

***Agrobacterium tumefaciens* yordamida pomidor o'simligi (*Solanum lycopersicum* L) transformatsiyasida qo'llaniladigan ozuqa muhitlarini optimallashtirish**

Murodov Anvarjon Adxamjon o'g'li^{1,2}, Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich³,
Mamajonov Bexzod O'rijfon o'gli⁴, Yusupov Abdurahmon Nodirjon o'g'li⁵,
Obidov Nurdinjon Shuhratjon o'g'li⁶, Bashirxonov Ziyodulloxon Hakimullo
o'g'li¹, Buriev Zabardast Tojiboyevich⁸.

1.O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi tayanch doktorant.

2.O'zbekiston Respublikasi Sog'liqni Saqlash vazirligi. Toshkent Tibbiyot Akademiyasi. Gistologiya va tibbiy biologiya kafedrasasi assistent.

3. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi katta ilmiy hodim.

4. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi tayanch kichik ilmiy hodim.

5. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi tayanch kichik ilmiy hodim.

6. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi tayanch doktorant.

7. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi tayanch doktorant.

8. O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Genomika va Bioinformatika markazi professor.

Tel: +998 99 365-94-40, Gmail: murodov95anvar@gmail.com.

Abstrakt. Pomidor o'simligi nafaqat iqtisodiy jihatdan muhim o'simlik, balki u mevalarining yetilishida yuz beradigan molekulyar va biokimyoviy jarayonlarni o'rganishda olimlar uchun model o'simlik hamdir. Genom tahrirlashning yangi usuli hisoblangan CRISPR/Cas9 va RNK interferensiya pomidor o'simligi genomini o'rganishga imkon yaratdi. Pomidor o'simligi *Agrobacterium* orqali transformatsiyasida genotip tanlamasligi, nisbatan qisqa vaqt sarflanishi kabi afzalliklarga ega bo'lishi bilan bir qatorda ba'zi kamchiliklarga ham

ega. Bu kamchiiklar transformatsiya foizining pastligi va oзуqalarning murakkabligi hisoblanadi. Ushbu maqolada *Agrobacterium* orqali pomidor o'simligi transformatsiyasida ishlatiladigan oзуqlarni optimallashtirish usullari va ularning natijalari bayon etilgan. Tajribalarda *Agrobacterium tumefaciens*ning LB4404 shtaminidan va pomidor o'simligining 3 xil navi: Yusupovskiy (mahalliy), Cherry va Beautydan foydalanildi. Eng yuqori transformatsiya foizi Cherry navida olindi. Selektiv antibiotik Hygromycin, o'sishni boshqaruvchi fitogarmon ZEATINni konsentratsiyalarini o'zgartirish va ildiz hosil qildiruvchi oзуqa RM ni tarkibini o'zgartirish orqali transgen o'simliklar olish miqdori ortishiga erishildi.

Kalit so'zlar: *Solanum lycopersicum L*, genetik transformatsiya, oзуqa muhitlari, *Agrobacterium tumefaciens*.

Питательные среды, используемые при генной трансформации растений томата (*Solanum lycopersicum L*) с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, и их оптимизация.

Муродов Анваржон Адхамжон угли ^{1,2}, Аюбов Мирзакамол Собитжонович ³, Мамаджонов Бехзод Ориджон угли ⁴, Юсупов Абдурахман Нодиржон угли ⁵, Обидов Нурдинжон Шухратжон угли ⁶, Баширхонов Зиёдуллахон Хакимулла угли ⁷, Буриев Забардаст Тожибоевич ⁸.

1. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. докторант
2. Министерство здравоохранения Республики Узбекистан. Ташкентская медицинская академия. Кафедра гистологии и медицинской биологии. Ассистент.
3. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. с.н.с.
4. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. м.н.с.
5. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. м.н.с.
6. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. докторант.
7. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. докторант.
8. АНРУз Центр Геномики и Биоинформатики. профессор

Тел: +998 99 365-94-40, Gmail: murodov95anvar@gmail.com

Аннотация. Томат (растение) является не только экономически важной культурой, но и служит для ученых модельным растением для изучения молекулярных и биохимических процессов, происходящих при созревании его плодов. Новый метод редактирования генома CRISPR/Cas9, а также методы РНК-интерференции предоставили возможности для изучения генома томата. Трансформация томата с помощью *Agrobacterium* обладает преимуществами, такими как неселективность в отношении генотипа и относительно малые временные затраты, но также имеет и некоторые недостатки. К этим недостаткам относятся низкий процент трансформации и сложность питательных сред. В данной статье описаны методы оптимизации питательных сред, используемых при трансформации томата с помощью *Agrobacterium*. В экспериментах использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 и три сорта томата: Юсуповский (местный), Черри и Бьюти. Наивысший процент трансформации был достигнут у сорта Черри. Путем изменения концентраций селективного антибиотика гигромицина, фитогормона, регулирующего рост, зеатина, и модификации состава среды для ризогенеза RM удалось увеличить выход трансгенных растений.

Ключ слова: *Solanum lycopersicum* L, генетический трансформация, питание среды, *Agrobacterium tumefaciens*.

**Nutrient media optimization in tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.)
transformation by *Agrobacterium tumefaciens***

Murodov Anvarjon Adhamjon ugli ^{1,2}, Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich ³,
Mamajonov Bekhzod Oriifon ugli ⁴, Yusupov Abdurahman Nodirjon ugli ⁵,
Obidov Nurdinjon Shuhratjon ugli ⁶, Bashirkhanov Ziyodullahkhon Hakimullah
ugli ⁷, Buriev Zabardast Tojiboyevich ⁸.

1. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. PhD student.

2. Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan. Tashkent Medical Academy. Department of Histology and Medical Biology. Assistant.
 3. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. Senior scientist.
 4. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. junior scientist.
 5. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. junior scientist.
 6. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. PhD student.
 7. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. PhD student.
 8. Center of Genomics and Bioinformatics Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. Professor.
- Tel: +998 99 365-94-40, Gmail: murodov95anvar@gmail.com.

Abstract. Tomato plant not only economic in terms of important plant, like this fruit especially berry of fruits in maturity face giving molecular and biochemical processes in learning scientists model plant for Genome genome editing new method CRISPR/Cas9 also known as RNA interference methods using tomato plant genome to study opportunity created by Tomato plant *Agrobacterium* through in transformation genotype indiscriminate , relatively short time consumption such as to the advantage has to be with one in the queue some It also has disadvantages . These disadvantages transformation percentage low and of food This is the complexity. in our article *Agrobacterium* through tomato plant in the transformation used food This is optimization. in experience *Agrobacterium tumefaciens* from strain LB4404 and tomato 3 varieties of the plant: Yusupovysky (local), cherry and beauty from used. Most high transformation percent cherry variety was taken. Selective antibiotic Hygromycin, growth manager phytohormon ZEATIN concentrations change and root harvest doer feed RM the composition changes through transgender plants to take amount to increase achieved.

Key words: *Solanum lycopersicum L*, genetic transformation, nutrition environments, *Agrobacterium tumefaciens*.

1. Kirish. Pomidor o'simligi *Solanaceae* oilasiga mansub bo'lib, kelib chiqish markazi Janubiy Amerika va u yevropaga 16-asrda olib kelingan [1]. Pomidor mevasi 2024 - yilda 67.6 mln tonnadan ortiq yetishtirilgan va Xitoy eng ko'p yetishtiruvchi davlat hisoblanadi, O'zbekiston esa 2.2 mln tonna ishlab chiqarib 15-o'rinni egalladi [2]. Shuningdek, pomidor birinchi CRISPR/Cas9 orqali genomi tahrirlangan ikki urug'palli o'simlik hamdir [3]. Pomidor o'simligi yilning istalgan vaqtida issiqxonada oson yetishtirish, hosil olish muddati nisbatan kamligi va ko'plab urug'lar hosil qilishi bilan bir qancha biologik jarayonlarni jumladan: transkriptoma, metabolomika va proteomika sohasida model o'simlik sifatida ham keng ishlatiladi [4,5,6]. Pomidor mevasi inson immunitet sistemasini kuchaytirishda ayniqsa, qonni aylanishini yaxshilashda, ko'rish qobiliyatini kuchaytishda muhim ahamiyatga ega va u tabiiy antiseptik hamdir. Pomidor, shuningdek, ovqat hazm qilish o'rganlari kasalliklarida, hujayra bo'linishini boshqarishda va qonda qand miqdorini meyorlashtirishda muhim ahamiyatga ega [7,8].

