

Qodiraliyeva Robiya Muhammad qizi

Mirzo Ulug‘bek nomida O‘zbekiston Milliy

Universiteti Jizzax filiali magistranti.

qodiraliyev@gmail.com

Mustafaqulov Mukhammadjon Abduvaliyevich

Mirzo Ulug‘bek nomida O‘zbekiston Milliy

Universiteti Jizzax filiali PhD dotsenti.

mmustafakulov@bk.ru

Ruziyev Kosimjon Abdusattarovich

SAG AGRO MCHJ in vitro laboratoriyasi muhandis biotexnolog.

kosimjonruziyev@gmail.com

ASTRAGALUS MEMBRANACEUS O‘SIMLIGINI IN VITRO

SHAROITIDA MIKROKLONAL KO‘PAYTIRISH

Annotatsiya: Ushbu tadqiqot *Astragalus membranaceus* o‘simligini in vitro sharoitda mikroklonal ko‘paytirish protokolini ishlab chiqishni maqsad qilgan. Eksperimentda Murashige & Skoog (MS) bazaviy ozuqa muhitida Kinetin, glyukoza, fruktoza, va Maxiama komponentlarining turli kombinatsiyalari sinovdan o‘tkazildi. Initsiatsiya bosqichida MS + Kinetin (1,0 mg/L) + Glyukoza (30 g/L) + Maxiama (1 mL/L) muhiti eng samarali bo‘lib, explantlardan yuqori o‘sinh darajasi va barqaror kurtak faolligi kuzatildi. Proliferatsiya bosqichida Kinetin (1,5–2,0 mg/L) va glyukoza (20–25 g/L) qo‘shilgan muhit 1 eksplantndan 4–7 ta yangi novda hosil bo‘lishini ta‘minladi. Ildizlantirish bosqichida esa ½ MS + Fruktoza (20 g/L) + IBA (0,5 mg/L) muhiti 10–14 kun ichida diagnostik va funksional ildizlanishni rag‘batlantirdi. Ushbu optimallashtirilgan protokol *Astragalus membranaceus* ni tez, barqaror va yuqori sifatda mikroklonal ko‘paytirish imkonini beradi. Bu natijalar dorivor o‘simlik resurslarini biomassa

jihatdan kengaytirish va sanoat farmatsevtika maqsadlarida foydalanish uchun potentsial asos yaratadi.

Kalit soʻzlar: *Astragalus membranaceus, in vitro madaniyati, mikroklonal koʻpaytirish, MS ozuqa muhiti, kinetin, maxيامa qoʻshimchasi, glyukoza bilan boyitilgan muhit, fruktozali muhit, kallus induksiyasi.*

АННОТАЦИЯ: Данное исследование было направлено на разработку протокола микроклонального размножения растения *Astragalus membranaceus* в условиях *in vitro*. В эксперименте исследовались различные комбинации компонентов среды Мурашиге & Скоог (MS) с кинетином, глюкозой, фруктозой и добавкой *Maxيامa*. На стадии инициации среда MS + кинетин (1,0 мг/л) + глюкоза (30 г/л) + *Maxيامa* (1 мл/л) оказалась наиболее эффективной, обеспечивая высокий уровень роста эксплантов и стабильную активность почек. На стадии пролиферации среда с кинетином (1,5–2,0 мг/л) и глюкозой (20–25 г/л) способствовала формированию 4–7 новых побегов с одного экспланта. На стадии укоренения среда ½ MS + фруктоза (20 г/л) + IBA (0,5 мг/л) стимулировала диагностическое и функциональное корнеобразование в течение 10–14 дней. Оптимизированный протокол позволяет быстро, стабильно и качественно микроклонально размножать *Astragalus membranaceus*. Полученные результаты создают потенциальную основу для расширения биомассы лекарственных растений и использования их в промышленной фармацевтике.

