

## **AGROBACTERIA VOSITASIDA SOYA TRANSFORMATSIYASINING YAXSHILANGAN SAMARALI USULI**

Yusupov Abdurahmonbek Nodirjon o'g'li toyanch doktorant., Ayubov  
Mirzakamol Sobitjonovich katta ilmiy xodim PhD., Ubaydullayeva Xurshida  
Abdullayevna b.f.d., Xatamov Dilmurod G'anijon o'g'li laborant., Mamajonov  
Bexzod Orifjon o'g'li toyanch doktorant., Obidov Nuriddin Shuhraton o'g'li kichik  
ilmiy xodim.

O'zRFA Genomika va bioinformatika markazi

Tel: 97 273-11-62, Gmail: [yusupova0107@gmail.com](mailto:yusupova0107@gmail.com)

**Annotatsiya:** Samarali transformatsiya usuli genetik jihatdan o'zgartirilgan soyani yaxshilashning asosiy omilidir. Qishloq xo'jaligi ekinlari orasida soya nisbatan transformatsiya jarayoni qiyin kechadigan o'simlik hisoblanadi. Shu kunga qadar dunyo olimlari tomonidan soya transformatsiyasi bo'yicha qator tadqiqot ishlari olib borilgan va turli usullar qo'llanilgan. Ushbu maqolada Agrobakteriya vositada soya transformatsiyasi va regeneratsiyasi uchun takomillashtirilgan kotiledon tuguni usulini bayon qilamiz.

**Kalit so'zlar:** soya, kotiledon tuguni, Agrobakteriya vositasida transformatsiyasi, yarim urug'lar.

## **УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД AGROBACTERIUM ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СОИ**

Юсупов Абдурахмонбек Нодиржон ўғли докторант., Аюбов  
Мирхакамол Собитжанович с.н.с PhD., Ubayduллаева Хуршида Абдуллаевна  
д.б.н., Хатамов Дилмурод Ганижон ўғли лаборант, Мамажонов Бехзод  
Орифжон ўғли докторант, Обидов Нуриддин Шухратжон ўғли м.н.с

АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики

Тел: 97 273-11-62, Gmail: [yusupova0107@gmail.com](mailto:yusupova0107@gmail.com)

**Аннотация:** Эффективный метод трансформации является ключевым фактором в улучшении генетически модифицированных растений сои. По сравнению с другими сельскохозяйственными культурами, процесс трансформации сои считается относительно сложным. На сегодняшний день учёные со всего мира проводят различные исследования в поисках эффективных методов трансформации сои. В данной статье приведен усовершенствованный метод трансформации семядольных узлов опосредованной *Agrobacterium* и их регенерации.

**Ключевые слова:** соя, семядольный узел, *Agrobacterium* опосредованная трансформация, полусемена.

## **IMPROVED EFFICIENT METHOD AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION IN SOYBEAN**

Yusupov Abdurakhmonbek Nodirjon ugli basic doctoral student., Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich senior researcher PhD., Ubaydullayeva Xurshida Abdullayevna doctor of biological sciences DSc., Khatamov Dilmurod Ganijon ugli., Mamajonov Bexzod Orifjon ugli basic doctoral student., Obidov Nuriddin Shukhraton ugli junior researcher.

Center of genomics and bioinformatics

Tel: 97 273-11-62, Gmail: [yusupova0107@gmail.com](mailto:yusupova0107@gmail.com)

**Annotation:** *An efficient transformation method is a key factor to improve of genetically modified soybean plants. The soybean transformation process is considered to be relatively complex compared to other crops. To date, scientists from all over the world are implementing various studies in search of effective methods for soybeans transformation. In this article we showed the effect of the modified cotyledon nodes transformation method using *Agrobacterium tumefaciens* and soybean regeneration processes.*

