

UNGERNIA VICTORIS (AMARYLLIDACEAE) ТУРИДА КАЛЛУСОГЕНЕЗ ВА IN VITRO МИКРОКЛОНАЛ КЎПАЙТИРИШ: СУРХОНДАРЁ ПОПУЛЯЦИЯЛАРИДА БИОТЕХНОЛОГИК ЁНДАШУВ

Чариева Назокат, Мустафина Феруза Усмановна, Ҳамроева Марғуба
Комиловна, Расулова Мавжуда

<https://doi.org/10.5281/zenodo.17893353>

Аннотация. Ушбу мақолада Сурхондарё вилоятида тарқалган эндемик ва ноёб доривор ўсимлик *Ungernia victoris* Vved. ex Artjush. (Amaryllidaceae) турини биотехнологик усуллар билан сақлаш ва кўпайтириш масалалари ёритилди. Тадқиқотнинг ўзига хос жиҳати сифатида уруздан унган сегментлар (гипокотиль, котиледон, илдизча) эксплант манбаи сифатида танланди ва Мурасиге—Скуг ҳамда Воллосович муҳитларида ауксин—цитокининларнинг турли комбинациялари қўлланилди. Каллусогенезнинг энг юқори самараси 2,4-Д + цитокинин (БАП ёки КИН) ҳамда қўшимча тидиазурон (ТДЗ) иштирокида кузатилди; гипокотильдан 60–80% эксплантларда каллус ҳосил бўлиб, бир эксплантга 150–200 тача микропиёзча шаклланди. In vitro шароитида каллус массасининг ойлик ўсиш коэффициенти 200% гача етди. Кимёвий таҳлил каллус таркибида фақат галантамин ажралиб чиқишини ва унинг миқдори табиий ўсимликка нисбатан 25,5 марта юқори эканини кўрсатди. Олинган натижалар *Ungernia victoris* учун барқарор, мавсумийликдан мустақил хомашё манбаини шакллантиради, табиий популяцияларга босимни камайтиради ва фармацевтика саноатида импорт ўрнини босиш имконини яратади.

Калит сўзлар: *Ungernia victoris*, каллусогенез, микроклонал кўпайтириш, Мурасиге—Скуг, тидиазурон, галантамин, Amaryllidaceae, in vitro.

Аннотация. В данной статье освещены вопросы сохранения и размножения эндемичного и редкого лекарственного растения *Ungernia victoris* Vved. ex Artjush. (Amaryllidaceae), произрастающего в Сурхандарьинской области, с использованием биотехнологических методов. Особенностью исследования явилось использование сегментов проросших семян (гипокотиль, котиледон, корешок) в качестве источника эксплантов, а также применение различных комбинаций ауксинов и цитокининов на средах Мурасиге—Скуга и Воллосовича. Наибольшая эффективность каллусогенеза наблюдалась при совместном действии 2,4-Д и цитокинина (БАП или КИН) с добавлением тидиазулона (ТДЗ); у 60–80% эксплантов гипокотили формировался каллус, и на одном экспланте образовывалось 150–200 микролуковичек. В условиях in vitro коэффициент месячного прироста каллусной массы достигал 200%. Химический анализ показал наличие в каллусе исключительно галантамина, содержание которого оказалось в 25,5 раза выше, чем в природном растении. Полученные результаты свидетельствуют о формировании стабильного, независимого от сезонности источника сырья для *Ungernia victoris*, снижении нагрузки на природные популяции и создании предпосылок для импортозамещения в фармацевтической промышленности.

Ключевые слова: *Ungernia victoris*, каллусогенез, микроклональное размножение, Мурасиге-Скуг, тидиазурон, галантамин, Amaryllidaceae, in vitro.