Ключевые слова: *Astragalus membranaceus, культура in vitro, микроклональное размножение, среда MS, кинетин, добавка Maxيامa, среда с глюкозой, среда с фруктозой, индукция каллуса.*

ABSTRACT: This study aimed to develop an *in vitro* micropropagation protocol for *Astragalus membranaceus*. Various combinations of Murashige &

Skoog (MS) basal medium supplemented with kinetin, glucose, fructose, and Maxiama were tested. During the initiation stage, MS + kinetin (1.0 mg/L) + glucose (30 g/L) + Maxiama (1 mL/L) medium was the most effective, showing high explant growth and stable shoot activity. In the proliferation stage, the medium containing kinetin (1.5–2.0 mg/L) and glucose (20–25 g/L) enabled 4–7 new shoots per explant. In the rooting stage, ½ MS + fructose (20 g/L) + IBA (0.5 mg/L) medium stimulated diagnostic and functional root formation within 10–14 days. This optimized protocol allows rapid, stable, and high-quality micropropagation of Astragalus membranaceus. These results provide a potential basis for expanding biomass of medicinal plants and their application in industrial pharmaceutical purposes.

Keywords: *Astragalus membranaceus, in vitro culture, micropropagation, MS medium, kinetin, Maxiama supplement, glucose-enriched medium, fructose medium, callus induction.*

Adabiyotlar tahlili

Dong va hammualliflar (2024) tomonidan olib borilgan tadqiqotlarda *Astragalus membranaceus* va unga yaqin turlar genetik xilma-xilligi, seleksiya imkoniyatlari va biotexnologik qayta ishlash usullari chuqur tahlil qilingan. Mualliflar ushbu o'simlikning biologik faol moddalarga boyligi va ayniqsa astragalosidlar biosintezining murakkabligi sababli, barqaror xomashyo olish uchun an'anaviy usullar yetarli emasligini ta'kidlashadi. Ularning ishlari *A. membranaceus* ning regeneratsiya qobiliyatini oshirish, to'qima madaniyatida optimal sharoitlarni tanlash va genetik resurslarni saqlashga qaratilgan ilmiy yondashuvlar talab etilishini ko'rsatadi [1]. Moraes (2021) esa dorivor o'simliklar uchun mikropropagatsiya texnologiyalarining nazariy asoslari va amaliy imkoniyatlarini tizimli ravishda yoritadi. Muallif mikroklonal ko'paytirish

jarayonida sitokininlar, karbon manbalari va organogenezni qo'llab-quvvatlovchi omillarning muhimligini ta'kidlab, ushbu jarayon dorivor o'simliklarni sanoatlashtirish uchun ishonchli platforma ekanini qayd etadi. Tadqiqotda, mikropropagatsiya genetik barqarorlikni saqlash, sifatli ekish materiallari olish hamda ikkilamchi metabolitlar sinteziga ta'sir qiluvchi omillarni boshqarish imkonini berishi bilan ajralib turadi [2]. Har ikkala manbaning natijalari shuni ko'rsatadiki, *Astragalus membranaceus* uchun mikropropagatsiya protokollarini takomillashtirish nafaqat regeneratsiya ko'rsatkichlarini yaxshilaydi, balki dorivor moddalarning miqdor va sifat jihatdan barqaror ishlab chiqarilishini ta'minlash uchun ham zarurdir. Bu esa o'simlikning biotexnologik qiymatini yanada oshiradi va ilmiy izlanishlar davom ettirilishi muhimligini ko'rsatadi.

Tadqiqot metodologiyasi

Ushbu tadqiqotda *Astragalus membranaceus* ning mikroklonal ko'paytirish protokoli ishlab chiqilishi uchun urug'lar asosiy eksplant materiali sifatida tanlandi. Tadqiqot quyidagi bosqichlarda amalga oshirildi:

1. Urug'larni tayyorlash va sterilizatsiya: *Astragalus membranaceus* urug'lari Koreyaning Aramseed kompaniyasidan (www.aramseed.com.kr) xarid qilinib, ko'rsatmaga muvofiq xona haroratida saqlandi. Tashqi qobig'i yumshatilishi va kontaminatsiyani kamaytirish maqsadida urug'lar 70% etanol bilan 30 soniya, so'ngra 2% natriy gipoxlorit (NaOCl) eritmasida 10–15 daqiqa davomida ishlov berildi. Steril distillangan suvda 3 marta yuvildi. Bu metodologiya Dong et al., 2024 va Moraes, 2021 tadqiqotlariga mos ravishda ishlatildi [1-2].

