanadi. Agregatsiyalanganlik darajasini aniklash uchun suspenziya mikroskop ostida kuriladi. Odatda sanash kuyidagi tartibda olib boriladi: yakka xujayralar kuriladi, ikkitadan beshtagacha xujayra agregatlari, oltitadan yigirmatagacha xujayra, 21 tadan 50

tagacha xujayra, ya'ni kulturalanuvchi birlikning 5 ta guruxi. 1000 tadan ortik kulturalanuvchi birlik taxlil kilinadi.

Ishning borishi. YAshashga kobilyatli xujayralarni sanash buyum oynasiga bir tomchi suspenziya, yoniga esa bir tomchi buyok tomizilib, shisha tayokcha bilan aralashtiriladi. Mikroskop ostida 1000 dan kam bulmagan kultural birlik sanaladi. Xujayraning yashash kobilyati xisoblab chikiladi. Xar bir xisob yozib olinadi.

Suspenziyaning agregatsiyalanish darajasi. Buyum oynasiga suspenziyadan bir tomchi tomiziladi, tushuntirishda kayt kilinganidek xisoblanadi va natijalar jadvalga yoziladi.

Kulturalanuvchi birlik soni	Agregatdagi xujayralar soni			
	1	1-5	6-20	50 dan ortik

18 - ish. Suspenzion kulturadagi xujayralar zichligini xisoblash.

Material va asbob uskunalar. Suspenziyali kolba, uchi kesilgan steril pipetka, rezina nok, pentsillin idishi, 20% li xrom kislotasi, uchi chuzinchok pipetka, Fuks-Rozental kamerasi (gemotsitometr), Garaeva kamerasi, mikroskop va yopkich oynalar.

Tushuntirish. Suspenziyadagi xujayra sistemasi xolatini xarakterlovchi asosiy kursatgichlardan biri bu xujayra populyasiyasining ichligidir. Xujayralar soni suspenziyaning matseratsiyasidan (xujayralarning bulinishi) sung aniklanadi. Xujayralarni xisoblash mikroskop ostida xisoblash kamerasida olib boriladi. Xujayralarni buluvchi modda sifatida 10-20% li xrom kislotasi ishlatiladi, u xujayralarni birlashtiruvchi oralik plastinkani gidrolizlaydi. Matseratsiyadan sung xujayralarni bir-biridan ajratish uchun, ularni yugon ignali shpiritsdan bir necha marta utkazish kerak (pipetkalash). Sung xujayralar soni sanaladi. Suspenziyaga xrom kislotasi kushilganidan sung aralashma termostatga 60° S ga 10-30 dakika kuyiladi. Isitish vakti suspenziyaning xususiyatiga boglik (agregatsiyalanganligi, xujayra devorlarining kimyoviy tarkibi va xakozo). Odatda, suspenziyaning usish tsikli uch fazaga bulinadi: fag faza (2-3 kun), eksponentsional usish fazasi (2-10 kun) va doimiy faza (1015 kun). YAxshi usuvchi suspenziya S-simon usish egri chizigini xosil kiladi. Usish tsikli kulturaning doimiy fazaga utgunicha bulgan vaktgacha belgilanadi. Fazalarning davomiyligi kallus kulturasi va suspenziyasi olingan usimliklarning turiga va organiga, xujayralarning boshlangich mikdoriga (birlamchi inokulyat) va ustirish sharoitlariga boglik. Odatda, ekishning davomiyligi (kayta ekishga bulgan vakt) 14-16 kundan iborat. Bunda zichlik 5×10^4 - 10^5 xuj/ml dan 10^6 - 5×10^6 xuj/ml gacha oshadi (taxminan 20 marta). Subkultivatsiyalash (kayta ekish) uchun suspenziya usadigan kulay sharoit aniklanadi: yashash kobilyati yukori bulganda (70-80%) S-simon egri chizik olinadi.

Ishning borishi. Uchi kesilgan pipetka bilan, oldindan chaykatib aralashtirilgan kolbadan, bir necha ml suspenziya olinadi. Oldindan xisoblash uchun 1 ta kolbadagi suspenziyadan foydalaniladi, usish egri chizigini chizish uchun esa 3 marta takrorlash kerak, ya'ni uchta kolbadagi suspenziya (taxminan xar biridan 2 ml dan)

bitta idishga kuyiladi, sungra xamma muolajalar aralash suspenziya bilan olib boriladi.

Tekshiralayotgan suspenziyaning bir xajmiga 2 xajm xrom kislotasi (masalan, 1 ml suspenziyaga 2 ml $H_2Cr_2O_7$) solinadi va 10 dakikaga 60^0 S li xaroratli termostatga kuyiladi. Katta ninali shpitsdan suspenziya uch marta utkaziladi, bunda xujayralar bir- biridan ajraladi. Xamma muolajalar juda extiyotkorlik bilan olib borilishi kerak, chunki xrom kislotasi kullarda, kiyimlarda ish joyida dog koldiradi. Fuks-Rozental kamerasi va yopkich oynalar yaxshilab yuvib kurtiladi. YOpkich oynalarni Nyuton xalkalari paydo bulgunga kadar kameraga yopishtiriladi. Uchli pipetka bilan matseratsiyalanuvchi eritmadan olib yopkich oyna chetiga asta olib kelinib, kamera suyuklik bilan tuldiriladi va xujayralar mikroskop ostida sanaladi. Sanash dioganal buyicha joylashgan turtta katta kataklarda yoki butun kamera buyicha olib boriladi. Xar galgi tuldirishda yukori va pastki kataklar xisoblanadi. Tugri natijalar olish uchun xisoblash 3-4 marta (odatda 1000 xujayra xisoblanadi) kaytariladi. S-simon egri chizikli jadval tuzish uchun kul'tivatsiyaning butun jarayoni davomida kursatgichlar kunora olinadi. Suspenziyaning zichligi kuyidagi formula bilan xisoblanadi.

$$X = \frac{M \times n - 1000}{3,2}$$

x - xujayralar soni ml da

M - kameradagi xujayralar sonining 6-8 marta ulchangandagi urtachasi

n - suyultirishi

19 - ish. Suspenziyani kayta ekish.

Material va asbob uskunalar. Suspenziyali kolba, kayta ekish uchun kolbada steril ozika muxiti, uchi kesilgan steril pipetka, rezina nok, spirtovka va gugurt.

Tushuntirish. Suspenziyani ustirishning birinchi tsikli davomiyligi suspkenziya olingan usimlikning naviga karab, suspenziya usuvchi ozika muxiti tarkibiga, tebratgichning aylanish tezligiga karab turlicha, lekin odatda 3-4 xaftadan iborat. Keyinchalik bu muddat ikki xaftagacha kiskaradi. Bu vaktning ichida xujayralarning ba'zilar uladi, kallusning dezagregatsiyasi va tirik xujayraning faol bulinishi yuzaga keladi. Kolba yuzasida tirik xujayralardan pardaning xosil bulishi bilan uni kayta ekish kerak buladi.

Ishning borishi. Suspenziyani kayta ekish kuyidagi usullarda olib boriladi:

1. yirik agregatlar chukishi uchun suspenziya 1-2 dakika tinch xolatda turadi. Steril pipetka bilan suspenziyaning yukori kismidan bir necha ml suspenziya olinadi.

2. suspenziya kapron yoki neylon matodan utkazilib filtrlanadi va filtrlangan kismiga yangi ozika muxit solinadi.

3. suspenziya 1-2 dakika tinch turadi va 5-10 ml olinib yangi ozika muxitga solinadi. Ekishdan oldin va ekishdan keyin kolba ogzi alangaga tutiladi.

Odatda, yaxshi usuvchi suspenziya uchun suyultirishning 1:10 nisbatdagi mikdori ishlatiladi, ya'ni 500 ml lik kolbaga 5 ml suspenziya, 45 ml yangi ozika muxiti solinadi. Usish xarakteristikasidan suyultirishning anik mikdori aniklanadi.

Suspenziya yukorida aytilganidek kayta ekilib, kolbalar ogzi paxta-dokali tikiqlar, folga va tsellofan bilan yopilib, keyingi kayta ekishgacha tebratgichga joylanadi.

20- ish. Suspenziyani katttik ozika muxitiga ekish (Pleyting usuli).

Material va asbob uskunalar. Suspenziya, steril Petri likobchalari, tsilindr, suspenziya usish uchun ikki brobar kup agar tutuvchi ozika muxit (1,2 - 1,4%).

Tushuntirish. Xujayra selektsiyasida odatda mayda agarli suspenziyani agarli ozika muxitiga kayta ekish kullaniladi. Bunda yakka xujayralar va mayda agregatlardan xujayra klonlarining vujudga kelishi boshlanadi. Xujayra selektsiyasidan asosiy maksad xujayra klonlaridan usimlik olish.

Ishning borishi. Suspenziya steril tsilindrga solinib 5 dakika tinch kuyiladi. Sung pipetka bilan 5 ml suspenziyaning yukori fraktsiyasidan olinib (u yakka xujayralarga boy), steril tsilindrdagi 5 ml kallus usishiga muljallangan ozika muxiti bilan aralashtiriladi. Bu ozika agar muxitida ikki marta kup bulishi kerak, ya'ni 1,4%. Tezlik bilan tsilindrdagi ozika muxiti Petri likobchalariga solnadi, kotgandan keyin parafilm bilan yopiladi. 3-5 xaftadan sung diametri 1 mm dan ortik bulgan koloniyalar xisoblanadi.

$$\text{ekish effektivligi} = \frac{\text{xosil bulgan koloniyalar mikdori}}{\text{ekilgan xujayralar mikdori}} \times 100$$

Odatda ekish zichligi 1×10^5 xujayra/ml ga teng. Usayotgan koloniyalar bir-biriga aralashib ketmasligi uchun ekish zichligi juda yukori bulmasligi kerak. Uch xaftadan sung xar bir likobchadagi koloniyalar soni sanaladi.

Xujayra va tukima kulturalarni ustirish uchun ozika muxitlar tarkibi

Murasige va Skuga ozika muxiti

1-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l			
NH ₄ NO ₃	1650	Fe ₂ (SO ₄) ₃ • 7H ₂ O	27,8
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	37,3
CaCl ₂ •2H ₂ O	4408	Tiamin HCl	0,1
KN ₂ PO ₄	170	Pridoksin HCl	0,5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	370	Mezo-inozit	100
C ₀ Cl ₂ • 6H ₂ O	0,02	Glitsin	2,0
	5		
ZnSO ₄ • 5H ₂ O	8,6	ISK	2,0
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,02	Kinetin	0,2
	5		
MnSO ₄ •4H ₂ O	22,3	Saxaroza	30000
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,25		
KI	0,83	rN 5,5 - 5,8	

Uayt ozika muxiti

2-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l			
Ca(NO ₄) ₂	200	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,02
MgSO ₄	360	ZnSO ₄ • 5H ₂ O	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,002
			5
KNO ₃	80	KI	0,75
KCl	55	Pridoksin HCl	0,1
NaH ₂ PO ₄	16,5	Tiamin HCl	0,1
H ₃ BO ₃	1,5	Nikotin kislota	0,5
MnSO ₄	4,5	Glitsin	3,0
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5	Saxaroza	2000
			0
		rN 5,5 - 5,6	

Gamborga va Evelega V-5 ozika muxiti

3-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

NaH ₂ PO ₄	150	KI	0,75
KNO ₃	2500	FeSO ₄ • 7H ₂ O	28,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	Tiamin HCl	10,0
MgSO ₄ • 7H ₂ O	250	Pridoksin HCl	1,0
CaCl ₂ •2H ₂ O	150	Nikotin kislotasi	1,0
H ₃ BO ₃	3,0	MnO ₄ ⁻ • 7H ₂ O	10,6
			0
C ₆ H ₁₂ • 6H ₂ O	0,02	Mezo-inozit	100
5CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,02	2b ₄ -D	2,0
	5		
ZnSO ₄ • 5H ₂ O	2,0	Saxaroza	2000
			0
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O			
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,02	rN 5,8	
	5		

Kartoshka apikal meristemasini ustirish uchun modifikatsiyalangan Murasige va
Skuga (MS) ozika muxiti

4-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l			
Mineral elementlar	MS	Nikotin kislotasi	2
Saxaroza	2000	Folin kislotasi	0,5
	0		
Glyukoza	2000	Kinetin	0,5
	0		
Kazin gidrolizati	1000	Ca pantotenat	10
Mezo-inozit	1	Riboflavin	0,5
Tiamin	1	Biotin	1
Pridoksin	1	Aktivlangan kumir	10000
Adenin	40	Agar-argar	7000
Vitamin V-12	0,015	rN 5,7 - 5,8 MS-Murasige-	
		Skugada	
GK		berilishi buyicha	

Kulupnay apikal meristemasini ustirish uchun modifikatsiyalangan Murasige va
Skuga (MS) ozika muxiti

5-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

Mineral elementlar	MS	Glyukoza	2000
Temir xelati	5,0	6-BAP	0
Askorbin kislotasi	1,0	Agar-argar	0,5
Tiamin	0,5	rN 5,8 MS-Murasige-Skugada	7000
Pridoksin	0,5	berilishi buyicha	
Nikotin kislotasi	0,5		

Kulupnayning mikroklonal kupayishida ildiz xosil kiluvchi ozika muxiti

6-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

Uayt buyicha makrotuzlar		Nikotin kislotasi	0,5
Xeller buyicha makrotuzlar		ISK	0,5
Temir tsitrati	3,5	Saxaroza	2000
			0
Askorbin kislotasi	1,0	Agar-argar	7000
Tiamin	0,5	rN 5,6 - 5,8	
Pridoksin	0,5		

Kartoshka novdasini kalamchalab kupaytirish uchun Murasige va Skuga ozika muxiti

7-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

Mineral elementlar MS buyicha	
Gibberal kislotasi	2,0
Kinetin	0,5
Adenin	40,0
Nikotin kislotasi	2,0
Pridoksin	1,0
Tiamin	1,0
Ca pantotenat	10,0
Faollangan kumir	10000
Saxaroza	30000
Agar-argar	7000
rN 5,8	

Soya urug murtagidan kallus tukimasi ustirish uchun Miller ozika muxiti

8-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

Ca(NO ₃) ₂	347	H ₃ BO ₃	1,6
KNO ₃	1000	KI	0,8
NH ₄ SO ₃	1000	Glitsin	2,0
KH ₂ PO ₄	300	Nikotin kislotasi	0,5
MgSO ₄	35	Pridoksin HCl	0,1
Tiamin	0,1	R-ISK	5
KCl	65	Saxaroza	3000
			0
Na ₂ EDTA	32	Agar-agar	1000
			0
MgSO ₄	4,4		
ZnSO ₄	1,5	rN 5,8	

Kartoshka poyasidan kallus kulturasini ustirish uchun ozika muxiti

9-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l

Mineral elementlar	MS	Glitsirin	1,0
Saxaroza	2000	Nikotin kislotasi	5,0
	0		
Glyukoza	2000	Folin kislotasi	0,5
	0		
Kazin gidrolizati	1000	Zeatin	0,05
Mezo-inozit	100	Kinetin	0,2
Tiamin	0,5	2,4-D	3,0
Pridoksin	0,5	Agar-argar	7000
			0
Adenin	1,0	rN 5,8	

Kartoshka kallus tukimasi kulturasida poya organogenezi induktsiyasi uchun ozika muxiti

10-jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l			
Mineral elementlar	MS	Folin kislotasi	5,0
Kazin gidrolizati	1000	Zeatin	1,0
Adenin	40	ISK	0,1
Mezo-inozit	100	Saxaroza	2,4
Tiamin	0,5	Glyukoza	10,0
Pridoksin	0,5	yoki	
Glitsin	2,0	Mannit	36,4
Nikotin kislotasi	5,0	rN 5,8	
Biotin	0,05	MS-Murasiga-Skugada berilishicha	

Kartoshka usimligi usishini tezlashtiruvchi ozika muxiti

11 -jadval

Ozika muxitning tarkibiy kismilari, mg/l	
Mineral elementlar	MS
Tiamin	1,0
Pridoksin	0,5
Saxaroza	5000
IMK	0,1
Agar-agar	7000
rN 5,8 MS-Murasiga-Skugada berilishicha	

II. USIMLIK USISHI VA RIVOJLANISHINI BOSHTSARUVCHI MODDALAR (REGULYATORLAR).

1 - Mavzu: Usimliklarni genetik apparatiga fitogormonlar ta'siri.

