

## **22-laboratoriya mashg'uloti: Viruslarning yuqish yo'llarini aniqlash**

**1. Viruslarni mexanik usulda yuqtirish va uni optimallashtirish.** Mexanik usulda virus (yoki uni RNK si) hujayraga barg kutikulasidagi jarohatlar (mikrotravmalar) orqali kiritiladi. Barg kutikulasida mikrojarohatlarni diatom suvo'tlari (selit) yoki karborund (kremniy karbidi) yoki korund (alyuminiy oksidi) kabi abrazivlarni mayda kukuni (400-700 mesh yordamida hosil qilinadi (mesh 2,5 sm<sup>2</sup> (1 dyum) dagi poralar (teshiklar) soni). Abraziv ishlatilganda inokulyasiya effekti 20- 50 barobar oshadi. Avtoklavda yoki quritish shkaflarida sterillangan karborund, korund yoki selitni, yoki diatom tuprog'ini barg yuzasiga inokulyasiyadan oldinroq changlatiladi, chunki ular suvda oson cho'kadi, ammo selit ularga Qaraganda sekin cho'kmaga tushadi, shuning uchun uni inokulum bilan aralashtirib ishlatsa ham bo'ladi. Abrazivni barg satxiga changlatish uchun probirka yoki 50 ml lik hajmga ega bo'lgan kolbaga solib, uni og'zini 2 qavatli doka bilan yopib so'ngra uni changlatishda foydalanish mumkin. Inokulum bilan abrazivni aralashtirilganda uning miqdori 50-100 mg/ml bo'lishi kerak. Inokulumdan barg sathiga 1-2 tomchi virus suspenziyasidan tomiziladi va sterillangan shisha tayyoqcha, paxta yoki doka tampon yoki yaxshilab yuvilgan va artilmay quritilgan barmoqlar yordamida oxistalik bilan surtiladi. Surtishdagi kuch kattaligi bir qancha omillarga bog'liq bo'ladi: o'simlikning turi, yoshi, bargning holati, abrazivni sifati va x. Abraziv ishlatilgandan so'ng barg so'lib qolishga moyilroq bo'lgani uchun ular qurib qolishining oldini olish maqsadida bir necha soat nam atmosferada saqlash yaxshi natijalar beradi.

**2. Viruslarni payvandlash yordamida yuqtirish.** Payvandlash bog'dor chilikda qadimdan ishlatiladi. Bunda har hil o'simliklar to'qimalarning (kesmalarini) ustki tomonlarini bir-biriga yopishtirib qisib qo'yiladi, keyinchalik ular bir-biri bilan qo'shib o'sib ketadi. Odatda bir o'simlikni (payvandustni ) distal qismini ikkinchi ildizli o'simlikka (payvandtgagga) o'tkaziladi. Agar payvandustda yoki payvandtagda virus bo'lsa, payvandlashdan so'ng virus ikkinchi juftiga o'tadi va unda ko'zga ko'rinadigan kasallik simptomlar hosil bo'ladi. Birinchi marta payvandlash vositasida viruslarni yuqtirish XVII asrda Gollandiya bog'bonlari tomonidan qo'llanildi. Ular lola gultojibarglarining atlasga o'xshash simptomlar hosil qilishini bilishdi va bu o'ta yuqori baholanadigan lola xususiyatini payvandlash bilan sog'lom lola piyozlariga o'tkazishni amalga oshirib kelishdi. Asosan payvandlash bilan daraxt o'simliklarga (olma, nok, olxo'ri, olcha va sitrus o'simliklari) viruslari yuqtiriladi. Payvandlash yaxshi natija berishi uchun payvandtag va payvandustning kambiy to'qimalari bir-biriga to'g'ri kelishi va ularning moyilligi bo'lishi kerak. Moyillik esa turlar bir-biridan uzoq bo'lsa, hamda bir pallalik o'simliklarda o'ta sust bo'ladi. Payvandlashdan so'ng o'simlikni yaxlit bo'lib o'sishiga ba'zan ularni biridagi virus ham ta'sir qiladi.

