

## **GINKGO BILOBA L. DARAXTI SOMATIK EMBRIOGENEZI VA REGENERAT O'SIMLIK YETISHTIRISH TEXNOLOGIYASI**

Z.T. Buriev, b.f.d. O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent

X.A. Ubaydullayeva, b.f.d. O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

A.A. Bolkiyev, kichik ilmiy xodim, O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

J.B. Eshmurzayev, kichik ilmiy xodim, O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

F.I. Babajanova, kichik ilmiy xodim, O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

S.A. Abdullaev, kichik ilmiy xodim, O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

A.N. Abdullaev, kichik ilmiy xodim, O'zR FA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

[zabar75@yahoo.com](mailto:zabar75@yahoo.com)

### **Anatatsiya.**

Tadqiqotda *in vitro* sharoitida *Ginkgo biloba* L. daraxtini somatik embriogenez usuli orqali regenerant o'simlik olish amalga oshirildi. Yetilmagan urug'larni 5 daq. vodorod peroksid, 20 sek. 96% spirt, 15 daq. 2% NaClO eritmalarida sirt sterilizatsiya qilish zamburugli va bakterial zararlanishdan xoli eksplantlar olish imkonini berdi. MS ozuqa muhiti tarkibiga 2.5 mg/l (2.4-D)+1.0 mg/l (BAP) fitoregulyatorlarining kiritilishi meristematik koteledon eksplantlarining rivojlanish darajasi 40.2 % ga, somatik embrionlar shakllanishi darajasi 86.4 % gacha ko'tarilganligi aniqlandi. Bunday ko'rsatkichlar gipokotel eksplantlarida rivojlanish darajasi va embrionlar shakllanishi mos ravishda 65.3 % va 12.1 % ni tashkil etdi. Olingan natijalar o'tkazilgan tajribalarni boshqa variantlariga nisbatan yuqori ekanligi aniqlandi.

**Kalit so'zlar:** *Ginkgo biloba* L., somatik embriogenez, *in vitro*, embrion.

### **Абстрактный.**

В исследовании регенерацию дерева *Ginkgo biloba* L. методом соматического эмбриогенеза проводили *in vitro*. Поверхностная стерилизация незрелых семян в растворах перекиси водорода в течение 5 мин, 96% спирте в течение 20 с и 2% NaClO в течение 15 мин позволила получить экспланты, свободные от грибкового и бактериального поражения. Установлено, что внесение в питательную среду МС 2,5 мг/л (2,4-Д)+1,0 мг/л (БАП) фиторегуляторов повышало уровень развития меристематических семядольных эксплантов на 40,2% и уровень формирования соматических

зародышей на 86,4%. Такие показатели составили 65,3% и 12,1% соответственно от уровня развития и формирования зародышей у гипокотильных эксплантов. Полученные результаты оказались выше по сравнению с другими вариантами проведенных экспериментов.

**Ключевые слова:** *Ginkgo biloba* L., соматический эмбриогенез, *in vitro*, эмбрион.

### **Abstract.**

In the exploration, the regeneration of *Ginkgo biloba* L. tree was carried out at *in vitro* by somatic embryogenesis method. The immature seeds of this tree had cleansed to do surface sterilization in hydrogen peroxide solutions for 5 min, 96% alcohol for 20 s, and 2% NaClO for 15 min. The latter of index, it is possible to obtain explants free from fungal and bacterial damage. It was established that the introduction of phytohormones into the nutrient medium MS 2.5 mg/l (2,4-D) + 1.0 mg/l (BAP) increased the level of development of meristematic cotyledon explants by 40.2% and the level of formation of somatic embryos by 86,4%. Such indicators amounted to 65.3% and 12.1%, respectively, the percentage of development and formation of embryos in hypocotyl explants, the results that obtained were higher than other variants of the experiments.