Fitogormonlar ta'sirining asosiy elementi bulib, uning usimliklar genetik apparatiga ta'siri xisoblanadi. Bu ta'sir, birinchidan bir kator gormonal genlar ekspressiyasining tezlashuvi xisobiga, ikkinchidan DNK metillanishining umumiy kamayishi xisobiga namoyon bulishi xozirgi vaktida aniklangan. Fitogormonlarning usimlik genetik apparatiga ta'siri kuydagilarda namoyon buladi: fitogormonlar oksil retseptori bilan birlashadi va bevosita retseptor-gormon birikmasi kurinishida yoki kator oralik reaksiyalar orkali DNK bilan birlashgan oksil va nasl informatsiyalarining ukilishiga karshilik kiluvchi repressor-oksillar bilan birlashishida namoyon buladi. Buning natijasida repressorlar bilan DNK molekulasi orasidagi uzaro bogliklik buziladi va ozod bulgan genlar ma'lumot ukilishini va ularga taalukli fermentlari biosintezini amalga oshiradi. Fitogormonlarning bunday xarakati tanlov asosida yuzaga keladi, ya'ni ma'lum fitogormonlar DNK ning butun molekulasidan emas balki aloxida genlardan repressor tusiklarni olib tashlaydi.

Genomga fitogormonlarning ta'sirining ikkinchi usuli shundan iboratki, uning ta'sirida DNK ning metillanish darajasi kamayadi va buning xisobiga genetik ma'lumotlar ukilishining umumiy kobilyati usadi. Bu ta'sir mexanizmi oxirigacha

urganilmagan bulib, fakat tsitokininlarning DNK ga urnashib olib, metil guruxlarning (CH_3) birlashishiga karshilik qilishi ma'lum.

1 - ish. Gibberellin ta'sirida xujayra aleyron kavatlarida a-amilaza sintezining tezlashuvi.

Material va asbob uskunalari. Arpa urug'lari, gibberellin (GK 3), agar-agar, kartoshka kraxmali, buyovchi eritma tayyorlash uchun kaliy yod va metalli yod, etil spirti, skalpel, pintsetlar, filtr kogoz, Petri likobchasi, 700 ml li issiklikka chidamli stakanlar, eritma tayyorlash uchun ulchov idishi, elektroisitgich va termostat.

Tushuntirish. Arpa doni xujayra aleyron kavati xujayralarida gibberellinning a-amilaza geni ekspressiyasini yuzaga keltirishi, fitogormonlarning genomga ta'siriga misol bula oladi (tanlangan genlarning ekspressiyasi). a-amilaza, b-amilaza va glyukoamilaza bilan bir katorida amilaza fermentlari guruxiga kirib, kraxmalda va shunga uxshash poli- va oligosaxaridlarda a-1,4-glikozid bog'larining fermentativ gidrolizini boshkaradi.

a-amilaza ta'siridagi gidrolizning maxsuloti bulib maltoza, maltotrioza, glyukoza va shoxlangan zanjirli bir kator kichik molekulali maxsulotlar xisoblanadi. a-amilaza, boshka amilazalarga nisbatan usimlik xujayralarida doimo kam mikdorda uchraydi, urug usishi uchun kulay sharoit yuzaga kelganda sintezlanadi. Kurtak burtish jarayonida gibberellin - gormoni ishlab chikara boshlaydi. Gibberellin aleyron kavat xujayralariga **diffundirlanadi**, faol gormon-retseptor birikmasi xosil kiluvchi oksil-retseptorlar bilan birlashadi va DNK molekulasida a-amilaza geni ukilishiga tushkinlik kiluvchi repressorlarga ta'sir etadi.

Bu ta'sir natijasida repressor kurshovi yukolib, a-amilaza biosintezi boshlanadi.

Tayyor fermentlar uz navbatida endospermaga **diffundirlanadi** va murtag usishi uchun energiya manbai va shakllanish materiali xisoblangan kraxmalni eruvchi kandlargacha parchalaydi. Murtagi olingan urugda a-amilaza biosintezi amalga oshmaydi, chunki bu ferment biosintezini tezlashtiruvchi gibberellin yuk. Bunday urug'larga gibberellin eritmasidan kushilganda a-amilaza biosintezi yuzaga keladi. a-amilaza biosintezini kraxmalli agarni yodli kaliy yod eritmasi bilan buyalganda kraxmalning parchalanish darajasiga karab aniqlash mumkin.

Ishning borishi. Arpa urugi murtagi kesib olinib, ikkita Petri likobchasiga joylanadi, uchinchi likobchaga shikastlanmagan uruglar (masalan, xar biriga 100 tadan urug) joylanadi. Gibberellin mikdori 50 mg/l bulgan 20 ml eritma tayyorlanadi. Buning uchun tarozida 10 mg gibberellin (GK3) tortib olinib 20 ml 76% li etil spirtida eritiladi va kolbadagi eritma mikdori distillangan suv bilan 50 ml gacha yetkaziladi. Sung shu eritmada 5 ml olib, tsilindrga solinadi va distillangan suv bilan uning mikdorini 20 ml ga yetkaziladi. Eritma Petri likobchalariga joylangan murtagi olinagan uruglar ustiga kuyiladi. Dolgan ikkitasiga 20 ml dan distillangan suv solinadi. Donli xar bir Petri likobchasi ustiga tajriba rakamlari yozilib, xarorati 26-29⁰ S termostatga 24-48 soatga kuyiladi.

Kraxmalli agar tayyorlash. Buning uchun issikga chidamli stakanga 6 g mayda kirkilgan agar-agar joylanadi, ustiga 300 ml distillangan suv solinadi va agar tula erigunga kadar, 6 g kraxmal bilan 30 ml sovuk suv shisha tayokcha yordamida

aralashtirilib, kaynab turgan agarning ustiga solinadi va kaynaguncha kizdiriladi. Issik eritma oldindan kizdirilgan Petri likobchasiga 5-7 ml dan solinadi.

Kaliy yod eritmasini tayyorlash. Buning uchun 2 g kaliy yod 5 ml distillangan suvda eritiladi, 1 g metal yodi solinadi va eritma tula erigandan sung unga 295 ml suv kushiladi va tuk rang idishga solinib zich tikin bilan yopib kzyiladi.

Petri likobchalaridagi kraxmalli agar sovugandan sung, skalpel bilan uchta bir xil sektorga bulinadi va inkubatsiya variantlariga muvofik belgilanadi. Termostatda inkubatsiyalangan uruglar teng ikkiga bulinadi va kesilgan tomoni bilan Petri likobchasidagi agar yuzasiga joylanadi, inkubatsiyaning xar bir varianti uz sektoriga joylanishi kerak. Bir soatdan sung urug pallalar extiyotkorlik bilan agardan olinadi va birinchi sektordagi agarli yuzaga **kaliy yodli yod** eritmasi solinadi va bir necha soniyadan sung tukiladi. Urug pallalar yotgan joy okish rangga kiradi, bu a-amilaza ta'sirida kraxmalning eriganidan va bu ferment urug pallalarda sintezlanganligidan darak beradi.

2 - Mavzu: Fitoregulyatorlar yordamida usimliklarning usish va tinch xolati jarayonlarini boshkarish.

Kishlok xujaligi amaliyotida fitoregulyatorlarni kullash usimliklaring usish jarayonlarini faol boshkarish imkoniyatini beradi. Xrzirgi vaktida retarant-moddalar keng tarkalgan bulib, bu moddalar yordamida nixollarning buyiga ortikcha usishini sekinlashtirish, boshokli usimliklarning egilib kolmasligiga, sabzavotlar, mevali daraxtlar va toklarning buyiga ortikcha usishini usishini tuxtatib, bir vaktida generativ a'zolarining rivojlanishini tezlashtirishga erishish mumkin. Retardantlar ta'siri usimlik gormonal sistemasiga ta'siri bilan boglik. Nixollarning vegetativ rivojlanishi fitogormonlar tizimi bilan, boshkariladi, ammo gibberellin asosiy tezlatuvchi ta'sir kursatadi. Retardant moddalar vaktincha biosintezni susaytirib, gibberellinning fitogormonal ta'sirini tuxtatish xususiyatiga ega. Xrzirgi vaktida usimliklarning usish jrayonlarini boshkarish bilan bir katorda usimliklaring fiziologik tinch xolatini boshkarish imkoniyatlari xam mavjud. Bu xolat odatda, kartoshka va piyozning saklanishini yaxshilash uchun ularning fiziologik tinch xolatini kuchaytiradi yoki teskari xolatini yuzaga keltiradi, ya'ni janubiy rayonlarda kartoshkadan ikki marta xosil olish uchun tuganaklarning tinch xolati buziladi. Usimliklaring fiziologik tinch xolati, shunigdek usish jarayoni fitogormonal sistemalar orkali nazorat kilinadi. Bunda abstsiz kislota tinch xolatni ta'minlaydi, gibberellinlar va tsitokininlar bu xolatdan chikishni belgilaydi. Nixollar va uruglarni, zaxira organlarida vegetatsion davr oxirida fitogormon-ingibitorlar (abstsiz kislotsi)ning maksimal mikdori tuplanadi. **Yarovizatsiya, stratifikatsiya** yoki saklash davrida abstsiz kislota parchalanadi va usimliklarda bulgan va yangidan sintezlanuvchi gibberellinlar va tsitokininlar, usish jarayonini ta'minlaydi.

2 - ish: Kuzgi bug'doy usimtlarida retardantlarning ta'sir usullaridagi farkni aniklash.

Material va asbob uskunalari. Kuzgi bugdoyning Mironovskaya 808 navi uruglari, gibberellin, retardantlar (xolinxlorid, a-xloretilfosfon kislota), kaliy permanganat, Petri likobchasi, doka, filtr kogoz, pintset, skalpel, ulchov idishi, fitoregulyator eritmalar tayyorlash uchun graduirlangan pipetkalar, termostat, taroz va chizgich.

Tushuntirish. Kishlok xujaligi amaliyotida keng tarkalgan 4 gurux retarandlar kullaniladi: ammoniyning turtlamchi tuzlari, triazol xosil kiluvchilar, etilen xosil kiluvchilar va gidrozin xosil kiluvchilar. SHular va boshka xozirgi vaktida ma'lum retardantlar anti-gibberellin xususiyatiga egadirlar. Lekin retardantlar ta'sir etish usullari buyicha bir-birlaridan fark kiladi. Ba'zi retardanlar gibberellin biosinteziga tuskinlik kiladi, ba'zilar esa gormon retseptor birikmasining xosil bulishiga yoki uning keyingi faolligining namoyon bulishiga tuskinlik kiladi.

Retardantlar ta'siri usullarining farkini, usimliklarning usish protsessida ekzogen gibberellinlar ta'sir ettirib urganishda aniklanadi. Retardantlar gibberellin biosinteziga tuskinlik kilgan xollarda, ekzogen gibberellinning ta'sir etirilishi retardantlar tomonidan yuzaga keltirilgan usishni sekinlashtirish jarayonini tuxtatadi. Retardantlar gormon retseptor birikmasiga tuskinlik kilganda, gibberellinning ta'sir ettirilishi usishning tuxtashini oldini ololmaydi.

Bunday tajribalar utkazishda kuzgi bugdoyning Mironovskaya 808 navi model sifatida kullaniladi, u gibberellin bilan xamda retardantlar bilan ishlov berilganda yukori reaksion kobiliyatni namoyon kiladi. Bundan tashkari bu modelda usishni boshkaruvchi yangi preparatlarni urganish, retardantlarning birgalikdagi faolligini aniklashda va retardantlarning optimal aralashmalarini ishlab chikishda juda kulaydir.

Ishning borishi. Bugdoy uruglari 5 dakika kaliy permanganatining och-pushti rangli eritmasida dezinfikatsiyalanadi va distillangan suvda tozalab yuviladi. YUvilgan uruglar Petri likobchasiga solinadi, xar bir likobchaga 15 ml dan distillangan suv solinadi va undirish uchun 26⁰-29⁰ S xaroratli termostatga kuyiladi.

Belgilangan kontsentratsiyalarda usish regulyatorlari eritmaları tayyorlanadi va Petri likobchalariga kuyib chikiladi, ustiga doka yoki filtr kogoz solinadi. SHu likobchalarga 30 ta xil unib chikkan uruglar joylanadi va 7 kunga xarorati 26⁰-29⁰ S bulgan termostatga kuyiladi.

Belgilangan muddat utgandan sung usimtalar kesib olinadi, ularning uzunligi va ogirligi ulchanadi. Olingan natijalarga karab gibberellin va retardantlarning usishni regulyatsiyalovchi ta'siri va retardantlarning ta'sir usullarining farklari xakida xulosa chikariladi.

3 - ish: Kuzgi bug'doy usimtlarida aralash retardantlarning ta'sir darajasini aniklash.

Material va asbob uskunalari. Arpa uruglari, gibberellin (GK-3), agar-agar, kartoshka kraxmali, buyovchi eritma tayyorlash uchun kaliy yod va metalli yod, etil spirti, skalpel, pintsetlar, filtr kogoz, Petri likobchasi, 700 ml li issiklikka chidamli stakanlar, eritma tayyorlash uchun ulchov idishi, eletroistgich va termostat.

Tushuntirish. Retardantlar ta'sirining farkini aniklash bilan birga ular aralashmasining usishni boshkaruvchi faolligi aniklanadi. Retardant aralashmada bir xil ta'sirli preparatlar kullanilganda, additiv samara yuzaga keladi. Retardant aralashmada turli ta'sirli preparatlar kullanilganda esa tarkibiy kismlar sinergizmi yuzaga keladi.

Tarkibiy kismlar sinergizmi vazifasi bir vaktning uzida xam gibberellin biosintezini tuxtatishga, xam gormon retseptor birikmasining yuzaga kelishiga tuskinlik kilishdan iborat. **Sinergin** retardantlar aralashmasi usish tezligini susaytirishda kullaniladigan preparatlar mikdorini sezilarli kamaytiradi va bu moddalarni tabiy sharoitda insonlar ist'mol kilishining zararsizligini ta'minlaydi.

