

**VERNONIA ANTHELMINTICA BARGIDAN AJRATILGAN THERMOTHELOMYCES
THERMOPHILES XJF-9 ENDOFIT ZAMBURUG`INING KUCHLI BIOLOGIK
FAOLLIGI**

**ВЫСОКАЯ БИОАКТИВНОСТЬ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ THERMOTHELOMYCES
THERMOPHILES XJF-9, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИСТА VERNONIA ANTHELMINTICA**

**POTENT BIOACTIVITY OF ENDOPHYTIC FUNGUS THERMOTHELOMYCES
THERMOPHILES XJF-9 ISOLATED FROM VERNONIA ANTHELMINTICA**

Nigora Aktamovna Rustamova, Samarqand davlat universiteti

Biologiya kafedrasi dotsenti, biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori (PhD)

Kahramon Davranovich Davranov, O'zFA, Mikrobiologiya instituti

Enzimologiya kafedrasi, biologiya fanlari doktori

Haji Akber Aisa, Xitoy Fanlar akademiyasi Shinjon fizika va kimyo texnika instituti

Professor (PhD), Qurg'oqchil hududlarda o'simlik resurslari va kimyosi asosiy laboratoriyasi

Abulimiti Yili, Xitoy Fanlar akademiyasi Shinjon fizika va kimyo texnika instituti

Farmakologiya fanlari doktori, Qurg'oqchil hududlarda o'simlik resurslari va kimyosi asosiy laboratoriyasi

DOI: <https://doi.org/10.55475/jcgtm/vol1.iss4.2022.77>

Annotatsiya: Endofitik mikroorganizmlar tomonidan ishlab chiqarilgan ikkilamchi metabolitlar yangi dorilarni kashf qilish uchun biologik faol birikmalarning muhim boy manbaidir. Ushbu tadqiqotda ilk bor Vernonia anthelmintica o'simligining bargidan endofitik zamburug'ning ajratib olinishi, 18S rRNA gen ketma-ketligi usuli bilan identifikatsiya qilinishi hamda endofit zamburug' tomonida ishlab chiqarilgan ikkilamchi metabolitlarning farmakologik faolligiga asoslangan. Thermothelomyces thermophiles XJF-9 zamburug'li shtammi Staphylococcus aureus, Escherichia coli bakteriya va Candida albicans zamburug' patogenlariga qarshi ko'rsatishda istiqbolli natijalarni ko'rsatdi. Bundan tashqari, sitotoksik va diabetga qarshi faollik ham namayon etdi.

Аннотация: Вторичные метаболиты, продуцируемые эндофитными микроорганизмами, являются важным богатым источником биологически активных соединений для создания новых лекарственных средств. Текущие исследования основаны на фармакологической активности эндофитного гриба, выделенного из листьев лекарственного растения Vernonia anthelmintica, идентифицированного с помощью метода последовательностей генов 18S рРНК и впервые оцененного на наличие биоактивных вторичных метаболитов. Штамм грибов Thermothelomyces thermophiles XJF-9 продемонстрировал многообещающие результаты в отношении антимикробной активности против бактерий Staphylococcus aureus, Escherichia coli и патогенов гриба Candida albicans. Кроме того, проявляет цитотоксическую и антидиабетическую активность.

Abstract. Secondary metabolites produced by endophytic microorganisms are an important rich source of biologically active compounds for novel drugs discovery. Current research is based on pharmacological activities of endophytic fungus isolated, identified with 18S rRNA gene sequences method and evaluated for bioactive secondary metabolites from the leaves of medicinal plant Vernonia anthelmintica for first time. Fungal strain Thermothelomyces thermophiles XJF-9 exhibited promising results towards antimicrobial activities against

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* and the yeast *Candida albicans*. Moreover, displayed cytotoxic and anti-diabetic activities.

Kalit soʻzlar: *Thermothelomyces thermophiles*, endofitlar, gen ketma-ketligi, mikroblarga qarshi tahlil, sitotoksik va diabetga qarshi faollik

