CHELIDONIUM MAJUS L. ILDIZIDAN AJRATILGAN *PLECTOSPHAERELLA CUCUMERINA* FK14 ENDOFIT ZAMBURUG‘INING MOLEKULYAR IDENTIFIKATSIYASI VA IKKILAMCHI METABOLITLARI

Sarvinoz Salimova[1], Saodat Nasmetova[2]
O’zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti,
O’zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya instituti, biologiya fanlari doktori
https://doi.org/10.5281/zenodo.17185278

Annotatsiya. *Ushbu tadqiqotda* ***Chelidonium majus*** *ildizlaridan ajratilgan va alkaloidlar produsenti bo‘lgan eng faol endofit zamburug‘ FK14* ***ITS1–ITS2 mintaqalarining sekvenslash molekulyar-genetik usuli*** *yordamida aniqlangan.* ***BLAST tahlili natijalari*** *FK14 izolati* ***Plectosphaerella cucumerina*** *turiga mansubligini (FK14 shtammi, gen kirish raqami PQ669676) tasdiqladi. Bundan tashqari, mazkur endofitning ikkilamchi metabolitlarni umumiy miqdori ham aniqlandi.*

Kalit so’zlar: *Chelidonium majus, endofit zamburug‘, Plectosphaerella cucumerina, ITS identifikatsiya, fenol, flavonoid, alkaloid.*

Abstract. *I In this study, the most active endophytic fungus, FK14, an alkaloid producer isolated from Chelidonium majus roots, was found utilising the molecular-genetic method of sequencing the ITS1-ITS2 regions. BLAST analysis verified that the FK14 isolate is from the Plectosphaerella cucumerina species (strain FK14, gene accession number PQ669676). In addition, the total amount of secondary metabolites produced by this endophyte was quantified.*

Keywords. *Chelidonium majus, endophytic fungus, Plectosphaerella cucumerina, ITS identification, phenol, flavonoid, alkaloid.*

Аннотация. *В данном исследовании идентифицирован наиболее активный эндофитный гриб FK14 - продуцент алкалоидов, выделенный из корней Chelidonium majus, с помощью молекулярно-генетического метода секвенирования ITS1–ITS2 регионов. Результаты BLAST-анализа подтвердили, что изолят FK14 относится к виду* Plectosphaerella cucumerina *(штамм FK14, доступ к гену PQ669676). Кроме того, было количественно определено общее содержание вторичных метаболитов, продуцируемых данным эндофитом.*

Ключевые слова. *Chelidonium majus, эндофитный гриб, Plectosphaerella cucumerina, ITS-идентификация, фенолы, флавоноиды, алкалоиды.*

Kirish.

Chelidonium majus L. Papaveraceae oilasiga mansub bo‘lib, qadimdan xalq tabobatida yo‘tal, astma, spazm va og‘riqlarni davolashda qo‘llanib kelinadi. Zamonaviy tadqiqotlar ushbu o‘simlik tarkibida biologik faol birikmalar — alkaloidlar, flavonoidlar va fenol birikmalari mavjudligini tasdiqlaydi. Ular antimikrob, yallig‘lanishga qarshi, virusga qarshi va o‘smaga qarshi faollikka ega. Asosiy farmakologik faol komponentlar izoxinolin alkaloidlari (jumladan benzofenatridinlar, protoberberinlar, aporfinlar va boshqalar) bo‘lib, keng biologik faollik spektrini namoyon etadi [1,2].

Dori o‘simliklari to‘qimalarida yashovchi endofit mikroorganizmlar mezbon o‘simlik birikmalariga o‘xshash metabolitlarni sintez qilish qobiliyatiga ega. Endofitlarning mezbon o‘simlik kabi o'xshash yoki bir xil muhim ikkilamchi metabolitlarni biosintez qilish qobiliyati noyob va yo'qolib borayotgan dorivor o'simliklardan foydalanishni kamaytirishda muhim rol o‘ynaydi [3].

Avvalgi tadqiqotlarda aniqlanishicha, *Chelidonium majus* endofit zamburug‘lari ham alkaloidlar va flavonoidlarni ishlab chiqaradi, bu esa ularni chuqur o‘rganishga qiziqish uyg‘otadi. Biroq zamburug‘larning morfologik identifikatsiyasi ko‘pincha yetarli bo‘lmaydi, ayniqsa yaqin qarindosh turlar mavjud bo‘lganda.