Ishning borishi. Arpa urugidan murtakni kesib olib, ikkita Petri likobchasiga joylanadi, uchinchi likobchaga shikastlanmagan uruglar (masalan, xar biriga 100 tadan urug) joylanadi. Gibberellin mikdori 50 mg/l bulganda 20 ml eritma tayyorlanadi. Buning uchun tarozida 10 mg gibberellin (GK-3) tortib olinib 20 ml 76% li etil spirtida eritiladi, kolbadagi eritma mikdori distillangan suv bilan 50 ml gacha yetkaziladi. Sung shu eritma 5 ml olib, tsilindrga solinadi va distillangan suv bilan uning mikdorini 20 ml ga yetkaziladi. Eritma Petri likobchalariga joylangan murtagi olingan uruglar ustiga kuyiladi. Kolgan ikkitasiga 20 ml dan distillangan suv solinadi. X,ar bir donli Petri likobchasi ustiga tajriba rakamlari yozilib xarorati 26⁰-29⁰ S bulgan termostatga 24-48 soatga kuyiladi.

Kraxmalli agar tayyorlash. Buning uchun issikga chidamli stakanga 6 g mayda kirkilgan agar-agar joylanadi, ustiga 300 ml distillangan suv solinadi va agar tula erigunga kadar, 6 g kraxmal bilan 30 ml sovuk suv shisha tayokcha yordamida aralashtirilib, kaynab turgan agarining ustiga solinadi va kaynaguncha kizdiriladi. Issik eritma oldindan **kizdirilgan** Petri likobchalariga 5-7 ml dan solinadi.

Yodli kaliy yod eritmasini tayyorlash. Buning uchun 2 g kaliy yod 5 ml distillangan suvda eritiladi, 1 g metal yodi solinadi va eritma tula erigandan sung unga 295 ml suv kushiladi va tuk rang idishga solinib zich tikin bilan yopib kuyiladi.

Petri likobchalaridagi kraxmalli agar sovigandan sung, skalpel bilan uchta bir xil sektorga bulinadi va inkubatsiya variantlariga muvofik belgilanadi. Termostatda inkubatsiyalangan uruglar teng ikkiga bulinadi va kesilgan tarafi bilan Petri likobchasidagi agar yuzasiga joylanadi. Inkubatsiyaning xar bir varianti uz sektoriga joylanishi kerak. Bir soatdan sung urug pallalar extiyotkorlik bilan agardan olinadi va birinchi sektordagi agarli yuzaga kaliy yodli yod eritmasi solinadi va bir necha soniyadan sung tukiladi. Urug pallalar yotgan joy okish rangga kiradi, bu amilaza ta'sirida kraxmalning eriganidan va bu ferment urug pallalarda sintezlanganligidan darak beradi.

Retardant aralashma komponentlarining uzaro ta'sir darajasi kuyidagi formulada aniklanadi:

$$(X, U) = \frac{A - K}{X + U - 2K}$$

Bu yerda:

(X, U) - uzaro ta'sir koeffitsenti

A - ikkita retardantning birgalikda ta'sir ettirilganda usimtalar uzunligi X - usimtalarning birinchi retardant ta'siridagi uzunligi U - usimtalarning ikkinchi retardant ta'siridagi uzunligi K - kontrol usimtaning uzunligi X - usimtalarning umumiy uzunligi

HCP0,95

Agar $(X, U) 1+ \frac{HCP0,95}{X}$ dan katta bulsa aralashmadagi retardant sinergik ta'sirga ega,

HCP095

HCP095

Agar $(X, U) 1- \frac{HCP095}{X} < (X, U) < 1+ \frac{HCP095}{X}$ retardantlar ta'sir additiv buladi,

HCP0

X

95

Agar $(X, U) 1+ \frac{HCP0}{95}$ dan kichik bulsa retardantlar eritmada bir-biriga ontogonistdir.

4 - ish: Fitoregulyatorlar yordamida kartoshka tuganaklari tinch xolati va usishini boshkarish.

Material va asbob uskunalari. Kartoshka tuganaklari, giberellin, 2-xlor etil fosfon kislotasi yoki shunday asosli preparatlar, etil spirti, tuganaklarni ivitishga eritmalar tayyorlash uchun idishlar, termostat va polietilen xaltalar.

Tushuntirish. Ba'zi janubiy rayonlarda, jumladan Uzbekiston xam bir yilda kartoshkadan ikki marta xosil olsa buladi, lekin bu imkoniyatlardan kam foydalaniladi. Bunga sabab ikkinchi marta ekish uchun uruglikning kamligidir. Oldingi yilgi uruglarni ekishgacha saklash kiyin bulib, bu yilgi xosil esa xali fiziologik tinch xolda buladi. Bu xolatni buzib, ularni ekishga tayyor kilish mumkin. Buning uchun tuganaklar usishini tezlashtiruvchi fitogormonlar mikdorini tusatdan oshirib, gibberellin bilan ishlov beriladi.

Kartoshkani saklashda tuganaklarning tinch xolatdan muddatidan oldin chikishida usish ingibitori abstsiz kislotasining parchalanishi yuzaga keladi. Tuganaklarni saklashga joylashdan oldin ularga etilen produtsentlari bilan ishlov berish abstsiz kislotasi biosintezining kupayishini ta'minlaydi va shu bilan tuganaklarning yaxshi saklanishiga olib keladi.

Ishning borishi. Gibberellin va 2-xloretilfosfat kislotalari eritmalarini tayyorlash. Tuganaklarni 5 dakika shu eritmalarda buktirib, sung filtr kogos bilan kuritiladi, polietilen paketlarga joylab (xar biriga ishlov variantlari yozilgan yorlik solib) va 26⁰-29⁰ S xaroratdagi termostatga kuyiladi. yetti kundan sung usgan

kurtaklar xisoblanadi. Olingan natijalarga karab tinch xolat va usish tezashtiruvchilarining optimal mikdori aniklanadi.

Adabiyotlar

1. Bolshoy praktikum po fiziologii rasteniy. /Pod red. B.A.Rubina. M.: Vysshaya shkola. 1978.
2. Viktorov D.P. Malyy praktikum po fiziologii rasteniy. M.: Vysshaya shkola. 1975.
3. Defling K. Gormony rasteniy. Sistemnyy podkhod. M.: Mir, 1985.
4. Nikell L. Dj. Regulyatorы rosta rasteniy. M.Mir, 1984.

III. Gen muxandisligi.

1 - mavzu: Plazmid DNK sini ajratish va tozalash usullari.

1 - ish: Qaynatish usuli yordamida preparativ plazmid DNK sini ajratish.

Material va asbob uskunalar. 4 ta studentga 400 ml tungi rT plazmidli Agrobacterium tumefaciens C58 va rSH plazmidli Agrobacterium rizogenes kulturasini.

2 ta studentga: 10 ml STET buferi; 0,9 ml TES - buferi; 50 ml li kolba; 1 ml lizotsim eritmasi (20 mg/ml); sekundomer va 1 ml li avtomat pipetkalar.

Guruxga: 0,65 g agaroz, 0,5 l elektroforez buferi, 12-21 V "Bekman" tsentrifugasi, 18-80 M "Bekman" ultratsentrifugasi, -20 S xaroratli muzlatgich kamera yoki -18⁰ S xaroratli muzlatgich, 100⁰ S xaroratli suv xammomi, muz xammomi, elektroforez apparati, doimiy tok manbai va xemiskop.

Shtamm va ozika muxitlar: Agrobacterium tumefaciens S 58 va Agrobacterium rizogenes Ri A4 shtammlari, biomassa ustirish uchun (agarli) Xottikler yoki LD buloni.

Tushuntirish. Xozirgi vaktida plazmid DNK olishning kupgina usullari mavjud. Barcha usullar muolajalarida asosiy 3 ta jarayon amalga oshiriladi: bakterial xujayralarni ustirish (iloji boricha plazmid DNK amplifikatsiyasini kuchaytirish), bakterial xujayralar lizisi va plazmid DNK ni tozalash. Plazmid DNK ni ajratish va tozalashning barcha usullari xromosoma va plazmid DNK larning fizik-kimyoviy xususiyatlarining farkiga asoslangan. Ikkinchidan plazmidlar xujayralardan kovalent yopik shaklda xam ajratilishi mumkin, bunda xromosoma DNK si ajratish jarayonida bir zanjirli bulaklarga bulinib ketadi. Bu DNK bulaklari odatda katta molekulyar ogirlikka ega bulib, ular ajratish jarayonida denaturatsiyaga uchragan oksillar va xujayra kobiklari bilan birga chukmaga tushadi, plazmid DNK si esa suyuqlik kismida koladi (tinik xujayra lizatida). Agar xujayralar lizisi xromosoma DNK sini tanlab denaturatsiya kiluvchi sharoitda olib borilsa plazmid DNK sining kup mikdorda chikishi ta'minlanadi. Buning uchun bakterial xujayralarga ishkori va issiklik bilan ishlov beriladi. Sung denaturatsiyalangan maxsulotlar differentsial tsentrifugalash usuli yordamida chuktiriladi. Bir kancha usullar orkali xujayra lizatini tiniklashtirib, sung kerakli mikdorda plazmid DNK ning toza preparatlari olinadi va ularni transformatsiyalash va restriksiyalash tajribalarida ishlatish mumkin.

Gen muxandisligi maksadlari uchun yukori tozalikka ega plazmid DNK kerak. Buning uchun plazmid DNKsini preparati etidium bromidli CsCl ning zichligi gradiyentida ultratsentrifugalanadi. Etidium bromid DNK ga urnashib olib, tseziy xlorid zichligi gradiyentida DNK ning suzish zichligini kamaytiradi. Etidiy bromididning DNK bilan boglanishi DNK ning kaysi shakldaligiga bogoik. DNK ning tugri shaklli molekulalari kup mikdordagi, kovalent yopik shakllari esa kamrok mikdordagi etidiy bromidid bilan birikadi. SHuning uchun etidiy bromididli CsCl gradiyentida DNK ning tugri shaklli va ochik xalkali shakllarining suzish zichligi kamyadi, aksincha esa xalkali kovalent yopik DNK molekulalari zichligi kam mikdorda uzgaradi. SHunday kilib, etidiy bromididli CsCl gradiyentida ultratsentrifugalash DNK molekulalarini shakliga karab ajralishiga olib keladi va shu bilan plazmida DNK sining tozaligini ta'minlaydi.

Ishdan maksad - Agrobakteriyalar Ti va Ri plazmid DNK larini ajratish.

Tajriba rejasi. Bakterial xujayralar tsentrifugada chuktilirilib, STET - buferida suspendirlanadi. Xujayradagi xromasoma DNK si va oksillarni chuktilirish uchun suspenziyaga lizotsim solib kaynatiladi. TSentrifugalanib, denaturatsiyaga uchragan oksillar va xromasoma DNK si chuktiliriladi. Suyuk kismiga RNKaza fermenti bilan ishlov beriladi va plazmid DNK si etanolda chuktiliriladi, sung TES - buferida eritiladi va agarozali gel elektroforezda taxlil kilinadi.

Ishning borishi. Bu tajribani bajarish uchun talabalar ikkitadan birlashadi. Xar bir juft bitta shtammdan DNK ajratadi. Bir kun ustirilgan kultura (400 ml) 3000 aylana/dak. tezlikda 30 dakika tsentrifugalanadi. Xar bir kultura chukmasi 10 ml STET - buferida suspendirlanadi va 50 ml li Erlenmeyer kolbasiga solinadi. Suspenziyaga 1 ml lizotsimning suvdagi eritmasi (20 mg/ml) kushiladi va tez aralashtirib aralashma isitgichga kuyiladi. Birinchi kaynash alomatlari kurinishi bilan kolbani, 40 sekundga kaynab turgan suv xammomiga joylanadi, sung olib tezlik bilan muz xammomiga 5 dakika kuyiladi. Xosil bulgan yopishkok (shilimshik) lizatni tsentrifuga probirkalariga teng mikdorda solib 25000 ayl/dak. tezlikda 4⁰ S da 30 dakika tsentrifugalanib, xromosoma DNK si va denaturatsiyalangan oksillardan tozalanadi. Sung tinik suyuklik shisha, tsentrifuga probirkalariga solinadi va 10 mg/ml mikdordagi RNKaza bilan xona xaroratida 1 soat inkubatsiyalanadi. Suyuklikka teng mikdorda izopropanol kushib, muzlatgichga -20⁰ S ga 1 soat kuyiladi. Sung 3000 ay/dak. tezlikda 20 dakika tsentrifugalanadi. CHukma xavoda kurtiladi va 0,9 ml TES - buferida eritiladi.shu eritmadan 20 mkl olib agarozali gelda elektroforez kuyiladi va plazmidning borligi tekshiriladi.

DNK eritmasiga 1 g tseziy xlorid solib eritiladi va -4⁰ S da saklanadi.

2 - ish: Etidiy bromididli CsCl - gradiyentida plazmid DNK sini tozalash.

Material va asbob uskunalar. 1 mshgulot. Ikkita talaba uchun: 0,1 ml etidiy bromid eritmasi (5 mg/ml); refraktometr; 1, 20, 200 mkl li avtomat pipetkalar; 50 Ti rotori uchun tsentrifuga polliallomer probirkalari kopkoklari bilan; 5 ml vazelin yogi; 5 ml li shprits.

Guru* uchun: 1 g tseziy xlor, 1 ml TES - buferi, tsentrifuga tarozisi, Bekman ultratsentrifugasi, 50 Ti - rotori.

2 - mashgulot. Gurux uchun: ximeskop; 2-3 ta fen; J2-21 B "Bekman" tsentrifugasi; 7 g agaroz; 1 l elektroforez buferi; -20° S xaroratli muzlatgich; elektroforez apparati; doimiy tok manbai; refraktometr; 3 ml zichligi $1,772 \text{ g/sm}^3$ va 3 ml zichligi $1,446 \text{ g/sm}^3$ bulgan CsCl eritmalari.

Ikkita talaba uchun: shisha ximoya kuzoynagi: 5 ml li shprits; 10 ml li shisha tsentrifuga probirkalari; 1 ml li avtomat pipetkalar; 4 ta parafilm plenksi (2x2 sm); 25-50 ml li shisha stakan; 2 ml distillangan suv; 5 ml butanol; 0,7 ml 3 M li natriy atsetat (rN 6,0); 50 mkl TE-buferi.

Tushuntirish. Makromolekulalar va viruslarning fizik-kimyoviy taxlilida CsCl gradiyenti zichligida ultratsentrifugalash usuli samarali foyda beradi. Taxlil kilinayotgan material CsCl eritmasi bilan aralashtrilib, aralashma sedimentatsion - diffuzion muvozanat xosil bulgunicha tsentrifugalanishi, CsCl gradiyenti zichligining shakllanishining keng tarkalgan usuli xisoblanadi. Burchak rotorlardan foydalanilganda DNK ning suzish zichligida bulinishi uchun tsentrifugalash vakti 36-50 soatni tashkil etadi. Teng mikdorli gradiyent zichligi tezda shakllansa xam lekin asosiy vakt DNK molekulasini teng ogirlikdagi katoriga yigilishiga sarf buladi. Taxlil kilinayotgan material CsCl ning yukori yoki pastki katlamiga katlanmaydigan zinasimon gradiyentning shakllanishi tsentrifugalash vaktini 12 soatga kiskarishini ta'minlash mumkin. Zinasimon gradiyent usulini kullab vertikal rotorlardan foydalanilganda esa tsentrifugalash vaktini 2 soatga kiskartirish mumkin. Burchak rotorlarida DNK ning suzish zichligi buyicha tez bulinishining usullari ishlab chikilgan (6 soatda) [2]. SHu maksadda, CsCl ning uch katlamli-urta katlamning ya'ni arifmetik zichligi yukori va pastki katlamlarning zichligiga muallak bulgan gradiyenti shakllantiriladi va taxlil kilinayotgan material urta katlamga joylashtiriladi. Bunda makromolekulalarining teng ogirlikdagi zichlikkacha migratsiya masofasi kiskarishi xisobiga makromolekular ajralishi tezlashadi.

