

UO'K: 634.51-576.535

EKSPLANTLARNI STERILIZATSIYA QILISH USULLARINI OPTIMIZATSIYA QILISH

Xaydarov Ilyos Abdurashitovich 

Akademik M.Mirzaev nomidagi bog'dorchilik, uzumchilik va vinochilik ilmiy tadqiqot instituti mustaqil tadqiqotchisi, k.i.x. Toshkent, O'zbekiston

e-mail: ilyosbiotex2017@gmail.comAllayarov Abduraxman Nazaralievich 

Agrosanoatni rivojlantirish agentligi bo'lim boshlig'i loyiha ishtrokchisi, q.x.f.f.d., dosent. Toshkent, O'zbekiston

e-mail: allayarovabduraxmon1986@gmail.com

Annotatsiya. *Ushbu maqolada* Juglans regia L o'simliklarini in vitro sharoitida eksplantlarni sterilizatsiya qilishga qaratilgan bo'lib, bunda eksplantlarni dastlab suv va idish sovuni bilan yuvish orqali sterilizatsiya qilgan. Keyinchalik protokolda eksplantlar 0,1% HgCl₂ eritmasi va Twin-20 qo'shilgan eritmada 3 daqiqa davomida dezinfeksiya qilingan. Ideal shtammi – 58,6%, Form PDM23 shtammi – 52,7% va Form 202YaKT shtammi – 45,4% natija bergan.

Kalit so'zlar: eksplant, sterilizatsiya, apikal, meristema, yuvish, Ideal, Juglans regia L, HgCl₂, Twin.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ЭКСПЛАНТАТОВ

Аннотация. В данной статье рассматривается стерилизация эксплантов Juglans regia L. in vitro. Сначала экспланты стерилизовали промыванием водой и моющим средством. Затем протокол включал дезинфекцию эксплантов в 0,1% растворе HgCl₂ и Twin-20 в течение 3 минут. Для штамма Ideal показатель стерилизации составил 58,6%, для штамма Form PDM23 — 52,7%, а для штамма Form 202YAKT — 45,4%.

Ключевые слова: эксплантат, стерилизация, апикальный, меристема, промывка, Идеал, Juglans regia L, HgCl₂, Твин.

OPTIMIZATION OF EXPLANT STERILIZATION METHODS

Abstract. This article examines the in vitro sterilization of Juglans regia L. explants. The explants were first sterilized by rinsing with water and detergent. The protocol then included disinfection of the explants in a 0.1% HgCl₂ solution and Twin-20 for 3 minutes. The sterilization rate was 58.6% for the Ideal strain, 52.7% for the Form PDM23 strain, and 45.4% for the Form 202YAKT strain.

Key words: explant, sterilization, apical, meristema, washing, Ideal, Juglans regia L, HgCl₂, Tween.

KIRISH

Aholi sonining barqaror o'sishi va oziq-ovqat mahsulotlariga bo'lgan ehtiyojning ortib borishi sharoitida qishloq xo'jaligi yerlaridan samarali foydalanish, shuningdek, innovatsion agrotexnologiyalarni ishlab chiqish va joriy etish masalalari alohida dolzarflik kasb etmoqda. Shu nuqtai nazardan, yuqori oziqaviy va iqtisodiy ahamiyatga ega bo'lgan yong'oq (Juglans regia L.) istiqbolli mevali ekinlardan biri hisoblanadi. Jahon miqyosida yong'oq ishlab chiqarish hajmi taxminan 3874 mln tonnani tashkil etadi.

O'simlik katta to'qima yoki organdan, tartibsiz kallus massasidan yoki hatto yakka hujayradan ham hosil bo'lishi regeneratsiya deb ataladigan jarayon orqali qayta tiklanadi. O'simliklar regeneratsiyasi o'simliklarda to'qimalarning fiziologik yangilanishi, tiklanishi yoki almashinuvini anglatadi (Ikeuchi et al., 2016; Long et al., 2022). O'simlik hujayralarining totipotentligi yoki pluripotentligi ularning regeneratsiya qobiliyatining asosini tashkil etadi va hujayra

taqdirining yuqori darajadagi plastiklik xususiyatini aks ettiradi. Totipotentlik — hujayraning to'liq shakllangan organizmga differensiallanish qobiliyatini anglatadi, pluripotentlik esa bir hujayradan muayyan to'qimalar yoki organlar guruhining differensiallanishini nazarda tutadi (Long et al., 2022; Verdeil et al., 2007).