2. Ozuqa muhitini tayyorlash: Bazaviy muhit sifatida Murashige & Skoog (MS) (1-jadval) tuzlari ishlatildi. pH 5.7–5.8 gacha sozlandi va 121°C da 20 daqiqa davomida avtoklavda sterilizatsiya qilindi. Sitokinin sifatida Kinetin, karbon manbai sifatida glyukoza va fruktoza, shuningdek, o'sishni rag'batlantiruvchi

organik qo'shimcha Maxima qo'shildi. Mazkur kombinatsiya urug'larning germinatsiyasini va keyingi kurtak rivojlanishini optimallashtirishga qaratilgan.

1- Jadval

N ^o	Ingridientlar	Kimyoviy formulasi	Mg/L
1	Ammoniy nitrat	NH ₄ NO ₃	1650.000
2	Bor kislotasi	H ₃ BO ₃	6.200
3	Kobalt xlorid * 6H ₂ O	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.025
4	Mis sulfat *5H ₂ O	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.025
5	EDTA dinatriy tuzi *2H ₂ O	Na ₂ EDTA *2H ₂ O	37.300
6	Temir (II) sulfat *7H ₂ O	FeSO ₄ *7H ₂ O	27.800
7	Glitsin (erkin shakl)	NH ₂ CH ₂ COOH	2.000
8	Magniy sulfat	MgSO ₄	180.900
9	Marganes sulfat * H ₂ O	MnSO ₄ * H ₂ O	16.900
10	Molibden kislotasi (natriyli tuzi) * 2H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.250
11	Mio -inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100.000
12	Nikotin kislotasi	C ₆ H ₅ NO ₂	0.500
13	Kaliy yodid	KI	0.83
14	Kaliy nitrat	KNO ₃	1900.000
15	Kaliygidro fosfat	KH ₂ PO ₄	170.000
16	Piridoksin gidroxlorid	C ₈ H ₁₁ NO ₃ *HCl	0.500
17	Saxaroza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30000.000
18	Tiamin gidroxlorid	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS+Cl-	0.100
19	Rux sulfat *H ₂ O	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8.600

3. Germinatsiya va meristema rivojlanishi: Steril sharoitda urug'lar shisha bonka idishlariga joylashtirildi va 25°C harorat, 16/8 soat yorug'lik/qorong'ilik sharoitida o'stirildi. Urug'lardan hosil bo'lgan meristema bo'limlari keyinchalik kurtak proliferatsiyasi va kallus induksiyasi uchun MS muhitiga ko'chirildi.

4. Proliferatsiya va ildizlanish: Meristema bo'limlari Kinetin (1.5–2.0 mg/L) va glyukoza (20–25 g/L) bilan boyitilgan muhitda ko'paytirildi. Kallus induksiyasi auxinlar (IBA yoki NAA) bilan boyitilgan muhitda amalga oshirildi. Ildizlanish hosil bo'lgan kurtaklar ½ MS + fruktoza (20 g/L) + IBA (0.5 mg/L) muhiti

yordamida ildizlantirildi. Har bir bosqichda 3–4 haftada subkultivatsiya amalga oshirildi [5].

5. Statistika: Har bir muhit varianti uchun 3 takror va har bir takror uchun 20 urug‘dan foydalanildi. Natijalar ANOVA yordamida tahlil qilindi va $p < 0.05$ darajada statistik jihatdan ahamiyatli farqlar aniqlandi.