**Key words:** *Ginkgo biloba* L., somatic embryogenesis, *in vitro*, embryo.

### **KIRISH.**

Somatik embriogenez – vegetativ ko'payish asosida yotuvchi jarayon bo'lib, bu jarayonda somatik hujayradan totipotent hujayralar hosil bo'ladi va jinsiy jarayonsiz yangi organizmning paydo bo'lishiga olib keladi [1, 2]. Turli omillar ta'sirida ba'zi kallas hujayralarida embrion hosil bo'lmasligi mumkin, ular ekilgan ozuqa muhitning tarkibiy qismlari va yorug'lik, harorat kabi omillarni misol qilishimiz mumkin. Embriogenik potensialga ega bo'lgan hujayralar embriogen kallas hujayralariga-qutblangan hujayralarga differensiyalanadi, ular sharsimon tuzilishni hosil qila boshlaydi [3, 4]. Somatik embriogenez ko'p bosqichli regeneratsiya jarayoni bo'lib, somatik embrionlarning embrion qopchasidan tashqarida to'qimalar kulturasining somatik hujayralaridan rivojlanishi bilan

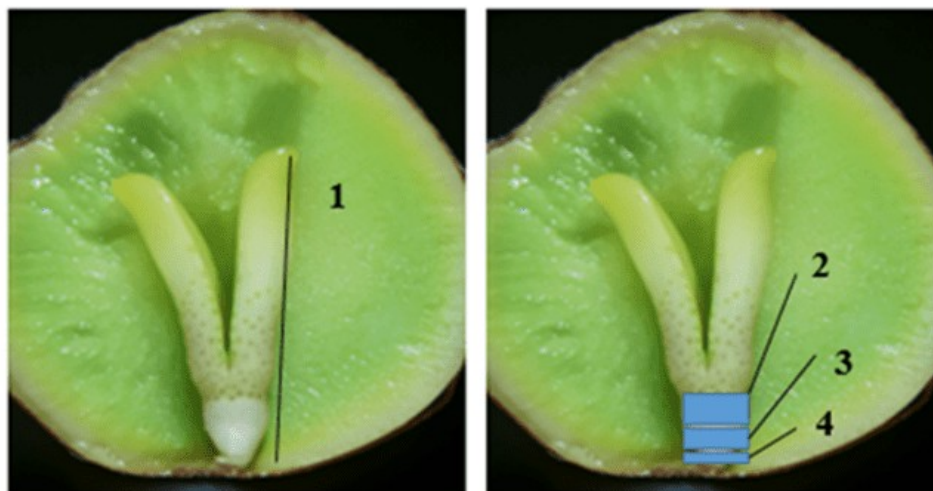
tavsiflanadi. Somatik embrionning rivojlanishi embrion suspensor (o'simliklarda suspensorlar, angiospermilar va zigotalarda topilib, endospermni embrion bilan bog'laydi) massasining shakllanishi bilan boshlanadi, keyin embrion shakllanishi, o'simlikka aylanishi va yosh o'simlikning yangilanishi (nihol bosqichi) bosqichlaridan o'taydi [5].

*Ginkgo biloba* L. daraxti embrionlarni *in vitro* sharoitida yetishtirish va somatik embriogenezga oid ba'zi tadqiqotlar mavjud [6, 7, 8, 9]. Achitqi ekstrakti, hindiston yong'og'i suti, kazein gidrolizat yoki glutamat kabi moddalarni o'z ichiga olgan ozuqa muhitda foydalanish orqali *Ginkgo biloba* L. daraxtini *in vitro* yetishtirish bilan tadqiqotlar e'lon qilingan [10, 11].

## **MATERIALLAR VA USULLAR.**

Tadqiqotlar 2022 yilning I - II choragida O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Genomika va bioinformatika markazining Transgenomika va to'qimalar kulturasida laboratoriyasida o'tkazildi. Tajriba nav namunalari (*Ginkgo biloba* L.) O'rmon xo'jaligi ilmiy-tadqiqot institutida mavjud navlardan tanlab olindi.

**O'simlik materiallari va sirt yuza sterilizatsiyasi.** *Ginkgo biloba* L. o'simligida somatik embriogenez orqali regenerant o'simlik olishda o'simlikning bir nechta qismi (barg, yashil novda, urug') dan namunalar olinib tadqiqotlar amalga oshirildi.