**Key words:** *soybean, cotyledon-node, agrobacterium-mediated transformation, half-seed.*

## **Kirish**

Soya (*Glycine max* L.) tarkibida ko'p miqdorda oqsil va yog' bo'lgan muhim dukkakli ekin bo'lib, oziq-ovqat, chorva mollari uchun yem-xashak va sanoat maqsadlarida keng yetishtiriladi. Urug'larida ko'plab to'yinmagan yog'li kislotalar, vitaminlar va minerallar mavjud. Makroelementlar va minerallar manbai bo'lishdan tashqari, soya dukkaklari tarkibida izoflavonlar, saponinlar, oligosaxaridlar, goitrogenlar va fitoestrogenlar kabi ikkilamchi metabolitlarni saqlaydi. Shuningdek, soya biodizel ishlab chiqarishda samarali xomashyo hisoblanadi. U atmosfera tarkibidagi erkin azotni o'zlashtirish qobiliyatiga ega va shuning uchun ham yetishtirish jarayonida minimal o'g'it sarfini talab qiladi. Ammo boshqa ko'pgina madaniy o'simliklar kabi, soya ham ko'p suv talab etadi va qurg'oqchil muhitda hosildorligi pasayadi. Shuning uchun ham uning qurg'oqchilikka chidamli navlarini olish bo'yicha dunyo olimlari ko'p yillardan buyon tadqiqot ishlarini olib bormoqdalar. An'anaviy seleksiya usullaridan tashqari, hozirgi paytda zamonaviy genomlarni tahrir qiluvchi usullar ham keng qo'llanilmoqda.

## **Adabiyotlar tahlili**

Soya mahsulotlarini iste'mol qilishga bo'lgan talab uning organizmda xolesterin miqdorini kamaytirish, saratonni oldini olish, qandli diabet, ichak va buyrak kasalliklarini oldini olish kabi foydali ta'sirga ega ekanligi tufayli dunyo bo'ylab yildan-yilga ortib bormoqda [1]. Buning natijasida soyaning global import va eksport qiymati bug'doy, sholi va makkajo'xori kabi boshqa barcha asosiy ekinlarga nisbatan sezilarli darajadi ortgan. Biroq, global ishlab chiqarish potentsiali hozirgi vaqtda qishloq xo'jaligidagi suv resurslarining cheklanganligi hamda iqlim omillari, xususan qurg'oqchilik, havo harorati va yog'ingarchilikning o'zgaruvchanligi sababli cheklangan [2]. Bu esa o'z navbatiga global oziq-ovqat xavfsizligini ta'minlashda jiddiy muammolarni vujudga kelishiga olib kelmoqda. Yuqoridagi omillarni hisobga olgan xolda, soyaning turli stresslarga chidamli, hosildor liniya va navlarini yaratish muhim ahamiyatga ega.

Genetik o'zgartirilgan ekin sifatida transgen soya o'zining ozuqaviy, shuningdek, sanoat va farmatsevtikada qo'llanilishi tufayli dunyoda eng katta o'rinni egallaydi. Genetik transformatsiya genlar funktsiyasini va soyaning molekulyar seleksiyasini o'rganishda muhim rol o'ynaydi. Samarali transformatsiya genetik o'zgartirilgan soyani yaxshilashning asosiy omilidir. Bugungi kunda ko'pgina tadqiqotchilar tomonidan soyada transformatsiyaning ikkita usuli qo'llaniladi. Birinchisi embrionogen to'qimalarni DNK bilan qoplangan inert material zarralari bilan bombardimon qilish [3,4,5]. Ushbu usulning asosiy kamchiligi nishon-to'qimalarni tayyorlash uchun uzoq vaqt talab qilishidir. Shu bilan birgalikda qimmat usul hisoblandi. Ikkinchi usul esa embrion o'qi, yetilmagan urug' kurtaklar yoki yangi unib chiqqan ko'chatlarning urug'kurtak to'qimalari kabi o'simlik to'qimalarini *Agrobacterium tumefaciens* L. vositachiligida transformatsiya qilishni o'z ichiga oladi [6,7,8,9]. Hozirgacha soyada Agrobakteriya vositasida transformatsiya usuli bo'yicha bir qancha tadqiqot ishlari e'lon qilingan. Soyaning kotiledon tugunlari eksplanti orqali o'simlikni qayta tiklanishi haqidagi ma'lumotlar birinchi bo'lib Cheng tomonidan nashr qilingan [10]. Transgen soya olish uchun kotiledonar-tugunli eksplantlarga Agrobakteriya vositachiligidagi transformatsiya tizimi birinchi bo'lib Hinchee tomonidan amaliyotga tadbiiq etilgan [6]. Ammo Chengni ta'kidlashicha bu usulning samaradorligi sholiga nisbatan (90% dan yuqori) taqqoslanganda soyada ancha past (5% dan kam) ko'rsatkichga ega [15]. Transformatsiya samaradorligini oshirish uchun ushbu kotiledon-tugun protokolini takomillashtirish bo'yicha tadqiqotlar yillar davomida faol ravishda olib borilmoqda [11,12,13,14,16,]. Biroq, soya transformatsiyasi chastotasini yaxshilash uchun qo'shimcha tadqiqotlar talab etiladi.