Natijalar va ularning tahlillari

O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2020 yil 10-apreldagi PQ-4670-sonli “Yovvoyi holda o‘sovchi dorivor o‘simliklarni muhofaza qilish, madaniy holda yetishtirish qayta ishlash va mavjud resurslardan oqilona foydalanish chora tadbirlari to‘g‘risida”gi, 2020-yil 26-noyabrdagi PQ-4901-sonli “Dorivor o‘simliklarni yetishtirish va qayta ishlash, ularning urug‘chiligini yo‘lga qo‘yishni rivojlantirish bo‘yicha ilmiy tadqiqotlar ko‘lamini kengaytirishga oid chora tadbirlar to‘g‘risida”gi qarorlari hamda mazkur faoliyatga tegishli boshqa me‘yoriy-xuquqiy hujjatlarda belgilangan vazifalarni amalga oshirishga, shuningdek dorivor o‘simlik turlarini ko‘paytirish, tabiiy resurslarni monitoring qilish va xomashyobop dorivor o‘simliklar zahiralarini aniqlash, tabiat resurslaridan oqilona foydalanish maqsadida xomashyosini tayyorlash va ular asosida tabiiy dori vositalarini ishlab chiqarishga katta e‘tibor qaratilmoqda. Respublika hududlarida dorivor o‘simliklarni yetishtirish va qayta ishlashga doir ilmiy tadqiqotlarning yagona bazasini yaratish, xorijiy davlatlarning ilg‘or ilmiy ishlanmalarini o‘rganib borish, yetakchi ilmiy muassasalar bilan hamkorlik o‘rnatish hamda zamonaviy texnologiyalar, ilmiy ishlanmalarni respublikaga joriy etish va mavjud imkoniyatlardan samarali foydalanishni kuchaytirish maqsadida dorivor o‘simliklarning madaniy plantatsiyalarini barpo etish maqsadida 2022-yildagi PQ-251-sonli qarorlari qabul qilingan bo‘lib, bu qarorlari ijrosini ta‘minlash maqsadida qator tashkilotlarda ilmiy amaliy ishlar olib borilmoqda [3].

Germinatsiya va meristema rivojlanishi

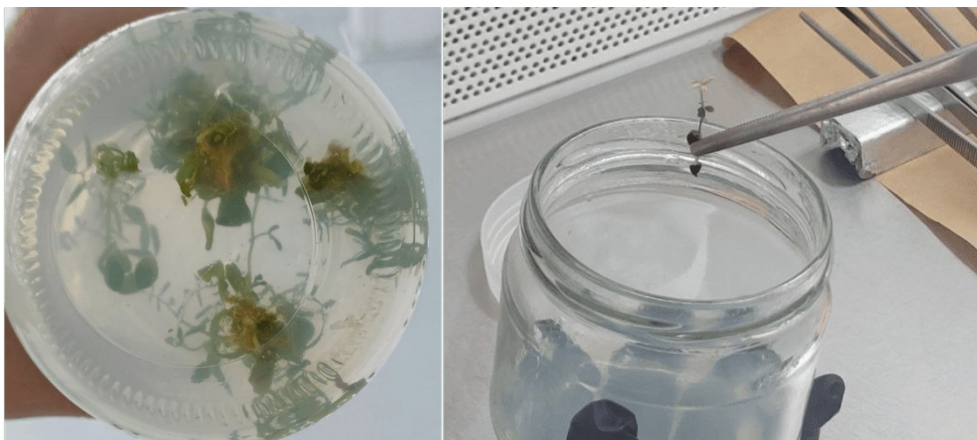
Urug'lardan olingan eksplantlar MS + Kinetin (1 mg/L) + glyukoza (30 g/L) + Maxiama (1 mL/L) muhitida eng yuqori germinatsiya darajasini ko'rsatdi. 10–12 kun ichida urug'larning 85–90% dan ortig'i rivojlanib, meristema hosil bo'ldi. Fruktoza bilan boyitilgan muhitda germinatsiya darajasi 70–75% ni tashkil qildi. Ushbu natija glyukoza va sitokinin kombinatsiyasining meristema rivojlanishidagi muhim rolini tasdiqlaydi. Bu bosqichda eksplantlar sog'lom, yashil va faol o'suvchi meristema bilan xarakterlandi [1-2].



1-rasm. Dastlabki MS ga ekilgan urug'lar va 1 oydan so'ng uning unib chiqishi.

Kurtak proliferatsiyasi

Meristemadan olingan kurtaklar MS + Kinetin (1.5–2 mg/L) + glyukoza (20–25 g/L) muhitida 3–4 hafta davomida ko'paytirildi. Har bir eksplantndan o'rtacha 4–7 yangi kurtak hosil bo'ldi. Kinetin kontsentratsiyasining oshishi bilan kurtak soni ortdi, ammo 2.5 mg/L dan yuqorida meristema deformatsiyasi va epinastiya kuzatildi. Bu natijalar Kinetin va uglevod manbalari kombinatsiyasining kurtak proliferatsiyasini rag'batlantirishda samarali ekanini ko'rsatadi (Baoyu Ji et al., 2023; Chokheli et al., 2020) [5].