Abstract. This article addresses the issues of conservation and propagation of the endemic and rare medicinal plant *Ungernia victoris* Vved. ex Artjush. (Amaryllidaceae), which grows in the Surkhandarya region, using biotechnological methods. A distinctive feature of the study was the use of segments of germinated seeds (hypocotyl, cotyledon, root) as explant sources, as well as the application of various combinations of auxins and cytokinins on Murashige–Skoog and Vollosovich media. The highest efficiency of callusogenesis was observed under the combined action of 2,4-D and a cytokinin (BAP or KIN) with the addition of thidiazuron (TDZ); in 60–80% of hypocotyl explants, callus was formed, and 150–200 microbulbs developed per explant. Under in vitro conditions, the monthly growth rate of callus mass reached 200%. Chemical analysis revealed the exclusive presence of galanthamine in the callus, with its content being 25.5 times higher than in the natural plant. The results indicate the formation of a stable, season-independent source of raw material for *Ungernia victoris*, reducing the pressure on natural populations and creating prerequisites for import substitution in the pharmaceutical industry.

Keywords: *Ungernia victoris*, callusogenesis, microclonal propagation, Murashige–Skoog, thidiazuron, galanthamine, Amaryllidaceae, in vitro.

Кириш

Доривор ўсимликлар инсон саломатлигини сақлаш ва тиклашда тарихан муҳим ўрин тутган. Айниқса, иккиламчи метаболитлар – алкалоидлар, гликозидлар, терпеноидлар – замонавий фармакотерапияда бебаҳо ресурс ҳисобланади. Бироқ эндемик ва ноёб турлардан ҳаддан зиёд хомашё йиғилиши табиий популяцияларнинг қисқаришига, баъзан эса йўқолиб кетиш хавфига олиб келади. Шу нуқтада биотехнологик (*in vitro*) ёндашувлар – тўқима ва ҳужайра културалари, микроклонал кўпайтириш, каллус ва эмбриогенез технологиялари – экотизимга зарар етказмасдан, юқори қийматли моддаларни барқарор ишлаб чиқаришга имкон беради.

Марказий Осиё эндемиги *Ungernia victoris* таркибидаги асосий алкалоидлардан бири — галантамин — холинэстераза ингибитори сифатида нейродегенератив касалликларда, жумладан Альцгеймер касаллигида клиникада қўлланилади. Мавжуд анъанавий йиғим–қайта ишлаш занжири мавсумий, географик ва экологиявий омилларга қаттиқ боғлиқ. Шу сабабдан ушбу турда каллусогенез орқали микропиёзчалар ҳосил қилиш ва галантаминни мақсадли ишлаб чиқариш стратегиясини ишлаб чиқиш долзарб аҳамиятга эга. Мақолада *U. victoris* уруғидан унган сегментлардан эксплант олиш, MS/Вч муҳитларида фитогормон комбинациялари таъсири, каллус массасининг ўсиш динамикаси, микропиёзча индукцияси ҳамда каллуснинг алкалоид профили бўйича олинган натижалар баён этилади.

Материал ва методлар

Тадқиқот объекти. Объект сифатида Сурхондарё вилоятидаги икки популяциядан йиғилган *Ungernia victoris* уруғлари ишлатилди. Тур — пиёзли, сарғиш гулли, Ўзбекистон Қизил китобига киритилган эндемик доривор ўсимлик.

Уруғни тайёрлаш ва стратификация. Янги йиғилган уруғлар сеткали қопчаларда — 10°C да ≥ 30 кун сақланди. Стерилизация қадамлари: механик тозалаш → оқар сувда ювиш → совунли эритмада шейкерда ишлов (150 айл/дақ) → дистилланган сувда ювиш → 6% NaOCl → қайта ювиш. Уруғлар Петри табақларида, фитогормонсиз 25% MS (+7 г/л сахароза, +7 г/л агар) муҳитига қўйилиб, +5°C да 1–4 ҳафта стратификация қилинди.

Эксплант манбаи. Стратификациядан сўнг 50% MS муҳитига кўчирилган уруғлар униб чиқди. Ундаги гипокотиль, котиледон, илдизча 0,5–1 см сегментларга ажратилиб, базал қисми билан муҳитга эксплантация қилинди.

Култивация шароити. Температура $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, нисбий намлик $\sim 40\%$, ёритиш ≈ 2400 лк, фотопериод 16/8 соат. Автоклавланган муҳитлар 25 мл ҳажмда қуватларга қуйилди.