Shu munosabat bilan, tadqiqotning maqsadi *Chelidonium majus* L. ildizlaridan ajratib olingan FK14 endofit zamburug‘ini molekulyar identifikatsiya qilish, shuningdek, asosiy ikkilamchi metabolitlar (fenollar, flavonoidlar va alkaloidlar) miqdorini aniqlashdir. Bu esa farmakologik jihatdan qimmatli birikmalarning istiqbolli manbai sifatida baholanadi.

Material va metodlar.

Ajratib olingan endofit zamburug‘ namunasining PZR amplifikatsiyasini amalga oshirishda internal transcribed spacer (ITS) genining universal oligonukleotid praymerlardan foydalanildi: ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), va ITS2 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Zamburug‘ ITS qismining PZR-amplifikatsiyasi GenPak® PCR MasterMix kitida amalga oshirildi. Bunda, reaktsiya umumiy 20 mkl miqdorida tayyorlanib, 10 mkl Dilution, 8,2 mkl ikki marta distillangan suv, 0,4 mkldan (ITS1va ITS2) praymer va 1 mkl DNK namunalaridan tarkib topdi. PZR amplifikatsiya optimizatsiyasi boshlang‘ich denaturatsiya 94°C da 3 daqiqa, denaturatsiya 94°C da 40 sekund, odjig (primer annealing) 55°C da 40 sekund, elongatsiya 70 °C da 90 sekund, yakuniy elongatsiya 70 °C da 7 daqiqa davomida takroriy 35 siklda olib borildi. Amplikonlar etidium bromid bilan bo'yalgan 2 % li agarozali gelda elektroforez yordamida deteksiya qilindi [4].

Zamburug‘ning etanol ekstraktidagi mavjud bo‘lgan umumiy fenollar va umumiy flavonoidlar miqdorini aniqlash Folin-Ciocalteu (FC) usuli asosida, biroz o‘zgartirishlar bilan amalga oshirildi [5]. Umumiy alkaloid miqdorini aniqlash uchun Harborne metodidan foydalanildi [6].

Natijalar va ularning muhokamasi.

Bugungi kunda zamonaviy texnologiyalarning rivojlanishi, molekulyar biologiya sohasida erishilgan yutuqlar, sekvenirlash usulining yuqori aniqlik imkoniyatlari sababli, fanda turlarni, xususan, mikroorganizmlarni identifikatsiya qilishda molekulyar-genetik usullaridan foydalanish tobora ommalashib bormoqda. Shu sababli, tadqiqotda eng faol endofit zamburug‘ FK14 turini aniqlashda zamonaviy identifikatsiya usullaridan bo'lgan (The Internal Transcribed Spacer (ITS) regionini sekvenirlash usulidan foydalanildi. Bunda eukariotlar ribosomalari kichik (18S) va katta (28S) subbirliklar ribosomal RNKlari sinteziga javob beruvchi genlari o‘rtasida joylashgan ITS regionlarini tashkil qilgan nukleotidlar ketma ketligini sekvenirlandi. Bu region o'zgarmas bo‘lib, zamburug‘lar identifikatsiyasida katta ahamiyatga ega. Plectosphaerella avlodiga mansub endofit zamburug‘ining rDNK genining ITS1 va ITS2 uchastkasidagi nukleotidlar ketma-ketligidan foydalangan holda molekulyar genetik usulda identifikatsiya qilindi. Uning sekvenslangan ITS 1, qisman sekvensi 5.8S rRNK geni va ITS 2, to‘liq sekvensi quyidagi ketma-ketlikdan iborat:

ATGTAGTCGAGTCTACACTCTCTACCCTTTGTGACTATTATACCTGTTGCTTCG
GCGGCGCCCGCGAGGGTGCCCGCCGGTCTCATCAGAATCTCTGTTTTCGAACCCGAC
GATACTTCTGAGTGTTCTTAGCGAACTGTCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGC

TCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTATCCTGGGAGGCAT
GCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCCGTGGCCCGGCGTTGGGGATCTG
CCACGGCAGGCCCCTAAAACCAGTGGCGGACCCGAAGGCCCTCTCCTTTGCGCAGT
AGCATCAGCCTCGCATTGGGATCCCTCGGCGTCCTGCCTCTAAACCCCCCACAAGTC
CGCTCCGGCGGCACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAT

Olingan ma’lumotlar NCBI xalqaro ma’lumotlar bazasida BLAST dasturida tahlil qilinib, unga ko‘ra: FK14 izolyati Plectosphaerella cucumerina ga 99 % o'xshash ekanligi aniqlandi.