Ishning maksadi: X,ar bir juft talabalar oldingi darslarda ajratilgan plazmid DNK lari bilan ishlaydi (1-ishni bajarishda). TSentrifuga probirkasiga uch katlamli CsCl gradiyenti shakllantiriladi. Gradiyent tsentrifugalanib plazmid DNK si fraktsiyasi shprits yordamida tortib olinadi. Etidiy bromid butanolda ekstraktsiya kilinadi, tozalangan plazmid DNK si etanolda chuktiliriladi, chukma TES-buferida eritiladi va agarozali gelda elektroforez kilinadi.

Ishning borishi. 1-mashgulot. CsCl gradiyentini tayyorlash va tsentrifugalash.

Avvalgi darslarda olingan 1 g CsCl li DNK preparatiga (0,9 ml) 0,1 ml etidiy bromid eritmasi (TES-buferida 5 mg/ml) solinadi. Etidiy bromid kuchli kantserogen bulganligi sababli teriga tushishiga yul kuymaslik kerak. Refraktometr yordamida eritmaning zichligi aniklanadi, bunda refraktometr kursatkichini 1,391 ga yetkazish uchun kuruk CsCl yoki TES-buferi solinadi. Refraktometr kursatkichi 0,003 ga farklanishi mumkin. CsCl ning xamma eritmalari TES-buferida tayyorlangan bulib, tarkibida 0,5 mg/ml etidiy bromid bulishi kerak. Pastki katlamning zichligi 1,77 ($1,406$); urta katlam zichligi 1,610 ($1,391$); yukori katlam zichligi 1,446 ($1,376$) g/sm^3 ga teng bulishi kerak (kavs ichida eritmalarining refraktsiya kursatkichlari kursatilgan). Zichligi 1,772, 1,610 va 1,446 g/sm^3 bulgan eritmalar uch katlamli gradiyent shakllantirish uchun asta sekinlik bilan zichligiga mos ravishda tsentrifuga probirkasiga avtomat pipetkalar yordamida katlamlanadi. Taxlil kilinayotgan material urta katlamiga solingan buladi. CsCl katlamlarining pastki, urta va yukori

katlamlarining mikdori: ml da 3:1:3 nisbatda bulishi kerak. Eritmalarni katlamlashda xar xil zichlikdagi eritmalarining aralashib, bir-biriga utib ketishiga yul kuymaslik kerak. TSentrifuga poliallomer probirkasi tagiga 3 ml zichligi $1,772 \text{ g/sm}^3$ bulgan CsCl eritmasi, ustiga zichligi $1,610 \text{ g/sm}^3$ bulgan tarkibida DNK preparati bor ikkinchi eritma katlamlanadi va uning ustiga 3 ml zichligi $1,446 \text{ g/sm}^3$ CsCl eritmasi asta-sekinlik bilan solinadi. Gradiyent shakllangandan sung probirkalarni juda extiyotlik bilan chaykatib yubormasdan kopkoklar bilan yopiladi va shprints yordamida kopkok teshiklari orkali vazelin yogi bilan tuldiriladi. Probirkalar juft-juft kilib tsentrifuga tarozida vazelin yogi yordamida tenglashtiriladi, kopkok teshiklari vintlar bilan burab yopiladi va rotorga bir-biriga karama-karshi kuyiladi. 42000 ayl/dakika 18^0 S xaroratda 6-8 soat davomida tsentrifugalanadi.

TSentrifugalash tugashi bilan gradiyentdan plazmid DNK sini olish kerak, agar buning iloji bulmasa kecha davomida tsentrifugalanadi.

2-mashgulot. Plazmid DNK si fraktsiyalarini CsCl gradiyentidan olish va etidiy bromiddan tozalash.

TSentrifuga tuxtaganidan sung gradiyent ximeskopda (tulkin uzunligi 254 nm bulgan kiska tulkinli ultrabinafsha nurlari yordamida yoritiladi) kuriladi. UB- nurlari manbai bilan ishlaganda albatta ximoya kuzoynagidan foydalanish kerak. TSentrifuga probirkasida normal bulinish yuzaga kelganda ikkita chizik kurinishi kerak: yukori chizigida xromosoma DNK si va tugri shaklli plazmid DNK si joylashgan, pastki chizigida esa xlaka shakldagi kovalent birlashgan plazmid DNK si joylashgan. Ochik xalka shaklli plazmid DNK si xromosoma DNK si bilan bir chizikda yoki sal pastrokda joylashgan buladi. TSentrifuga probirkalaridan markaziy vintlar olinib, shprints yordamida plazmid DNK si suriladi va 10 ml li tsentrifuga shisha probirkasiga solinadi sungra plazmid DNK si preparati etidiy bromiddan butanol yordamida ekstraktsiya kilinib tozalanadi. Buning uchun DNK eritmasiga teng mikdorda butanol kushiladi (5 M CsCl bilan tuyintirilgan bulsa yanayam yaxshi), probirka ogzi parafilm yoki shisha tikin bilan yopiladi va kulda probirkani tunkarish va asl xoliga kaytarish yuli bilan aralashtiriladi. 1-2 dakikadan sung aralashma katlamlarga ajraladi, yukorigi faza (etidiy bromidli butanaol) avtomat pipetka orkali olib tashlanadi. Pastki faza (DNK ning CsCl eritmasi) rangsizlangunga kadar bu muolaja 3-4 marta kaytariladi. DNK eritmasi etidiy bromiddan tozalangandan sung unga teng xajmda distillangan suv, 1/10 xajm 3 M rN 6,0 natriy atsetat va 2 xajm sovuk etanol aralashtirib, muzlatgichga -20^0 S ga 1-2 soatga kuyiladi. DNK 3000 ayl/dak. tezlikda 1520 dakika davomida past xaroratda tsentrifugalanib chuktililadi. Etanol xidini yukotish uchun probirkani vakuum eksikatoriga 10-15 dakikaga kuyiladi. Agar buning iloji bulmasa probirkani 10-15 dakika tunkarib kuyish mumkin. ^urigan DNK chukmasi 40 mkl TE-buferida eritiladi va Eppendorf probirkasiga olinadi.

Olingan eritmalaridan 3 mkl dan olinib agarozali gel elektroforezda tekshiriladi. Plazmid DNK si preparatlarni -20^0 S xaroratda muzlatgichlarda saklash mumkin.

Adabiyotlar

1. C.F. Brunk, V.Leick. Rapid equilibrium isopycnic CsCl gradients. Biochem. biophys. Acta. 1969. vol. 179. p. 136-144.

2. M.M. Babukin, V.V. Zinchenko. Rapid separation of DNA s by buoyant bensity in three-layer CsC gradients. -Anal. Biochemistry, 1984, vol. 137, p.175-181.

2 - mavzu: Plazmid DNK sini restriksion taxlili.

1 - ish: Plazmid DNK si molekulasini restriksion endonukleazalar bilan bulaklarga bulish.

Material va asbob uskunalalar. Guruxda: 37⁰ S va 65⁰ S xaroratli termostat, xammom, muz xammomi, 0,7 g agaroz, 0,5 l elektroforez buferi, 0,5 ml U-buferi, 0,5 ml ligaza buferi, II-tip restriktazalari, elektroforez apparati, doimiy tok manbai, Eppendorf probirkalari, aralashtirgich.

Ikita student uchun: 20 mkl li avtomat pipetka, 2 ta Eppendorf probirkasi, 0,5 ml steril distillangan suv. Agrobakteriy usishi uchun ozika muxiti.

Tushuntirish. Molekulyar klonlashda restriksiya endonukleazalari (II-tip restriktazalari) dan foydalaniladi, bular kush zanjirli DNK nukleotidlari ketma-ketligi, tanish (bilish) 4-6 nukleotiddan iborat bulgan ikkinchi tartibdagi simmetriya ukiga ega bulgan saytlardan kirkadi. Agar restriktaza simmetriya uki bulab emas balki bir necha nukleotid naridan uzsa "yopishkok" uchli bulaklar xosil buladi. X,ar xil DNK bulaklarining bunday "yopishkok" uchlari bir-birlariga mos ravishda birlashadi. Restriktazalar agar simmetriya ukidan uzsa "tumtok" uchli bulaklar xosil kiladi. X,ar bir restriktaza ma'lum bir kulay sharoitda uz faolligini namoyon kiladi. Bunga xarorat, rN, reaksiya aralashmalarining ion kuchi kiradi. Bular xakida tulik ma'lumotni Maniatis va boshkalarining "Molekulyarnoye klonirovaniye" kitobidan olish mumkin. DNK bulaklarining "yopishkok" uchlari komplementar (mos) asoslari uzaro vodorod boglari xosil bulishi xisobiga juftlashadi. Bunday juftlashishlarning samarasi "yopishkok" uchlarning eritmadagi mikdoriga va eritmaning temperaturasiga boglik. SHuning uchun biror DNK bulagini vektor orkali klonlashda vektor mikdoriga nisbatan klonlanadigan bulaklarning mikdori ancha kup bulishi kerak (vektor va DNK bulaklari nisbati 1:2 dan 1:10 gacha).

"YOishkok" uchlar uzaro juftlashganida DNK ligaza fermenti yordamida kovalent bog xosil kiladi (ligirlash reaksiyasi). Buning uchun asosan T fagdan olingan DNK ligaza fermentidan foydalaniladi. DNK bulaklarining "tumtok" uchlari xam T fagi DNK ligazasi yordamida birlashadi. Tasodifan uchrashganda bunday bulaklar urtasida yangi vodorod boglari xosil bulmaydi, birlashish samarasi "tumtok" uchlarning eritmadagi mikdoriga boglik. T fagi DNK ligazasi yuzaga keltiradigan reaksiya ATF kushilganda samarali kechadi.

Tajriba sxemasi. Avvalgi mashgulotlarda ajratilgan pTi va pRi plazmid DNK lariga II-tip restriktazalari bilan ishlov beriladi. Reaksiya oxirida restriktazalar kizdrish orkali inaktivatsiyalanadi (faolligi yukolatiladi). Reaksiya samarasi DNK ni agarozali gel elktroforezida tekshirish orkali kuruladi. Ligirlash uchun bir xil restriktazalar bilan 1:10 va 10:1 nisbatda gidrolizlangan pTi va pRi plazmid DNK lari olinadi, aralashmaga ligaza buferi va T fagi DNK ligazasi solinib, 20⁰ S da 12-24 soatga inkubatsiyaga kuyiladi.

Ishning borishi. Steril Eppendorf probirkalariga pTi (A) va pRi (B) plazmid DNK lari uchun reaksiya aralashmasi tuziladi.

A. H ₂ O - 9 mkl	B. H ₂ O - 7 mkl
U-bufer - 2 mkl	U-bufer - 1 mkl
pTi DNK si (1mg/ml) - 7 mkl	pRi DNKsi (1mg/ml) - 1mkl
R-ferment - 1 mkl	R-ferment - 1 mkl
(20 birlik/mkl) - 2 mkl	

Xar bir reaksiya aralashmasi tebratkichda aralashtirilib, 37⁰ S xaroratda 2 soat inkubatsiya kilinadi. Sungra probirkalar 65⁰ S suv xammomiga 10 dakika kuyiladi va tezda muz xammomida sovutiladi. Probirkalardan 2 mkl dan alikvotalar olinib, 8 mkl elektroforez buferi va 10 mkl antikonveksion eritma bilan aralashtiriladi va 0,8% agarozali gelda (20 v/sm) 1,5-2 soat davomida elektroforez kilinadi.

Restriktazalar xona temperaturasida tez inaktivatsiyaga uchraydi shuning uchun ularni -20⁰ S xaroratda saklash zarur, muzlatgichdan fakatgina ishlashdan oldin muz xammomiga olinadi. Agar restriksiya oxirigacha yetgan bulsa, ya'ni DNK bulaklari xosil bulsa unda probirkadagi A va B aralashmalar birlashtirilib, aralashmaga 30 mkl ligaza buferi va 2 mkl DNK ligaza (10 bir/mkl) solinadi va 20⁰ S da 12-24 soat inkubatsiya kilinadi. Agarda restriksiya oxirigacha ketmagan bulsa u xolda restriktazalar bilan kushimcha ishlov beriladi.

Adabiyot

1. T.Mannatis, E.Frich, Dj.Zamburk. Molekulyarnoye klonirovaniye. M., Mir, 1984, s. 107-117, 135

Agrobakteriyalar uchun ozika mux,iti					
YEB (transformatsiya uchun)		TY (Ti - plazmida ajratish uchun)		RM (Ti - plazmida ajratish UCHUN ¹)	
Gusht ekstrakti	5 g	Achitki ekstrakti	3 g	Pepton	0,4%
Achitki ekstrakti	1 g	Tripton	5 g	MgCl ₂ - 2mM	
Pepton	5 g	H ₂ O	1 l	pH - 7,2	
Saxaroza	5 g	pH - 7,2			
MgSO ₄ - 1 M	2 ml				
H ₂ O	1 l				
pH - 7,2					

I. Agrobakteriy Ti - plazmid DNK sini ajratish usullari (T.C.Currier, E.W.Naster. Annal. Biochem. p. 76, 431 - 441, 1976)

1. 12-14 soat davomida 5x10⁸ - 2x10⁹ x,uj/ml zichligigacha ustirilgan 1 l kultura.
2. TSentrifuga yordamida chukturib, ikki marta TE-buferida yuviladi -60⁰ S da muzlatib kuyish x,am mumkin (atseton va kuruk muz).
3. Pronaza V (oldindan boshka koldik fermentlarning faolligini inaktivatsiya kilish uchun 37⁰ S ga 2 soat kuilgan) oxirgi mikdori 500 mg/ml va SDS-1% 200 ml TE-buferida kushiladi va 37⁰ S ga 40-45 dakika davomida inkubatsiyalanadi. 2 dakika davomida chaykatib aralashtiriladi.
4. Lizat rN i 12,1-12,3 gacha yetgunicha 3 N NaOH kushiladi va 10 dakika davomida aralashtiriladi.

5. rN i 8,5-9,0 bulishi uchun 2 M rN 7,0 bulgan trisdan foydalaniladi.
6. Lizatga 200 ml 3% NaCl bilan tuyintirilgan fenol solinadi va 5 dakika chaykatib aralashtiriladi, (bir zanjirli DNK ni yukotish uchun).
7. Suvli fazani ajratib, teng mikdorda xloroform-izoamil spirtida ekstraktsiya kilinadi (24:1) (fenolni yukotish maksadida).
8. Suvli fazani ajratib, 10% li PEG-600 bilan kechasiga 4⁰ S da koldirib DNK chukhtiriladi.
9. 700 ayl/dak. tezlikda 10 dakika tsentrifugalanib PEG chukhtiriladi.
10. CHukma TES-buferi bilan yaxshilab pipetkalanadi va 4⁰ S da 2 soat koldiriladi.
11. PEG dan tozalash uchun 10 dakika 18000 ayl/dak. tezlikda yoki 1 soat 7000 ayl/dak. Tezlikda tsentrifugalanadi. Etidiy bromidid kushib 30000 ayl/dak. tezlikda 60 soat davomida tsentrifugalanadi.