Sitrus o'simliklarini payvandlashda ancha murakkab hodisa kuzatiladi. Ko'pincha iqtisodiy ahamiyati katta bo'lgan nav, payvandlangandan so'ng o'zini virusga chidamlilik xususiyatidan ayriladi. Virus yuqishi ba'zan payvandlanish amalga oshmasa ham yuz beraveradi. Taksonomik bir-biridan uzoq bo'lgan o'simliklardan *Chenopodium amaranticolor* va tok o'simliklarini ham bir-biri bilan yaqinlashtirilganda, ularning kesilgan qismlari ustida kalluslar o'sganda ham virus yuqadi. Ba'zan payvandlash yaxshi amalga oshgani bilan virus yuqmasligi mumkin. Masalan, tamakini "qaldirashi" virusi (virus po gremkovosti tabaka) kartoshkani payvandlaganda (boshqa viruslarga qaraganda) o'ta sust yuqadi, balki bu virusni o'simlik tanasi bo'ylab to'la tarqalmasligidan bo'lishi ham mumkin.

Viruslarni payvandlash usuli bilan yuqtirishning ko'pgina usullari mavjud. Masalan, eng keng tarqalganlaridan o'simlikdan qirqib olingan payvandtagga payvandustni o'tkazish va ikki o'simlikni yaqinlashtirish bilan amalga oshiriladi.

**Birinchi** usul-payvandustdagi virusni payvandtagga yuqtirishda ishlatiladi. Bu usulni har xil variantlari mavjud.

a) o'tsimon o'simliklarni payvandlaganda payvandustning pastki qismini ponasimon qilib o'tkirlashtiriladi.

b) daraxtsimon o'simliklarni kurtak payvand qilish yo'li bilan (payvandust bo'lib kurtak xizmat qiladi).

v) malinaga o'hshash o'simliklarni shohlarining suvli idishga solib ("butilka usul"), kartoshka, zemlyanika va boshqa o'simliklarni ham payvandlash orqali ularga virus yuqtirish mumkin. Yaqinlashtirib payvandlanganda ikkala partnyor ham ildiz qismini saqlab qoladi.

A. Daraxtsimon o'simliklarni "ko'zpayvandlash" usuli. Payvandust (kurtak) payvandtag po'stitagina joylashtiriladi. Ko'z payvandlashdan oldin payvan dustdagi (kurtak) birga kesib olingan yogoch qatlamini olib tashlasa ham bo'ladi.

B. Payvandlashning "bugilka" usuli malinani payvandlashda ishlatiladi. Payvandustning bargli shohchasi suvli probirkaga solinadi. Probirkadagi suvda suvo'tlari o'sib ketmasligi uchun alyumin folgasi bilan o'rab qo'yilsa yaxshi bo'ladi.

B. Payvandlashni "yorma" (uskuna) usuli kartoshka kabi o'tsimon o'simliklarni payvandlashda ishlatiladi.

G. Payvandlashni "kopulirovka"-yaqinlashtirish usuli, sho'ra o'simligi virusining tok o'simligiga o'tkazishda ishlatiladi. Ildizli ikki o'simlikning kambiy qismi ochilguncha tozalanadi, so'ngra ikkala o'simlik kesilgan joylari bilan bir-biriga jipslashtiriladi va bog'lanadi.

D. Payvandlashning "tilsimon kopulirovka" usuli, bu usul zemlyanika kabi o'simliklar viruslarini o'tkazishda ishlatiladi. O'simliklar maxsus lenta bilan bog'lanadi. Payvandlashni qaysi usuli qo'llanilishidan qat'iy nazar, ulanadigan o'simlik to'qimasini bir-biriga zich qilib tutashtirish muhim bo'lib, ular to bir -biri bilan ko'shib o'sib ketguncha qoldiriladi.

Payvandust va payvantaglarni bir-biriga bog'lash uchun maxsus lentalar ishlatiladi. Payvandlangan qismning usti, ayniqsa o'tsimon o'simliklarning ustki yuzasi doimo namlanib turishi katta ahamiyatga ega.