Озуқа муҳитлари ва фитогормонлар. Асосий муҳит — MS (Murashige & Skoog, 1962); қиёсий тажрибаларда Воллосович (1979), шунингдек Gamborg B5, WPM, N6 синовдан ўтказилди. Ауксинлар: 2,4-Д, ИУК, НУК; цитокининлар: БАП, КИН, шунингдек ТДЗ. Жами 183 комбинация варианты текширилди (ауксин/цитокинин 0,5–4,0 мг/л диапазонда), зарур ҳолларда ТДЗ 0,01–0,5 мг/л қўшилди.

Контаминацияни назорат қилиш. Ички инфекция хавфи туфайли озуқа муҳитига айрим серияларда гентамицин (2000 мг/л) қўшилди; замбуруғларга қарши ишловда пропиконазол, флудиоксонил фойдаланилди.

Каллус ва органогенез баҳоси. Каллус ҳосил бўлган эксплантлар улуши (%), каллус ранги/текстураси, бир эксплантга тўғри келган микропиёзча сони, илдизланиш тезлиги, пассажлар бўйича массалашуш коэффициенти қайд этилди. Каллус массаси ўсиши ойлик нисбатда баҳоланди.

Кимёвий таҳлил. Каллус ва табиий ўсимлик намунасида алкалоид таркиби солиштирилди; галантамин концентрациясига асосий эътибор қаратилди.

Олинган натижалар ва муҳокама

1) Эксплант манбаининг аҳамияти

Эксплант манбаи каллусогенез самарадорлигига ҳал қилувчи таъсир кўрсатди. Гипокотиль сегментлари энг юқори морфогенетик жавоб берди: 60–80% эксплантларда барқарор каллус ҳосил бўлди ва эксплантга 150–200 тача микропиёзча шаклланди. Котиледон сегментлари нисбатан пастроқ, 50–60% даражада каллус бериб, 100–120 микропиёзчага етди. Илдизчада каллусогенез 10–15% билан чекланди ва микропиёзча қайд этилмади. Бу зақономерлик бадамсимон пиёзли амариллидларда меристематика фаол қорақувватли (жамиратга яқин) тўқималарнинг регенерация потенциали юқори бўлишини тасдиқлайди. Демак, *U. victoris* учун гипокотиль — микроклонал кўпайтиришда афзал эксплантдир.

2) Фитогормон комбинациялари ва каллусогенез

Асосий муҳит сифатида MS ўзини энг барқарор ва самарали платформа сифатида намоён қилди. Ауксин–цитокинин мувозанати каллус индукциясида ҳал қилувчи бўлди:

- М56 (2,4-Д 0,5 мг/л + КИН 0,5 мг/л) → $70\pm 2\%$ каллусланиш;
- М5 (2,4-Д 0,5 мг/л + БАП 0,5 мг/л) → $65\pm 1,2\%$;
- М162 (БАП 0,5 мг/л) → $\sim 65\pm 2,2\%$ (ауксинсиз ҳам жавоб).

Ушбу базавий схемаларга ТДЗ (0,5 мг/л) қўшилганда каллусланиш $80\pm 1,2\%$ гача ошди (М56+ТДЗ, М5+ТДЗ), каллус массаси бир неча пассажда зич, қора-сарик нектилли тузилишга эга, регенератив қобиляти юқори агрегатга айланди. ТДЗнинг цитокининга ўхшаш фаоллиги ва тўқималардаки эндоген гормон балансини “қайта созлаши” *U. victoris* каллусининг индукцияси ва сақланишини кучайтирди.

Воллосович муҳити (Вч) айрим серияларда илдизланиш ва онтовегетатив тўқима стабиллигини яхшилагани кузатилди, бироқ каллуснинг тез массалашуви ва микропиёзча индукциясида MS+ТДЗ ечимларига қараганда самараси пастроқ бўлди. B5, WPM, N6 муҳитлари назарий жиҳатдан мос бўлса-да, амалда MS билан солиштирганда *U. victoris* учун кенг қўлланадиган протоколга айланмади.