II. Uslulni modifikatsiyalash. (Koekman et al., Plasmid, 4, 184-195, 1980)

1. CHaykatib aralashtirish boskichi bekor kilinadi.
2. Lizat neytrallangandan sung 1 M NaCl eritmasida 4⁰ S xdroratda 4 soat inkubatsiya kilinadi.
3. Xromosoma-membrana kompleksi 5000 ayl/dak. tezlikda chukhtiriladi.
4. Suyuk kismiga 120 PEG solinadi, 4⁰ S da kecha davomida inkubatsiya kilinadi.
5. CsCl dan sung, bromid etidiy 20 SSC bilan tuyintirilgan izoamil spirtida ekstraktsiya kilib, dializlanadi va 0,5 M li NaCl bilan tuyintirilgan fenol bilan ekstraktsiya kilinadi, fenoldan tozalash uchun xloroform bilan aralashtirilib tsentrifugalanadi va DNK etanolda chukhtiriladi.

III. Ti - plazmid DNK sini olish (J.Den. Microbiol., 113, 229-242, 1979. Casse et al. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis).

1. Bakteriyalar 50 ml ozika muxitida ustiriladi (kandsiz). Eksponentsial faza oxirida chukhtiriladi.
2. Oxirgi mikdori 1 M gacha NaCl solinadi va 30 dakika chaykatib, aralashtiriladi.
3. TE-bufer (0,05 M tris, 0,02 M EDTA, rN 8,0) bilan yuviladi. CHukma TE-buferi (100 mg bakteriya 0,5 ml buferda) da eziladi.
4. 0,5 ml suspenziyaga (suyuklikka) 9,5 ml lizis kiluvchi bufer (TE-bufer 1% SDS, pH 12 45 ml NaOH) solinadi va chaykatgichda 100 ayl/dak. tezlikda aralashtiriladi.
5. 20-25 dakika 34⁰ S xaroratda inkubatsiya kilinadi.
6. Magnitli aralashtirgichda 2 dakika 100 ayl/dak. tezlikda aralashtirilib, suyuklikning rN 8,5-9,0 gacha 0,6 ml rN 7,0 bulgan tris-bufer kushish orkali kamaytiriladi.
7. Lizatga 3% gacha NaCl solinadi va 30 dak. inkubatsiya kilinib, 3% NaCl va suvda tuyintirilgan fenol solinadi.
8. Ikkala faza magnit aralashtirgichda 300 ayl/dak. tezlikda 10 sek, sung 100 ayl/dak. tezlikda 2 dak. aralashtiriladi.
9. 10 dak. 5000 g da tsentrifugalanadi va ustki faza yigib olinadi.
10. Suyuklikka 0,3 M gacha Na atsetat va 2 xajm sovuk etanol kushib, kecha davomida DNK chukhtiriladi.
11. -10⁰ S da 12000 g 20 dak. tsentrifugalanib DNK chukhtiriladi.

12. CHukma 100 mkl TES-buferi (0,05 M tris, 0,005 M EDTA, 0,05 M NaCl, rN 8,0) da eritiladi va -20° da saklanadi yoki CsCl bilan tozalanadi.

Adabiyotlar

1. T.C.Currier, E.W.Naster. Annal. Biochem. p. 76, 431 - 441, 1976
2. Koekman et al., Plasmid, 4, 184-195, 1980
3. J.Den. Microbiol., 113, 229-242, 1979. Casse et al. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis

Mikroorganizmlarni ustirish uchun ozika muxitlari

Distillangan suvda tayyorlanadigan suyuq ozika muxitlarining g/l tarkibi berilgan. Xottinger buloni vodoprovod suvida tayyorlanadi. Bakteriyalarni ekish uchun suyuq muxitga 15 g/l agar solinadi.

Xottinger buloni. Tarkibiga 100 mg azot amini va 5 g/l NaCl kiruvchi Xottinger bulonidan foydalaniladi. Avtoklavda 1 atmosferada 30 dakika sterillanadi, sterilizatsiyadan keyin rN 7,3 bulishi kerak. Sterilizatsiyadan sung 2 g/l (5 ml 40% li eritmada) glyukoza solinadi.

LB muxiti (Lauria-Bertani)

Baktotripton 10 g
Achitki ekstrakti 5 g
NaCl 5 g

Sterilizatsiyadan oldin NaOH bilan rN 7,4 gacha olib boriladi, avtoklavda 0,5 atmosferada 30 dakika davomida sterillanadi. Agrobakteriy RA4 uchun LB muxitida rifampitsin antibiotiki (oxirgi mikdori 50 mkg/ml) buladi. Rifampitsin 96% li etanolda eritiladi (10 mg/ml boshlangich eritma).

Bufer eritmalar.

STET: 8% saxaroza, 5% triton X100, 50 mM EDTA, 50 mM tris-HCl, pH 8,0
TES: 50 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0
TE: 50 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

U-bufer. REB: 50 mM NaCl, 10 mM HCl, 10 mM MgCb, pH

7,5 Ligaza bufer.

(x10): 0,66 M tris-HCl, 50 mM MgCb, 50 mM ditiotreytol, 10 mM ATF, pH 7,5
TBE: 89 mM tris- HCl, 89 mM H₃BO₃, 2,5 mM EDTA, pH 8,2
SSC: 0,5 M NaCl, 0,015 M natriy nitrat, rN 7,0

Antikonveksion: 40% glitserin yoki saxaroza, 0,15 bromidfenolkuk.

Fenol. Fenol bilan ishlaganda extiyot choralarini kurib, rezina kulkop va ximoya kuzoynaklaridan foydalanish kerak. Suv bilan tuyintirilgan va kayta xaydalgan fenoldan foydalaniladi. Reaktivli banka issik suvli suv xammomiga joylanadi, erigan fenol (erish darajasi 41° S) extiyotkorlik bilan xavo sovitgichli

kayta xaydash kolbasiga solinadi (suvli sovutgichdan foydalanish mumkin emas, fenol kotib, sovutgichga tikilib kolishi mumkin), kaynash markaz xosil kilish uchun pemza yoki shisha kapillyarlar kushiladi (isitish kaynash nuqtasidan utsa fenol portlashi mumkin) va 181°S da kum xammomida boshka idishga olinadi, olinadigan fenol mikdorining 10-15% mikdoriga teng distillangan suv solinadi. Odatda, yangi xaydalangan fenol ishlatiladi, yukoridagi xolatda fenolni -4°S da bir oy mobaynida muzlatgichda saklash mumkin, u rangsiz bulishi kerak. Ishlatishdan avval fenol DNK deproteinizatsiyalanadigan bufer bilan tuyintiriladi. ^atlamlangandan sung, fenol pastki fazani tashkil kiladi, yukorigi faza pipetka yordamida olinadi. Tuyintirish fenol rN 7,5-8,0 bulgunga kadar 2 yoki undan kuprok marta deproteinizatsiya olib borilgan xaroratda olib boriladi.

Bakteriya shtammlarini saklash

Kupgina bakteriya shtammlari kopkogi buraladigan maxsus idishlarda 1-2 yil davomida yaxshi saklanadi. Buning uchun xajmi katta bulmagan flakonlarga 2-3 ml yarim suyuk agar (0,7%) kuyiladi. Plazmidli shtammlarni saklash uchun ozika muxitiga antibiotiklar solinadi. Bakterial kulturalar sanchib ekilib, flakonlar kopkogi maxkam buraladi va 18-24 soat davomida kerakli temperaturada inkubatsiya kilinadi. Sungra kultura 4°S da muzlatgichda saklanadi. Bakterial shtammlarni uzok vakt mobaynida (kup yillar davomida) saklash past manfiy temperaturada, -20°S da olib boriladi, -70°S bulsa yana xam yaxshi. Buning uchun kultura suyuk ozika muxitda ustiriladi, 1-2 ml dan flakonlarga kuyib chikiladi, 50% glitserindan oxirgi mikdori 15% gacha solinadi, flakon kopkogi maxkam yopiladi va yaxshilab aralashtiriladi. SHtammdan ekib olish kerak bulgan xollarda mikrobiologik ilmok yordamida suspenziya kilib olinadi (suspenziyani eritmasidan) va flakon yana muzlatgichga joylanadi.

Mikroorganizm koloniyalarini yoppasiga ekish usullari.

Kup tajribalarni bajarish uchun katta mikdordagi koloniyalarni xar xil selektiv muxitlarga ekish zarurati tugiladi. Bu kup mexnat talab kiladigan ishlarni bajarishda odatda nusxa olish texnikasi kullaniladi. Bunda dastlabki Petri likobchasidagi boshlangich materiallarning koloniyalarini bir yulda bir nechta selektiv muxitli likobchalarga ekish mumkin. Tajriba sharoitlaridan kelib chikkan xolda (dastlabki likobchadagi koloniyalar soniga, koloniyalar kayta ekiladigan selektiv muxit mikdoriga va olinadigan natijalarning anikligiga) nusxa olishning turli usullari kullaniladi. Agarda kup sonli koloniyalarni nisbatan kamrok sonli selektiv muxitlarga (bitta, ikkita yoki uchta) kayta ekish kerak bulganda, odatda baxmal yoki filtr kogozli nusxa oluvchi moslamalar ishlatiladi. Noselektiv muxitda usgan koloniyalar (agarli) xuddi shunday muxitli likobchalarga (kontrol) va selektiv muxitlarga muxrlanadi. Ammo mikroorganizmlar koloniyalari shu tarika kayta ekilganda anik natija bermaydi, bu dastlabki likobchadan selektiv muxitga nixoyatda kup mikdordagi yoki shuningdek bir xil xujayra koloniyalarining kup marta takrorlanishiga boglik (natijada muxrlangan mikroorganizmlar muxitda sust usishi, bulardan yakka xujayr koloniyalarining shakllantirish kobilyatini pasayishi yoki

aloxida xujayra revertantlaridan koloniyalarning usishi). Koloniyalardan baxmal yoki filtr kogoz bilan nusxa olishda xamma nusxalar baxmal yoki filtr kogozdagi nusxadan olinadi va replikatsiyalanuvchi likobchalar sonining oshishi bilan utkazilayotgan xujayralar soni kamayadi. Baxmalni yuvib va sterillab kup marta ishlatish mumkin. Baxmal filtr kogozi uralib avtoklavda sterillanadi.

Klonlarning replikatsiyasida ninali nusxa kuchiruvchilardan foydalanilganda anik natijalar olishga erishish mumkin. Nusxa kuchiruvchi materiallardan nusxalarni agarli muxit yuzasidan boshlangich likobchalar, matritsalarining metal plastinkalari chukurchalaridagi suspenziyalardan olish mumkin. Birinchi xolda test klonlari ma'lum tartibda boshlangich likobchalarga ekiladi. Boshlangich likobchalarni belgilashda ishlatiladigan shablon kalinligi 5-6 mm li plastmassa, metall, faner yoki kartondan iborat plastinka bulib, Petri likobchasi ulchamida, 2-3 mm kalinlikda buladi. Plastinkalarda chukurchalar uyilgan bulib, ular nusxa kuchiruvchi moslama ninalariga mos joylashgan. SHablon bulmagan takdirda belgilangan kogoz varagidan foydalanish mumkin. Dastlabki likobchalarni ninali nusxa oluvchining uzi bilan xam belgilash mumkin, buning uchun extiyotlik bilan nusxa kuchiruvchi moslama ninalari muxit yuzasiga belgilarini koldiradigan darajada tegiladi. Boshlangich likobchaga shablon buyicha steril gugurt chupi yoki kogoz lentalari ekish kulaydir. Boshlangich likobchalar bakteriyaning usishi kuringuncha termostatga kuyiladi (6-18 soat usish sharoitiga boglik xolda).

Dastlabki likobchaga mikroorganizmlar klonlarini temir nusxa kuchiruvchi yordamida ekilganda dastlabki likobcha yuzasidan bexisob selektiv muxitlarga ekish mumkin. Turli selektiv muxitlarga ekiladigan xujayralarning mikdoridagi farkni kamaytirish uchun yana boshlangich likobchadan nusxa olinadi va xar bir selektiv muxitga yoki ikki-uch likobchaga ekish mumkin. Agardagi klonlardan selektiv likobchalarga nusxa olishda kup mikdroda xujayra utadi, xuddi baxmal yoki kogoz filtr ishlatilganidek.

Matritsalaridan selektiv likobchalarga kayta ekiladigan xujayralar sonini kamaytirish uchun, agarda usayotgan koloniyalardan emas balki xujayralar suspenziyasidan olish kerak. Buning uchun chukurchali metal plastinka matritsasidan foydalaniladi. CHukurchalarning joylashishi nusxa kuchiruvchi moslama ninalarining joylashishiga mos keladi. CHukurchalarga 2-3 tomchi fiziologik eritma tomiziladi. X,ar bir chukurchada aloxida koloniyalar suspenziyasi tayyorlanadi. Bakterial xujayralarni aralashtirish va ekish uchun gugurt chuplarida yoki steril kogoz lentalaridan foydalanish mumkin.

Ba'zida replikatsiyalash urniga xar bir taxlil kilinuvchi koloniyalar selektiv muxitlarga aloxida-aloxida ekiladi. Kup bulmagan mikdordagi selektiv muxitlarga, xar bir klonning kam mikdordagi xujayralarini kayta ekish zarur bulgan xollarda yukoridagi usul ishlatiladi. Boshlangich koloniyalarni kayta ekishda uchi uchli kirkilgan kattik steril kogozlardan foydalanilsa, bu kam mikdordagi xujayralarni kuchirish va zich ekilgan likobchalardan mayda koloniyalarni kayta ekish imkoniyatini beradi.

Bakteriyalardan ishkor yordamida plazmid DNK sini ajratish.
(Birnboym-Dolining modifikatsiyalangan usuli)

Bakteriyalarda xujayra xromosoma DNK sidan tashkari xalkasimon tuzilishga ega bulgan DNK molekulalari bulib ular plazmidlar deyiladi. Plazmidlar tarkibida zaxarli moddalarga va antibiotiklarga chidamli gen mavjud. Ular mustakil ravishda replikatsiyalana oladi. SHu xususiyati tufayli plazmidlardan gen muxandisligida vektor sifatida foydalanish mumkin. Plazmidlarni ajratish asosan 3 ta boskichdan iborat.

