

**ЎЗБЕКИСТОН РЕСПУБЛИКАСИ ОЛИЙ ВА ЎРТА
МАХСУС ТАЪЛИМ ВАЗИРЛИГИ
ТОШКЕНТ КИМЁ-ТЕХНОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ**

**ОЗИҚ-ОВҚАТ МАХСУЛОТЛАРИ ТЕХНОЛОГИЯСИ
ФАКУЛТЕТИ**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСИ
“БИОТЕХНОЛОГИЯ АСОСЛАРИ”
ФАНИДАН**

РЕФЕРАТ

МАВЗУ: ҲУЖАЙРА БИОТЕХНОЛОГИЯСИ

**Бажарди: Тургунов А.
Текширди: Н.А.Хўжамшукуров**

Тошкент-2013

Режа:

1. Хужайра биотехнологияси моддий асослари.
2. Хужайра культураси.
3. Хужайра тўқимаси.
4. Ажратиб олинган ҳужайралар ва тўқималарининг йўналишлари.
5. Хужайралар қўшилиши. Протопласт. Каллус тўқималари. Меристема.

1. Хужайра культураси ва тўқимаси

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

Биотехнология узок - узоклардан маълум бўлсада, алоҳида амалий фан сифатида ўтган асрни иккинчи ярмидан бошлаб, инсоният энг аввало ўзи учун ўта зарур бўлган яъни озиқ-овқат, энергетика, заҳира (ресурс), атроф – муҳитни муҳофазаси ва х.к. муаммоларни тубдан янги асосда ечиши зарурлигини сезганидан кейин мужассамлана бошланди. Биотехнологик жараёнлар сунъий озуқа муҳитида ўстирилган микроорганизмлар, ўсимлик ва хайвон тўқималари, хужайралари ва оргаларидан фойдаланишга асосланади. Хозирги вақтда дунёни кўплаб мамлакатларида биотехнологияни ривожланишига алоҳида эътибор берилмоқда. Бунга асосий сабаб, биотехнологияни бошқа технологияларга нисбатан бир қатор устунликка эгалигидир. Масалан, биотехнологик жараёнлар жуда кам энергия талаб қиладилар, деярли чиқиндисиз, экологик тоза ва х.к. Шунинг билан бир қаторда, биотехнология стандарт жиҳозлардан ва препаратлардан фойдаланади ва иқлим шароитига қарамасдан ҳамда кўп майдон эгалламаган ҳолда жараёнларни йил бўйи ўтказишга асосланади. Айтиб ўтилган устунликлар, ўсимликларни ва хайвонларни хужайралари, тўқималари ва органларига ҳам тегишлидир.

Ажратиб олинган хужайралар ва тўқималарни биотехнологиядаги ролини уч йўналишда кўриш мумкин:

Биринчи йўналиш ажратиб олинган ўсимлик хужайрасини тиббёт, ветеринария, косметика ва бошқа соҳалар учун зарур бўлган иккиламчи метаболитлар : алколоидлар, стероидлар, глюкозидлар, гормонлар, эфир мойлари ва бошқа биологик фаол моддалар синтез қилиш имконияти билан боғлиқ. Маълумки, иккиламчи метаболитлар қаттиқ (агарли) ёки суюқ озуқа муҳитида ўстирилган калус тўқималардан олинади. Хужайра технологияси асосида диосгенин – диоскоре хужайрасидан; аймолин – илон рацвольфи хужайрасидан; умумий куч берувчи моддалар – женьшен хужайрасидан; ва х.к. ажратиб олинади ва тиббиёт ҳамда парфюмерияда ишлатилади. Шунинг эътиборга олиш керакки, ўстириладиган хужайраларни ҳосилдорлиги, бутун ўсимликни ҳосилдорлигидан анча баланд. Бундай усул билан иккиламчи метаболитлар ажратиб олишни яна бир устунлик томони шундаки, муайян шароитда ўсимликни ўзини ўстириш имконияти бўлмаган шароитда (совуқ ёки иссиқ иқлимли минтақаларда), уларни хужайраларини бутун йил мабойинида ўстриш мумкин.

Иккинчи йўналиш – ажаратиб олинган хужайраларни, ўсимликлар селекциясида ишлатиш ва шу орқали тез ривожланувчи, ҳар хил ташқи муҳит таъсирига чидамли (иссиққа, совуққа, шўрланишига, оғир металлларга, қўрғоқчиликка, касалликка ва х.к.) ўсимликлар яратиш. Шунинг билан бирга бу йўналиш, ажратилган протопластларни қўшилиши орқали янги ўсимликлар яратиш ҳамда ножинсий (сомотик) гибридлар олишни ҳам ўз ичига олади. Ажратиб олинган протопластларга ген муҳандислиги методлари ёрдамида бегона генларни киритиши, кейинчалик янги, мерос қоладиган хоссаларга эга бўлган ўсимлик яратишга ҳам олиб келади. Ажратиб олинган чангдон ва уруғ куртакни сунъий озуқа муҳитида ўстириш, гаплоидлар, олиш имконини берса,

муртакларни ўстириш – ўсаолмайдиган (эндоспермаси ёмон ривожланган) ўсимликлардан гибрид уруғларетиштириш имконини беради.

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

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

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

- **I-босқич (1892 – 1902 йиллар)** – Хаберландт, Фехтинг, Рехтигер каби немис олимларини номлари билан боғлиқ. Улар сахароза эритмасида ҳар хил ўсимликлар тўқималарини ўстиришга уришиб кўришган, аммо ўсимликларни ўсиши кузатилмаган. Фақатгина қоқи ўтини ва тол дарахтини пояларини сигментлари учун бирламчи каллус олинган ва каллусгенезга айланиши мумкин бўлган сегментин энг кичик размери аниқланган. Экспериментал муваффақиятларга етаолмасдан бу олимлар қатор гоё ва гипотезалар яратганлар. Бу гоё ва гипотезалар анча кечироқ ўз тасдиқини топган. Масалан, Харерландт ҳар қандай тирик ўсимлик хужайрасини тотипотентлиги яъни хужайраларни маълум шароитда ўстирилганда ўзини ривожланиш потенциалини намоён қилиши ва бутун ўсимлик ҳосил бўлишига бошлаши ҳақида гипотеза эълон қилган эди.
- **II-босқич (1902-1922 йиллар)** – хайвон тўқималарини ўстириш учун биринчи озуқа муҳити яратилганлиги билан нишонланади. Бу озуқа муҳитлари табиий бўлиб, таркибида қон плазмаси (қонни суюқ қисми) ва қуртак суюқлиги сақлаган. Ажратиб олинган ўсимлик тўқималарини ўсимлик экстрактлари сақлаган сунъий озуқа муҳитида ўстириб кўриш мувоффақиятсиз чиққан, чунки экспериментларда юксак ўсимликларни ўсиш фаоллигини намоён қилишга тўғри келмайдиган хужайра ва тўқималаридан фойдаланилган.
- **III-босқич (1922 – 1932 йиллар).** Бу даврда бир-бирлари билан боғлиқ бўлмаган ҳолда Америкалик олим В.Робинс ва немис олими Котте қаттиқ озуқа муҳитида помидори ва маккажўхори илдизи учидagi меристемаларни ўстириш мумкин эканлигини намоёни қилганлар. Аммо, маълум вақт ўтгач, ўсимлик тўқималари қўнғир ранга кириб, ҳалок бўлганлар. Ўсимликларни тўқималарини ўстириш методи ривожланиши – 1932 йилдан бошланган.
- **IV-босқич (1932 – 1940 йиллар), француз олими Р.Готре номи билан боғлиқ.** У, *in vitro* шароитида ўсимлик тўқималарини вақти- вақти билан тоза озуқа муҳитига кўчириб туриш орқали узоқ вақт ўстириш мумкинлигини намоёни қилган. Бу янгилик, тўқималар технологиясини ривожланишига катта хисса қўшди ва ўстиришга қўйиладиган ўсимликлар сони жуда ҳам кпайди.
- **V-босқич (1940 – 1960 йиллар).** 1955 йилда янги синфга мансуб фитогормон – цитокининларни ихтиро қилиниши, (хусусан кинетинни) хужайраларни бўлинишини кучайтириш имконини яратади. Ўсишни кучайтирувчи моддаларни миқдори ва уларни нисбатига қараб, эксплант хужайрасини бўлинишини кучайтириш, каллус тўқималарни ўсишини муҳофаза қилиш, морфогенезни мндуцироват қилиш мумкин эканлиги намоёни этилди. Шу даврда какос ёнгогини, каштан, маккажўхори ва бошқа ўсимликлар эндоспермаларини хужайрани ўсиши,

моргенез жараёнлари (каллус тўқима ва ҳужайра суспензиясида)га ижобий таъсир кўрсатиши аниқлашган.