**1- Rasm.** *Ginkgo biloba* L. yetilmagan meva urug'ining ichki tuzilishi  
1. Zigotik embrion, 2. meristematik koteledon, 3. gipokotel, 4. radicle (ildiz)

Tanlab olingan namunalarda 70-140 kun oralig'ida kallusogenez bosqichi amalga oshirildi. Somatik embrionlarning rivojlanishi faqat urug'dan ajratib olingan eksplantlarda kuzatildi. Dastlab o'simlik yetilmagan urug'lari 24 soat davomida tozza suvda saqlandi va maxsus qog'ozlarga olinib xavo oqimida quritildi. Urug'lar 5 min davomida vodorod peroksid eritmasida, 20 sekund davomida 96% spirtida, 15 daqiqa davomida 2% NaClO eritmasida sirt sterilizatsiya qilindi va distillangan suv bilan uch marta yuvildi va zigotik embrionlar ajratib olindi. Zigotik embrionlar yaxlit va qismlarga ajratilib (1-Rasm), MS ozuqa muhitiga ekildi va turli o'sishni boshqaruvchi moddalar ta'siri o'rganildi. Tajribalarda to'rt xil eksplant ikkta variant va xar bir variantda ikkta takrorda amalga oshirildi.

**Ozuqa muhiti va uning tarkibi.** Tadqiqotda MS (Murashige va Skoog 1962) [12] ozuqa muhitidan foydalanildi. Ozuqa tarkibi bayonnoma bo'yicha tashkil etildi. Tayyorlangan ozuqa muhitining pH qiymati 0.1 N NaOH eritmasi yordamida 5.8 ga to'g'irlandi. Ozuqa muhitlari 1000 ml hajmli issiqlikka chidamli konussimon kolbalarga taqsimlanib avtoklavda 120°C da 0.75-1.0 atm. bosimda 20 minut davomida sterilizatsiya qilindi. Steril ozuqa 500 ml hajmli idishlarga 50 ml dan teng taqsimlandi.

## **TADQIQOT NATIJALARI.**

Tajribaning birinchi varianti birinchi takrorida (MS+(0.0 mg/L) 2.4-D+ (2.0 mg/L) BAP) ozuqa muhiti tarkibiga induktor sifatida faqat (2.0 mg/L) BAP kiritildi va kuzatishlar olib borildi. Tajriba eksplantlarining barchasida rivojlanish darajasi past ko'rsatkichlarni namoyon qildi. Embrionlarning shakllanishi zararlanmagan (yaxlit) va radicle (ildiz) eksplantlarida kuzatilmadi. Meristematik koteledon eksplantlarida kallus shakllanish darajasi 11.8 % ni tashkil etdi, ammo embrionlarning shakllanishi boshqa eksplantlarga nisbatan yuqori 15.8 % ni namoyon etdi. Gipokotel eksplantlarida kallusogenez bir muncha yuqori (23.3 %) lekin embrionlar shakllanishi past (4.4 %) ko'rsatkichni namoyon qildi. Radicle (ildiz) eksplantlarida kallus shakllanishi yuqori, ammo ildiz rivojlanganligi bilan ajralib turdi (6-jadval).

6-Jadval. MS ozuqa muhitida turli eksplantlarning BAP ta'sirida somatik embrionlarning shakllanishi

| Eksplant               | Ozuqa muhiti va fitoregulyator (lar), mg/L | Eksplant soni, dona | Eksplant uzunligi, mm | Rivojlanish darajasi, % | Somatik embrionlar shakllanishi, % |
|------------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Zararlanmagan (yaxlit) | MS+(0.0 mg/L) 2.4-D+ (2.0 mg/L) BAP        | 30                  | 5.0                   | 32.3±2.2                | 0.0                                |
| Meristema koteledon    | MS+(0.0 mg/L) 2.4-D+ (2.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 11.8±2.3                | 15.8±2.1                           |
| Gipokotel              | MS+(0.0 mg/L) 2.4-D+ (2.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 23.3±1.8                | 4.4±2.0                            |
| Radicle (ildiz)        | MS+(0.0 mg/L) 2.4-D+ (2.0 mg/L) BAP        | 30                  | 1.0                   | 14.6±1.2                | 0.0                                |

Tajribaning birinchi varianti ikkinchi takrorida (MS+(2.0 mg/L) 2.4-D+(0.0 mg/L) BAP) tajriba eksplantlarining barchasida rivojlanish va embrion shakllanishi birinchi takrorga nisbatan yuqori ko'rsatkichlarni namoyon qildi (7-jadval). Zararlanmagan (yaxlit) eksplantlarda morfologik belgilar (ildiz, poya, barg) kuchli rivojlanganligi bilan ajralib turdi. Somatik embrionlarning shakllanishi faqat meristematik koteledon (51.1 %) va gipokotel (6.4 %) eksplantlarida kuzatildi.

