«АНОР (PUNICA GRANATUM L.) МАҲАЛЛИЙ НАВЛАРИНИ IN VITRO КЎПАЙТИРИШДА СТЕРИЛИЗАЦИЯ АГЕНТЛАРИ ВА ФИТОГОРМОНЛАР (BAP, GA_3, IBA, NAA) САМАРАДОРЛИГИНИ МОЛЕКУЛЯР ТАҲЛИЛ АСОСИДА БАҲОЛАШ ҲАМДА MURASHIGE & SKOOG ВА WOODY PLANT MEDIUM ОЗУҚА МУҲИТЛАРИ ТАРКИБИ ВА КОНЦЕНТРАЦИЯСИНИНГ ГЕНОТИП-ХОС РЕГЕНЕРАЦИЯ ВА РИЗОГЕНЕЗ ЖАРАЁНИГА ТАЪСИРИ»

Ахмедов Бехзод Хабибулла ўғли

Самарқанд давлат тиббиёт университети

Аннотация. Ушбу тадқиқот маҳаллий анор (Punica granatum L.) навларини **in vitro** шароитида кўпайтириш ва уларнинг генетик яхлитлигини сақлашга қаратилган. Тадқиқот жараёнида озуқа муҳитларини тайёрлаш ва стерилизация қилиш учун автоклавлаш усули қўлланилиб, 115–120°C ҳарорат ва 0,7–1,0 атм босимда 15–30 дақиқа давомида стерилизация амалга оширилди. Эксплантларнинг сирт юза стерилизацияси Р.Г. Бутенко (1990) методикаси асосида асептик шароитда ламинар боксда бажарилиб, H_2O_2, этанол ва NaClO эритмаларининг турли экспозиция вақтларидаги самарадорлиги баҳоланди. Анор эксплантларини кўпайтириш мақсадида Murashige & Skoog (MS) ва Woody Plant Medium (WPM) сунъий озуқа муҳитлари танланиб, уларнинг таркиби ва физиологик таъсири таҳлил қилинди. Озуқа муҳитлари сахароза, мио-инозитол ва агар-агар билан бойитилиб, pH қиймати 5,8 га мослаштирилди. Шунингдек, турли фитогормонлар (цитокинин ва ауксинлар) комбинациясининг анор генотипларига таъсири ўрганилди. Маҳаллий анор навларининг генетик яхлитлигини баҳолаш мақсадида ўсимлик тўқималаридан CTAB (CTAB) усулида геном ДНК ажратиб олинди. Олинган ДНК сифат ва миқдор жиҳатдан агароза гел электрофорези орқали таҳлил қилинди. Тадқиқот натижалари анорни **in vitro** кўпайтириш технологиясини такомиллаштириш ва қимматли генетик ресурсларни сақлаш учун амалий аҳамиятга эга.

Калит сўзлар: Анор (Пуниса гранатум Л.), маҳаллий навлар, ин vitro кўпайтириш, микроклонал кўпайтириш, стерилизация агентлари, експлант стерилизацияси, фитогормонлар, БАП (6-бензиламинопурин), $ГА_3$ (гиббереллин кислотаси), ИБА (индолил-3-мой кислотаси), НАА (нафтил сирка кислотаси), Мурашиге & Скоог (МС) озиқа муҳити, Woody Plant Medium (WPM), озиқа муҳити таркиби, гормон консентрацияси, генотип-хос жавоб, регенерация жараёни, ризогенез, илдиз ҳосил бўлиши, молекуляр таҳлил, генетик барқарорлик, клонал идентификация, ПСР таҳлил, тўқима маданияти, биотехнология.