Agar virus konsentratsiyasi o'simlikda yuqori bo'lsa, hamda o'simlikning butun tanasi bo'ylab bir tekis tarqamagan bo'lsa, ikki kundan so'ng payvandlangan joyda virus ikkinchi o'simlikga o'tadi. Ammo virusning konsentratsiyasi o'simlikda kam va butun tana bo'ylab bir tekisda tarqalgan bo'lsa virus partnyor o'simlikga o'tishi uchun xafta va "ipdan oshiqroq, daraxtsimon o'simliklarda bir kecha oy bo'lishi mumkin. Kasallik simptomlari avval. Sog' o'simlik shohlarining eng ustki qismlarida paydo bo'ladi. O'tsimon o'simliklarda esa simptomlar bir va bir necha haftada, daraxtlarda 1 yildan so'ng yoki bir necha yildan so'ng paydo bo'ladi.

### **3. Viruslarni zarpechak yordamida yuqtirish**

Zarpechak-Cuscuta spp.-ko'plab ingichka shoxlarga ega poyali parazit o'simlik bo'lib xo'jayin o'simlik poyasini o'rab oladi va tegib turgan joylarida xo'jayin - o'simlikni o'tqazuvchi to'qimalariga kirgan ildizsimon gaustoriyalar hosil qiladi. Zarpechak yordamida ikki o'simlikni birlashtirish mumkin. 1940 yildan Bennet birinchi marta ba'zi viruslarni zarpechak kanali orqali boshqa o'simlikga o'tishini aniqladi. Zarpechakning 20 dan ortiq turi virus yuqtirishda ishlatiladi Eng ko'p ishlatiladiganlari Cuscuta campestris. Bu tur 39 ta tekshirilgan virusdan ; 24

tasini o'tkazgan, C-subincluda esa 23 tadan 12 tasini o'tkazdi. Odatda zarpechak to'qimalarida ham ko'payadigan viruslar (bodring mozaikasi virusi) sog'lom o'simlikga yaxshi o'tadi, aksincha zarpechakda passiv tarqaluvchi viruslarning yuqish samaradorligi past bo'ladi. Bu usulda virus yuqtirish, odatda, mexanik inokulyasiya bilan, hashorotlar bilan, payvandlash bilan virus boshqa o'simlikga o'tkaza olinmagan hollarda qo'llaniladi. Ba'zan ikki o'simlik bir-biridan taksonomik uzoq bo'ladi, shu vaqtlarda yuqoridagi usullar qo'llanilganida virus yuqmaydi. Shunday vaqtlarda zarpechak bilan virusni o'tkazish qo'l keladi. Zarpechak urug'i o'z unuvchanligini bir necha yillargacha (10 yilgacha) saqlashi mumkin. Ularni xo'jayin-o'simliklarning orasiga urug'i ekilsa ular o'z hayot faoliyatini yaxshi saqlaydilar. Zarpechak ko'chatlarini birdaniga ishlatasa ham bo'ladi, yoki ularni avval xo'jayin-o'simlik tanasiga yaxshilab yopishib olganidan so'ng, uni shohlari ishlatiladi. Zarpechakning ko'chati yoki shohini virus bilan kasallangan o'simlik yaqiniga joylashtiriladi va u o'simlikga yaxshi yopishib olganidan so'ng uni ikkinchi uchini indikator o'simlikga birlashtiriladi. Ko'pgina viruslarda simptomlar avvalo indikator-o'simliklarning uchlaridagi yosh barglarda hosil bo'ladi. Masalan, bodring mozaikasi virusi zarpechakni o'zida simptomlar hosil qiladi.