Hozirda o'simliklarga gen transformatsiyasining *Agrobakteriya*, mikrozarra bombardment, mikroinyeksiya va elektroporatsiya xillaridan foydalaniladi. Bu usullar orasida *Agrobakteriya* orqali gen transformatsiyasi qulayli, kam mablag' talab qilganligi va tabiiy jarayoniga asoslangani uchun keng qo'llanilmoqda [9]. *Agrobacterium tumefaciens* orqali transformatsiya qilinganda kiritilgan genetik konstruktsiya 1 yoki 2 nusxada o'simlik genomiga kiradi bu esa o'simlik genomidagi boshqa qismlarni faoliyatini o'zgartirmaydi [10].

O'simlikning ozuqa muhitidagi moddalar ayniqsa rivojlanishni boshqaruvchi fitogarmonlar miqdori muhim ahamiyatga ega. Zeatin ushbu garmonlar qatoriga kirib, pomidor transformatsiyasida asosiy rivojlanishni boshqaruvchi garmondur. Kokultivatsiya va novda hosil qiluvchi ozuqalarda turli miqdorlarda ishlatiladi [11-13]. Ba'zi tajribalarda ushbu garmonsiz ham transgen o'simlik olishgan, lekin

transgen o'simlik foizi nisbatan kam bo'lgan [14]. Ushbu tadqiqotda Agrobakteriya orqali gen transformatsiyasida ishlatishi mumkin bo'lgan ozuqalar, ularning tarkibi va tayyorlash ketma-ketligi ko'rsatilgan.

2. Materiallar.

1. Cherry pomidor o'simlik urug'lari.
2. *Agrobacterium tumefaciens* ning LB4404 shtami.
3. Maqsadga muvofiq vektor konstruksiya. Bizning tajribada CRISPR/Cas9 vektor konstruksiya.

2.1. *Agrobacterium tumefaciens* o'stirish uchun foydalaniladigan ozuqalar.

1. YEP suyuq ozuqasi: 10 gr yeast ekstrakti, 10 gr pepton, 5 gr NaCl va vektorga mos antibiotik.
2. YEP qattiq ozuqasi: 15 gr agar, 15 gr pepton (soya), 5 gr NaCl va 10 gr yeast ekstrakti.

2.2. Urug' o'stirish va transformatsiya uchun ozuqalar.

1. Urug' o'stirish ozuqasi (MSO) 1 Litr uchun: 3 gr Murashige and Skoog (MS) tuzi, 2 ml tiamin xlorid (1mg/ml), 100 mg myoinositol, 10 gr saxaroza, 1ml nikotin kislota eritmasi(0.5mg/ml), pH=5.8, 3 gr gelzan.

2.3. Transformatsiya ozuqasi (1 Litr uchun):

1. **Suyuq** (MSO) 1 Litr uchun: 4.3 gr MS tuzi, 0.4ml **tiamin** xlorid (1mg/ml), 20 gr saxaroza, pH=5.8.
2. **Qattiq:** 4.3 gr MS tuzi 100 mg myoinositol 1 ml nitch vitaminlari 20 gr saxaroza pH=6, 3 gr gelzan, trans-zeatin (1mg/ml).