- **VI-босқич (1960 – 1975 йиллар).** Бу даврни энг муҳим воқеаси Ноттинген университети профессори Э.К.Коккинг томонидан ферментатив йўл билан помидорини илдизи ва мевасидан протопластлар олиниши ва уларни назорат қилиниб турилган шароитда ўстирилганлиги бўлган. Кейинроқ шу лабораторияда Пауэр ўзини шогирдлари билан протопластларни сунъий қўшилиш шароитларини яратишган. Бу эса, соматик гибридлар яратишида янги йўл бўлиб хизмат қилган. Ўша даврда яратилган яна бир усул – бу ўсимликларни *in vitro* шароитида меристин культуралар ишлатиб микро қўпайтиришидир. Дастлаб бу усул француз олими Ж.Морел томонидан орхидей ўсимлигини соғлом кўчатини олиш мақсадида яратилган.
- **VII-босқич – (1975 йилдан ҳозирги вақтгача).** *In vitro* техникасини жадаллик билан ривожланиши ўстириладиган манбаларни биологиясини ўрганиш давом этмоқда ажратилган протопластларни электро қовуштириш усуллари ишлаб чиқилмоқда, мутагенез ва ҳужайра селекцияси усуллари, гаплоидли ўсимликлар яратиш усуллари, ҳужайраларни ажратилган протопластлар ва *Ti* ва *Ri* *Agrobacterium tumefaciens* ва *Agrobacterium rhizogenes* асосида тайёрланган *Ti* ва *Ri* плазмид векторларни ишлатиб суюқликда ўстириш усуллари мукамаллаштирилмоқда. Ген мухандислиги усуллари ёрдамида икки паллали ўсимликларни генларини кўчириб ўтказишни самарали усуллари ишлаб чиқилди.

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

2. ЎСИМЛИКЛАРДАН АЖРАТИБ ОЛИНГАН ҲУЖАЙРА ВА ТЎҲИМАЛАРИНИ ЎСТИРИШ ТЕХНИКАСИ

Ажратиб олинган тўқималар билан ишлашни асосий шарти – стерилликга қатъий риоя қилишдир. Таркиби бой бўлган озуқа муҳити микроорганизмларни ривожланиши учун ҳам жуда яхши субстрат ҳисобланади, ўсимликлардан ажратиб олинган фрагментлар (эксплантлар) озуқа муҳити билан аралаштирилганда микроорганизмлар таъсирига тез учрайдилар. Шунинг учун ҳам эксплантни ҳам, озуқа муҳитини ҳам стерилизация қилиш керак. Ажратилган ҳужайралар ва тўқималар билан қилинадиган барча нозик ишлар (манипуляция) асептик шароитда (ламинар-боксларда) стерилланган ускуналар ёрдамида бажарилади. Ажратилган тўқималарни ўстириш даврида ҳам стерилликни сақлаш керак, айниқса харорат ва намлик ўзгарганда, чунки пробиркаларни пахта-бинтдан тайёрланган тикинчалари намланади ва ундан микроорганизмлар осон ўтишади.

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

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

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

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

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

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

Озуқа муҳити

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

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

Фитогормонлар хужайраларни табақаланиши (дедифференцировки) ва хужайра бўлинишини кучайтириш (индукция) учун керак. Шунинг учун ҳам каллусли тўқималар олиш учун мўлжалланган озуқа муҳити таркибида албатта ауксинлар (хужайра бўлинишини кучайтирувчи) бўлиши шарт. Поя морфогенезини индукция қилганда муҳит таркибидаги ауксинлар миқдорини камайитириш ёки бутунлай олиб ташлаш мумкин.

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

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

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

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

3.2-жадвал.

Ўсимликларни ажратиб олинган тўқималарини ўстириш учун ишлатиладиган озуқа муҳитларини таркиби

Озуқа муҳити компонентлари	миқдори, мг/л			
	Мурасига-Скуга	Гамборга	Шенка - Хильдебрандта	Грессхофф-Доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-
KNO_3	1900	-	-	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	130	-	-
KH_2PO_4	170	-	-	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	90,0
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,1	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoU}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотин кислотаси	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-HCl	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин HCl	1,0	10,0	5,0	-
2,4-	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Глутамин	-	-	-	2,0
Сахароза	30000	30000	30000	20000

+аттиқ озуқа муҳит тайёрлаш учун агар-аграр ишлатилади. Агар-агар денгиз сув ўтларидан олинадиган полисахариддир. Вақтдан унумли фойдаланиш мақсадида, макро- ва микроэлементлар эритмалари ҳамда витаминлар ва фитогормонлар қуюқроқ қилиб

тайёрланади ва совуқ шароитда сақланади ҳамда керак бўлганда суюлтирилиб ишлатилади.

Ўстириш шароити

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

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

Ўстириладиган хонада намлик 60-70 % бўлиши керак. Ундан курукроқ ҳаво озик муҳитини қуритиб юборади, агар пробирка пахтали тикин билан бектилган бўлса, озуқа моддаларни концентрацияси ўзгариб, ўстириш шароити бузилади.

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

3. КАЛЛУС ТЎҚИМАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Умумий ҳолати

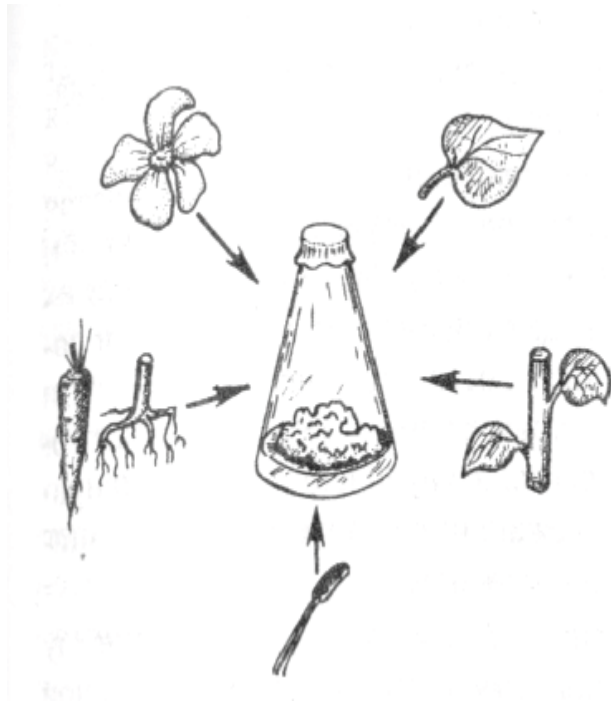
Ажратилган тўқималар культураси одатда ёки каллусли, ёки шиш (жуда кам ҳолатда) тўқима бўлиши мумкин. Каллусли культура табақалашмаган (дедифференцированнўй) хужайралардан ташкил топган, тартибсиз тўқималардир. Кейинроқ улар каллуслига ихтисослашади, яъни ўзига хос равишда табақалашади. Каллус дегани қадоқ (қотиб қолган) деган маънони англатиб, *in vitro* шароитида алоҳида олинган тўқималарни (эксплантлар) бир қисмида ва бутун ўсимликни бир қисмида (шикастланганда) пайдо бўлиши мумкин.