**4. Hashorotlar yordamida o'simliklarga virus yuqtirish.** Gibbs va Xarrison o'simliklarni virus bilan kasallantirish uchun ishlatiladigan hashoratlarni (shirincha, kana va boshqalarni) doimo boqib turadigan sharoit bo'lishini va parvarishlash sharoitlarining quyidagicha bo'lishini ko'rsatishadi. Quyida shu usullarni batafsil ko'rsatishga harakat qilamiz. Hashorotlar boqiladigan o'simliklar ma'lum shamollanib turiladigan kameralarda saqlanishi kerak. Ishlatiladigan o'simlik esa shu virusga chidamli bo'lgan o'simlik (immun) bo'lishi kerak. Hashoratlarni doimo yaxshi holatda saqlash uchun ular faol o'sib turgan o'simlikda bo'lishi maqsadga muvofiq bo'ladi. Kameraning tuzilishini quyidagicha tasvirlash mumkin. Diametri 10 smga teng keladigan gultuvak uchun moslanadigan kamerani tag qismi diametri 10-12 smlik taglikdan ibopat plastmassa yoki boshqa materialdan tuzilgan, balandligi 5-7 smlik berk elaksimondan idish bo'lyb uning ust qismi 25-30 smlik selluloid plenka bilan aylantirib qoplanadi va uning ustki qismi esa hashorotlar o'lchamidan kichikroq bo'lgan tur o'ralgan qopqoq bilan yopiladi (doka ishlatish ham mumkin). To'r ishlatishdan maqsad o'simlik o'stiriladigan va hashorat parvarishlanadigan bu kameraning ichida kondensatsiyalangan suv (kam shamollantirilsa) yig'ilishini oldini olish, hashoratlarni unda cho'kib qolishi, hamda zamburug'lar rivojlanib mog'orlashiga yo'l qo'ymaslikdir.

**A.** Shiralarni ko'paytirish uchun ishlatiladigan selluloiddan tayyorlangan moslama. Uni bir necha joyida doka (to'r) bilan to'silgan shamollatishga xizmat qiladigan tirqishlar mavjud.

**B.** Sikadalar (chirildoq) saqlashda qo'llaniladigan kichik moslama.

**V.** Virus-tashuvchi hashorotlar bilan ishlashda qo'llaniladigan asboblardir. Yuqorida: tish muolajasida ishlatiladigan uchi qayrilgan asbob bo'lib u nematodalar bilan ishlash jarayonida foydalaniladi.

O'rtada kanalarni o'tkazishda foydalaniladigan 1 dona olmaxon muyi. Pastda - xuddi shunga o'xshash, shiralar bilan ishlashda foydalaniladigan olmaxon mo'yi to'plami.

**G.** Sikadalar (chirildoq) bilan ishlashda ishlatiladigan aspirator. So'rib olish uchun ishlatiladigan naychani bir tomoni doka bilan berkitilgan bo'ladi.

Hashoratlarni bir o‘simlikdan ikkinchisiga o‘tkazish uchun qo‘llaniladigan moslama odatda quyidagicha tuzilishlarda bo‘ladi, nematodlar bilan ishlaganda tish doctorlari tishning kavaklarini muolaja qilishda ishlatadigan uchi qayrilgan metallardan yasalgan bandlik moslama qo‘llaniladi, kanalar bilan ishlash uchun esa birgina hayvon muyi o‘rnatilgan (ko‘pincha olmaxon muyi) mo‘yqalam ishlatiladi, chirildoqlar bilan ishlash va ularni yig‘ish uchun aspiratorlar ishlatiladi. Aspirator bu katta probirkaga po‘kak yordamida kiritilgan ikki naycha bo‘lib, uning biri doka bilan yopilgani bo‘lib og‘izda tortish uchun xizmat qilsa, ikkinchisi 20-25 smlik oson bukiluvchan tiniq plastmassa naychadan iboratdir, odatda (aspiratorning bu tomoni) sikadalarini yig‘ish uchi hisoblanadi.