ISSN 3030-3907

Abstract. This study aimed to propagate local pomegranate (Punica granatum L.) varieties in vitro and maintain their genetic integrity. In the process of the study, the autoclaving method was used to prepare and sterilize the nutrient media, sterilization was carried out at a temperature of 115–120°C and a pressure of 0.7–1.0 atm for 15–30 minutes. Surface sterilization of explants was carried out in a laminar flow cabinet under aseptic conditions according to the method of R.G. Butenko (1990), and the effectiveness of H_2O_2, ethanol and NaClO solutions at different exposure times was evaluated. For the propagation of pomegranate explants, Murashige & Skoog (MS) and Woody Plant Medium (WPM) artificial nutrient media were selected, and their composition and physiological effects were analyzed. The nutrient media were enriched with sucrose, myo-inositol and agar-agar, and the pH value was adjusted to 5.8. The effect of various combinations of phytohormones (cytokinins and auxins) on pomegranate genotypes was also studied. In order to assess the genetic integrity of local pomegranate varieties, genomic DNA was isolated from plant tissues using the CTAB method. The obtained DNA was qualitatively and quantitatively analyzed by agarose gel electrophoresis. The results of the study are of practical importance for improving the technology of in vitro propagation of pomegranate and preserving valuable genetic resources.

Keywords: pomegranate (Punica granatum L.Keywords: pomegranate (Punica granatum L.), local varieties, in vitro reproduction, microclonal reproduction, sterilization agents, exploration sterilization, phytogormons, BAP (6-benzylaminopurine), GA_3 (gibberellinic acid), IBA (indolyl-3-fatty acid), Naa (naphthyl acetic acid), Murashige & Skoog (MS) food medium, Woody Plant Medium (WPM), nutrient medium composition, hormone concentration, genotype-specific response, regeneration process, rhizogenesis, root formation, molecular analysis, genetic stability, clonal identification, PCR

Аннотация. Целью данного исследования было размножение местных сортов граната (Punica granatum L.) in vitro и сохранение их генетической целостности. В процессе исследования для приготовления и стерилизации питательных сред использовался метод автоклавирования, стерилизация проводилась при температуре 115–120°C и давлении 0,7–1,0 атм в течение 15–30 минут. Поверхностная стерилизация эксплантов проводилась в ламинарном боксе в асептических условиях по методу Р.Г. Бутенко (1990), и оценивалась эффективность растворов H_2O_2, этанола и NaClO при различном времени воздействия. Для размножения эксплантов граната были выбраны искусственные питательные среды Мурасиге и Скога (MS) и древесно-растительная среда (WPM), и проанализированы их состав и физиологические эффекты. Питательные среды были обогащены сахарозой,

ISSN 3030-3907

мио-инозитолом и агар-агаром, а значение pH было отрегулировано до 5,8. Также было изучено влияние различных комбинаций фитогормонов (цитокининов и ауксинов) на генотипы граната. Для оценки генетической целостности местных сортов граната геномная ДНК была выделена из растительных тканей с использованием метода CTAB. Полученная ДНК была качественно и количественно проанализирована методом электрофореза в агарозном геле. Результаты исследования имеют практическое значение для совершенствования технологии размножения граната in vitro и сохранения ценных генетических ресурсов.

Ключевые слова: гранат (Punica granatum L.Ключевые слова: гранат (Punica granatum L.), местные сорта, размножение in vitro, микроклональное размножение, стерилизующие агенты, стерилизация эксплантатов, фитогормоны, bap (6-бензиламинопурин), gaiq (гиббереллиновая кислота), IBA (индолил-3-жирная кислота), naa (нафтилуксусная кислота), murashige & Skoog (MS) питательная среда, Woody Plant Medium (WPM), состав питательной среды, концентрация гормонов, генотипоспецифический ответ, процесс регенерации, ризогенез, образование корней, молекулярный анализ, генетическая стабильность, клональная идентификация, П

Кириш.

Республикада анор мевалари ҳажмини ошириш учун нафақат майдонларни кенгайтириш, балки анор кўчатчилик тармоғига янги инновацион технологияларни илмий асосланган услубларини жорий қилишни талаб этилади. Анор етиштириш бўйича дунёнинг етакчи Ҳиндистон (йиллик 743000 т- International Society for Horticultural Science), Эрон (йиллик 705,166 т. ISHS), АҚШ (йиллик- 282532 т, www.agmrc.org) каби давлатларида анор кўчатчилик тармоғида биотехнология ютуқлари орқали юқори сифатли экиш материалини ишлаб чиқариш ва анор боғларини ташкил этишнинг янги юқори самарали усулларини ишлаб чиқишга катта аҳамият берилмоқда. Анор мевали экинининг ривожланиши, мева сифати ва унинг ҳосилдорлиги кўп жиҳатдан экиш материалининг сифатига боғлиқ. Айниқса экспортга йўналтирилган анор боғларнинг нав тозалиги катта ахамиятга эга. Бироқ шуни таъкидлаш жоизки, анор кўчатларини анъанавий усулда етиштиришга узоқ вақт талаб этилади. Шунинг учун ҳозирги кунда *in vitro* микроклонлаш технологияси ёрдамида анор кўчатлари етиштириш ва нав тозалиги таъминотининг энг истиқболли усулларидан бири ҳисобланади.