2.4. O'simlik regeneratsiyasi va ildizlatuvchi ozuqalar:

1. Birlamchi novda shakllantiruvchi ozuqa: 4.3 gr MS tuzi 100 mg myoinositol 1 ml nitch vitaminlari 20 gr saxaroza pH=6 8 gr agar, 3 gr gelzan, 2ml trans-zeatin (1mg/ml), 4 ml timetin(100mg/ml) va vektorga mos antibiotik (Hygromycin).

2. Ikkilamchi novda shakllantiruvchi ozuqa: 4.3 gr MS tuzi 100 mg myoinositol 1 ml nitch vitaminlari 20 gr saxaroza pH=6 8 gr agar, 3 gr gelzan, 1 ml trans-zeatin (1mg/ml), 4 ml timetin(100mg/ml) va vektorga mos antibiotik (Hygromycin).

3. Ildiz shakllantiruvchi ozuqa: 4.3 gr MS tuzi 100 mg myoinositol 1 ml nitch vitaminlari 30 gr saxaroza pH=6 8 gr agar, 3 gr gelzan, 4 ml timetin(100mg/ml) va vektorga mos antibiotik (Hygromycin).

Yuqoridagi barcha reagenlar miqdori 1 litr ozuqa uchun keltirilgan va barchasi avtoklav qilinadi. Antibiotiklar va fitogarmonlar ozuqa avtoklav qilingandan so'ng harorat 50-55 C bo'lgandan so'ng steril laminar ichida qo'shiladi. Qattiq ozuqalar steril petri idishlarga quyiladi.

3. Metodlar.

3.1. O'simlik namunalarini transformatsiyaga tayyorlash.

1. Tanlangan nav urug'lar avval 10 minut gipoxloridda, keyin yana 10 minut 96% etil spirtida yaxshilab sterillandi, so'ngra distirlangan suvda 3 marta 5 minutdan yuvilib agar ozuqa muhiiga ekildi.
2. 7-9 kundan so'ng o'simliklarning koteledonlaridan foydalanildi. Haqiqiy barglar shakllanmagan bo'lishiga e'tibor berish kerak.

3.2. Agrobakteriyani transformatsiyaga tayyorlash.

Tajribada Agrobakteriyaning LB4404 shtamidan foydalanildi.

1. Tarkibida maqsadli vektor konstruksiya tutgan Agrobakteriyani transformatsiya qilish kunida 2 kun oldin qattiq YEP ozuqasida o'stirildi. Transformatsiya kunidan 1 kun oldin qattiq ozuqadan tarkibida selektiv antibiotik bo'lgan suyuq YEP ozuqasida ko'chirildi. Bakteriyaning OD ko'rsatkichi transformatsiyada 0.6 ga teng bo'lishi taminlandi.

2. So'ngra suyuq YEP ozuqada o'sgan bakteriya kulturasini sentrifugada cho'ktirilib, transformatsiya uchun tayyorlangan suyuq transformatsiya ozuqasida suyultiriladi.

3.3. Transformatsiya jarayoni.

1. Pomidor kotoledonlari steril skalpel yordamida 1-1.5 sm kattalik kesib olindi. Har bir bargning uchi va novda tomoni kesib tashlandi va tarkibida konstruksiya tutgan suyuq (MSO) ozuqasida 5-8 minut vaqti- vaqti bilan chayqatilib ushlab turildi.
2. Kotoledonlari steril filtr qog'ozda ortiqcha suyuqlik shimib olinguncha saqlanadi, so'ngra Qattiq transformatsiya ozuqasiga bargning yuqori qismi pastga qaratilgan holda ko'chirildi. Parafilm landi.
3. Qorong'uda 20 C da 2 kun saqlandi.
4. Kotoledonlar birlamchi novda shakllantiruvchi ozuqaga bargning yuqori qismi yuqoriga qaratilgan holda ko'chiriladi. Ozuqa parafilm qilinib 24 C harorat va 16 fotoperiod sharoitida 2 hafta saqlandi.
5. Yangi tayyorangan ikkilamchi novda shakllantiruvchi ozuqaga kotoledonlar bargning yuqori qismi yuqoriga qaratilgan holda ko'chiriladi va 24 C harorat va 16 fotoperiod sharoitida dastlabki novdalar shakllanib 1.5-3 sm o'sguncha saqlanadi. Har 2 haftada ushbu ozuqa yangisiga almashtirib borildi.
6. 4-6 hafta ichida dastlabki novdalar ko'rinishga boshlaydi. Ushu novdalar 1.5-2 sm ga yetganda novdalar kesib olinadi va ildiz hozil qiluvchi ozuqaga bo'lgan yirik petri idishlarga yoki bankalarga ko'chirib o'tkaziladi. Ildizlar 5-10 kun ichida ko'rinishga boshlaydi.