3) Каллус массасининг ўсиш динамикаси ва пассаж стратегияси

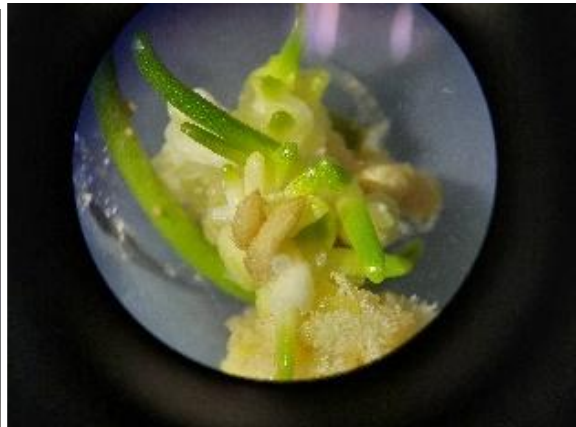
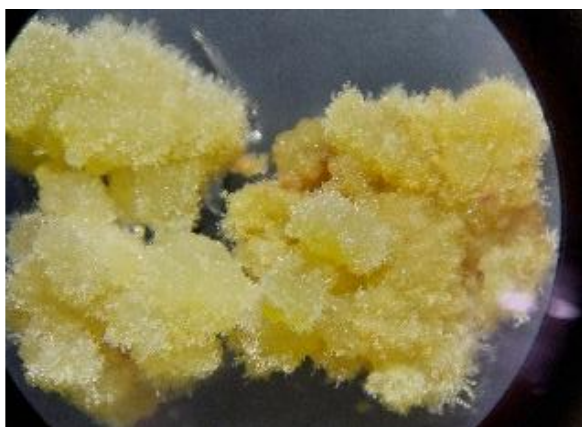
Индукциядан сўнг каллус MS + (2,4-Д/БАП/КИН) + ТДЗда сақланди; М5да ҳосил қилинган каллусни М56га ўтказиш (passage) каллус массасини 60–70% қўшимча ўсиш билан кучайтирди. Ойлик массалашув коэффиценти (инглизча growth index) 200% гача етди: бир ойда масса камида икки бараварга ошди, бу биореакторга масштаблаш учун қулай биокинетик профилни билдиради. Каллус ранги қора-сарик, зерчалар зичлиги юқори бўлган агрегат тузилиши регенератив потенциалнинг юқори эканидан далолат берди.

4) Бевосита органогенез ва микропиёзчалар ҳосил бўлиши

U. victoris каллусида бевосита органогенез орқали микропиёзчалар шаклланиши куйидаги схемаларда самарали бўлди:

- ИУК 0,5 мг/л + БАП 0,5 мг/л (М17),
- НУК 0,5 мг/л + БАП 0,5 мг/л (М32),
- НУК 0,5 мг/л + КИН 0,5 мг/л (М44),
- ИУК 0,5 мг/л + КИН 0,5 мг/л (М68).

Биринчи пассаждан сўнг микропиёзчаларни кўпайтириш учун ауксин:цитокинин = 5:1 нисбатга ўтилди (масалан, ИУК 2,5 + БАП 0,5 мг/л; НУК 2,5 + БАП 0,5 мг/л; ИУК 2,5 + КИН 0,5 мг/л). Учинчи пассажда 50% MS + НУК 2,5 + БАП 0,5 + ТДЗ 0,3 мг/л илдизланиш сигналларини кучайтирди; кейинги пассажларда 50% MS + НУК 0,5 мг/л кўлланиб, илдиз тизими барқарорлашди. Бир эксплантдан 100–150 микропиёзча олина бошланди; 5–6 ой ичида *in vitro* дан грунтга тайёр ҳолатга етиштириш амалга оширилди.



Расм 1. *U. Victoris*. Каллусогенез ва каллусдан олинган микропиёзчалар

5) Контаминация ва стериллик

Аспергиллюс спектридаги ички инфекциялар қайд этилган серияларда гентамицин 2000 мг/л қўшиш стерилликни 80% гача яхшилади. Фунгицидлардан пропиконазол ва флудиоксонил билан эксплант олдиндан ишлов берилиши контаминацияни кескин пасайтирди. Шу билан бирга, антибиотик/фунгицидлар дозалари тўқиманинг морфогенез потенциалига зарар бермаслик учун минимал самарали сатҳда сақланди.