1. Bakteriya xujayralarini parchalash (lisis kilish)
2. Plazmid DNK sini xromosoma DNK sidan ajratish
3. Plazmid DNK sini xujayra RNK sidan va oksillardan tozalash

Material va asbob uskunalar. Es^{en}ia coli bakteriyasi kloni, LV ozika muxiti, I-eritma (50 mM saxoroza, 25 mM tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), II-eritma (0,2 NaOH, 1% SDS), 5 M kaliy atsetat rN 4,8 (60 ml 5 M kaliy atsetat tayyorlash uchun 11,5 ml sirka kislotasi, 28,5 ml distillangan suv), 1 ml 96% li etil spirti, TE-bufer muzlatgich, stol tsentrifugasi, 4 ta eppendorf probirkalari, sterill shisha tayokcha, parafilm, filtr kogozi va 1 ml li avtomat pipetka. **Ishning borishi.**

1. Tanlangan koloniyani mikrobiologik sirtmok yordamida 3 ml LV ozika muxiti va antibiotikli probirkaga solinadi va kecha davomida 37⁰ S temperaturada ustiriladi (bu tungi kultura deyiladi).
2. 1,5 ml tungi kulturani eppendorf probirkasiga solinadi va stol tsentrifugasida 15 dakika 5000 ayl/dak. aylantiriladi.
3. CHukmaga 100 mkl (mikrolitr) I-eritma solinadi va aralashtiriladi.
4. Tezda 2000 mkl II-eritma solinadi va 5 dakika yaxshilab aralashtirilgandan sung muz xammomida 15 dakika saklanadi. Bunda suspenziyaning rangi okarib shilimshik xoliga kelishi kerak.
5. Ustiga sovitilgan 150 mkl 3 M natriy atsetat (rN 4,8-5,0) solinadi va yaxshilab aralashtiriladi, bunda ok chukma tusha boshlaydi (oksil va xromosoma DNK si). 5 dakika 5000 ayl/dak. tsentrifugalanadi.
6. CHukma steril shisha tayokcha yordamida olib tashlanadi va suyuk kismiga 1 ml 96% li etil spirti solinadi va plazmid DNK si chukmaga yaxshi tushishi uchun sovutgichga kuyiladi.
7. 2 soatdan sung 3 min. davomida 3000 ayl/dak. tsentrifugalanadi. CHukma xona xaroratida kuritilib 150 mkl TE buferida eritiladi va plazmid DNK si elektroforez yordamida tekshiriladi.

Agarozali gelda DNK elektroforezi.

Material va asbob uskunalar. Eletroforez apparati, gelda chukurcha xosil kiluvchi tarokcha, doimiy tok manbai, 120 ml 0,8% li agaroz, 0,5 l elektroforez buferi, antkonveksion eritma (namuna mikdoridan 1/4 - 1/5 mg/ml) 300 ml etidiy bromidli buyovchi modda (0,5 mg/ml), rezina kulkop, ximeskop, fotoapparat, sarik yoki sabzi rangli filtr, ob'ektiv uchun uzunlashtiruvchi xalka, plyonka, foto bochka, standart proyavitel va standart mustaxkamlovchi.

Tushuntirish. DNK agarozali gel elektroforezida molekulalarining ulchamiga va konformatsion xolatiga karab bulinadi. DNK molekulalarining geldagi yurish tezligi uning ulchami logarifimiga teskari proportsionaldir, demak ularning

molekulyar ogirliklarga ham berilgan kattalikdagi DNK molekulalarining gelda yurish tezligi - geldagi agaroz mikdoriga ham bog'liq. Molekulalarning samarali bulinishi uchun agaroz mikdori tugri tanlash lozim. Buni 12-jadval buyicha amalga oshirish mumkin.

Turli ulchamdagi DNK molekulalarining (tugri shaklli, kovalent-tutashgan xalkali) samarali bulinishi uchun ishlatiladigan geldagi agarozaning (%) mikdori.

12-jadval

Agarozaning mikdori (%)	DNK molekulalarining ulchami m.j.n. da
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Bir xil kattalikdagi lekin turli konformatsion xolatdagi DNK molekulalari (buralgan yopik xalkali, ochik xalkali va liniyal shakllari) agaroz gelida turli tezlikda yuradi. Ularning kiyosi elektroforetik xarakati ma'lum darajada elektroforez kuyish sharoitlariga buferning ion kuchiga, tok kuchiga va agarozaning mikdoriga bog'liq. Maxsus usullar yordamida DNK molekulalarining konformatsion xolati bilan ularning geldagi joylashgan joyi orasidagi moslikni aniklash mumkin. Ushbu amaliyotda ishlatiladigan elektroforezning standart sharoitida DNK ning kichik molekulyar ogirlikdagi ($30 \cdot 10^6$ daltongacha bulgan) buralgan xalkasimon shakli katta bulmagan tezlikda xromosoma DNK sidan oldinda yuradi, katta molekulyar ogirlikga ($30 \cdot 10^6$ daltondan yukori bulgan) ega bulgan molekulalari esa kamroq tezlikda yuradi va gelda xromosoma DNK sidan yukorida joylashadi.

Ishning borishi. Elektroforez apparatini yigish.

Agarozali gel elektroforez gorizonta va vertika kurilmalar yordamida olib borish mumkin. Anik natijalar olish uchun gorizonta kurilmalar oddiy tuzilishga ega bulib va ishlash uchun juda kulaydir. Agar organika shishadan yasalgan turtburchak

idish (kyuveta) bulib, ikki chetida doimiy tok manbaiga ulanadigan platinali elektrodlar joylashgan buladi. Kyuveta tagiga apparatga kuyiladigan buferning xajmini kupaytirish uchun va gel bilan ishlashga kulayligi uchun organika shisha plastinka-taglik kuyiladi.

Agarozali gel tayyorlash. Kerakli mikdorda agaroz tortib olinadi va kerakli mikdorda bufer eritma solinadi va agar eriguncha (suv xammomida) kaynatiladi. Agaroz batamom erib ketganidan sung $50-55^{\circ} \text{C}$ gacha sovitiladi, tezda plastinka taglikka kuyiladi va chukurchalar xosil kilish uchun tarokcha (grebenka) kuyiladi. Tarokchani shunday kuyish kerakki tarok tishlari gel kuyilgan bilan plastinka tagiga 0,5-1 mm oralik kolsin. Gel kotganidan sung (30-40 dak. xona xaroratida) tarokcha

geldan sekin olinadi va elektroforez apparatiga joylab elektroforez buferi geldan 2-3 mm yukorigacha tuldiriladi.

DNK namunalarini gelga solish. DNK namunalri antikonveksion eritma bilan aralashtiriladi, avtomat pipetkalar (20-200 mkl) yordamida gelga extiyotkorlik bilan solinadi. Antikonveksion eritma tarkibida buyovchi modda (bromid fenol kuk-0,0025%) tutib, uning yurishiga karab elektroforez jarayonining borishini kuzatish mumkin. Bundan tashkari yana saxaroza (40%) bulib u DNK namunasining elektroforez buferi bilan aralashib ketmasligini ta'minlaydi. Odatda namuna mikdorining 1/4 - 1/5 mikdoricha antikonveksion eritma solinadi.

Namuna solingandan sung apparatning kopkogi yopiladi, doimiy tok manbai yokiladi va kerakli kuchlanish kuyiladi (DNK gelga kirguncha 20 V sungra 100-120 V).

Elektroforez odatda kuk buyok gel oxiriga (1-2 sm kolgunicha) yetgunicha olib boriladi. 0,5-0,7 % li agarozali gel elektroforezida kuchlanish 100-120 V bulganda 2 soat davom etadi.

Gelni buyash. Elektroforez tamom bulganidan sung kurulma tok tarmogidan uziladi, gelli idishcha fotografiya kyuvetasiga olinadi va bromid etidiy (0,5 mkg/ml distillangan suvda) solinadi va 40-60 dakika davomida buyaladi. Sung buyogi tukiladi (albatta rezina kulkop bilan ishlash kerak), gel distillangan suvda chayiladi va (shisha kuzoynak bilan) transillyuminatorda kuruladi.

Gelni rasmga olish. Zarur bulgan xollarda gel rasmga olinadi. Buning uchun ochik diafragmada sarik yoki sabzi rang filtrlarida rasmga olinadi. Ekspozitsiya empirik tanlanadi (odatda 5-10 dak). Gel akslanuvchi yoki utuvchi ultrabinafsha nurlarida (254 nm) ultrabinafsha nuri manbai tizimiga boglik ravishda yoritiladi.

Adabiyot

1. V.M.Glazer, V.V.Zinchenko, S.V.Kameneva, S.V.Shestakov. Bolshoy praktikum po genetike mikroorganizmov. Moskva Universiteti nashriyoti. 1985 yil.

3 - mavzu: Usimliklardan xujayra organoidlarini ajratish

Usimliklarni me'yor rivojlanish jarayonini yadro, xloroplast va mitoxondriya genomi uzaro xamkorlikda boshkaradi. Bu xamkorlikdagi jarayonning molekulyar mexanizmini bilish uchun xujayra organoidlari genomining strukturaviy va funktsional xossalari aloxida xamda tulik urganish lozim. Bu esa uz navbatida xujayra organoidlarini toza xolda ajratib olishni takozo etadi.

1 - ish: Guza usimligi xujayrasidan yadro ajratib olish usuli.

Material va asbob uskunalar. 50 g ikki kunlik guza usimtasi, 100 ml 70% spirt, 1 metr kapron, gomogenizator, K-23, K-32 tsentrifugalari probirkalari bilan, 2 ta stakan va 2 ta kolba.

Ishning borishi. 50 g 2 kunlik guza usimtasi 70% spirtda 2 dakika saklangandan sung distillangan suvda yuviladi. SHu yusinda sterillangan guza usimtasiga 150 ml A buferi solinadi va 30 sek. davomida yukori aylanishga ega bulgan (25000-30000 ayl/dak) utkir pichokli gomogenizatorda maydalanadi.

Gomogenat 4 kavatli sterillangan kapron yordamida filtrlanadi va xujayra bulaklarini olib tashlash uchun 10 dakika 4° S xaroratda 600 ayl/dak. tezlikda K-23, tsentrifugasida aylantiriladi va chukma tashlab yuboriladi. Supernatant 1800 ayl/dak. tezlikda 10 dakika, 4° S xaroratda K-23 tsentrifugasida aylantiriladi. CHukma 10 ml B buferi suspenziya xolatiga keltiriladi va katlamli saxaroza (1,6; 2,2 M) gradiyentining yukori kismiga extiyotkorlik bilan kuyiladi. Saxaroza eritmasi V buferi yordamida tayyorlanadi. Xrsil kilingan gradiyent 22000 ayl/dak. tezlikda 4° S xaroratda 2 soat K-23 tsentrifugasida aylantiriladi (baket rotorda). CHukmada shikastlanmagan funktsional faol yadro joylashadi. **Bufer eritmalar.**

Bufer A: 0,4 M mannit; 50 mM tris HCl, 3 mM EDTA, 1% PVP, 1 mM oktanol, 0,1%

Albumin (xayvon zardobidan olingan), rN 8,0. **Bufer B:** 50 mM tris HCl, rN 7,5, 10 iI NaCb, 10 mM MgCb **Bufer V:** 50 mM tris HCl, rN 7,5, 25 mM NaCl, 10 mM MgCb

2 - ish: G'o'za usimligi xujayrasidan xloroplast olish.

Material va asbob uskunalar. 100 g 14 kunlik guza barglari, 100 ml 70% spirt, 1 metr kapron, gomogenizator, K-23, K-32 tsentrifugalari probirkalari bilan, 2 ta stakan va 2 ta kolba.

Ishning borishi. 100 g 14 kunlik guza usimligi bargi 70% spirtga 2 dakikaga solib kuyiladi sung distillangan suvda yuviladi. Sterillangan guza bargi 400 ml A buferda 30 soniya davomida yukori aylanish tezligiga ega bulgan gomogenizatorda maydalaniladi. Gomogenat 4 kavatli sterillangan kapron yordamida filtrlanadi va 1800 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalanadi. Bunda xujayra bulaklari va yadro chukmaga tushadi. Supernatantdan xloroplast 2500 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalash yuli bilan olinadi. CHukma 20 ml A buferida suspenziya xolatiga keltiriladi va saxaroza gradiyenti yordamida (0,5 M; 0,8 M; 1,6 M; 2,0 M) tozalanadi. Saxaroza gradiyenti V buferi yordamida tayyorlanadi. Xrsil bulgan gradiyent 2200 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalanganda xloroplast 1,6 M saxaroza katlamining yukori kismiga joylashadi. Pipetka yordamida xloroplast katlami extiyotkorlik bilan olinadi va A buferda 3 marta suyultiriladi. Suyultirilgan xloroplast suspenziyasi 2500 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalash yuli bilan toza xloroplast chukmasi olinadi.

Bufer eritmalar.

Bufer A: 0,4 M mannit; 50 mM tris HCl, 3 mM EDTA, 1% PVP, 1 mM oktanol, 0,1%

Albumin (xayvon zardobidan olingan), rN 8,0. **Bufer V:** 50 mM tris HCl, rN 7,5, 25 mM NaCl, 10 mM MgCb

3 - ish: G'uza usimligi xujayrasidan mitoxondriya olish.

Material va asbob uskunalar. 50 g ikki kunlik guza usimtasi, 100 ml 70% spirt, 1 metr kapron, gomogenizator, K-23, K-32 tsentrifugalari probirkalari bilan, 2 ta stakan va 2 ta kolba.

Tushuntirish. 50 g ikki kunlik guza usimtasi xuddi yadro ajratish usulidagidek sterillanadi, maydalanadi va filtrlanadi. Olingan gomogenat 10 dakika davomida 3000 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalanib xujayra bulaklari, yadro va xloroplastdan xalos buladi. Supernatant 15000 ayl/dak. tezlikda 45 dakika tsentrifugalanib

mitoxondriya chuktirib olinadi. CHukma 20 ml A buferda suspenziya xolatiga keltirilib katlamli saxaroza gradiyentida (0,6; 0,9; 1,6 M) 22000 ayl/dak. tezlikda 2 soat tsentrifugalash yuli bilan (shikastlangan mitoxondriyalardan, kraxmal donachalaridan) tozalab olinadi. Toza mitoxondriya 1,6 M saxaroza katlamining tepa kismida joylashadi. Pipetka yordamida mitoxondriya katlami extiyotkorlik bilan olinib, A buferda 3 marta suyultiriladi va 15000 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalash yuli bilan toza mitoxondriya chuktirib olinadi. **Bufer A:** 0,4 M mannit; 50 mM tris HCl, 3 mM EDTA, 1% PVP, 1 mM oktanol, 0,1% Albumin (xayvon zardobidan olingan), rN 8,0.

4 - mavzu: Nuklein kislotalarni ajratish

Genlarni molekulyar darajada urganishda asosiy vazifa DNK va RNK preparatlarini olishdir. Rekombinat DNK texnologiyasiga asoslangan gen muxandisligi tajribalarida ajratilgan DNK genom klonlarining bankini yaratishda, ajratilgan RNK xususan mRNK kDNK bibliotekasini yaratib, birinchidan foydali genlarni aniklashda, ikkinchidan genom bankidagi klonlardan shu genlarni topish uchun zondlarga ega bulish uchun zarurdir.

^iziktiruvchi gen klonlashtirilib, shu genning strukturasi va xususiyatlari urganilgandan sung, shu klonlashtirilgan genni yana usimlik xujayrasiga transformatsiya kilish mumkin. DNK va RNK olish muolajalari transformatsiyalangan usimlik tukimalarida va butun regeneratsiyalangan kismilarida ekzogen DNK ekspressiyasini urganishda asosiy kurol bulib xizmat kiladi.

Gen muxandisligida genlarni ajratib olish, ularning strukturasi, ekspressiyasini urganishda DNK ni toza xolda ajratib olish muxim ahamiyatga ega. DNK ni ajratib olishda tukima va xujayralarni maydalash asosiy omillardan biri xisoblanadi. Bundan tashkari usimlik ekstrakti tarkibidagi juda katta mikdordagi taninlar, polisaxaridlar, pigmentlar yukori molekulyar ogirlikdagi DNK molekulasi ajratib olishda kiyinchiliklar tugdiradi.