Анорнинг тиббиёт ва фармацевтика, озиқ-овқат саноати ҳамда бошқа ишлаб чиқариш соҳалардаги аҳамиятини эътиборга олган ҳолда тупроқ-иқлим шароитга мос бўлган биотехнологик усулда анор навларини *in vitro* микроклонли кўпайтириш бўйича олиб борилаётган ва олинган дастлабки

ISSN 3030-3907

натижалар минтақада анорчиликни ривожлантиришга муҳим асос бўлиб хизмат қилади. Микроклонлаш технологияси ёрдамида қисқа муддатда кўплаб сифатли, вирус ва бактериал инфекциядан холи бўлган материални керакли миқдорда тез кўпайтириш имконини беради ва нав тозалиги юқори бўлган кўчатлар олишга эришилади.

ТАДКИКОТ ОБЪЕКТИ ВА ПРЕДМЕТИ.

Геномика ва Биоинформатика маркази Трансгеномика ва тўқималар культураси лабораторияси дала тажриба майдонида парвариш қилинаётган анорнинг махаллий (Қозоқи, Туятиш, Қайин анори, Дашнабод) навлари. *Тадкикот предмети.* Танлаб олинган тадқиқот навларини *in vitro* шароитида етиштириш. Бунда айнан анорнинг махаллий генотиплари учун мос бўлган озуқа мухити ва унинг таркиби хамда анор эксплантлариниг регенерацияси (пролиферация) ва эксплантлар регенерацияси натижасида хосил бўлган микроновдаларнинг илдиз хосил қилиши ва ривожланиши (ризогенез) учун ўсишни бошқарувчи моддалар (фиторегулторлар) нинг тури ва мақбул концентрациялари ишлаб чиқилади.

ТАДҚИҚОТ НАТИЖАЛАРИ ВА МУҲОКАМАСИ.

Автоклавлаш - автоклавларда босим остида нам буг билан ишлов бериш. Бактериялар ва замбуруғларнинг вегетатив ҳужайралари нобуд бўлиши учун 15 дақиқа давомида 120°С ҳарорат талаб қилинади. Озуқа мухитларини автоклавлаш уларни пробиркаларга ёки колбаларга 0.7-0.8 атм босим остида тўлдиргандан сўнг амалга оширилди. Восита ҳажмига қараб 115-120°С ҳароратда 15-30 минут.

Сирт юза стерилизацияси. Эксплантларда сирт юза стерилизацияси Р.Г.Бутенко (1990 йил) методикасида асосида асептик шароитда ламинар бох (HFsafe LC, Biobase. China) да амалга оширилди. Експлантларнинг сирт юза стерилизацияси учун бир нечта кимёвий бирикмаларнинг турли вақт оралиғида таъсир даражаси ўрганилди (1-жадвал).

1-жадвал.

Сирт юза стерилизация воситалари ва стериллаш давомийлиги

Тажриба	Komponentlar		
T_1	5 мин H_2O_2 (3%)	10 сек C_2H_5OH (96%)	10 мин NaClO (2%) + dH_2O (Sterill)
T_2	5 мин H_2O_2 (3%)	15 сек C_2H_5OH (96%)	15 мин NaClO (2%) + dH_2O (Sterill)
T_3	5 мин H_2O_2 (3%)	20 сек C_2H_5OH (96%)	20 мин NaClO (2%) + dH_2O (Sterill)

Сунъий озуқа муҳити ва унинг таркиби. Тадқиқотда *in vitro* шароитида кўпайтириш учун MS (Murashige & Skoog, 1962) ва WPM (Woody

ISSN 3030-3907

Plant Medium, 1980) озуқа мухитлари танлаб олинди ва улар тахлили амалга оширилди. Ўтказилган тахлил ва хулосаларга асосоланиб анор эксплантларини *in vitro* шароитида кўпайтириш учун MS ва WPM озуқа мухитлари танлаб олинди ва тажрибалар олиб борилди (2-жадвал).