Shiralar partenogenez yoki tirik tutib ko‘paygani uchun ular juda tez ko‘payadi va qanotli, qanotsiz shakllari paydo bo‘ladi, shuning uchun ham ularni ko‘paytirish ancha osondir. Qung‘izlar, chirildoqlarni ko‘paytirish ancha qiyin bo‘lib, ayrim malaka talab etadi. Nematodlarni ko‘paytirganda esa tuproq o‘ta quruq yoki sernam bo‘lmasdan mo‘tadil bo‘lishi zarur. Zamburug‘larni virus yuqtiruvchi qilib o‘stirish uchun steril qumda saqlanadigan o‘simlik ildizlarida saqlash maqsadga muvofiq bo‘ladi, chunki uning zoosporalarini kerak vaqtda oson yuvib olsa bo‘ladi.

Virus tarqatuvchi hashoratlardan ishlash ham mutaxassisdan malaka talab qiladi. Masalan, shiralar bilan ishlashda ularni bir o‘simlikdan boshqasiga o‘tkazish uchun muyqalam sal qo‘llaniladi, so‘ngra muyqalamdagi yagona muy yordamida shiralarning qorin qismiga salgina urib-uryb qo‘yiladi, natijada shira o‘z stiletini barg tubidan sug‘irib oladi. Keyin uni qil yordamida ko‘tarib olinadi va yangi kasallantiriladigan barg ustiga oxista qo‘yiladi. Ba‘zi xollarda, ayniqsa shirincha oziqlanayotgan bargda virus katta miqdorda bo‘lsa, bexosdan stilet sug‘irib olinganda o‘simlik shirasi mo‘yqalam qiliga tegib so‘ngra sog‘ o‘simlikka o‘tib ketmasligining oldini olish uchun mo‘yqalam bilan ajratib olingan shirincha avval barg ustiga qo‘yilgan kichik qog‘oz parchasiga qo‘yiladi, qog‘ozdan esa shirincha sekin-asta o‘zi bargga o‘tadi. Chirildoqlar juda faol bo‘lganligi uchun ularni aspirator yordamida boshqa bargga o‘tkaziladi. Nematodalar bilan kasallantirish uchun esa ularni tuproq suspenziyasida ajratib olinadi va u bilan kasallantiriladigan o‘simlik ildizi kasallantiriladi. Nematodalarni ajratib olishning birinchi stadiyasi tuproq bo‘lakchalarini maydalab, ko‘proq hajmdagi suvga o‘tkaziladi. So‘ngra nematodalarni har xil o‘lchamlik elaklardan o‘tkazib, suzib olinadi. Birinchi eng yirik teshikli va keyin undan mayda va eng mayda teshikli elaklardan o‘tkazib, kerakli tur nematodalarni yig‘ib olinadi. Odatda kerakli to‘r birinchi yoki ikkinchi elakda yig‘iladi. So‘ngra ularni streomikroskop yordamida har xil o‘simlik ildizi qoldiqlaridan, boshqa har xil organizm va begona buyumlardan tozalab ajratib olinadi va ularni idishdagi suvda saqlanadi. Nematodalar bilan ishlash, ular bilan o‘simliklarni kasallantirish uchun tish doktorlarini tish muolajasida ishlatadigan qayrilgan uchli asboblardan foydalaniladi. Boshqacha usul ham bo‘lib, bu usulni ishlatganda paxtadan to‘qilgan material joylashtiriladi, bu material (filtr) ustaga esa elakdan ajratilgan nematodalar solinadi. Bir necha soatdan so‘ng nematodalar to‘qimadan sekin asta suvga o‘tadilar va bu tozalangan nematodlarni virus yuqtirish tajribalarida ishlatish mumkin.

Yana boshqa usul bu **elyutriator** degan asbobdan foydalanib ajratiladi. Bu asbobning prinsipi shundayki, unda suvning kuchsiz oqimi yuqoriga yo‘naltirib oqiziladi, tuproq zarrachalari esa cho‘kib qoladi, asbobdan o‘tgan suv fraksiyalarida esa nematodlar bo‘ladi. Virus tashuvchi zamburug‘larni virusga ega bo‘lishlari uchun *Ospidium zamburug‘i* zoosporasini tamaki nekrozi virusi ( TNV) bilan

ta'minlash kerak. Buning uchun tozalangan virusni zoosporalar suspenziyasi bilan aralashtiriladi, 5-15S da bir necha daqiqa saqlanadi. So'ngra suspenziyani virus yuqtiriladigan o'simlik ildiziga o'tkaziladi. Zoosporalarni aktivligini 2 kun va undan ortiqroq saqlash uchun ularni suyultirilgan fosfat buferi yoki 5% li Xog-lend eritmasida saqlanadi.