Bularning xammasi DNK ning mikdorini spektrofotometrda ulchashda notugri natija chikishiga olib keladi. Undan tashkari restriksiya modifikatsiya fermentlarining faolligini chegaralaydi. Bu Sauzern gibridiziyalashda genlarni klonlashtirishda xalakit beradi.

Xujayra maydalangandan sung tsentrifuga yordamida maydalangan xujayra membranalari va oksillar denaturatsiya kilinib, chuktiriladi. Buning uchun xloroform- fenol-izoamil spirti aralashmasi ishlatiladi.

Kup mikdordagi DNK ni tozalash zarur bulsa tseziy xloridning suzish zichligida ultratsentrifugalash usulida maksadga erishish mumkin. DNK dializ yordamida tuzlardan tozalab olinadi va etil spirtida chuktiriladi. SHu boskichda DNK ni RNK dan va boshka ortikcha narsalardan tozalab olinadi va TE buferida eritilib spektrofotometrda mikdori ulchanadi, sung agaroza gel elektroforezi yordamida tozaligi aniklanadi.

1 - ish: Usimlik bargidan DNK ajratish. Material va asbob uskunalar. 4 g 14 kunlik guza barglari, xavoncha, tsentrifuga, tsentrifuga stakanlari,

2 ta kolba, 2 ta stakan, shisha tayokcha, refraktometr, dializ kogozi, magnitli aralashtirgich, spektrofotometr va muzlatgich.

1. 4 g barg xavonchada suyuk azot yordamida kukun xoliga kelguncha maydalanadi.
2. Kukunni 50 ml bufer V bilan birga kolbaga solinadi va 20 dakika davomida aralashtirib turiladi.
3. 30 ml fenol kushiladi va yana aralashtiriladi (30 dak).
4. K-23 tsentrifugasida 10^0 S da 5000 ayl/dak. tezlikda 1 soat aylantiriladi.
5. Ustki kismi toza kolbaga olinib teng mikdorda fenol-xloroform aralashmasi solinib, 10 dakika aralashtiriladi.
6. 30 dakika 10^0 S da 5000 ayl/dak. tezlikda tsentrifugalanadi.
7. Ustki kismini olib teng mikdorda xloroform kushib, 10 dakika aralashtiriladi va yana tsentrifugalash yuli bilan fazalarga bulinadi.
8. Suyuk kismi 2 mikdor etil spirti solingan stakanga asta sekinlik bilan aralashtirilib muzlatgichga kuyiladi. "Meduza" xosil bulgandan sung tayokchaga urab olinib 10 ml DNK erituvchi (TE) buferida stakanda eritiladi.
9. DNK eritmasiga etidiy bromid 0,2 mg/ml va 1,55 g/ml tseziy xlor solinadi (sinish kursatkichi 1,3860).
10. Suyuklik tsentrifuga probirkalariga solinadi va tenglashtirib ogzi maxkamlangandan sung 20 soat 50000 ayl/dak. tezlikda (15^0 S) tsentrifugalanadi.
11. UF nurlari ostida DNK shprints yordamida tortib olinadi.
12. DNK ni etidiy bromiddan izoamil spirtida 5 marta ekstraktsiya kilib tozalanadi.
13. DNK ni tseziy xlordan TE buferida 10^0 S da 24 soat magnitli aralashtirgichda buferni bir necha marta almashtirib dializ kilish yuli bilan tozalanadi.
14. DNK mikdorini spektrofotometrda 260 nm tulkin uzunligida kvartslı kyuvetada ulchanadi.

V buferi:

0,2 M Nad

0,05 M HQ

pH 8,0 0,01

M EDTA

0.01 M

DDT 0,2%

SDS

Fenol, 0,1 M NaCl; 0,1 M tris HCl; rN 8,0; 0,01 M EDTA bilan

tuyintirilgan. Xloroform : izoamil spirti (24:1) TE buferi 10 mM tris HCl,

rN 8,0. 1 mM EDTA

4,5 tseziy xloridning TE buferda eritmasi

Etidiy bromid eritmasi 10 mg/ml

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

2- ish: Usimlik xujayrasidan RNK ajratish.

Material va asbob uskunalalar. 5 g barg, suyuk azot, xavoncha, 2 ta 250 ml kolba, 100 ml stakan, 1 m doka, stol tsentrifugasi, tsentrifuga probirkalari, magnitli aralashtirgich, rezina nokchaga ulangan pipetka, muzlatgich, muz xammomi va spektrofotometr.

1. 5 g usimlik materialli suyuk azot yordamida muzlatiladi va xavonchada kukun xoliga keltiriladi va 250 ml li tagi yumalok kolbaga solinadi.
2. 50 ml bufer G solinadi va aralashtirib, 4 kavat dokadan utkaziladi. 8000 ayl/dak. tezlikda 10 dakika -4° S da tsentrifugalanadi.
3. Ustki suyuk kismi olinib 1/20 xajmi 10% li SDS (oxirgi kontsentratsiyasi 0,5%) solinadi.
4. Teng mikdorda suv bilan tuyintirilgan fenol, teng mikdorda xloroform, izoamil spirti aralashmasi (24:1) solinadi va magnitli aralashtirgichda 20 dakika xona xaroratida aralashtiriladi. Sung tsentrifuga probirkalariga solib stol tsentrifugasigada 2500 g da 10 dakika davomida tsentrifugalanadi. Denaturatsiyaga uchragan oksillar organik suyuklik va suv kavatlari urtasida interfaza xosil kiladi.
5. Ustki suyuk kismi va interfaza rezina nokga ulangan pipetka yordamida 250 ml kolbaga tortib olinadi va teng mikdorda xloroform solib 10 dakika davomida aralashtiriladi.
6. TSentrifugalanib fazalarga ajratiladi va ustki suyuk kismi toza 100 ml li stakanga olinib, 1/20 xajm 3M natriy atsetat va 2 xajm etanol solib -20° S xaroratda kecha davomida nuklein kislotalar chuktiriladi.
7. TSentrifugalanib chukma -4° S da ikki marta 1-2 ml rN 6, 0,3 M natriy atsetat bilan yuviladi (etanol va DNK dan tozalash uchun).
8. CHukma ikki marta tarkibida 0,1 M kaliy atsetat bulgan 80% li etanol bilan yuviladi va shu eritmada -20° S da saklanadi. RNK ning mikdorini chukmani oldindan kuritib, distillangan suvda eritib spektrofotometrda aniklash mumkin. Olingan eritmaning optik zichligini 260 nm ($1 \text{ O}_{260}=40 \text{ mkg/ml}^2$) ulchanadi. Preparatning tozaligini baxolash uchun UF nurlarining yutilishi spektri ulchanadi: toza RNK uchun - $0,3_{260}:0,3_{260}=2,0$ bulishi kerak.

Bufer eritmalar va reaktivlar:

Bufer G: 0,2 M tris HCl rN 8,5; 0,2 M saxaroza; 30 mM magniy atsetat; 60 mM KCl. Eritmalar avtoklavda sterillanib suyuk xolda yoki -20° S da muzlatib saklanadi. Ishlatishdan oldin 1% gacha polivinilpirolidon va 0,31% gacha 2 merkapoetanol kushiladi.

Xloroform: izoamil spirti (24:1), suvda tuyintirilgan fenol, 3 M natriy atsetat, 0,1 M kaliy atsetat.

Adabiyot

1. Klonirovaniye DNK. Методы. Москва, Mir. 1988.

5 - mavzu: Oksillarni ajratish

Oksil-geterogen tabiatli yukori molekulyar moddalar. Bu xususiyat oksillarni molekulyar strukturasi buyicha ajratish axamiyatiga ega. Bundan tashkari oksillar eruvchanligi buyicha va bironta eritma ta'sirida ajralishi buyicha farklanadi.

Oksillar biosintezi murakkab, kup boskichli jarayon bulib, energiya manbai, kupgina fermentlar va xujayra aloxida strukturalari ishtrok etishini talab kiladi.

Funktsional belgilariga karab konstitutiv, katalitik va zaxira oksillar ajraladi. Oksillarning asosiy strukturaviy tarkibini azotlar tashkil kiladi.

Madaniy usimliklarning turli taksonlari oksillarining tarkibi bilan farqlanadi. Bu navlar, turlar, biotiplarning genetik xususiyatiga va ularning usish sharoitiga bog'liq.

1- ish: Usimlik xujayrasidan oksil ajratish.

Material va asbob uskunalari. Usimlik tukimasi va urugi, suyuk azot, borat buferi, (rN-10), 0,2% li natriy bisulfit eritmasi, oktil spirti, atsetat kislotasining 1% va 10% li eritmalari, 0,2 n natriy gidroksid eritmasi, 50% li uchxloratsetat kilotasi, etil spirti, atseton, dietilefiri, Folin reaktivi, chinni xavoncha, tebratgich-aralashtirgich, tsentrifuga va tsentrifuga probirkalari.

1 - mashg'ulot. Usimlikdan yangi uzib olingan barg, poya, ildiz kabi vegetativ organlardan 50-100 g namuna olib, sovutgichda yoki suyuk azotda muzlatiladi. Muzlatilgan namuna chinni xavoncha yoki gomogenizatorida borat buferi eritmasi (1:4 nisbatda) bilan bir xil massa xosil bulguncha (rN 10) yanchiladi. Oksillarning eruvchanligini oshirish maksadida 4-5 tomchi 0,2% li natriy bisulfit eritmasi tomiziladi. Kupik xosil bulmasligi uchun aralashmaga 2-3 tomchi oktil spirti kushiladi. Gomogenat avval muzlatgichda muzlatiladi, sungra eritiladi va tebratgich asbob yordamida 30-40 dakika davomida chaykatiladi. Keyinchalik aralashma 5-10 dakika davomida 3000 g tezlikda tsentrifugalanadi. CHukma ustidagi eritma 500 ml xajmdagi ulchov kolbaga solinadi, chukma esa bufer eritmasi bilan gomogenizator yoki chinni xavonchada yana maydalanadi va eritma 20-30 dakika davomida chaykatilib, sung tsentrifugalanadi. CHukma ustidagi eritma ilgari tsentrifugalangan eritma ustiga kuyiladi. CHukmani ekstraktsiya kilish va tsentrifugalash 4-5 marta takrorlanadi, ya'ni oksilning ajralib chikishi tugashiga kadar davom ettiriladi. Oksil ajralib chikishining tugagan-tugamaganligini Folin reaktivi yordamida tekshirib boriladi. Oksil ajralib chikishiningtuxtaganligiga ishonch xosil kilingach, eritma xajmi bufer eritmasi yordamida 500 ml ga yetkaziladi. Agar oksilli ekstraktsiya kilish oxirigacha yetkazilgan bulsa, eritmadagi azot mikdori usimlik tarkibidagi azotning 90-95% ni tashkil kilishi kerak. Buning uchun eritmadan ma'lum mikdorda olib kislotada kuydiriladi va K'eldal usuli bilan azot mikdori aniklanadi. Topilgan azot mikdori asosida olingan material tarkibidagi azotning umumiy mikdori aniklanadi. Topilgan sonning tugriligini isbotlashda, oksilni ajratib olish uchun tayyorlangan usimlik materialidan ma'lum mikdorda olib, uning tarkibidagi umumiy azot xam K'eldal usuli buyicha aniklanadi.

Eritmaga utgan oksilni chuktirish uchun ekstrakti 700-800 ml xajmli idishga (stakanga) olib, eritma rN 4,4-4,5 ga kelguncha uning ustiga 10% li atsetat kislotasi kushiladi. Sungra eritma suv xammomida 70% da kizdiriladi va chukmaga tushgan oksil tsentrifugalash bilan ajratiladi. CHukmadagi oksilni yigish uchun 1% li atsetat kislotasidan ozrok mikdorda kushib, yaxshilab aralashtiriladi va kayta tsentrifugalanadi, keyin esa chukma ustidagi eritma extiyotkorlik bilan boshka idishga olinadi. Oksillarni yanada tozarok xolda ajratib olish zaruriyati tugilsa kayta chuktiriladi. Buning uchun tsentrifuga probirkasidagi chukma ustiga natriy gidroksidning 0,2 n li eritmasidan solib yaxshilab aralashtiriladi va suyuklik chukma bilan boshka idishga kuyib olinadi. TSentrifuga probirkasi natriy gidroksidning 0,2 n li eritmasi bilan 2-3 marta yuvilib, u xam usha idishga kuyiladi. Sung eritmadagi

oksillar tula erigunga kadar 50° S li suv xammomida shisha tayokcha bilan aralashtirib turiladi. Erimasdan kolgan xujayra zarrachalari tsentrifugalash bilan ajratib olinadi.

Eritmadan oksillarni kayta chuktirish uchun idishdagi kislotaning oxirgi kontsentratsiyasi 5% bulguncha uchxloratsetat kislotaning 50% li eritmasidan kushiladi. CHukmaga tushgan oksillarni tsentrifugalash yuli bilan ajratib olinadi. Oksillarni toza xolda olish uchun tsetrifuga probirkasidagi oksil, avvalo 5-6 marta atsetonda, 1-2 marta issik etil spirtida va 2-3 marta efirda yuviladi. Xar gal yuvilganda tsentrifugalash yuli bilan chukma ustidagi eritma tukib tashlanadi va olingan oksil xona xaroratida kuritilib vakkum eksikatorida saklanadi. Olingan oksil preparatlarining rangi usimlik turiga va uning organiga karab ok yoki kulrang kukun xolida bulib, tarkibida 14-17% gacha azot buladi. Oksil preparati tarkibidagi umumiy azot mikdori Keldel usuli buyicha aniklanadi.

2 - mashg'ulot. Usimliklar urugi tarkibidagi oksillarni ajratib olishdan oldin, ularni uglevod, lipid, nuklein kislotalar kabi moddalardan tozalash zarur. Buning uchun urug magzi ustki kobigidan ajratib maydalanadi. Maydalanib kukun xolga keltirilgan material 0,25 mm teshikli elakdan utkazilib, avvalo efirda, keyin atsetonda yuvish yuli bilan yogsizlantiriladi.

SHu usulda tayyorlangan urug kukunidan 10-15 g olib kolbaga solinadi, uning ustiga 0,2% natriy bisulfat aralashtirilgan borat buferidan (rN 10) 100 ml kuyiladi va 1 soat davomida chaykaladi. Sungra 15-18 soat sovutgichda (0° S da) tutiladi. Keyin aralashma 3-4 ming tezlikda 10-15 dakika davomida tsentrifugalanadi. CHukma ustidagi eritma 250 ml xajmli ulchov kolbaga kuyib olinadi. TSentrifuga probirkasidagi chukmani tarkibida bisulfat tutgan bufer eritmasi bilan yuvib, 100-200 ml xajmli ulchov kolbasiga utkaziladi va eritma 30-40 dakika chaykatiladi, sungra tsentrifugalanadi. CHukma ustidagi suyuklik, avvalgi 250 ml li kolbadagi eritma eritma ustiga kuyiladi. CHukmani ekstraktsiya kilish va uni tsentrifugalash jarayoni 3-4 marta takrorlanadi.

Oksillarni kayta chuktirish va tozalash, xuddi usimlik vegetativ kismalaridan ajratib olingan oksillarni tozalashdagidek olib boriladi. Uruglardan ajratib olingan oksil ok rangli kukun bulib, uning tarkibida 14-18% azot buladi.