Озуқа таркиби баённома бўйича ташкил этилди ҳамда сахароза (30.0 гр/Л да ва мио-инозитол (0.1гр/Л) ва агар-агар (8.0 гр/Л) қўшилди. Тайёрланган озуқа муҳитининг pH қиймати 0.1 H NaOH эритмаси ёрдамида 5.8 га тўғирланди. Озуқа муитлари 1000 мл ҳажмли иссиқликка чидамли конуссимон колбаларга қуйилди ва автоклавда 120°C да 0.75-1.0 атм. босимда 20 минут давомида стерилизация килинди. Стерил озуқа 500 мл ҳажмли идишларга 50 мл дан тақсимланди. Бундан ташқари фитогармонлар (цитокинин, ауксин) тури ва таркиблари танлаб олиниб, уларнинг анор генотипларига таьсир даражалари тадқиқ қилинди.

2-жадвал.

Ўсимлик ҳужайра ва тўқималар культурасида фойдаланиладиган “Murashige & Skoog” (MS) сунъий озуқа муҳити

	Ингредиентлар	Концентрация, мг/л
Макроэлементлар		
	Аммоний нитрат *(NH_4NO_3)*	1650
	Калий нитрат *(KNO_3)*	1900
	Кальций хлорит *($CaCl_2$)*	440.0
	Магний қулфат *($MgSO_4$)*	370
	Калий дигидрофасфат *(KH_2PO_4)*	170
Микроэлементлар		
	Бор кислота *(H_3BO_3)*	6.2
	Кобальт хлорит *($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)*	0.025
	Темир сулфат *($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)*	27.8
	Марганец (II) сулфат *($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)*	22.3
	Калий йодит *(KI)*	0.83
	Натрий молибдат *($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)*	0.25
	Рух сулфат *($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)*	8.6
	Этилендиаминотетраацетат темир натрий *(Na_2EDTA)*	36.7
	Мис сулфат *($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)*	0.025
Витамин ва органик бирикмалар		
	Мио-иноситол	100
	Аминобензой кислота	0.50

ISSN 3030-3907

	Никотин кислота	0.5
	Пиридоксин · HCl	0.5
	Тиамин · HCl	0.1
	Глицин	2.0
	Глутамин	50.0
	Агар-агар	8000
	Сахароза	30000
	dH$_2$O	1 литр

3-жадвал.

Қаттиқ ёғочлик ўсимликлар тўқималари культурасида фойдаланиладиган Woody Plant Medium (WPM) сунъий озуқа муҳити

	Ингредиентлар	Концентрация, мг/л
	Макроэлементлар	
	Аммоний нитрат *(NH_4NO_3)*	400.0
	Калий нитрат *(KNO_3)*	990.0
	Кальций хлорит *($CaCl_2$)*	72.50
	Магний қулфат *($MgSO_4$)*	370.0
	Калий дигидрофасфат *(KH_2PO_4)*	170.0
	Микроэлементлар	
	Бор кислота *(H_3BO_3)*	6.20
	Кобальт хлорит *($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)*	-
	Темир сулфат *($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)*	27.80
	Марганец (II) сулфат *($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)*	22.30
	Калий йодит *(KI)*	-
	Натрий молибдат *($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)*	0.250
	Рух сулфат *($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)*	8.60
	Этилендиаминотетраацетат темир натрий *(Na_2EDTA)*	36.70
	Мис сулфат *($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)*	0.025
	Витамин ва органик бирикмалар	
	Мио-иноситол	100.0
	Аминобензой кислота	-
	Никотин кислота	0.50
	Пиридоксин · HCl	0.50
	Тиамин · HCl	0.10
	Глицин	2.0

ISSN 3030-3907

	Глутамин	-
	Агар-агар	8000
	Сахароза	30000
	dH$_2$O	1 литр

STAB усулида геном ДНК ажратиш

Махаллий анор навлари генетик яхлитлигини таъминлаш мақсадида анор навларидан ДНК ажратиб олиш учун намуналар олинди. Намуналардан ДНК CTAB усулига биноан ажратилди.