To'qima kulturası konsepsiyası bir asr avval taklif qilingan bo'lib, u somatik hujayralardan in vitro sharoitida butun o'simliklarni regeneratsiya qilishni nazarda tutgan (Ikeuchi et al., 2016; Long et al., 2022). To'qimalarni kultivatsiya qilish tizimi auksin va sitokinin (CK) konsentratsiyalarining turli nisbatlari qo'shimcha ildizlar va novdalarning regeneratsiyasida hal qiluvchi ahamiyatga ega ekanligi aniqlangandan so'ng rivojlanib, mukammallashti (Ikeuchi et al., 2016; Long et al., 2022). Steward va hammualliflar (1958) sabzi ildizlaridan olingan floema hujayralaridan foydalanib, yangi somatik embrionlarni muvaffaqiyatli regeneratsiya qilgan hamda keyinchalik ildiz va novdalarni rivojlantirgan, bu esa o'simlik hujayralarining totipotentligini tasdiqlagan (Long et al., 2022; Verdeil et al., 2007). Shu vaqtdan boshlab, regeneratsiya qobiliyatiga asoslangan to'qima kulturası texnologiyası fundamental tadqiqotlar, mikroko'paytirish va transgen seleksiya kabi turli sohalarda keng qo'llanilib kelinmoqda.

Eksplantlarning tashqi ifloslanishini epifit mikroblar orqali oldini olish uchun ularning yuzasini oqim suv bilan yuvish (yuvish vositasi bilan yoki undan foydalanmasdan), kimyoviy moddalar (etanol, rux xlorid $[HgCl_2]$, natriy gipoxlorit $[NaOCl]$) va o'simliklar uchun konservantlar aralashmalari yordamida sterilizatsiya qilish mumkin (Abdalla et al., 2022; Singh, 2018). Bundan tashqari, tashqi ifloslanishni oldini olish maqsadida ozuqa muhitiga mikroorganizmlar o'sishini oldini oluvchi ba'zi moddalarni, masalan, o'simlik konservantlari aralashmasi (Abdalla et al., 2022; Singh, 2018) yoki fungitsid benomilni qo'shish mumkin (Ahmadpoor et al., 2022). Shuningdek, in vitro sharoitda o'simliklarda mavjud endofit bakteriyalarini bartaraf etish uchun antibiotiklardan antimikrob vosita sifatida foydalanish mumkin (Jugreet & Mahomoodally, 2020).

Somatik embrionlar bevosita alohida somatik hujayralardan induksiya qilinishi yoki embriogen kallusdan hosil bo'lishi mumkin (Horstman, Bemer va boshq., 2017; Long et al., 2022).

MATERIALLAR VA USULLAR

Dezinfeksiya va sterilizatsiya uchun qalamchalar avval 1 soat davomida oqova suvda yaxshilab yuvildi, so'ng xo'jalik sovuni bilan yuvilib, sovun qoldiqlarini ketkazish uchun qayta chayildi. Keyin namunalar ketma-ket ravishda:

- karbendazim fungitsidi eritmasida (kod 378674, 10 daqiqa,
- streptomitsin eritmasida (1 g/l) bakteritsid sifatida 12 daqiqa,
- etanol (C_2H_5OH) da 2 daqiqa,
- $AgNO_3$ (0,2%) eritmasida 1 daqiqa davomida ishlov berildi.

Har bir bosqichdan so'ng namunalar 3 marta distillangan suvda chayildi. Barcha jarayonlar steril laminar shkafda bajarildi.

II-protokol. Bir bo'g'imli novdalar triklozan eritmasida (OOO "Billio Ximiya", Rossiya) 1 soat davomida 200 ayl/min tezlikda orbital sheykerda ishlov berildi. Shuningdek, eksplantlar $HgCl_2$ (0,1%) va Tween-20 qo'shilgan eritmada 3 daqiqa davomida dezinfeksiya qilindi, so'ng distillangan suvda 5, 10 va 15 daqiqa davomida orbital sheykerda yuvildi. Barcha jarayonlar steril laminar shkafda olib borildi.

Eksplantlar alohida holda 150×20 mm o'lchamdagi shisha probirkalarga inokulyatsiya qilindi. Har bir probirkada 10 ml MS muhiti, 2 mg/l izopenteniladenin (2iP) bilan boyitilgan holda ishlatildi va standart fotoperiod sharoitida saqlandi. Ifloslangan, nobud bo'lgan yoki fenolni ko'p ajratgan eksplantlar hisobga olinib, chiqarib tashlandi.