### **TADQIQOT METODOLOGIYASI**

Maqolada takomillashtirilgan Agrobakteriya vositasida soyada kotiledon tuguni transformatsiya usulini tavsiflaymiz. Ushbu maqolada Agrobakteriya vositada soya transformatsiyasi va to'qima kulturasida bosqichlari ilgari chop etilgan protokollarga [12,13] nisbatan takomillashtirilgan.

## TAHLILLAR VA NATIJALAR

O'simlik materillari sifatida soyaning ayrim navlari (NC 17478, NC 17495, NC 17501<sup>1</sup>) ushbu tadqiqotda Agrobakteriya vositasida transformatsiya qilish uchun ishlatildi. Transformatsiya uchun o'zida gigromitsinga chidamlilik geni tutgan vektorni o'z ichiga olgan *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 shtammi ishlatildi.

Sog'lom urug'lar Di tomonidan ta'riflanganidek, 16 soat davomida xlor gazi ta'sirida sterilizatsiya qilindi [17]. Sterilizatsiya qilingan urug'lar distillangan-sterillangan suvli petriy idishlarida (har bir idishda 30 ta) 12-14 soat 25 °C da qorong'u joyda inkubatsiya qilindi (Rasm, A). Inkubatsiyadan so'ng urug'lar steril sharoitda urug' po'stidan ajratildi va murtak o'qi bo'ylab skalpel yordamida ikki pallaga ajratildi. Keyingi ishlar uchun gipokotilga ega yarim urug'pallali eksplantlar tanlab olindi. Yarim urug'pallali eksplantlarda gipokotil kotelidondan 3-5 mm qoldirilib kesib tashlandi. Kotiledon va gipokotilning tutashgan qismida skalpel bilan bir nechta chuqur bo'lmagan yaralar hosil qilindi. Kotiledonga birikkan kurtaklar olib tashlandi.

Eksplantlarni zararlashdan bir kun odin tarkibida 40 mg/L rifampitsin va 50 mg/L spektinomitsin bo'lgan 200 ml LB suyuq ozuqasiga -80°C da saqlanayotgan bakteriya kulturasidan 200 mkl qo'shildi. 28°C va 200 rpm da ( $OD_{600} = 0.8-1.2$ ) inkubatsiya qilindi. Kerakli ko'rsatkichgacha o'sgan bakteriya kulturasini 50 ml steril plastik probirkalarga solinib, 1000 x g tezlikda 10 daqiqa davomida cho'ktirildi. Cho'kma tarkibida 0,31 g/L Gamborgning B-5 bazal tuzlar aralashasi (Phytotech G768,) 3.8 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 30 g/L saxaroza (Phytotech S829), 0,1 g/L Gamborgning B5 vitaminlari (Phytotech G249), 30 mg/L asetosiringon (Phytotech A104), 2,5 mg/L 6-benzilaminopurin (Phytotech B800) va 0,60 mg/L gibberellin kislota ( $GA_3$ ) bo'lgan suyuq ozuqa (pH=5.4) vositasida  $OD_{600} = \sim 0.6$  gacha suyiltirildi.