7-Jadval. MS ozuqa muhitida turli eksplantlarning 2.4-D ta'sirida somatik embrionlarning shakllanishi

| Eksplant               | Ozuqa muhiti va fitoregulyator (lar), mg/L | Eksplant soni, dona | Eksplant uzunligi, mm | Rivojlanish darajasi, % | Somatik embrionlar shakllanishi, % |
|------------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Zararlanmagan (yaxlit) | MS+(2.0 mg/L) 2.4-D+ (0.0 mg/L) BAP        | 30                  | 5.0                   | 53.2±1.3                | 0.0                                |
| Meristema koteledon    | MS+(2.0 mg/L) 2.4-D+ (0.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 21.7±1.5                | 51.1±1.5                           |
| Gipokotel              | MS+(2.0 mg/L) 2.4-D+ (0.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 33.5±1.4                | 6.4±2.0                            |

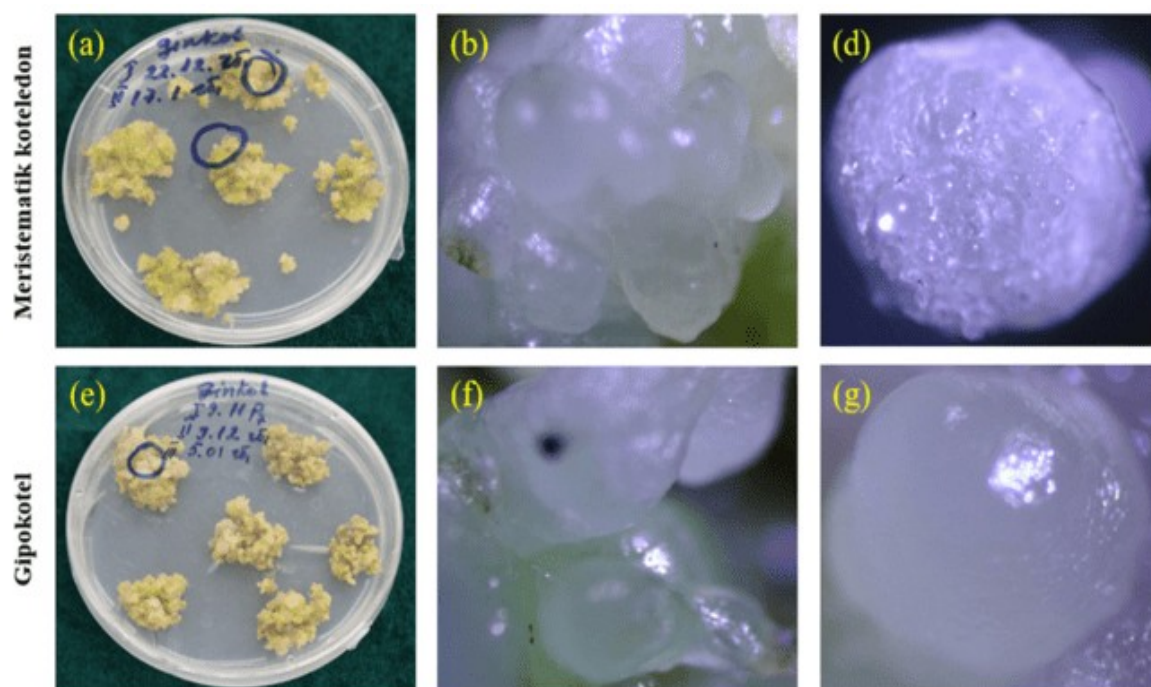
|                    |                                           |    |     |          |     |
|--------------------|-------------------------------------------|----|-----|----------|-----|
| Radicle<br>(ildiz) | MS+(1.0 mg/L)<br>2.4-D+ (0.0<br>mg/L) BAP | 30 | 1.0 | 41.5±1.1 | 0.0 |
|--------------------|-------------------------------------------|----|-----|----------|-----|

Tajribaning ikkinchi varianti birinchi takrorida (MS+(2.0 mg/L) 2.4-D+ (0.5 mg/L) BAP) tajriba eksplantlarining barchasida ma'lum farqlar asosida rivojlanish kuzatildi, ammo somatik embrionlarning shakllanishi zararlanmagan (yaxlit) va Radicle (ildiz) eksplantlarida kuzatilmadi.