II-protokol. Eksplantlar alohida holda 150×20 mm shisha probirkalarga, 10 ml DKWC muhiti (tarkibida 4,4 μM 6-benzilaminopurin (BAP) va 0,05 μM indol-3-moy kislota (IBA)) solingan holda ekildi va standart fotoperiod sharoitida saqlandi. Ifloslangan, nobud bo'lgan yoki fenolni ko'p ajratgan eksplantlar hisobga olinib, chiqarib tashlandi (Licea-Moreno et al., 2015).

NATIJALAR VA MUHOKAMA

O'simliklarni mikroklonal ko'paytirishda asosiy muammolardan biri eksplantlarning turli mikroorganizmlar bilan ifloslanishi bo'lib, bu kallus va olingan klonlarning nobud bo'lishiga olib kelishi mumkin (Abdalla et al., 2022). Shu sababli, in vitro muhitga kiritish jarayonining muhim bosqichi eksplantlarni sterilizatsiya qilishdir.

Yuqoridagilardan kelib chiqqan holda, birinchi bosqichda eksplantlarni sterilizatsiya qilish usullarini tanlash va optimizatsiya qilish bo'yicha tadqiqotlar o'tkazilgan. Adabiyot tahlili shuni ko'rsatdiki, sterilizatsiya qiluvchi birikmalar uch asosiy guruhga bo'linadi:

1. Zaif dezinfektsiyalovchi birikmalar – masalan, Twin-20;
2. O'rta darajadagi dezinfektsiyalovchi birikmalar – masalan, natriy gipoxlorit [NaOCl];
3. Kuchli dezinfektsiyalovchi birikmalar – masalan, rux xlorid [HgCl₂] (Kutas & Ogorodnik, 2011; Sharma, Sharma, Kumar va boshq., 2025).

Ushbu tasnifga muvofiq, turli protokollarda yong'oq eksplantlarini sterilizatsiya qilish uchun ushbu birikmalar kombinatsiyalari qo'llaniladi.

Shu asosda, adabiyotlarni tahlil qilgandan so'ng, I protokol uchun eksplantlarni sterilizatsiya qilish quyidagi tartibda tanlandi:

Eksplantlarni sterilizatsiya qilish uchun gipoxlorit (1,5 g/l faol xlor) ishlatishni tavsiya qilgan. Biroq, bu birikma kuchli oksidlovchi xususiyatga ega bo'lib, eksplantlarning qorayishiga olib kelishi mumkinligi sababli, biz ishimizda gipoxloritni sterilizatsiya vositasi sifatida ishlatmaslikka qaror qildik.

Yong'oq eksplantlarini dastlabki yuvish uchun Twin-20 ishlatilgan, keyingi dezinfeksiya uchun esa gipoxlorit, karbendazim va kaptam eritmaları ishlatilgan. Kimyoviy sterilizatsiya uchun HgCl₂ eritmasi qo'llanilgan. Biroq HgCl₂ eritmasi nafaqat o'simliklar uchun, balki inson sog'ligi uchun ham toksik bo'lgani sababli, biz ushbu metodikadan voz kechdik.