---

<sup>1</sup> O'simliklar genetik resurslari ilmiy-tadqiqot instituti Milliy Genbankdagi ro'yxatga olish raqami

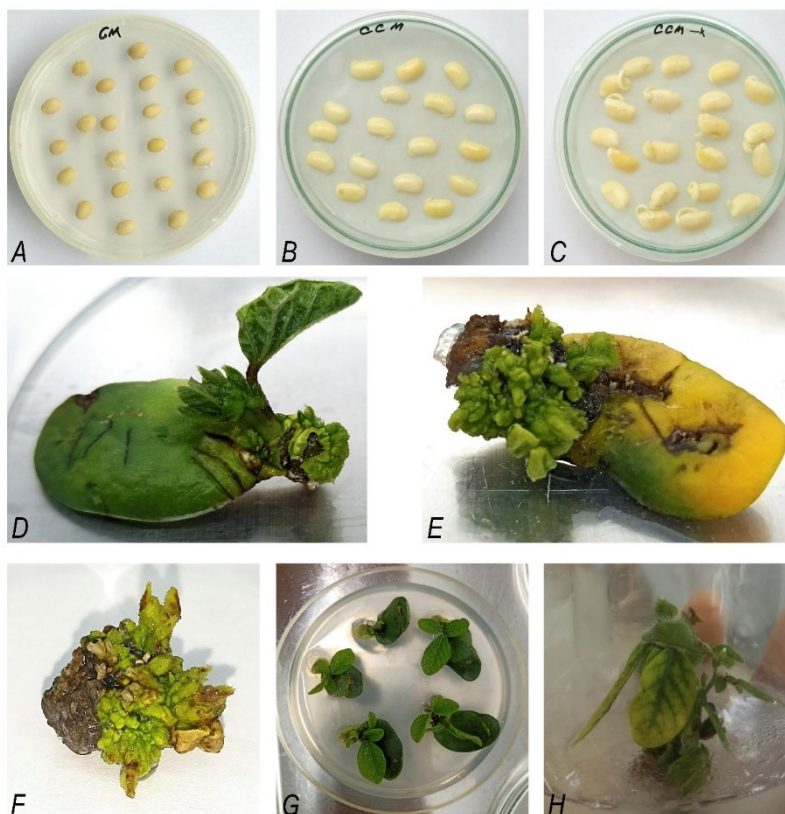
Yarim urug'pallali eksplantlar avvaldan tayyorlab qo'yilgan Agrobakteriya suspenziyasi bilan 28°C haroratda 200 rpm da 30 daqiqa inkubatsiya qilindi. Jarayon yakunlangandan so'ng, bakteriya suspenziyasi to'kib tashlanib, eksplantlardagi ortiqcha suyuqlik sterillangan filtr qog'oz yordamida olib tashlandi. Eksplantlar tarkibida 0,31 g/L Gamborgning B-5 bazal tuzlar aralashmasi (Phytotech G768,) 4,3 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 30 g/L saxaroza (Phytotech S829), 7 g/L agar (Phytotech A1000), 0,1 g/L Gamborgning B5 vitaminlari (Phytotech G249), 200 mg/L L-sistein (Phytotech C204), 30 mg/L asetosiringon (Phytotech A104), 182 mg/L ditiotreitol (Phytotech T869), 300 mg/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> va 0,60 mg/L gibberellin kislotasi (GA<sub>3</sub>) bo'lgan qattiq ozuqada (pH=5.4) 5-kun harorat 25°C bo'lgan 18:6 (yorug'lik:qorong'ulik) fotoperiodik muhitda inkubatsiya qilindi (Rasm, B-C).

Birgalikda o'stirish boqichidan so'ng eksplantlar yuzasida agrobakteriya ko'payishini to'xtatish uchun tarkibida 3,1 g/L Gamborgning B-5 bazal tuzlar aralashmasi (Phytotech G768,) 0,644 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 30 g/L saxaroza (Phytotech S829), 0,1 g/L Gamborgning B5 vitaminlari (Phytotech G249), 170 mg/L sefotaksim, 65 mg/L tikarsillin, 100 mg/L vankomitsin bo'lgan ozuqada (pH=5,7) 3-4 marta yuvildi. Ortiqcha suyuqlik sterillangan filtr qog'oz yordamida olib tashlandi. O'sib ketgan gipokotillar kotiledon tugunidan 3-5 mm qoldirib kesib tashlandi.