Plectosphaerella cucumerina strain FK14 (PQ669676) shtammining ITS qismining PZR natijasi 600 bp ga yaqin bo’lib, NCBI BLAST bazasidagi ma’lumotlar bilan taqqoslaganimizda mazkur shtamm Plectosphaerella cucumerina ning 30 ga yaqin turlari bilan 100 % o’xshash ekanligini ko’rsatdi. Filogenetik daraxtni tuzishda P.melonis, P.sinensis, P.oligotrophica va P.plurivora turlari bilan bir guruhda analiz qilib chiqildi. Mazkur shtammning (PQ669676) ITS qismi va morfologik identifikatsiyasi bo’yicha Plectosphaerella cucumerina strain FK14 (PQ669676) shtammi deb nomlandi.

Chelidonium majus o‘simligining ildiz qismidan ajratib olingan endofit zamburug‘larida umumiy fenol, flavonoid va alkaloidlarning umumiy miqdori o‘rganilganda, **Plectosphaerella sp. FK14** shtammida fenollar miqdori **40,64±0,13 mkg/mg**, flavonoidlar **170,72±1,40 mkg/mg** alkaloidlar 9,6±0,05% ni tashkil etgani aniqlandi. (1-jadval). **Jakovljevic** va hammualliflarining tadqiqotlariga ko‘ra, ushbu o‘simlikning metanol ekstraktida fenollar miqdori **60,96 mg GAE/g,** flavonoidlar esa **98,00 RU/g** ni tashkil etgan[5]. Xin-Lan Li va b. ma’lumotlariga ko‘ra, o‘simlikning ildiz qismida alkaloidlarning umumiy miqdori 3-4%ni tashkil etadi [7].

1-jadval

Plectosphaerella cucumerina FK14 endofit zamburug‘ining etanol ekstraktidagi ikkilamchi metabolitlarining umumiy miqdori

Shtamm	Umumiy fenol miqdori (mg GK/ g quruq ekstrakt)	Quercitine bo’yicha flavanoidlarning umumiy miqdori (mg/ g quruq ekstrakt)	Alkaloidlarning umumiy miqdori, (mg/ g quruq ekstrakt)
Plectosphaerella cucumerina FK14	40,64±0,13	170,72±1,40	96,0 ±0,5 mg / g

Xulosa.

O‘tkazilgan tadqiqot natijalariga ko‘ra, *Chelidonium majus* ildiz qismidan ajratilgan FK14 endofit zamburug‘i molekulyar-genetik usullar yordamida aniqlanib, u **Plectosphaerella cucumerina FK14** ekanligi aniqlandi. Fitokimyoviy tahlil natijalarida mazkur shtamm xo’jayin o’simlikka mos ravishda fenol, flavonoid va alkaloidlarni sintez qilishi aniqlandi. Tadqiqot natijalari Chelidonium majus o‘simligidan ajratilgan endofit zamburug‘larning farmakologik faol moddalar manbai sifatida istiqbolga ega ekanligini ko‘rsatadi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Li, X., Sun, Y., Wang, M., Wang, Z., & Kuang, H. (2024b). Alkaloids in Chelidonium majus L: a review of its phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Frontiers in Pharmacology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1440979
2. Liu, C., Yao, F., Lu, X., Zhang, X., Luo, L., Liang, X., & Qi, S. (2022). Isoquinoline Alkaloids as Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors from a Deep-Sea-Derived Fungus Aspergillus puniceus. *Marine Drugs*, *20*(1), 78. https://doi.org/10.3390/md20010078
3. Wu, X., Ibrahim, N., Liang, Y., & Liu, X. (2024). Screening and Genomic Analysis of Alkaloid-Producing Endophytic Fungus Fusarium solani Strain MC503 from Macleaya cordata. *Microorganisms*, *12*(6), 1088. https://doi.org/10.3390/microorganisms12061088
4. Martin, K. J., & Rygiewicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, *5*(1). https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28
5. Jakovljevic, Z. D., Stankovic, S. M., & Topuzovic, D. M. (2013, March 15). Seasonal variability of Chelidonium majus L. secondary metabolites content and antioxidant activity. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4804397/
6. Harborne, J.B. Phytochemical Methods; Chapman and Hall, Ltd.: London, UK, 1973; pp. 49–188.
7. Li, X., Sun, Y., Wang, M., Wang, Z., & Kuang, H. (2024). Alkaloids in Chelidonium majus L: a review of its phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Frontiers in Pharmacology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1440979