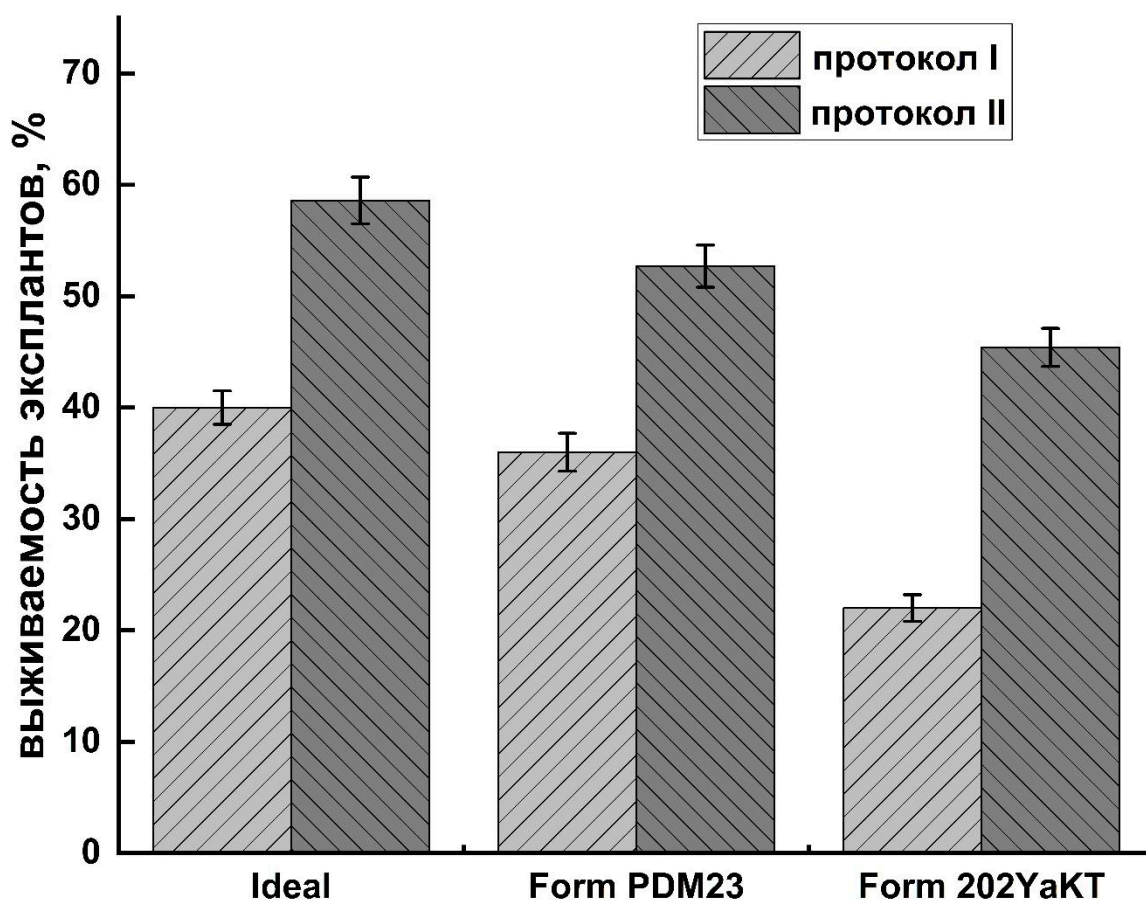
Ishida eksplantlarni dastlab suv va idish sovuni bilan yuvish orqali sterilizatsiya qilgan. Keyinchalik protokolda eksplantlar 0,1% HgCl₂ eritmasi va Twin-20 qo'shilgan eritmada 3 daqiqa davomida dezinfeksiya qilindi.

Shu ma'lumotlar asosida, I protokol uchun quyidagi eksplant sterilizatsiyasi tartibi tanlandi:

1. Eksplantlar 1 soat davomida oqim suvda yaxshi yuvildi;
2. Idish sovuni bilan yuvilib, qolgan sovun qoldiqlarini yo'qotish uchun yana suvda yuvildi;
3. Karbendazim fungitsidi eritmasida (kod 378674, Sigma-Aldrich) 10 daqiqa davomida yuvildi;
4. Bakteritsid sifatida streptomitsin eritmasida (1 g/l) 12 daqiqa davomida yuvildi;
5. Etanol (C₂H₅OH) eritmasida 2 daqiqa davomida yuvildi;
6. AgNO₃ eritmasida (0,2%) 1 daqiqa davomida yuvildi.

Har bir bosqichdan so'ng namunalar 3 marta distillangan suvda yuvildi. Barcha jarayonlar steril laminar shkafda amalga oshirildi. Ushbu sterilizatsiya protokoli o'simliklar va inson uchun juda toksik bo'lgan moddalarni o'z ichiga

olmaydi.



Rasm 3.1. Yong'oq eksplantlarining sterilizatsiyadan keyingi omon qolish darajasi.

Keyingi tadqiqotlar ushbu sterilizatsiya protokolining eksplantlarning omon qolishiga ta'sirini o'rganishga qaratildi. Kuzatuvlar 1 haftalik in vitro kultivatsiya jarayonidan keyin ifloslanmagan eksplantlar foizi va eksplantlarning umumiy omon qolish foizi sifatida qayd etildi.

Natijalar shuni ko'rsatdiki, ushbu sterilizatsiya protokolidan foydalanganda eksplantlarning omon qolish darajasi nisbatan yuqori bo'lgan. Xususan:

- Ideal shtammi uchun – 40%
- Form PDM23 shtammi uchun – 36%
- Form 202YaKT shtammi uchun – 22%

(Rasm 3.1).