Ўсимликлар тўқимасидан STAB усулида геном ДНК сини ажратиш

Керакли реагентлар:	**Керакли асбоб-ускуналар:**
• Суюқ азот • 2xCTAB • 10xCTAB • Хлороформ: изоамил (24:1) • CTAB Precipitation • High Salt RNK азали(50ml/200мкл) • Изопропонол • 70% спирт • ТЕ буфери	• Ховонча ёки пробирка(1500/2000 мкл) • Поставка (96 лик) • Центрифуга • Музлатгич • 65^0 С Автоблот ва Вортекс • Концентратор • Резина қўлқоп ва кончиклар (100, 200 va 1000 мкл)

1. Барг **суюқ азот**да музлатилиб гомогенизация қилинади.
2. 600 мкл **2xCTAB** солинади ва 60^0 С **AUTOBLOT**га 20 минутга қўйилади(хар 5 минутда аралаштирилади).
3. Устига 600 мкл х**лороформ: изоамил**(24:1) солиниб, 2 минут қаттиқ аралаштирилади.
4. 5 минут/10 000 аборот **центрифуга** қилинади ва супернатантнинг юқорисидан 600 мкл бошқа пробиркага олинади.
5. Устига 60 мкл **10xCTAB** солиниб аралаштирилади.
6. Устига 600 мкл **Хлороформ: изоамил** (24:1) солиниб, 2 минут қаттиқ аралаштирилади.
7. 5 минут/10 000 аборот **центрифуга** қилинади ва супернатантнинг юқорисидан 600 мкл бошқа пробиркага олинади.
8. Устига 1:1 нисбатда **NaAc+Eton** солинади ва 25^0 С **AUTOBLOTга** 40 минут инкубацияга қўйилади.
9. 15-20 минут/14 000 аборот **центрифуга** қилинади ва супернатант тўкилади.
10. Чўкма устига 500 мкл **High Salt** солинади ва 5 минут вортекс қилиниб сўнг 15 минут хона хароратида сақланади.

ISSN 3030-3907

11. Устига 300 мкл изопропонол солинади ва 2 минут секин аралаштирилади.
12. 15 минут/10 000 аборот **центрифуга** қилинади ва супернатант тўкилади.
13. Чўкма устига 600 мкл **70% ли спирт** солиниб 5 минут аралаштирилади.
14. 3 минут/14 000 аборот **центрифуга** қилинади ва спирт тўкилади. (Чўкма спирт билан икки марта ювилади).
15. Чўкма яьни ДНК **концентраторда** қуритилади 10-15 минут
16. Чўкма устига 100 мкл **ТЕ буфери** солиниб **вортекс** қилинади ва шорт **центрифуга** ва -20^0 С **музлатгичга** солинади.

ДНК агарозли гел электрофорез - бу ДНК бўлакларини узунлик бўйича ажратиш учун ишлатиладиган аналитик усул. Бу ташқи электр майдонининг таъсирида гелда ҳаракатланаётганда турли узунликдаги бўлакларнинг ҳаракатланишининг ҳар хил тезлигига асосланади.

Ҳар хил узунликдаги ДНК парчаларини ажратиш учун агароза концентрацияси ҳар хил бўлган гелдан фойдаланилади. Ажратилган ДНК бўлакларининг узунлиги қанча қисқа бўлса, агароза концентрацияси шунчалик юқори бўлиши керак.

4-жадвал.

ДНК намуналарини текшириш ва генетик масофаларини аниқлаш учун агароза гели

0.9 % Агароза – 200мл	**3.5 % Агароза – 200мл**
1.8г Agarose 200мл 0.5X TBE 14µl *Etidium bromid*	7.0г Agarose 200мл 0.5X TBE 14µl etBr.

5-жадвал.