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

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

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

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



3.1-расм.
Турли хил эксплантлардан
каллус тўқимаси культура-
ларини олиш:

Ҳар бир ҳужайра ўсишни уч босқичда ўтади:

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

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

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

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

Масалан, буғдойни етилмаган куртакларида цитокининсиз 2,4-Д сақлаган озуқада каллус ҳосил бўлиши ёки кунгабоқарни уруғ палласида цитокинин сақлаган ауксин

сақламаган озуда каллус ҳосил бўлиши ва х.к. Кузатиладигн натижалар кўпроқ эндоген гормонларга, аниқроғи у ёки бу эксплантни ҳужайрасида сақланадиган гормонлар билан яъни ҳужайрани гормонал статуси билан боғлиқ эканлиги исботланган.

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

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

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

Ҳужайрани *in vitro* шароитида дифференциалланган ҳолатдан дидифференциалланган ҳолатга ва ҳужайрани фаол бўлинишга ўтиши, генларни фаоллигини ўзгариши билан бошланади. (Эпигеномни ўзгарувчанлик). Бир генни фаоллашуви ва иккинчисини репрессияга учраши ҳужайрадаги оксил таркибини ўзгаришига олиб келади. Каллусли ҳужайраларда ўзига хос бўлган оксиллар пайдо бўлади ва бир вақтнинг ўзида баргнинг фотосинтез қилувчи ҳужайраларида оксиллар миқдори пасаяди. Икки паллали ўсимликларда дидифференциаллашган генларни репрессия ва депрессия жараёнлари нисбатан осон ўтади.

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

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

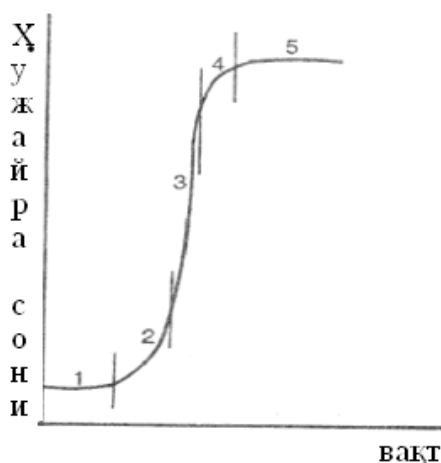
Каллусли ҳужайра ўзини ривожланиш циклига эга бўлиб, ҳар қандай ҳужайрани ривожланишини қайтаради: бўлиниш, чўзилиш ва дифференция ва ундан кейин қариш ва ҳужайрани ўлиш даври. Каллусли дифференцияни иккиламчи деб атаса бўлади, аммо уни морфогенез асосида ётувчи ҳужайраларни иккиламчи дифференцияси билан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

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

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

- **1–латент ёки лаг-фаза** даврида ҳужайра сони ёки оғирлиги ўзгармайди. Ҳужайралар бу даврда бўлинишга тайёргарлик кўрадилар.

- **2-фаза логарифмик ёки экспоненциал ўсиш фазаси** энг кўп митодик фаоллик билан ва каллус культуранинг массасини ошиши билан ҳамда тезлик билан ўсиш кузатилиши билан характерланади.
- **3-фаза тўғри чизиқли (линейка)**, бунда ҳужайраларнинг ўсиш тезлиги доимийдир.
- **4-фаза ўсишни секинлашув фазаси бошланади**, бу босқичда ҳужайранинг митотик фаоллиги кескин пасаяди.
- **5-фаза ўсиш чизиғи (стационар) бир текис ҳолатга келади**. Бу даврда ҳужайралар парчаланади, аммо ҳужайра сонини ошиши билан баробарланишади; умуман олганда бу босқичда, ҳужайра массасини кўтарилиши нолга тенг бўлади. Стационар фазадан кейин ҳужайраларнинг деградацияси бошланади ва бу даврда тирик ҳужайраларнинг сони ва массаси тобора камайиб бораверади.



3.2-расм. Каллус
ҳужайраларнинг ўсиш
чизиғи

Каллусли ҳужайраларнинг ўзига хослиги

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

Ўсимликларнинг нормал ва каллусли тўқималари учун умумийлик яна қатор белгиларда намоён бўлади, хусусан, юқори хароратга чидамлилиқ, осмотик фаол моддаларга, шўрланишга чидамлилиқ ва х.к. Шунинг билан бирга, каллусли тўқималарнинг нормал тўқималардан фарқи томонлари ҳам бор. Уларда специфик оксиллар пайдо бўлади ва умумий оксил миқдори, хусусан баргда фотосинтез жараёнида қатнашадиган оксиллар камаяди ёки бутунлай йўқолади. Каллусли ҳужайралар улкан генетик гетерогенлиги ва физиологик синхронликни бузулганлиги билан фарқ қилади.

Организм назоратидан чиққанлиги сабабли. Каллусли ҳужайраларнинг ўсиши тартибсиз, синхронсиз равишда ўтади ва чегараланмайди. Бундан 65 йил аввал Р.Готре томонидан олинган сабзининг каллусли ҳужайраси, янги озуқа муҳитига ўтказиб туриш ҳисобидан ҳозиргача яшаб келмоқда.

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

Каллусли ҳужайра ўзига хос томонларидан яна бири-уларнинг ёшини хар хиллиги (гетерогенлиги). Каллус тўқима бир вақтни ўзида ёш ҳужайралар (G_1 - фазадаги), қари (G_2) ва S – фазалар иштирок этадилар.

Каллусли хужайраларни энергия алмашинувида ҳам анча фарқ кузатилади. Улар, нормал хужайраларга нисбатан кислородни кам истеъмол қиладилар. 1938 йилда Ромсторн бундай хусусият меристематик хужайраларда ҳам борлигини кузатган эди, демак бу хусусият фаол бўлинадиган хужайралар учун хосдир. Каллус хужайраларни нафас олиш коэффиценти бирдан катта. Масалан нўхат каллус хужайрасида бу сон 3,5 дан катта (А.В. Романова, 1988).

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

Пастер эффекти деганда, бижғишни кислород иштирокида нафас олиш билан босишни тушунилади.

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

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

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

Каллус хужайралари генетикаси

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

Каллусли ва суспензион культураларда дастлабки ўсимликка хос бўлган қатор диплоид хромосомалар сақловчи хужайралар 3, 4, 5 ва ундан ҳам кўпроқ хромосомалар тўплами сақловчи полиплоидли хужайралар учрайдилар. Шулар қатори каллусли тўқималарда тез-тез анеуплоидияни яъни хромосомалар тўпламини бир неча хромосомага камайиши ёки кўпайишини кузатиш мумкин. Каллусли тўқималарни қанчалитк узоқ вақт ўстирилса, ўшанчалик улар плодлиги билан фарқланадилар. Тамаки ўсимлигини каллусли тўқимларида тўрт йил ўстирилгандан кейин умуман, диплоидли хужайралар қолмайди: Барча хужайралар полиплоидли ёки анеуплоидли бўлиб қоладилар. Бу эса плоидликни ўзгариши ўстириш шароити таъсирида, энг аввало озуқа муҳити таркибидаги моддалар таъсирида амалга ошишини кўрсатади. Аммо бу ҳолатни бошқача тушунтириш ҳам мумкин.

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

Плоидликни ўзгаришидан ташқари ўсимлик хужайра ва тўқималарини *in vitro* ўстирилиши, хужайрада хромосомали абберациялар ҳосил бўлишини чақиради. Бу эса

ўстирилаётган тўқималарни биологик хусусиятларига таъсир кўрсатади, уларни (тўқималарни) ташқи кўриниши, модда алмашинуви, ўсиш тезлиги ўзгаради.

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

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

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

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

Цитокининлар хусусан кинетик хужайраларда полиплоидия содир бўлишига ёрдам берадилар.