8-Jadval. MS ozuqa muhitida turli fitogormonlar ta'sirida tajriba eksplantlarida somatik embrionlarning shakllanishi

| Eksplant               | Ozuqa muhiti va fitoregulyator (lar), mg/L | Eksplant soni, dona | Eksplant uzunligi, mm | Rivojlanish darajasi, % | Somatik embrionlar shakllanishi, % |
|------------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Zararlanmagan (yaxlit) | MS+(2.0 mg/L)<br>2.4-D+ (0.5 mg/L) BAP     | 30                  | 5.0                   | 76.1±1.2                | 0.0                                |
| Meristema koteledon    | MS+(2.0 mg/L)<br>2.4-D+ (0.5 mg/L) BAP     | 30                  | 2.0                   | 24.3±1.6                | 66.8±1.0                           |
| Gipokotel              | MS+(2.0 mg/L)<br>2.4-D+ (0.5 mg/L) BAP     | 30                  | 2.0                   | 44.6±1.5                | 8.2±1.7                            |
| Radicle (ildiz)        | MS+(2.0 mg/L)<br>2.4-D+ (0.5 mg/L) BAP     | 30                  | 1.0                   | 65.±2.2                 | 0.0                                |

Zararlanmagan eksplantlarda rivojlanish boshqa eksplantlarga nisbatan yuqori ko'rsatkichni namoyon etdi, ammo bu rivojlanish morfologik belgilar (ildiz, poya, barg) bilan amalga oshdi. Radicle (ildiz) eksplantlarida rivojlanish asosan ildizlar xosil bo'lishi bilan amalga oshdi. Meristematik koteledon eksplantlarida rivojlanish (kallusogenez) darajasi 24.3 % ni tashkil etganligiga qaramay somatik embrionlarning shakllanishi eng yuqori ko'rsatkich 66.8 % ni namoyon etdi. Gipokotel eksplantlarida kallusogenez bir muncha yuqori 44.6 % ni tashkil etgan bo'lsada somatik embrionlarning shakllanishi 8.2 % ni tashkil etdi. Bundan tashqari embrionlar kichikligi va nisbatan nozikligi bilan meristematik koteledon eksplantlarida farq qildi (8-jadval).



**2-Rasm.** Tajriba eksplantlaridan somatik embrionlarning shakllanishi. **a, b, d.** Meristematik koteledondan somatik embrionlarning shakllanishi. **e, f, g.** Gipokotel eksplantlaridan somatik embrionlarning shakllanishi

Tajribaning ikkinchi varianti ikkinchi takrorida (MS+(2.5 mg/l) 2.4-D+(1.0 mg/l) BAP) eksplantlarning barchasida rivojlanish darajasi va embrionlar shakllanishi birinchi takrorga nisbatan yuqori ekanligi aniqlandi (9-jadval). Zararlanmagan (yaxlit) kallusogenez amalga oshmadi, ammo morfologik o'zgarishlar birinchi takrorga nisbatan yuqori (96.5 %) ekanligi bilan farq qildi. Somatik embrionlar shakllanishi esa kuzatilmadi. Meristematik koteledon eksplantlarida rivojlanish bir muncha oshganligi (40.2 %) aniqlandi. Somatik embrionlar shakllanishi (86.4 %) yuqori ko'rsatkichni namoyon qildi. Gipokotel eksplantlarida rivojlanish darajasi va embrionlar shakllanishi mos ravishda 65.3 % va 12.1 % ni tashkil etdi. Bu ko'rsatkich birinchi takrorga nisbatan o'rtacha 1.45 marta yuqori ekanligi aniqlandi. Radicle (ildiz) eksplantlarida rivojlanish yuqori (85.2 %) ko'rsatkichni namoyon qildi, ammo embrionlar rivojlanishi kuzatilmadi.