Virus tashuvchi hashoratlarga virus yuqtirish uchun ularni membrana orqali oziqlantirish kerak. Membrana Vazifasini Parafilm bajarishi mumkin. Shiralar 10-20% saxaroza solingan virus preparatlarini sevib istemol qilishadi. Ba'zi viruslar hashoratlarda uzoq vaqtgacha saqlanadilar. Ba'zi hollarda hashorat virusini o'simlikga yuqtirishdan ilgari ma'lum vaqt o'tishi zarur bo'ladi. Chunki bu vaqt ichida virus ovqat bilan hashorat ichagidan gemo-limfaga so'ngra esa undan so'lak bezlariga o'tadi, ana shu vaqt ichida bir xil tur viruslar ko'payadilar va o'simlikga yuqadilar. Bunda virus-tashuvchilar (shirincha, qo'ng'iz, chirildoqlar) virusni turridan- turridan in'eksiya qilishi mumkin.

Hashoratlarni 4°S da CO<sub>2</sub> bilan anesteziya qilinib, diametri 30 mkml shisha kapilyar bilan virus preparati hashorat qornidagi segmentlar orasiga yuboriladi. Inokulum miqdori hashorat og'irligining 1% dan kamrog'iga teng bo'lishi va bakteriyalardan xoli bo'lishi kerak (1 shiraga 5 mkl). In'eksiyadan so'ng hashorat bir necha soat salqin nam kamerada saqlanadi, so'ngra indikator o'simlikga o'tkaziladi. Virus yuqtiruvchi zamburug'lar bilan ishlaganda zamburug'larning zoosporalaridan foydalaniladi. Zoospora olish uchun masalan, olpidium zamburug'i bilan kasallangan o'simlik ildizini quruqroq sharoitda bir kun saqlanadi, bunda zoosporalarning chiqishi kechikadi, keyinchalik ildizni xo'llab (suvga botirib) zoosporalarni olinadi. Buning uchun ildiz 15- 20 daqiqa davomida suvga yoki birorta zamburug' o'stiriladigan ozuqa muhitiga solib quyiladi. Suvga o'tgan zoosporalarni sentrifuga yordamida konsentrlash mumkin. Zoosporalarni ehtiyotlik bilan asrash zarur, sovuq sharoitda yaxshi saqlanadi, bo'lmasa zoosporalar harakatchanliklarini yo'qotadi, shu bilan birga virus tarqatish o'simlikda kasallikni ko'zg'atish xususiyatlarini ham yo'qotishi mumkin.

### **5. Viruslarni hujayra (to'qima) lar kulturalariga (ekmalariga) yuqtirish**

Ko'pgina viruslar faqat o'simliklarnigina emas, ulardan ajratib olingan probirkalarda o'stiriladigan hujayralarni ham kasallantiradi. Kallus to'qimalari yoki kallus hujayralari suyuq yoki qattiq oziqa muhitlarida o'stiriladi. Maxsus muhitlarda o'simlik meristemalari kulturalarini olingan bo'lib, ularni hozir virussiz o'stirish ishlarida qo'llaniladi. Ba'zi kallus hujayralari g'ovak to'plamlar hosil qiladi. Tamakining kallus hujayralarini TMV bilan kasallantirish uchun virusni ular bilan gomogenizatorida aralastirib amalga oshirish mumkin. Bu usulda 50 dan 90% gacha hujayra suspenziyasiga virus yuqtirish mumkin 100 soatdan so'ng bir hujayraga 10<sup>7</sup> cha virus zarrasi to'g'ri keladi. O'simlik viruslarini yuqtirish uchun bargni fermentlar yordamida matseratsiya qilingan hujayra po'sti saqlangan hujayralar ishlatiladi.