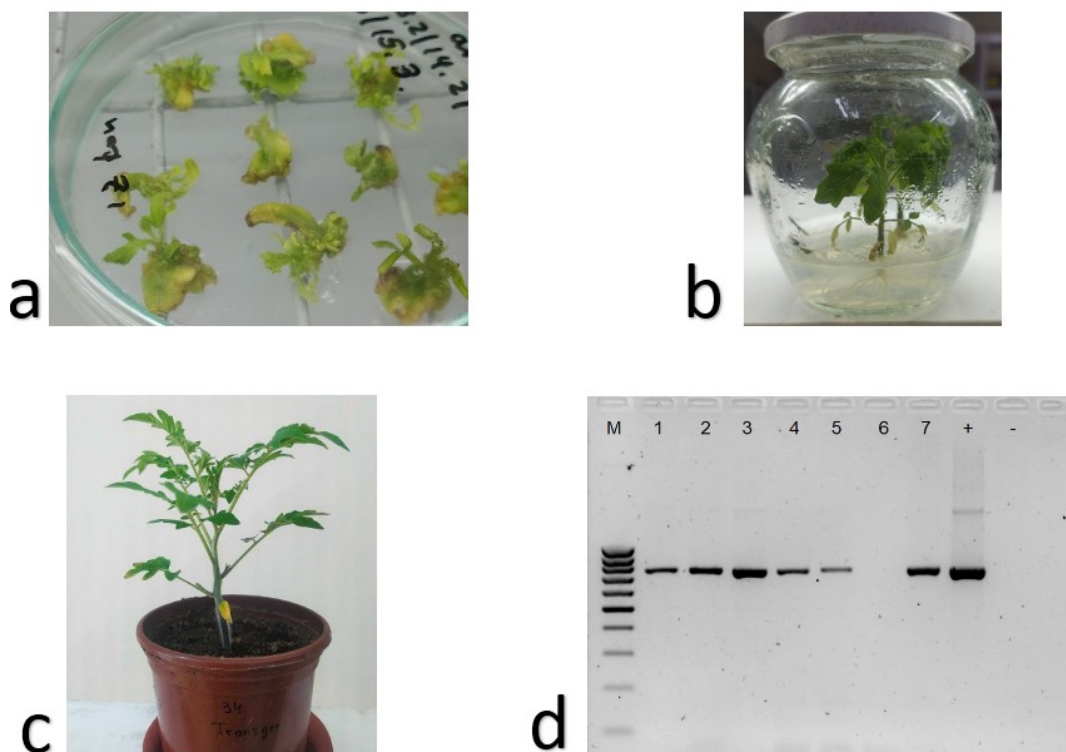
4. Tuproqqa moslashtirish.

1. Ildizlovchi ozuqada o'sgan novdalar banka yuqorisiga yetganda taxminan 7-10 sm yetganda steril tuproqqa ko'chirib o'tkaziladi va tupak usti shaffof plastik yoki shisha idish bilan yopiladi. Dastlab 3-7 kun klima kamerada harorat 24 C da saqlanib tuproqqa moslashtirib boriladi. Tuproqqa moslashtirishda asta-sekin shaffof yuqori qismi 1-kunda 3-4 marta 10-20 minutga ochib quyilib tashqi muhitga moslashtirib borildi.