6) Каллус таркиби: галантаминнинг устунлиги

Каллусдан ажратилган алкалоидлар профили таҳлилида фақат галантамин аниқланди; бошқа типик амариллид алкалоидлари ажратилмади. Бу “моно-мақсадли” биосинтезни саноат учун катта устунлик қилади: сепарация ва тозалаш босқичлари соддалашади, чиқим–самарадорлик баланси яхшиланади, стандартлаштириш осонлашади. Энг муҳим топилма — каллусдаги галантамин миқдори табиий ўсимликка нисбатан 25,5

марта юқори. Бу кўрсаткич модданинг таркиби мавсум, иқлим ва географик омиллardan қатъий назар *in vitro* платформасида барқарор ва юқори бўлиши мумкинлигини тасдиқлайди.

7) Экологик ва иқтисодий натижалар

Тақдим этилган протокол мавсумийликка боғлиқ эмас, йил давомида ишлайди, ресурс тежайди ва табиий популяцияларга бўлган босимни камайтиради. Экспортбop қийматга эга галантаминни маҳаллий хомашё базасида ишлаб чиқариш имконияти импорт ўрнини босиш стратегиясини қўллаб-қувватлайди. Шу билан бирга, *ex situ* коллекциялар ва қайта интродукция орқали *U. victoris* генофонди узоқ муддатли сақланади.

8) Протоколнинг амалиётга жорий этишга тайёрлиги

Ишлаб чиқилган йўл-йўриқ лаборатория—пилот—семи-производство босқичларига масштабланиши мумкин. Ойлик 200% каллус ўсиши ва микропиёзчага юқори конверсия кўрсаткичлари биореактор тизимларида селл-суспензия ва/ёки агрегат каллус платформаларига мослашади. Сифат назоратида (QC) галантаминнинг хроматографик бармоқ изи ва микробиологик стериллик индикаторлари асосий критериялар бўлиб хизмат қилади.

9) Чекловлар ва келгуси ишлар

Тадқиқот каллусдаги алкалоид профилингни тезкор тарзда келтириб берди; шу билан бирга, генетик барқарорлик (SSRs/ISSR), эпигенетик маркерлар ва омикс ёндошувларини қўшиш протоколнинг узоқ муддатли барқарорлигини кафолатлайди.

Якуний тезис: *U. victoris* учун таклиф этилган каллусогенез ва микроклонал кўпайтириш протоколи фармацевтик-биотех тармоққа тез трансфер этиладиган, галантаминга йўналтирилган самарали технологик йўлни таклиф этади.

Хулоса

1. *U. victoris* уруғидан унган гипокотиль — каллусогенез ва микропиёзча индукцияси учун энг самарали эксплант.
2. MS + (2,4-Д + БАП/КИН) + ТДЗ схемалари каллусланишни 80% гача оширади; каллус ойлик массалашуви $\approx 200\%$.
3. Каллус таркибида фақат галантамин аниқланди; миқдори табиий ўсимликка нисбатан $25,5\times$ юқори.
4. Бир эксплантдан 100–150 микропиёзча олиш мумкин; 5–6 ой ичида грунтга чиқаришгача етказилади.
5. Протокол мавсумийликдан мустақил, табиий популяцияларга босимни камайтиради ва импорт ўрнини босишга хизмат қилади.

Фойдаланилган адабиётлар

1. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473–497.
2. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. (eds.) (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd ed., Vol. 1. Springer.
3. Воллосович А.Г., Пучинина Т.Н., Николаева Л.А. (1979). Оптимизация состава макросолей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina*. *Растительные ресурсы*, 15(4): 516–526.
4. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of soybean root cell cultures. *Exp. Cell Res.*, 50: 151–158.

5. Lloyd G., McCown B. (1980). Commercial micropropagation of *Kalmia latifolia* by shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, 30: 421.
6. Skoog F., Miller C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 118–131.
7. Fujimura T., Komamine A. (1980). Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in carrot cell suspension. *Z. Pflanzenphysiol.*, 99(1): 1–8.
8. Bacchetta L. et al. (2003). Adventitious regeneration in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 37–44.
9. Reshetnikov V.N., Spiridovich E.V., Nosov A.M. (2014). Биотехнология растений и перспективы ее развития. *Физиология растений и генетика*, 46(1): 1–18.
10. Красная книга Республики Узбекистан. Т. 1. Растения. Ташкент: Tasvir, 2019.