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

4. ГОРМОНЛАРГА БОҒЛИҚ БЎЛМАГАН ЎСИМЛИК ТЎҚИМАЛАРИ

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

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

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

«Мослашган» тўқималардан ташқари (кимёвий шишлар), бактериялар ва вируслар чақирадиган ўсимлик шишлари ҳамда ҳар хил ўсимликларда турлараро гибридларда пайдо бўладиган генетик шишлар ҳам маълум. Табиатда кенг тарқалган ва илмий

изланувчиларда катта қизиқиш уйғотадиган шишлар – икки паллали ўсимликларда агробактериялар (*Agrobacterium tumefaciens*) томонидан чақириладиган шишлар ҳисобланади. Бундан ташқари ўсимликларда яна иккита ҳақиқий шишлар:- попук илдиз (*Agrobacterium rhizogenes* чақирадиган касаллик) ва пояли галл (*A.rubi* чақиради) учрайди.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Опинлар аминокислоталар, ҳар хил кетокислоталар ва шакарларни ҳосилаларидир. Улар янги типдаги биологик фаол моддалар ҳисобланадилар ва фақатгина ўсимликларни қорончатўй галли тўқималарида учрайдилар, шунинг учун ҳам уларни қорончатўй галларни биокимёвий марҳори сифатида қараш мумкин. Опинлар агробактериялар учун озуқа модда ҳисобланадилар, аммо шис тўқималар опинлар стерил шароитда агробактериялар бўлмаган шароитда ҳам синтез қилаверадилар. Опинларни уч тип маълум: нопалин, актопин ва агропин. Агробактерияларни бир штамми октопинсинтез қилувчи шишларни индукция қилса, бошқа штамми нопалинсинтез қилувчисини индукция қилади.

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

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

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

5. ХУЖАЙРА СУСПЕНЗИЯЛАРИ КУЛЬТУРАСИ

Қаллусни суяқ озуқа муҳитига ўтказиб, автоматик равишда аралаштириш орқали хужайра суспензияси олиш мумкин. Ферментлар ёрдамида. Масалан пектиназа ферменти

ёрдамида тўғридан-тўғри эксплант тўқималардан (барг, поя, илдиз ва х.к) ҳам хужайра суспензияси тайёрлаш мумкин. Дастлаб, эксплант юзасида каллусли тўқима пайдо бўлади, кейин ундан хужайра ва хужайра агрегатлари ажралади ва оқибатда хужайра суспензияси олинади.

100 мл хужайра суспензияси олиш учун 2-3 г каллусли тўқима керак бўлади.

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

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

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

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

Суспензион культуралардан иккиламчи метаболитлар продуценти сифатида фойдаланилганда, даврий ёки оқава усулида очик ёки ёпиқ тизимда хужайраларни кўпайтириш усуллари ишлатилади. Ёпиқ тизимда хужайра суспензиясига тоза озуқа муҳити киритилмайди, тизимда домий режимда ўстирилганда эса озуқа муҳити тозасига алмаштириб турилади.

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

Суспензион хужайралар билан ишлаганда уларни характеристикасини билиш шарт: тириклиги, хужайраларни суспензион культурда кўп ёки камлиги, агрегация даражаси, ўсиш тезлиги ва х.к.

Хужайраларни тирик ёки тирик эмаслиги уларни бўяш (кўк метилен ёки Эванс кўки) орқали аниқланади. Тирик хужайралар, хужайра мембранаси бўёқни ўтказмаслиги сабабли бўялмайди. Ўлик хужайра қобиғидан бўёқ тез ўтади ва шунинг учун ҳам кўк ранга бўялади. Хужайра суспензиясини асосий кўрсаткичларидан бири, хужайра популяциясини қалинлигидир. Хужайра сони Фукс-Розентал ҳисоб камерасида микроскоп остида мацерациядан кейин (хужайраларни ажратилгандан кейин) аниқланади. Мацерация қилувчи модда сифатида хром кислотасини 10-20% ли эритмасидан фойдаланилади. Бу кислота, хужайраларни бириктириб турувчи ўртадаги пластинкани эритиб (гидролиз қилиб) юборади.

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

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

Иккиламчи синтез маҳсулотларини саноат шароитида олиш учун катта ҳажмдаги (20 м³ ва ундан ҳам каттарок) ферментерлардан фойдаланилади ва ҳужайралар доимий режимда ўстирилади. Суюқликда ўстиришни энг кўп тарқалган режими ҳужайра суспензиясини ёпиқ даврий тизимда ўстиришдир. Суспензияни аэрацияси ва аралаштирилиши учун (качалка) тебратгичлардан фойдаланилади. Шунингдек бу мақсадда механик ёки магнит аралаштиргич ўрнатилган ферментлардан, ёки барбатация (ҳаво ёрдамида аралаштириб туриш) дан ҳам фойдаланса бўлади.

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

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

6. ЯГОНА ҲУЖАЙРАЛАР КУЛЬТУРАСИ

Генетик ва физиологик изланишлар ҳамда ҳужайроа селекцияси амалиётида ишлатиш учун алоҳида ҳужайралар жуда катта аҳамият касб этади. Клонни олиниши ягона ҳужайра авлодини олиниши каллусли ҳужайраларни генетик бир хил эмаслигини сабабларини аниқлашга ёрдам беради, чунки бу ҳолатда кузатишлар гетероген эксплат олинган тўқималарда эмас, балки алоҳида олинган ҳужайраларда олиб борилади.

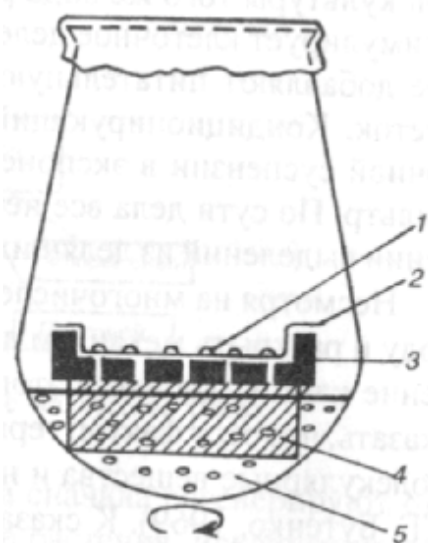
Пропластлардан ажратилган алоҳида (ягона) гибрид ҳужайра кейинги бўлинишларида гибрид ҳужайрадан ташкил топган клон яратиш имконини беради. Бу эса изланувчиларни ишларини енгиллаштиради, чунки ажратилган пропласт культураларда гибрид бўлмаган ҳужайралардан пайдо бўладиган янги ҳужайраларни алоҳида ажратиш каби машаққатли ишдан озод қилади. Бундан ташқари алоҳида ажратиб олинган ҳужайраларни протопластларини ўрганилганда соматик гибридизация жараёнини ўзини кузатиш ҳам яхшироқ бўлади. Алоҳида (ягона) ҳужайралар ҳужайра суспензияларидан, ўсимлик тўқималаридан, масалан барг мезофиллидан уни ферментлар ёрдамида мацерация қилингандан кейин, алоҳида ажратиб олинган пропластлардан уларда ҳужайра қобиғи пайдо бўлганидан кейин ажратиб олинади.

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

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

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

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



3.3-расм.

Маккажўхорининг ягона ҳужайралари ва ажратилган протопластларини ўстиришда «энага» сифатида суспензион ҳужайралар культурасининг ишлатилиши:

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

(Бу Дык Куанг, З.Б. Шамина, 1985).

Ҳужайрани бўлиниши муҳитни кондицирлаш ҳам тезлатади, бунинг учун унга (муҳитга) тез бўлинадиган ҳужайра культурасини озуқа муҳити қўшилади. Кондиция қилувчи фактор ҳужайра суспензиясини ўсишни экспоненциал фазасида бактериал филтрдан ўтказиш даврида пайдо бўлади (олинади). Моҳияти бўйича юқорида зикр этилган барча усуллар ҳам бўлинадиган ҳужайралардан чиқадиган кондиция қилувчи фактордан фойдаланишга асосланган.