- X o'qi – yong'oq shtamlari
- Y o'qi – eksplantlarning omon qolish foizi, %
- $p \geq 0,005$

II protokol uchun quyidagi sterilizatsiya usuli qo'llanildi:

- Bir tugunli shoxlar triklozan eritmasi (ООО «Биллио Химия», Россия) bilan 1 soat davomida orbital shaykerda 200 aylanma/min tezlikda ishlov berildi.

- Shuningdek, eksplantlar 0,1% HgCl₂ eritmasi va Twin-20 bilan 3 daqiqa davomida dezinfeksiya qilindi, so'ngra distillangan suvda 5, 10 va 15 daqiqa davomida orbital shaykerda yuvildi.

Ushbu protokolning natijasi sifatida eksplantlarning omon qolish darajasi yuqori bo'ldi:

- Ideal shtammi – 58,6%
- Form PDM23 shtammi – 52,7%
- Form 202YaKT shtammi – 45,4%

Eksplantlar sterilizatsiyasi natijasida omon qolish foizini $39,77 \pm 0,48\%$ deb ko'rsatgan. Олиб борилган tadqiqotlar bilan ham mos keladi, ularning ishlarida shox uchidagi segmentlardan foydalanilganda eng yuqori omon qolish darajasi qayd etilgan.

Buning sababi shundaki, shox uchidagi segmentlar meristematik hujayralarga boy bo'lib, yuqori miqdorda auksin va sitokinin saqlaydi, bu esa muvaffaqiyatli regeneratsiya va o'sishni ta'minlab, shoxlarning samarali proliferatsiyasi va chanoq (bud) hosil bo'lishiga olib keladi.

Uzoq davom etgan karbendazim (10 daqiqa) va streptomitsin (12 daqiqa) bilan ishlov berish natijalari.

Shunday qilib, biz ishlab chiqqan II protokol Yong'oq shoxchalarini sterilizatsiya qilishda o'sishni va regeneratsiyani rag'batlantirish bilan birga, eksplantlarga ortiqcha stress yoki zarar yetkazmasdan, yong'oq madaniyatlarini muvaffaqiyatli yaratish uchun optimal sharoitlarni ta'minladi.

XULOSA

Xulosa qilib aytganda laboratoriya sharoitida shox uchidagi segmentlar meristematik hujayralarga boy bo'lib, yuqori miqdorda auksin va sitokinin saqlaydi, bu esa muvaffaqiyatli regeneratsiya va o'sishni ta'minlab, shoxlarning samarali proliferatsiyasi va chanoq hosil bo'lishiga olib keldi.

Uzoq davom etgan karbendazim (10 daqiqa) va streptomitsin (12 daqiqa) bilan ishlov berish yaxshi natijalarni berdi.

ADABIYOTLAR

1. Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T. A., & Dobránszki, J. (2022). An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 2022, Vol. 8, Page 677, 8(8), 677. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8080677>
2. Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R., & Sheikhzadeh, P. (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in in vitro cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13568-022-01343-8/FIGURES/6>
3. Verdeil, J., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science*, 12(6), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>
4. Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New Insights Into Tissue Culture Plant-Regeneration Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 13, 926752. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.926752/XML/NLM>
5. Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development (Cambridge)*, 143(9), 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/DEV.134668>

6. Jugreet, B. S., & Mahomoodally, M. F. (2020). Essential oils from 9 exotic and endemic medicinal plants from Mauritius shows in vitro antibacterial and antibiotic potentiating activities. *South African Journal of Botany*, 132, 355–362. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.05.001>
7. Kutas, E., & Ogorodnik, L. (2011). The influence of sterilizing compounds on the yield of viable explants of *Rhododendron* L. (Ericaceae) . *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 3(1), 24–26.
8. Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201–216. <https://doi.org/10.1002/REG2.91>
9. Licea-Moreno, R. J., Contreras, A., Morales, A. V., Urban, I., Daquinta, M., & Gomez, L. (2015). Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/S11240-015-0822-3/FIGURES/3>
10. Singh, C. R. (2018). Review on problems and its remedy in plant tissue culture. *Asian J. Biol. Sci.*, 11, 165–172.
11. Sharma, S., Sharma, S., & Kumar, P. (2025). In vitro establishment of walnut (*Juglans regia* L.) from the embryonic axis with customized nutrient media and synergy of growth regulators. *South African Journal of Botany*, 177, 598–603. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2024.12.034>