9-Jadval. MS ozuqa muhitida turli fitogormonlar ta'sirida tajriba eksplantlarida somatik embrionlarning shakllanishi

| Eksplant               | Ozuqa muhiti va fitoregulyator (lar), mg/L | Eksplant soni, dona | Eksplant uzunligi, mm | Rivojlanish darajasi, % | Somatik embrionlar shakllanishi, % |
|------------------------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Zararlanmagan (yaxlit) | MS+(2.5 mg/L) 2.4-D+ (1.0 mg/L) BAP        | 30                  | 5.0                   | 96.5±1.5                | 0.0                                |
| Meristema koteledon    | MS+(2.5 mg/L) 2.4-D+ (1.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 40.2±2.5                | 86.4±2.0                           |
| Gipokotel              | MS+(2.5 mg/L) 2.4-D+ (1.0 mg/L) BAP        | 30                  | 2.0                   | 65.3±2.5                | 12.1±1.4                           |
| Radicle (ildiz)        | MS+(2.5 mg/L) 2.4-D+ (1.0 mg/L) BAP        | 30                  | 1.0                   | 85.2±3.1                | 0.0                                |

Eksplantlarda rivojlangan somatik embrionlar soni, katta kichikligi va shakli jihatdan bir-biridan ma'lum darajalarda farqlanib, asosan sharsimon va ovalsimon shakllarda namoyon bo'ldi (2-Rasm). O'tkazilgan tajribalar asosida embrionlarning shakllanishi eksplant turiga va fitogormonlar kontsentratsiyasiga bog'liq ravishda o'zgarganligi aniqlandi.

**Xulosa.**

*Ginkgo biloba* L. yetilmagan meva urug'idan somatik embriogeneza uchun ajratib olingan meristematik kotiledon eksplantlaridan yuqori darajada, gipokotel eksplantlarida nisbatan past darajada embrionlar shakllanishi kuzatildi ammo yaxlit va radicle (ildiz) eksplantlarida somatik embrionlar shakllanishi kuzatilmaganligi aniqlandi. Tajriba eksplantlarida somatik embrionlar shakllanishi bilan bog'liq tajribalarda bir nechta gormonlar kombinatsiyalaridan foydalanildi. Bunda eng yuqori darajada somatik embrionlarning shakllanishi meristematik kotiledon eksplantlarida 2.0 mg/L 2.4-D+ 0.5 mg/L BAP ta'sirida 66.8 %, 2.5 mg/L 2.4-D+ 1.0 mg/L BAP ta'sirida 86.4 % ni tashkil etdi.



## FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 228—243. PMID 32437079 doi:10.1111/jipb.12972
2. Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 10, 77. doi:10.3389/fpls.2019.00077 PMC 6375091 PMID 30792725
3. Pan, X., Fang, L., Liu, J., Senay-Aras, B., Lin, W., Zheng, S., & Yang, Z. (2020). Auxin-induced signaling protein nanoclustering contributes to cell polarity formation. *Nature communications*, 11(1), 1-14. PMID 32764676 PMC 7410848 doi:10.1038/s41467-020-17602-w
4. Ramalho, J. J., Jones, V. A. S., Mutte, S., & Weijers, D. (2021). Pole position: How plant cells polarize along the axes. *The Plant Cell*. PMID 34338785 doi:10.1093/plcell/koab203
5. Klimaszewska, K., Noceda, C., Pelletier, G., Label, P., Rodriguez, R., and Lelu-Walter, M. (2009). Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45, 20–33. doi:10.1007/s11627-008- 9158-6
6. Bulard, C. Culture aseptique d'embryons de *Ginkgo biloba*. Rôle des cotyledons dans l'absorption du sucre et la croissance de la tige. - *Compt. rend. Acad. Sci. France* 235: 739-741, 1952.
7. Bulard, C.: Modification provoquées par divers régulateurs de croissance sur des plantules de *Ginkgo biloba* L. cultivées in vitro. - *Bull. Soc. bot. France* 114: 119-127, 1966
8. Webb, D.T., Arias, W., Hostos, E.: Callus formation by *G. biloba* embryos on hormone free media controlled by closure and media component. - *Phytomorphology* 36: 121-127, 1986.
9. Camper, N.D., Coker, P.S., Wedge, D.E., Keese, R.J.: In vitro culture of *Ginkgo*. - *In vitro cell. Dev. Biol. Plant* 33: 125-127, 1997.

10. Wang, F.H., Chen, T.K.: Experimental studies of young Ginkgo embryos. The effect of coconut milk on the embryos cultured in vitro. - *Acta bot. sin.* 13: 224-239, 1965
11. Wang, F.H., Lee, S.C.: Experimental studies of young Ginkgo embryos. The effect of casein hydrolysate, glutamine, asparagine, 2-4-D and adenine sulphate on embryos grown in vitro - *Kexue Tongbao* 17: 323-327, 1966
12. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497