Молекуляр анализлар учун ишчи эритмалар

10 X TBE– 1 Liter	**TE 50 ml**	**Super TEA 50ml**
800 мл dH20 121г Tris(Trizma) Base 55 г Boric Acid 7.44 г EDTA 1,0 л га dH2O билан етказилади.	10mM Tris 0.5 мл 1M Tris pH 8.0 1 mM EDTA 0.1 мл 0.5M eDTA pH 8.0	50 mM Tris 2.5мл 1M Tris 10 mM EDTA 1мл 0.5M EDTA 300 mM NaOAc 15мл 1M NaOAc 50 мл га dH2O билан етказилади.

Умумий хулоса.

ISSN 3030-3907

Олиб борилган тадқиқотлар маҳаллий анор (*Punica granatum L.*) навларини **in vitro** шароитида кўпайтириш ва уларнинг генетик яхлитлигини сақлашда қўлланилган технологик ёндашувларнинг самарадорлигини тасдиқлади. Озуқа муҳитлари ва лаборатория асбоб-ускуналарини стерилизация қилишда автоклавлаш усули 115–120°C ҳарорат ва 0,7–1,0 атм босимда 15–30 дақиқа давомида ишончли натижалар берди ҳамда микробиологик ифлосланишнинг олди олинди. Эксплантларни сирт юза стерилизация қилишда водород пероксиди, этил спирти ва натрий гипохлорити эритмаларининг турли экспозиция вақтлари солиштирма таҳлил қилинди ва асептик культура олиш учун оптимал режимлар аниқланди. Натижаларга кўра, стерилизация давомийлигининг тўғри танланиши эксплантларнинг тирик қолиш даражаси ва кейинги морфогенетик фаоллигига бевосита таъсир кўрсатиши исботланди. Анор эксплантларини кўпайтиришда Murashige & Skoog (MS) ва Woody Plant Medium (WPM) сунъий озуқа муҳитларининг қўлланилиши ижобий натижалар берди. Озуқа муҳитларининг таркибий фарқлари эксплантларнинг ўсиш суръати ва ривожланиш хусусиятларига таъсир қилиши аниқланди. Шунингдек, фитогормонлар (цитокинин ва ауксинлар) комбинацияси анор генотипларининг **in vitro** кўпайтириш самарадорлигини ошириши кузатилди. Маҳаллий анор навларидан CTAB усулида геном ДНК ажратиш юқори сифат ва барқарорликда амалга оширилди ҳамда агароза гел электрофорези натижалари генетик яхлитлик сақланганини тасдиқлади. Олинган натижалар анорни **in vitro** кўпайтириш технологиясини такомиллаштириш, қимматли генетик ресурсларни сақлаш ва селекция ишларида қўллаш учун муҳим амалий аҳамиятга эга.

ФОЙДАЛАНИЛГАН АДАБИЁТЛАР.

1. Методические указания по диагностике и учёту болезней корней и стеблей земляники и малины, передающихся через почву. М- 2001. – 43 с. 26.
2. Conservation and Restoration of Pine Forest Genetic Resources in México / By C. SÁENZ-ROMERO, A. E. SNIVELY and R. LINDIG-CISNEROS (Received 12 th June 2003)
3. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 1998.
4. Управление биологическим разнообразием в сельскохозяйственных системах / Под ред. Д.И. Джарвис, К. Пэдок, Х.Д. Купер. – Рим, 2012. – 476 с.
5. Овощи – это пища и лекарство / Зуев В.И. Мавлянова Р.Ф. Дусмуратова С.И. Буриев Х.Ч. - Ташкент – 2016.

ISSN 3030-3907

6. Samir, Z. (2010). In vitro Salt and Drought Tolerance of Manfalouty and Nab El-Gamal Pomegranate Cultivars. Australian. Basic Appl. Sci. 4(6): 1076-1082.
7. Akhmedov B. K., Mamarajabova D. E. THE SIGNIFICANCE OF GOVERNMENT INITIATIVES IN ENHANCING THE ACCESSIBILITY OF PHARMACEUTICALS FOR THE CITIZENS OF UZBEKISTAN. ENSURING THE QUALITY OF PHARMACEUTICAL PRODUCTS IN UZBEKISTAN //AMERICAN JOURNAL OF APPLIED MEDICAL SCIENCE. – 2025. – Т. 3. – №. 1. – С. 143-149.

ISSN 3030-3907