5. Natijalar va tahlillar.

Transfomatsiya foizi 7-12% kuzatildi. Fitigarmonlar va antibiotiklarni yangi tayyorlangan eritmalaridan foydalanish Agrobakteriyani o'sib ketishidan saqlanishi aniqlandi.

T0 Transgen o'simliklar molekular metodlar yordamida PZR va Senger sequenlash yordamida vektor konstruksiya tutgani tekshirildi. Transgen stabiligi T1 va T2 avlodlarda tekshirib aniqlandi.



1-rasm. Transformatsiya ketma-ketligi. **a** somatik embriogenezda kotoledonlarda yosh nihollar chiqishi. **b** yosh nihollarni ildiz hosil qiluvchi ozuqada o'sishi. **c** nihollarni tuproqdagi o'sishi. **d** nihollarni transgen ekanligini PZR orqali tekshirish: **1-7** o'simlik namulari, **+** plasmida, **-** manfiy kontrol.

6. Xulosalar.

Pomidor o'simligi transformatiyaga samaradorligiga foydalanilayotgan ozuqa moddalar sifati va konsentratsiyasi ta'siri katta. Fitogarmonlar va antibiotiklar ozuqaga harorat 50-55C da qo'shilsa ularningyuqori faolligi saqlanib

qolinishi kuzatildi. Selektiv antibiotikning miqdori aniqlab olish juda muhim. Bu miqdor kanamitsin uchun 200mg/L, gigramitsin uchun 25mg/L aniqlandi.

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Jones JBJ (1998) Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
2. Adem AKSOY, Haluk Çağlar KAYMA. Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development Vol. 24, Issue 3, 2024 PRINT ISSN 2284-7995, E-ISSN 2285-3952.
3. Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van Eck J (2014) Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-Associated9 system. *Plant Physiol* 166:1292–1297.
4. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., Kononowicz A.K. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 2015;120(3):881–902.
5. Gerszberg A., Hnatuszko-Konka K., Kowalczyk T., Kononowicz A.K. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 2015;120(3):881–902.
6. Chaudhary J., Alisha A., Bhatt V., Chandanshive S., Kumar N., Mir Z., Kumar A., Yadav S.K., Shivaraj S.M., Sonah H., Deshmukh R. Mutation breeding in tomato: advances, applicability and challenges. *Plants.* 2019; 8:128. doi: 10.3390/plants8050128.
7. Palozza P., Catalano A., Simone R.E., Mele M.C., Cittadini A. Effect of Lycopene and tomato products on cholesterol metabolism. *Ann. Nutri. Metabol.* 2012; 6:126–134. doi: 10.1159/000342077.
8. Tierney A.C., Rumble C.E., Billings L.M., George E.S. Effect of dietary and supplemental Lycopene on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Adv. Nutri.* 2020;11(6):1453–1488. doi: 10.1093/advances/nmaa069.

9. Otoni W C, Picoli E A, Costa M G, Nogueira F T and Zerbini F M 2003 Transgenic tomato; in Plant genetic engineering – a multivolume series: 1 vol. 5 (eds) R P Singh and P K Jaiwal (Houston: Sci-Tech. Pub. Co) pp 41–131.
10. Kohli A, Leech M, Vain P, Laurie DA, Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7203–7208.
11. Van Eck, J., Keen, P., Tjahjadi, M. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Tomato. In: Kumar, S., Barone, P., Smith, M. (eds) *Transgenic Plants. Methods in Molecular Biology*, vol 1864. Humana Press, New York, NY.
12. Eck, J.V., Kirk, D.D., Walmsley, A.M. (2006). Tomato (*Lycopersicon esculentum*). In: Wang, K. (eds) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 343. Humana Press.
13. Sandhya D, Jogam P, Venkatapuram AK, Savitikadi P, Peddaboina V, Allini VR, Abbagani S. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudi J Biol Sci.* 2022 Jun;29(6):103292. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103292. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35540178; PMCID: PMC9079358.
14. Jawad, et al. *Agrobacterium*-Mediated Transformation Improvement in Tomato. *J Biol Today's World*, 2021, 10(5), 001-004.