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

7. КАЛЛУСЛИ ТЎҚИМАЛАРДА МОРФОГЕНЕЗ

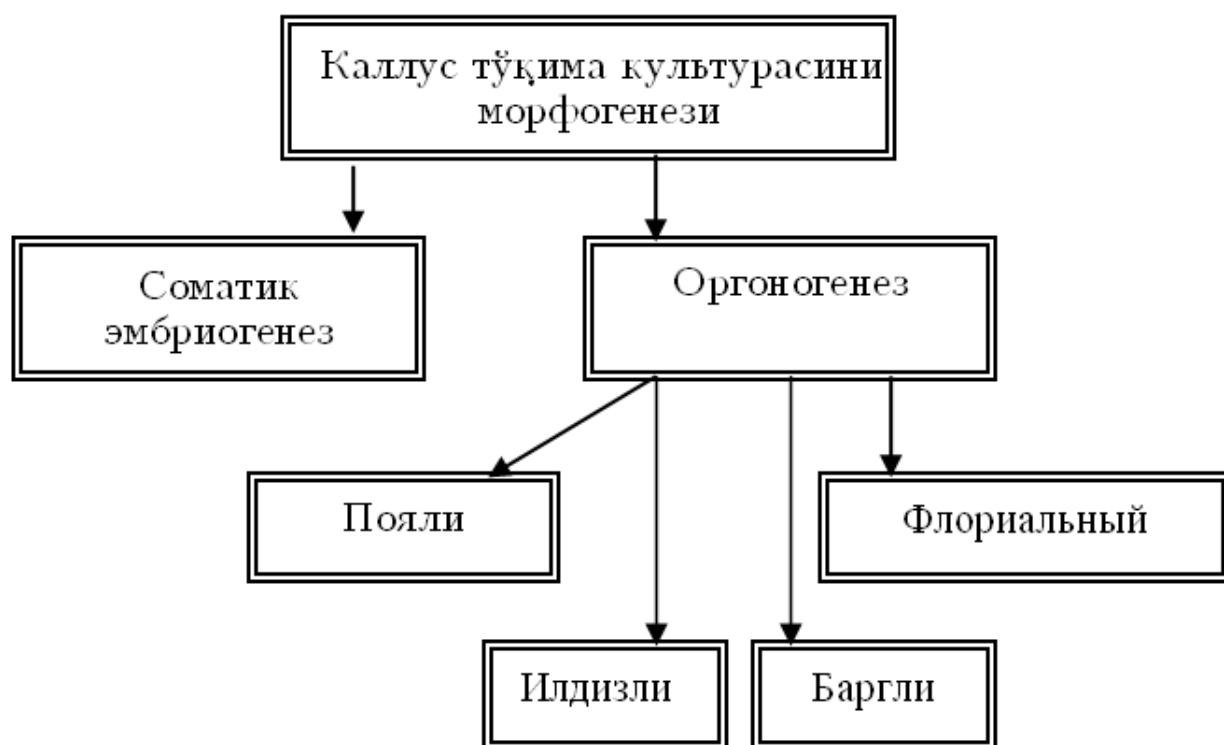
Ҳужайра ривожланишини табақасизлангандан кейин ўтадиган бир неча йўли маълум. Биринчи йўл – бу бутун ўсимликни қайта регенерацияси, балким, ҳужайра, тўқима, органлар даражасида табақаланиш. Иккинчи йўл ҳужайрани қайта табақаланиш хусусиятини йўқолиши ва ўсимликни регенерацияси, мустаҳкам табақасизланиш, гормонсиз муҳитда ўсиш хусусияти, яъни шишга айланиш. Бундай хоссалар эски (қари) кўчат культураларга хос. Учинчи йўл – каллусли ҳужайрани нормал ривожланиш цикли, уни қариб, нобуд бўлиши билан тугайди. Бу ҳолатда ҳужайра иккиламчи табақаланишга учрайди ва бўлинишдан тўхтади (ўсишни стационар фазаси). Аммо бундай табақаланиш морфогенезга олиб келмайди ва унда қариган каллус ҳужайралари хоссаларини мустаҳкамлайди.

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

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

Тўқималар культурасини у органогенез сифатида (монополяр тузилишини ҳосил бўлиши, яъни алоҳида органларни) кўриниш мумкин: илдиз, поя, камроқ феорал (гулли) ёки баргли ҳамда соматик эмбриогенез, кўринишида (соматик ҳужайралардан бифтоляр зародиш куртаксимон тузилмалар ҳолатида) кўриниши мумкин. Органогенезда дастлаб алоҳида органлар регенерация бўлади, кейин эса улардан бутун ўсимлик пайдо бўлади. Илдиз органогенези бундан мустасно. Соматик эмбриогенез натижасида органогенездан фарқли ўлароқ, илдиз меристемси ҳамда тепа қават меристемаларига эга бўлган куртак ҳосил бўлади ва ундан кейинроқ бутун ўсимлик ўсиб чиқади.

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



3.4 –расм. Каллус тўқима культурасини морфогенез типлари

Ўсимлик ҳужайраларида тотипотентлик ғояси биринчилардан бўлиб, 1902 йилда Г.Хаберлант томонидан илгари сурилган бўлсада, тажрибалар билан исботланган эмас эди.

«Ўсимликни ҳар қандай ҳужайраси янги организм пайдо бўлишига асос бўла олади, фақатгина ўсимлик организми ҳужайрани ривожланиш потенциалсини босиб қўйган

ҳолатдагина бундай бўлмаслиги мумкин» -деган эди Хаберлант. Ўсимликдан хужайрани алоҳида ажратиб олиш мана шу потенциални намоён бўлишига ёрдам беради.

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

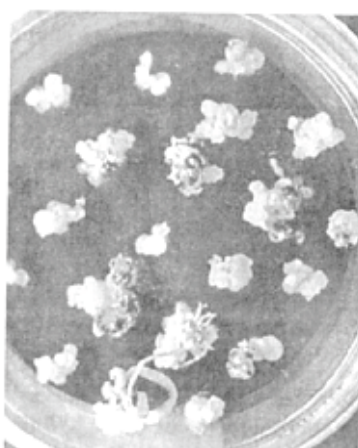
Каллусли хужайраларни иккиламчи дифференцировкаси ҳар доим ҳам ўсимликни регенерацияси ва морфогенез билан тугалланавермайди. Баъзида у фақат тўқима ҳосил бўлишига олиб келади ҳалос (гистодифференцировка). Шу йўл билан каллусли хужайра флорэмли ёки ксилемли элементларга айланиши мумкин. Иккиламчи табақаланишга бошқа бир мисол бўлиб, табақасизланган фаол проферация қиладиган хужайрани – эски (қари) бўлинмайдиган каллусли хужайрага айланиб қолиши хизмат қилиш мумкин (ривожланишни стационар фазаси).

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

Табақаланиш ва морфогенезни асосида ҳар хил генларни бирин-кетин кўшилиши ётади, яъни хужайрани табақаланиши генларни табақалашган фаоллиги билан аниқланади. Структура генларини фаоллигини ўзгариши уларни дерепрессияси (уйғониши), репрессияси ёки амплификацияси (кўпайиши) билан боғлиқ. Бу жараёнда фитогормонлар катта роль ўйнайдилар. Каллусли тўқималарни морфогенезини бошқариш мумкин. Ўсимликларни алоҳида ажратиб олинган хужайраларини морфогенезга бўлган қобилятларига ҳа ички, ҳам ташқи факторлар таъсир кўрсатадилар. Ички факторларларга: дастлабки ўсимликни қайси турга мансублиги, эксплант олинган орган, эксплантнинг ёши киради. Ташқи факторларга эса, энг аввало озук муҳити таркиби, ҳарорат, ёруғлик (уни интенсивлиги ва фотодаврнинг узунлиги) киради. Морфогенезни энг кучли индуктори – озук муҳити таркибига кирувчи цитокинин ва ауксинларнинг ўзгариши ҳисобланади. Буни стимул ёки морфогенезни сигнали деб ҳам юритилади. Ауксинга нисбатан цитокинилар миқдори кўпроқ бўлганда, поя органогенези бошланади, тескари бўлганда эса (ауксин цитокинингга нисбатан кўпроқ бўлганда) илдиз яхшироқ ривожланади (3.5-расм).



а)



б)



3.5 расм.

Каллус тўқимаси

морфогенетик реакцияси:

А – бўлиниб тармоқланувчи каллус;

Б – адвентив муртак;

В - илдиз (ризогенез) ҳосил бўлиши.