Eksplantlarda kurtaklarni shakillantirish uchun tarkibida 3,1 g/L Gamborgning B-5 bazal tuzlar aralashmasi (Phytotech G768,) 0,644 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 30 g/L saxaroza (Phytotech S829), 7 g/L agar (Phytotech A1000), 0,028 g/L Gamborgning B5 vitaminlari (Phytotech G249), 200 mg/L L-sistein (Phytotech C204), 1,4 mg/L 6-benzilaminopurin (Phytotech B800), 250 mg/L timentin (Phytotech T869), 0,6 mg/L kinetin, 170 mg/L sefotaksim va 20 mg/L gigromitsin bo'lgan kurtak hosil qiluvchi qattiq ozuqaga (pH=5,7) ~45° burchak ostida gipokotilli qismi botirilib, 42 kun davomida harorat 25°C bo'lgan 18:6 (yorug'lik:qorong'ulik) fotoperiodik muhitda inkubatsiya qilindi. Ozuqa har

ikki haftada yangilandi (Rasm, D-E). Gigromitsin selektiv vosita sifatida ishlatildi. Oʻzida konstruksiya tutmagan eksplantlar sargʻayib nobud boʻldi.

Kurtaklar shakillanib, taxminan 5-10 mm boʻlganida ular kotiledondan ajratib olindi. Kurtaklarni choʻzilishi uchun tarkibida 4.43 g/L vitaminlar boʻlgan MS bazal muhiti (Phytotech M404), 0,644 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 30 g/L saxaroza (Phytotech S829), 7 g/L agar (Phytotech A1000), 0.8 mg/L zeatin riboza, 55 mg/L asparagin (Phytotech A107), 130 mg/L L-pirolglutamin kislota (Sigma 83160-100G), 250 mg/L timentin (Phytotech T869), 0,7 mg/L GA<sub>3</sub>, 20 mg/L gigromitsin, 170 mg/L sefotaksim, va 0,25 mg/L 3-indol sirka kislota boʻlgan qattiq ozuqada (pH=5,7) 42-56 kun davomida harorat 25°C boʻlgan 18:6 (yorugʻlik:qorongʻulik) fotoperiodik muhitda inkubatsiya qilindi. Ozuqa har ikki haftada yangilandi. Yangi ozuqaga olishdan avval sargʻaygan kurtaklar olib tashlandi (Rasm, F-G).



Rasm. Agrobakteriya vositachiligida transformatsiya qilingan soyaning yarim urugʻini oʻzgarish jarayoni. (A) Urugʻlarni undirish; (B-C) Co-cultivatsiya; (D-E) Kurtak xosil qilish; (F-G) Kurtaklarni choʻzilishi (oʻsishi); (H) Ildizlatish.

Kurtaklar 4-6 sm bo'lganida asosiy klasterdan ajratib olindi va ildizlatish uchun tarkibida 4.43 g/L vitaminlar bo'lgan MS bazal muhiti (Phytotech M404), 0,644 g/L MES monogidrat (Phytotech M825), 20 g/L saxaroza (Phytotech S829), 7 g/L agar (Phytotech A1000), 2 mg/L 3-indol moy kislota (Phytotech A560), 55 mg/L asparagin (Phytotech A107), 130 mg/L L-piroglutamik kislota (Sigma 83160-100G), 250 mg/L timentin (Phytotech T869) va 100 mg/L sefatoksim bo'lgan qattiq ozuqaga (pH=5,6) ko'chirildi. Eksplantlar ildiz hosil qiluvchi ozuqada kurtaklarni cho'zilishidagi kabi sharoitda 42-56 kun davomida inkubatsiya qilindi (Rasm, H). Ildiz hosil bo'lganida so'ng tuproq-vermikulit (1:2) aralashmasiga o'tkazildi va usti nam saqlovchi vosita bilan yopilgan holda 3 kun davomida harorat 25°C bo'lgan 16:8 (yorug'lik:qorong'ulik) fotoperiodik muhitda o'stirildi.