2-rasm Unib chiqqan dastlabki ko‘chatlarni MS ga ko‘chirish va kallus hosil bo‘lishi.

Kallus induksiyasi va organogenez

Auxin (IBA 0.5 mg/L) bilan boyitilgan muhitda kallus hosil bo‘lishi 80% gacha yetdi. Glyukoza + Maxiama qo‘shimchasi kallus massasining o‘rishini 15–20% ga oshirdi, fruktoza bilan esa o‘rish 10–12% ni tashkil qildi. Hosil bo‘lgan kallus 3–4 haftadan keyin kurtaklar va ildizlarga differensiyalashdi, bu esa o‘simlikning organogenez qobiliyatini tasdiqlaydi. To‘qimalar sog‘lom, zich va barqaror bo‘lib, keyingi bosqichlar uchun tayyorlandi [4].



3-rasm. Kallusdan yangi kurtaklar rivoylangani va organogenezi.

Ildizlanish

Hosil bo'lgan kurtaklar $\frac{1}{2}$ MS + Fruktoza (20 g/L) + IBA (0.5 mg/L) muhitiga ko'chirildi. 10–14 kun ichida kurtaklarning 75–80% da funksional ildizlar hosil bo'ldi. Glyukoza bilan boyitilgan muhitda ildizlanish biroz yuqori (80–85%), ammo fruktoza bilan hosil bo'lgan ildizlar yanada barqaror va sog'lom rivojlandi. O'rtacha ildiz uzunligi 3–4 sm ni tashkil qildi. Bu natija ildizlanish jarayonida karbon manbai va auxinlar kombinatsiyasining muhimligini ko'rsatadi [2].



4-rasm. Ildizlatuvchi ozuqa muhitidagi o'simlik va perlitli ozuqaga o'tkazilgani.

Statistika va tahlil

Ekspiriment har bir muhit varianti uchun 3 takror va har bir takror uchun 20 urug'dan tashkil etildi. ANOVA tahlili natijasida shoot soni, kallus massasining o'sishi va ildiz hosil bo'lishidagi farqlar $p < 0.05$ darajada ahamiyatli ekanligi aniqlanib, ozuqa muhiti va fitoregulyatorlarning in vitro rivojlanishga sezilarli ta'sirini tasdiqladi [1].

Xulosa: MS + Kinetin + glyukoza + Maxiama muhiti germinatsiya va kurtak ko'payishi uchun optimal hisoblanadi. Fruktoza ildizlanishni rag'batlantirishda samarali, ayniqsa barqaror va sog'lom ildizlar hosil qilishda. Auxinlar kallus hosil bo'lishi va organogenez uchun zarur. Natijalar asosida, mikroklonal ko'paytirish

protokoli urug'idan eksplantlar asosida barqaror va yuqori samarali bo'lib, dorivor o'simliklarni sanoat miqyosida ko'paytirish imkonini beradi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. DONG, P.; WEI, N.; LI, Y.; LIU, J.; GAO, W. Germplasm resources and genetic breeding of Huang-Qi (*Astragalus* species) // *Plants*. – 2024. – Vol. 13, No. 3. – P. 512. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11351161/>
2. Moraes R. M. Using micropropagation to develop medicinal plants into crops // *Horticulturae*. – 2021. – Vol. 7, No. 3. – Article 52. – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8003982/>
3. <https://lex.uz>
4. Kulak V., Jaramillo S., Holgun R., et al. In vitro technology in plant conservation: relevance to biocultural environments // *Plants*. – 2022. – Vol. 11, No. 4. – Article 503. – URL: <https://www.mdpi.com/>
5. Ji B., Liu X., Wang Y., et al. Optimizing in vitro propagation of medicinal legumes using seed-derived explants // *Plants*. – 2023. – Vol. 12. – Article – URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/>