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

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

Ауксин > цитокинин = илдиз → каллусли тўқима

Цитокинин > ауксин = поя → новда → илдиз → ўсимлик

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

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

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

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

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

Морфогенезни кучайтирувчи у ёки бу таъсир оқибатида каллусли хужайра детеринация ҳолатига ўтиши керак бўлсада, уларни 400-1000 дан биттаси регенерация йўлига ўтадилар холос. Демак, морфогенезга ўтиш учун индукторни бўлиши етарли эмас, балки хужайра унга жавоб беришга тайёр бўлиши керак. Морфогенезни стимулини қабул қилиш қобиляти хужайрани компентлиги деб аталади. Олимларни фикрига хужайрани компетентлиги тасаддуф воқеълик, шунинг учун ҳам жуда кам учрайди. Шу муносабати билан ўзини компетентсизлиги туфайли морфогенез стимулини қабул қолаолмайдиган каллусли хужайралар ҳаёти тўғрисида савол туғилиши муқаррар.

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

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

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

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

Меристематик учоқни хужайраларини ваглобуляр проэмбриони синтетик фаоллигини ошиши, уларни озуқа муҳитидаги моддалар интиладиган аттрагир (озуқа муҳитини фитогормонлар микдори кўпроқ бўлган органга йўллантирувчи) марказга айлантириб қўяди. Бундай ҳолатда атрофдаги каллусли хужайралар емирилиб, ҳосил бўлган эмбрионидлар каллусли хужайралар массасидан осон тушиб кетади.

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

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

8. ЎСИМЛИКЛАРНИ КЛОНАЛ МИКРОКЎПАЙТИРИШ

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

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

- *Биринчидан, кўпчилик турлар (навлар) ҳаттоки, ювенил босқичда ҳам вегетатив усулда керакли самара билан кўпаявермайди (эман, тилогоч, ёнзоқдошлар ва бошқалар);*
- *иккинчидан, ўсимликларни кўпчилик дарахт навларини 10-15 ёшдан кейин, қаламча ёрдамида кўпайтириш мумкин эмас;*
- *учинчидан, ҳар доим ҳам стандарт экиш материали олиш мумкин эмас (юқумли касалликлар тўпланиши ва ўтиши мумкин);*
- *тўртинчидан, пайванд қилиш орқали катта ёшли (ёғочли) ўсимликларни кўпайтириш жуда ҳам қийин ва мураккаб; бешинчидан, йил давомида бир хил генетик материални олиш учун ишлаб чиқилган технологиялар самарадорлигининг ўта пастлигидир.*
- *Ҳужайра ва тўқималар културалари бўйича эришилган ютуқлар вегетатив кўпайишни тубдан янги бўлган усулни клонал микрокўпайтириш in vitro шароитида (пробиркада), жинсий бўлмаган йўл билан, ўсимликларни дастлабки нусхаси билан генетик бир хил бўлган навини яратиш).*

Бу усул асосида ўсимлик хужайраларига хо бўлган ноёб хусусият, тотипотентлик, яъни ташқи таъсирини бутун ўсимлик организми ҳосил бўлишига туртки бўлиши ётади. Албатта, бу усулни бошқа анъанавий усуллардан устунлик томонлари жуда ҳам кўп:

- *генетик бир хил экиш материалнинг олиниши;*
- *меристема тўқималари културалари ишлатилиши ҳисобига ўсимликларни вирусли ва бошқа юқумли касалликлардан ҳоли бўлиши;*
- *кўпайиш коэффициентининг юқорилиги (ўтчил ва гулли ўсимликлар учун 10^4 - 10^5 ; нинабаргли ўсимликлар учун -10^4);*
- *селекция даврининг қиқариши;*
- *ўсимлик ривожланиши ювенил даврдан репродуктив фазага ўтишини тезлаштириш;*
- *анъанавий йўллар билан қийин кўпаядиган ўсимликларни кўпайтириш;*
- *ишни йил давомида ташкил этиш имкониятларининг мавжудлиги ва кўчат материаллари ўстириш учун керак бўлган майдонни тежаш;*
- *ўстириш жараёнини автоматлаштириш имкониятлари ва ҳ.к.*

Клонал микрокўпайтиришни дастлабки муваффақиятлари ўтган асрнинг 50-йиллари охирида француз олими Жорж Морел орхидея ўсимлигининг регенерантини яратганда эришилган эди. Бу муваффақиятга ўшў вақтларда яратилган, **In vitro** шароитида ўсимликларни апикал меристемаларини кўпайтириш техникаси ўз ҳиссасини қўшган. Одатда олимлар бирламчи эксплант сифатида ўтчил ўсимликларни устки меристемаларидан фойдаланадилар, ва озуқа муҳити таркибини ўсимликни регенерация

ва пайдо бўлиш жараёнларига таъсирини ўрганадилар. Худди шу мақсадда чиннигул, хризантема, кунгабоқар, нўхат, маккажўхориқоқиўт ва бошқа ўсимликлар ўрганиб чиқилган эди.

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

Ҳосил бўлган (етилган) протокормларни бўлиш ва кейин алоҳида мустақил равишда янги тайёрланган озуқа муҳитида барг ва илдиз пайдо бўлгунча ўстириш мумкин бўлган эди. Натижада у, бу жараён чегарасиз эканлигини ва юқори сифатли генетик бир хил, вируссиз экиш материални жуда ҳам кўп миқдорда тайёрлаш мумкинлигини кузатган эди.

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

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

Шуни ҳам эслатиб ўтиш ўринлики, микрокўпайтиришдан фойдаланиш доираси жуда кенг бўлиб, кундан кунга янада ошиб бормоқда. Энг аввало бу *in vitro* шароитида ўсимликларни ёғочли турларини, айниқса, ингибиторлар ва бу усулни йўқолиб кетаётган ўсимликлар ҳамда доривор ўсимликларни кўпайтириш учун ишлатилганда катта самара беради.

Ёғочли (дарахтларни) ўсимликларни тўқима культураси бўйича биринчи илмий ишлар 1920 йилларда чоп этилган бўлиб, француз олими Готре номи билан боғлиқ. Бу мақолаларда тилоғоч дарахти камбиал тўқималарини *in vitro* шароитида каллусогенезга имкониятлари (қобилятлари) борлиги хабар қилинган. 1960 йилларда Матес деган олим биринчи марта **ОСИН** дарахти регенерантини олишга эришган ва уни тупроққа экишгача етказган. Нина баргли ўсимликларни *in vitro* шароитида ўстириш узоқ вақт тажриба сифатида ишлатилиб келинди. Бу ўсимликдан ажратиб олинган ювенил айниқса, катта ёшли тўқималарни ўсишида ўзига хос қийинчиликлар борлиги билан боғлиқ.

Маълумки, ёғоч ҳосил қилувчи дарахтлар, айниқса игна баргли ўсимликлар жуда ҳам секин ўсадилар, қийин томир оладилар, жуда кўп миқдорда иккиламчи бирикмалар (феноллар, терпенлар ва бошқа моддалар) сақлайдилар, бу моддалар эса алоҳида ажратиб олинган тўқималарда фенолаза ферментлари таъсирида оксидланадилар.

Ўз навбатида фенолларни оксидланган маҳсулотлари одатда хужайрани ўсишини ва бўлинишини ингибирлайдилар, бу эса бирламчи эксплентларни нобуд бўлишига ёки ёғочли ўсимликлар тўқимасини регенерация имкониятларини пасайишига ва ёши улғайган сари секин бутунлай йўқолишига олиб келади. Аммо, қанчалик қийин бўлишига қарамасдан олимлар изланиш манбаи сифатида тез-тез ёғочли ўсимликларни тўқима ва органларидан фойдаланиб келмоқдалар.

Ҳозирги вақтга келиб, *in vitro* шароитида кўпайтирилган ёғочли ўсимликлар сони 40 оилага мансуб бўлган 250 турдан ошиб кетган (каштан, дуб, қайин, заранг, тоғ тераги, толни тоғ тераги билан гибриди, сосна, арча ва х.к.).

Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришни усуллари ва босқичлари

Клонал микрокўпайтириш жараёнини 4 га босқичга бўлиш мумкин:

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

- *иккинчи – микрокўпайтиришни ўзи, бунда мериклонларни энг кўп (максимал) миқдорини олишга эришилади;*
- *учинчи – кўпайтирилган навдани илдиз олиши ва уларни тупроқ шароитига мослаштириш, керак бўлганда регенерант – ўсимликларни совуқ хароратда (+2⁰, +10⁰) сақлаш;*
- *тўртинчи – ўсимликни иссиқхона шароитида ўстириш ва уларни майдонга чиқариб экиш ёки сотишга тайёрлаш (3.8-расм).*

Клонал микрокўпайтиришни кўп усуллари маълум. Кўплаб муаллифлар эксплантларни ўстиришга шароитни морфогенез жараёнига таъсирини ўргана бориб, ўстириш шароитини ўзгаришига ҳар хил мофогенетик реакция бўлишини кузатганлар, бу эса клонал микрокўпайтириш методларини янги классификациясини яратишга олиб келди.

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

- *ўсимликда бор бўлган меристемаларни ривожланишини жабдаллаштириш (поя апекси, пояни куртаклари);*
- *эксплантлар тўқималарида тўғридан - тўғри адвентив куртаклар ҳосил бўлишини индукция қилиш;*
- *соматик эмбриогенезни индукция қилиш;*
- *бирламчи ва кўчат олувчи каллусли тўқималарда адвентив куртакларни табақалаштириш.*

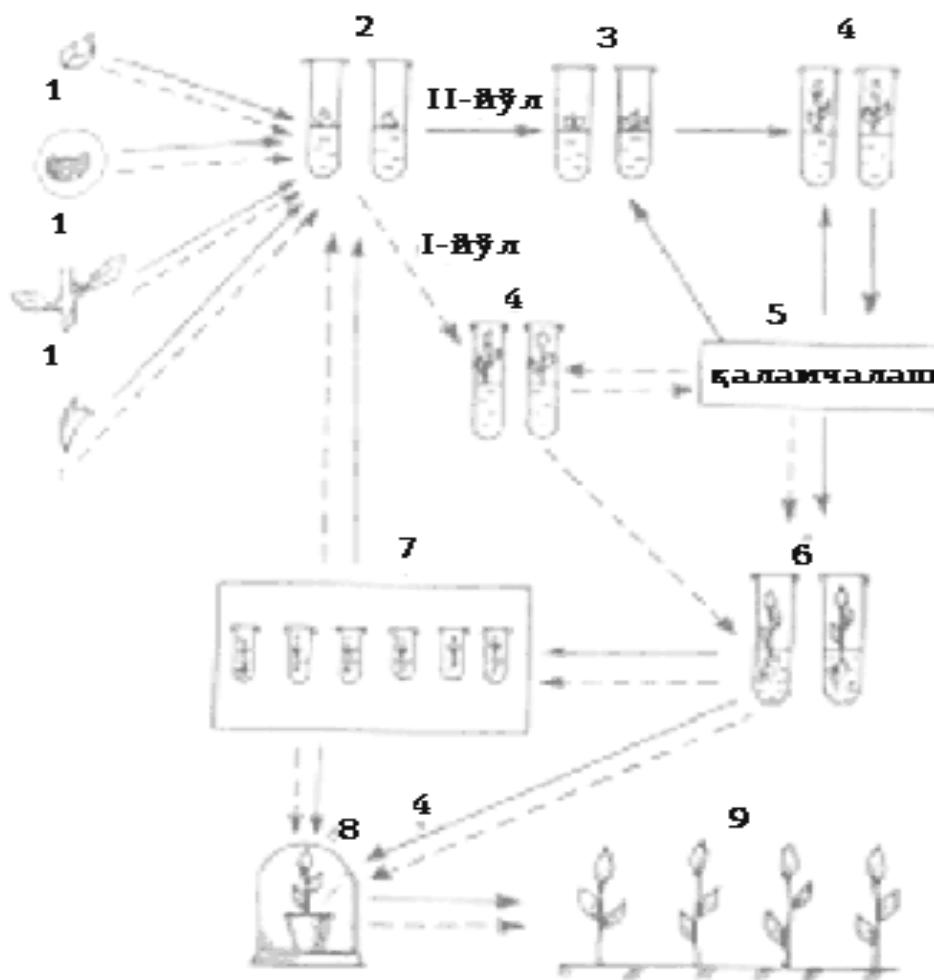
Ўсимликларни клонал микрокўпайтиришда ишлатиладиган асосий усул – бу ўсимликларда бор бўлган меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш бўлиб, у апикал устиворликни (доминирования) олиб ташлашга асосланган (3.9-расм).

Бунга икки йўл билан эришиш мумкин:

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

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

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

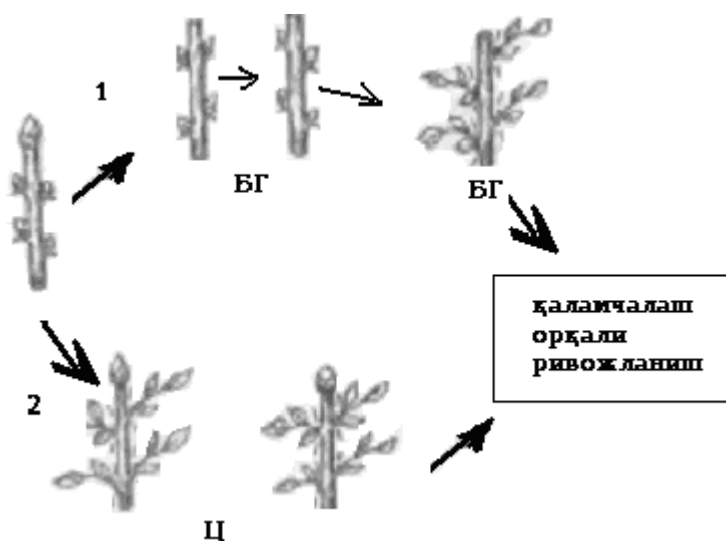


3.8-расм. Ўсимликларни клонал микрокўпайтириш

1-йўл – бор меристемаларни ривожланишини фаоллаштириш усули;

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

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



9-расм.

Ўсимликларни бор меристемаларини фаоллаштириш усули билан кўпайтириш чизмаси:

1 - тепа меристемасини юлиб ташлаш йўли;
2 - озуқа муштитига цитокининлар қўшиши йўли

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

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

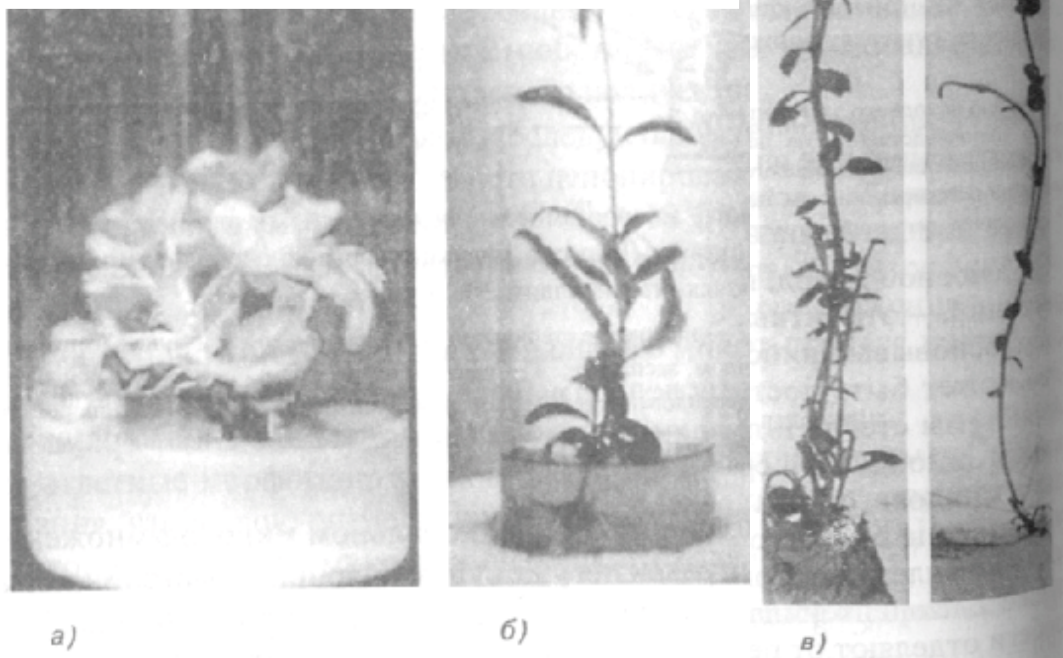
Адвентив куртак ҳосил қилишни ўсимликни ҳоҳлаган органи ва тўқимаси (ажратиб олинган куртак, барг, поя, уруғпалла, илдизни бир қисми ва х.к) асосида ташкил этиш мумкин.