### **XULOSALAR**

Urug'larni 14 soatdan ortiq inkubatsiya qilinganda teng ikki pallaga ajratish jarayonida ularning butunligi oson buzilishi, inkubatsiya vaqti 12 soatdan kam bo'lganda esa urug'lar yaxshi shishmaganligi sababli teng ikki bo'lakka ajralish qiyinlashgani kuzatildi. Co-cultivatsiya bosqichidan so'ng explantlarga tarkibida sefatoksim, tikarsillin va vankomitsin bo'lgan yuvish muhiti bilan ishlov berilganda agrobakteriyani o'sishi kuztilmadi. Kurtaklarni shakillantiruvchi ozuqa muhitiga kinetin qo'shish kurtaklarni hosil bo'lish chastotasini, kurtaklarni o'stiruvchi ozuqa muhitida L-asparagin hamda L-pyroglutamin kislotalarini birgalikda qo'llanilishi esa kurtaklarni cho'zilish chostatasini oshirdi.

### **Adabiyotlar**

1. Friedman, M. and Brandon, D.L. Nutritional and health benefits of soy proteins/J. Agric. Food Chem. – 2001. – 49 (3). 1069–1086.
2. Kunert K. J, Vorster B. J, Fenta B. A, Kibido T, Dionisio G, Foyer, C. H. Drought stress responses in soybean roots and nodules/Frontiers in Plant Science. – 2016. – Vol 7. 1015.

3. Hadi M. Z, McMullen M.D, Finer J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* –1996. Vol 15. 500–505
4. Santarem E.R, Finer J.J Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium/*In Vitro Cell Dev Biol Plant.* –1999. – Vol 35. 451–455
5. Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue/*Euphytica.* – 2002. – Vol 127. 367–376
6. Hinchey M, Connor-Ward D, Newell C.A, McDonnell R.E, Sato S.J, Gasser C.S, Fischhoff D.A, Re D.B, Fraley R. Horsch R. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer/*Biotechnology* – 1988. № 6. 915–922
7. Parrott W.A, Hoffman L.M, Hildebrand D.F, Williams E.G, Collins G.B. Recovery of primary transformants of soybean/*Plant Cell Rep.* –1989. № 7. 615–617
8. Somers D.A, Samac D.A, Olhoft P.M. Recent advances in legume transformation/*Plant Physiol.* – 2003. – Vol 131. 892–899
9. Paz M.M, Shou H, Guo Z, Zhang Z, Banerjee A.K, Wang K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant/*Euphytica.* – 2004. – Vol 136. 167–179
10. Cheng T.Y, Saka H, Voqui-Dinh T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture/*Plant Sci. Letters.* –1980. –Vol 19. 91–99.
11. Clemente T, LaVallee B.J, Howe A.R, Ward D.C, Rozman R.J, Hunter P.E, Broyles D.L, Kasten D.S, Hinchey M.A. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation/*Crop Sci.* – 2000. – Vol 40. 797–803
12. Olhoft P.M, Lin K, Galbraith J, Nielsen N.C, Somers D.A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells/*Plant Cell Rep.* –2001. –Vol 20. 731–737

13. Olhoft P.M, Flagel L.E, Donovan C.M, Somers D.A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method/ *Planta*. –2003. – Vol 216. 723–735.
14. Liu H, Yang C, Wei Z. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system/*Planta*. – 2004. –Vol 219. 1042–1049
15. Chen, L.; Cai, Y.; Liu, X.; Yao, W.; Guo, C.; Sun, S.; Wu, C.; Jiang, B.; Han, T.; Hou, W. Improvement of Soybean *Agrobacterium*-Mediated Transformation Efficiency by Adding Glutamine and Asparagine into the Culture Media./*Int. J. Mol. Sci.* – 2018. –Vol 19. 3039.
16. Bao A, Tran L, Cao D. CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in Soybean. In: Jain, M., Garg, R. (eds) *Legume Genomics. Methods in Molecular Biology*. –2020. –Vol 2107. 349-364
17. Di, R.; Purcell, V.; Collins, G.B.; Ghabril, S.A. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 1996, 15, 746–750.