Oksillar elektroforezi 2- ish:
Ishkoriy poliakrilamid gelda Fuza chigiti
oksillari spektrini urganish.

Material va asbob uskunalar. Oksil namunasi, vertikal elektroforez apparati, chetlari rezina prokladka bilan yopilgan shisha kamera, tarokcha, elektrodlar, doimiy tok manbai, 7 ta 100 ml li, 1 ta 2 l li kolbalar, shpirts va gelni buyash uchun idish.

Tushuntirish. Oksillar elektroforezi tabiiy aralash moddalarning tarkibini, ajratib olingan preparatlarning fraktsiyalarini, subfraktsiyalarini, ajratib olingan oksillarining spektrini aniklashda katta axamiyatga ega. Oksillar elektroforezida zaryadga ega bulgan oksil molekulalarining elektr maydonida anik bir xarakat tezligida anodga yoki katodga karab xarakati tushiniladi.

Oksillarning xarakat yunalishi molekula yoki polipeptidlarning izoelektrik nuktasiga va elektroforez uchun ishlatiladigan buferning rN iga boglik. Oksillarni

ishkoriy yoki kislotali gelda eletroforez qilish mumkin. X,ar kanday sharoitda xam oksillar yukoridan pastga karab xarakat kiladi.

Ishning borishi.

Gel tayyorlash. Poliakramid gel-atrofi rezinka tikin bilan yopilgan 2 ta shisha oyna orasiga kuyiladi. YUkori yirik teshikli kismida oksillarning mikdori yigilib, pastki-mayda gelda fraktsiyalanadi (zaryadga va molekulalarning ulchamiga karab).

Mayda teshikli gel tayyorlash uchun 1 xajm A eritmasi, 2 xajm V eritmasi, 1 xajm distillangan suv (rN 8,9), 2 xajm PSA aralashtirilib plastinka orasiga kuyiladi. Gelga xavo kirib kolmasligi va tekis chikishi uchun aralashma ustiga shprints yordamida 1 sm gacha suv solinadi. Sung 37^0 S xaroratli termostatga kuyiladi. Polimerizatsiya ya'ni (gelning kotishi) taxminan 1 soat davom etadi. Polimerizatsiyadan sung gel ustidagi suv shprints yordamida tortib olinadi va ikkinchi gel solinadi. Yirik teshikli gel solingandan sung, oksil eritmasi solinadigan chukurcha xosil qilish uchun tishlari 0,5 sm tarokcha gelga botirib kuyiladi. Yirik porali gelni tayyorlash uchun 1 xajm V eritmasi, 2 xajm G eritmasi, 4 xajm ye eritmasi, 1 xajm D eritmasi aralashtiriladi. Yirik porali gel 37^0 S xaroratli termostatda 20-25 dakikada polimerizatsiya buladi. Polimerizatsiya tugaganidan sung tarokcha olinib, tishlaridan xosil bulgan chukurcha suv bilan yuviladi, sung urganilayotgan oksil preparati solinadi (0,1 mg). Oksil eritmasi bufer bilan aralashib ketmasligi uchun 40% saxaroza va oksil bilan birikmaydigan buyok solinadi. Ishkoriy gelda bromfenolkuk (0,001 g 100 ml suvdagi eritmasi), kislotali gelda esa metil kuk yoki metil yashil buyogi ishlatiladi. X,ar bitta yacheykaga (chukurchaga) 4 mA tok kuchi beriladi. Elektroforez 45-60 dakika davom etadi. Elektroforez tugagandan sung gel 01% amidokora buyogida 20 dakika buyaladi. Gel buyalgandan sung suv bilan yuvib, 7% li sirka kislotaaning suvdagi eritmasiga solib kuyiladi.

Gel tayyorlash uchun eritmalar. A-eritmasi. 1 HO- 48,0 ml, tris- 36,0 gr, TEMED- 0,23 ml distillangan suv bilan 100 ml gacha olib boriladi.

V-eritmasi. Akrilamid- 28,0 gr. Metilen bis akrilamid (BIS)- 0,8 g, distillangan suv 100 ml gacha.

PSA-eritmasi. Peresulfatammoniy- 0,14 g , distillangan suv 100 ml.

B-eritmasi. 1 N NS1- 48,0 ml, tris- 5,98 gr, TEMED- 0,46 ml, distillangan suv 100 ml gacha.

G-eritmasi. Akrilamid- 10 gr. Metilen bis akrilamid (BIS)- 2,5 g, distillangan suv 100 ml gacha.

Elektrod buferi. Tris- 12 g, glitsirin- 5,8 g, 200 ml gacha suv.

Buyovchi va fiksatsiya kiluvchi eritma. 0,1 g amidokora, 100 ml 7% li sirka kislota.

6 - mavzu: Biologik faol moddalar xosil kiluvchi "serxosil" mikromitsetlar olish (xosil qilish).

Zamonaviy biotexnologiya fanining eng ustivor yunalishlaridan biri gen va xujayra muxandisligi usullaridan foydalanib yangi biologik faol moddalar xosil kiluvchi mikroorganizmlar yaratishdir.

Kupincha turli biotexnologiya jarayonlar yaratishda mitseliali zamburuglardan keng foydalaniladi. Ularda xakikiy jinsiy jarayon yukligi sababli, mitseliali zamburuglarni genetik tomonidan urganish fakat paraseksual usullar orkali olib boriladi. Mitselial zamburuglarni duragaylashni ikki usuli ma'lum. Birinchisi, protoplastlarni kushilishidan xosil bulgan geterokarionlarni tanlash; ikkinchisi esa, giflarni anastamoz xolatida kushilishidan xosil bulgan geterokarionlarni ajratishdir.

1- ish: Zamburug' protoplastlarini olish va ularni

kushilishi. I.I. Protoplastlarni olish usuli.

"Protoplast" deganda faol metabolizm va energiya almashish kobilyatiga ega bulgan, xujayra kobigi ichida joylashgan, xujayrani bir kismini tushinish mumkin. Protoalastlarni ajratib olish usullari rivojlangan sari tadkikotchilar protoplastlar deb mikrob xujayrasi parchalanganda xosil buladigan yarim utkazgich xususiyatiga ega bulgan tsitoplazma membranasini ataydigan buldilar. Uzoq vaqtlargacha protoplastlar asosan tsitologik izlanishning manbai sifatida karalar edi. Xozirgi paytda protoplastlar yordamida olingan mikroorganizmlarni kimmatli duragay shtammlarini sanoat mikiyosida keng kullanilmokda. Protoplastlarni kushish usuli mikroorganizmlarni genetik selektsion jarayonlarini atroflicha urganib, xujayralardan normal jinsiy usul bilan duragay olish mumkin bulmaganda, protoplastlar yordamida turlararo duragay olish mumkinligini takoza kiladi.

Protoplast asosan 3 usulda olinadi.

1. Mexanik usul
2. Xujayra devorlaridagi komponentlarni spetsifik sintezi.
3. Litik fermentlar ta'sirida xujayra devorlarini parchalash.

1. Mexanik usul bilan protoplast olish asosan kam samarali bulgani uchun deyarli kullanilmaydi.
2. Xujayra devorlaridagi komponentlarni spetsifik sintezi esa spetsifik ingibitorlarni tanlab xujayra devoriga ta'sir kilib tsitoplazmatik komponentlarga zarar yetkazmaydi.
3. Protoplastlarni bakteriya xujayralaridan litik fermentlar yordamida ajratib olishda xar xil litik fermentlardan asosan lizotsimdan foydalaniladi. Zamburuglardan protoplast olish uchun tok shillik kurti oshkozonidan ajratib olingan xitinaza fermentidan foydalaniladi.

Xozirgi paytda bir kator mikroorganizmlardan litik fermentlar ajratib olish yulga kuyilgan. Bular jumlasiga Streptomeces, Arthrobacter luteus, Bacillus circulans, Trichoderma harzianum va Actinomyces cinerosus lar kiradi.

SHuning uchun mikropreparatlardan istagancha proplast ajratib olish imkoniyati mavjuddir. Protoplast olishda litik fermentlardan tashkari osmotik stabilizatorlar xam katta vazifani bajaradi. Xujayra devorlaridagi osmotik tusik protoplastlarda tabiiy muxofazani yzkotganligi tufayli osmotik ta'sirga sezgir bulib koladi.

Stabilizatorsiz ozikada xujayrani urab turuvchi nozik tsitoplazmatik membrana ferment ta'sirida tez parchalanadi. Protoplastlarni yorilishini oldini olish maksadida litik birikmaga xar xil moddalar kushiladi, bu moddalar suyuqlikdagi osmotik bosimni xujayra ichidagi suyuqlik bosimga tenglashtiradi, shuning bilan birga stabil jarayonni ta'minlaydi. Stabilizator vazifasini utovchi moddalarning mikdori samarasiga katta ta'sir kursatadi. Stabilizator sifatida kand, kup atomli spirtlar, neorganik birikmalar, mannit, sorbit, raminoza, maltoza, saxaroza, KCl_2 , $MgCl_2$, $NaCl_2$, NM_4Cl_2 , $MgSO_4$, va boshkalar ishlatiladi. Stabilizatorning mikdori zamburuglarning turlariga karab 0,4 dan 2,0 M gacha bulishi mumkin. Stabilizatorlarni mikdori tugri tanlansa litik fermentning ta'siri kuchayadi. Protoplastlar olish imkoniyati samarali kechadi. Protoplast olish uchun suyuq boy ozikada zamburug tayyorlanadi. Boy ozikaning tarkibi - CHapek ozikasi, pepton-10g/l, achitki atolizati-1g/l. Mikroorganizmlar 16-18 soat davomida 30^0 S xaroratda chaykatish usuli bilan ustiriladi. SHuning bilan birga mikroorganizmlar suyuq ozikada chaykatgichda kechkurundan mashgulot utkazgungacha ustiriladi.

Mashgulotlar utkazish uchun kuyidagi ishlar bajariladi:

1. Otalik va onalik kulturalarning konidiyalaridan suspenziya tayyorlanadi (rangli yoki auksotrof mutantlar).
2. Buning uchun platina yoki pulat simdan yaslgan ilmok bilan agarli ozikadagi kultura sterillangan suvli probirkaga solinadi. Olingan suvli probirkada xosil bulgan suspenziyani chaykatib steril dokadan utkazish kerak.

Mundarija

KIRISH	2
I. XUJAYRA MUXANDISLIGI	
1 – Mavzu: Xujayra va tukimalarni sun'iy ozika muxitlarida ustirish texnikasi	3
1 - ish. Usimlik xujayra va tukimalarini ustirish uchun ozika muxitini tayyorlash	3
2 - ish. Ajratilgan usimlik xujayralari va tukimalari tuplamlari bilan ishlash jarayonida sterillash usullari	5
3 - ish. Steril usimtalar ustirish	8
4 - ish. Kartoshkaning apikal meristemasini ajratish va ustirish	8
5 - ish. Kulupnayning apikal meristemalarini ajratish va ustirish. Kulupnayning mikroklonal kupayishi	10
6 - ish. Kulupnayning mikroklonal kupaytirishda ildiz xosil bulish induktsiyasi	11
7 - ish. Tamakining uzak parenximasidan kallusli tukima olish va ustirish	12
8 - ish. Soya urug pallasidan kallus tukimasi olish va ustirish	12
9 - ish. Sabzi ildiz mevasidan kallus tukimasi olish va ustirish	13
10 - ish. Beda barglaridan kallus tukimasi olish va ustirish	13
11 - ish. Steril kartoshka usimligi poyasidan kallus olish va ustirish	14
12 - ish. Kallus tukimasini yangi ozika muxitga kayta ekish	15
13 - ish. Kallusni kayta ekish va kallus tukimasining usish xususiyatlarini aniklash (kartoshka misolida)	15
14 - ish. Kallus tukimalari kulturasida poya orgonogenezi induktsiyasi (kartoshka misolida)	16
15 - ish. Beda barglari kallus tukimalarida poya orgonogenezi va somatik embriogenezi induktsiyasi. Regenerant-usimliklar olish	17
16 - ish. Kartoshka kallusidan suspenziyali kultura olish	18
17 - ish. Xujayraning yashash kobilyatini va suspenziyaning agregatsiyalanish darajasini baxolsh	18
18 - ish. Suspenzion kulturadagi xujayralar zichligini xisoblash	19
19 - ish. Suspenziyani kayta ekish	20
20- ish. Suspenziyani katttik ozika muxitiga ekish (Pleyting usuli)	21
II. USIMLIK USISHI VA RIVOJLANISHINI BOSH KARUVCHI MODDALAR (REGULYATORLAR)	
1 – Mavzu: Usimliklarni genetik apparatiga fitogormonlar ta'siri	25
1 - ish. Gibberlin ta'sirida xujayra aleyron kavatlarida a-amilaza sintezining tezlashuvi	25
2 – Mavzu: Ftioiregulyatorlar yordamida usimliklarning usish va tinch xolati jarayonlarini boshkarish	26
2 - ish: Kuzgi bugdoy usimtalarida retardantlarning ta'sir usullaridagi farkni aniklash	27
3 - ish: Kuzgi bugdoy usimtalarida aralash retardantlarning ta'sir darajasini aniklash	28
4 - ish: Fitoregulyatorlar yordamida kartoshka tuganaklari tinch xolati va usishini bokarish	30

III. GEN MUXANDISLIGI.	
1 - mavzu: Plazmid DNK sini ajratish va tozalash uslublari	
1 - ish: Kaynatish usuli yordamida preparativ plazmid DNK sini ajratish	30
2 - ish: Etidiy bromididli CsCl - gradiyentida plazmid DNK sini tozalash	32
2 - mavzu: Plazmid DNK sini restriksion taxlili	
1 - ish: Plazmid DNK si molekulasi restriksion endonukleazalar bilan bulaklarga bulish	34
I. Agrobakteriy Ti - plazmid DNK sini ajratish usullari	36
II. Uslulni modifikatsiyalash	36
III. Ti - plazmid DNK sini olish	37
Mikroorganizmlarni ustirish uchun ozika muxitlari	37
Bakteriya shtammlarini saklash	38
Mikroorganizm koloniyalarini yoppasiga ekish usullari	39
Bakteriyalardan ishkor yordamida plazmid DNK sini ajratish	40
Agarozali gelda DNK elektroforezi	41
3 - mavzu: Usimliklardan xujayra organoidlarini ajratish	42
1 - ish: Guza usimligi xujayrasidan yadro ajratib olish usuli	43
2 - ish: Guza usimligi xujayrasidan xloroplast olish	43
3 - ish: Guza usimligi xujayrasidan mitoxondriya olish	44
4 - mavzu: Nuklein kislotalarni ajratish	44
1 - ish: Usimlik bargidan DNK ajratish	45
2- ish: Usimlik xujayrasidan RNK ajratish	46
5 - mavzu: Oksillarni ajratish	47
1- ish: Usimlik xujayrasidan oksil ajratish	47
OKSILLAR ELEKTROFOREZI	
2- ish: Ishkoriy poliakrilamid gelda guza chigiti oksillari spektrini urganish	49
6 - mavzu: Biologik faol moddalar xosil kiluvchi "serxosil" mikromitsetlar olish (xosil kilish)	50
1- ish: Zamburug protoplastlarini olish va ularni kushilishi	50