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

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

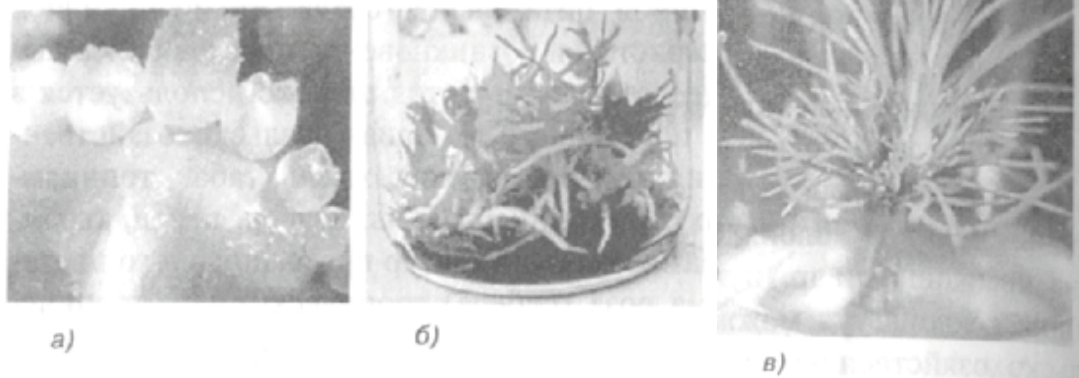
3.10-расм.

Ўсимликларни *in vitro* шароитида мавжуд меристемаларни ўсишини фаоллаштириш усули:



3.11-расм.

Ўсимликларни адвентив куртакни индукция қилиш орқали кўпайтириш:
а- буғдой; б- орхидея; в- арча.



Ер тути (земляника) ўсимлигини апикалли меристемаларини ўстиришга асосланган клонал микроўпайтириш технологияси ҳам яхши йўлга қўйилган (3.12-расм.).



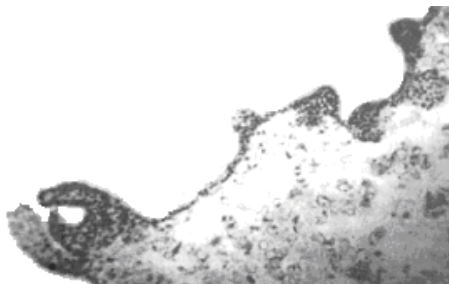
3.12-расм.
Ер тутини клонал кўпайиши

а- микроўпайишнинг ўзи;
б- адаптация бўлган ўсимлик.

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

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

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



3.13-расм.
Эксплантни эпидермал ва
субэпидермал хужайра қаватида
адвентив куртакларни ҳосил
бўлиши

Шунингдек, адвентив куртаклар меристематик хужайраларни юқори қатламидан пайдо бўлиши ҳам кўрсатиб ўтилган. Сосна дарахти мисолида адвентив куртакни куртакни уруғпалласини ва субэпидермал қаватларида пайдо бўлиши кузатиш ва бу жараён сосна учун ишлатиладиган цитокининларга боғлиқ эмаслиги кўрсатиб ўтилган (3.13-расм).

Клонал микрокўпайтиришда қўлланиладиган учинчи усул. Соматик хужайралардан, ташқи кўриниши зиготали куртакчага ўхшаган куртаксимон структурани табақаланишига (дифференциация) асосланади. Бу усул соматик эмбриогенез деб ном олган. In vitro шароитида куртак ҳосил бўлишини in vivo (табiiй) ҳолатидан фарқи шундан иборатки, соматик куртаклар, куртак қопчасидан ташқарида асексуал ривожланадилар ва ўзларини ташқи кўринишлари бўйича бир вақтни ўзида поя ва илдизни апикал меристемаларини ривожланиши кузатиладиган икки полярли тузумани эслатадилар. 0000Стевардни тушунтирилишича, соматик куртаклар ривожланишни уч босқичини ўтадилар: глобуляр, юраксимон, торпедосимон ва оқибатда майса бўлиб униб чиқади. 1950 йилларда сабзи хужайраларида биринчилардан бўлиб кузатиш бу кўриниш ҳозирги даврда Orchidaceae ва Rutaceae оилаларига мансуб бўлган шунингдек бошоқлиларни баъзи бирларини (буғдой арпа) беда, редис, ток ва баъзи дарахтлар каби кўплаб ўсимликларни кўпайтириш учун ишлатилиб келинмоқда.

Тўқима културасида эмбрионидларни пайдо бўлиши икки босқичда амалга ошади:

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

Соматик эмбриогенезни тўғридан – тўғри бирламчи эксплантлар тўқималарида, ҳамда каллусли культураларда кузтиш мумкин. Шунинг ҳам таъкидлаб ўтиш лозимки, каллусли культуралардан клонал микрокўпайтиришда фойдланиш камроқ самара беради, чунки шу йўл билан тайёрланган эквивалент материаллари (кўчатлар) донор – ўсимликга нисбатан генетик турғун (мустаҳкам) бўлмайди. Кўпинча, каллусли хужайраларни суюқ озуқа муҳитида ўстирилганда, соматик эмбриогенез келиб чиқади ва энг қийин операцидлардан ҳисобланади. Бунга сабаб, ҳар доим ҳам хужайраларга хос бўлган тотипотентлик амалга ошавермайди

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР РЎЙХАТИ

1. Бакай С.М. Биотехнология обогащения кормов мицелиальным белком. Киев. Урожай 1987.
2. Биотехнология кормопроизводства и переработки отходов. Рига: Зинатие, 1987.
3. Быков В.А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М. Высшая школа, 1987.
4. Гаврилова Н.Н. Липиды микроорганизмов для кормовых целей. М., ВНИИСЭНТИ, 1985.
5. Глележа А.А. и др. Микробные ферменты в народном хозяйства – Вильнюс: Мокслас, 1985.
6. Давронов К. Микроблар дунёси. Тошкент: ТошДАУ, 2001.
7. Давронов Қ.Д., Хўжамшукуров Н.А. Умумий ва техник микробиология. Тошкент, Ўзбекистон энциклопедияси, 2004. – 279 б.
8. Удалова Э.В. и др. Энзиматическая конверсия растительно сырья и отходов сельскохозяйственного производства. М. ВНИИ систем управления, экологических исследований и научно-технической информации, 1990.
9. Хазин Д.А. Производство кормового белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных. М. ВНИИТЭИ, 1987.
10. Алексеев В.В, Синюгин О.А. Техничко-экономическая оценка традиционной, атомной и альтернативной энергетики. - Российский химический журнал Т.41.№6.-М.:1997.
11. Баадер В., Донэ Е., Брендерфельд М. Биогаз-теория и практика.-М.:1982.
12. Гриднев П.И. Энергетические аспекты процесса переработки навоза в анаэробных условиях //Механизация и автоматизация производственных процессов ферм крупного рогатого скота. Сб. научных трудов ВНИИМЖ.- Подольск:1987, С.97-104.
13. Заварзин Г.А. Биогаз и малая энергетика. Природа,1987,№1.
14. Ковалев А.А. Ножевникова А.Н. Технологические линии утилизации отходов животноводства в биогаз и удобрения.-М.: Знания, 1990.