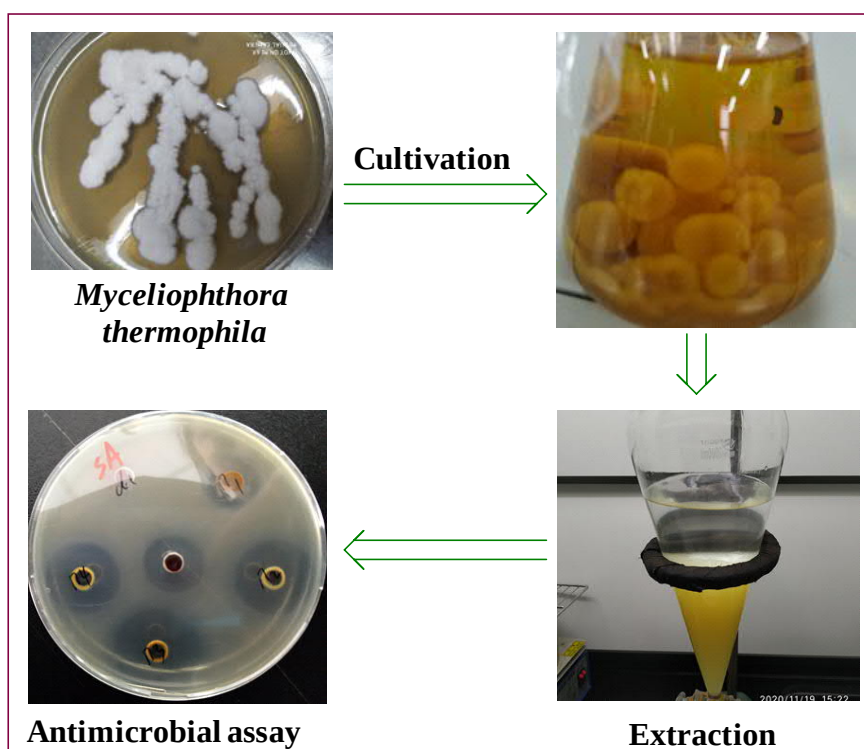
Ключевые слова: *Thermothelomyces thermophiles*, эндофиты, последовательности генов, антимикробный анализ, цитотоксическая и антидиабетическая активность.

Keywords: *Thermothelomyces thermophiles*, endophytes, gene sequences, antimicrobial assay, cytotoxic and anti-diabetic activities

Kirish

Endofitik zamburugʻlar oʻsimlik mikrobiomining muhim va xilma-xil guruhi boʻlib, ular xoʻjayin oʻsimlikning sogʻlom toʻqimalarida koloniya hosil qiladi va hech qanday salbiy alomatlarini keltirib chiqarmaydi [1-3]. Endofitik zamburugʻlar farmakologik faol ikkilamchi metabolitlarning eng koʻzga koʻringan va muhim ishlab chiqaruvchilardan biri boʻlib, hosil boʻlgan biofaol ikkilamchi metabolitlar xoʻjayin oʻsimliklarining fiziologiyasiga, biotik va abiotik stresslarga qarshi himoya va bardoshlilikiga taʼsir qilishi mumkin [4, 5]. Biologik faol tabiiy birikmalar bir qator biologik faollikni namoyish etdi: mikroblarga qarshi [6, 7], antioksidant [8], rak hujayralariga [9, 10] va asetilxolinesteraza (AChE) ingibitor aktivligi [11]. Shunday qilib, endofit zamburugʻlar farmakologiya va qishloq xoʻjaligida qoʻllaniladigan farmakologik faol birikmalarning boy manbai hisoblanadi.

Ushbu tadqiqot endofitlarning biologik faolligini chuqurroq oʻrganishda muhim qadamdir. Dorivor *V. anthelmintica* oʻsimligining bargidan ajratib olingan endofitik zamburugʻi *Th. thermophile* XJF-9 ning umumiy etil asetat ekstrakti inson saraton hujayralarining bir nechta liniyalarida sitotoksiklik faolligini, shuningdek, mikroblarga qarshi va diabetga qarshi faollikni namoyish etdi. Olingan natijalar shuni koʻrsatadiki, biofaol ikkilamchi moddalar farmakologik salohiyatga ega dori nomzodi sifatida koʻrib chiqishni taklif qiladi.



Rasm 1. Ushbu tadqiqotda qo'llaniladigan asosiy yondashuv

Materiallar va usullar

Endofitik zamburug'ning ajratish va aniqlash

O'simlik namunalari Xitoy Xalq Respublikasi, Shinjon viloyatining Xutan tumanidan yig'ildi. Endofit zamburug'larni ajratib olishda Rustamova [12-14]. va boshqalar tomonidan tasvirlangan metoddan foydalanildi. Endofitlarni ajratishda kartoshka dekstroza agar (PDA) ozuqasidan (kartoshka ekstrakti 4g/L, dekstroza 20g/L, agar 15g/L va distillangan suv) foydalanildi va 28C⁰ da bir hafta inkubatsiya qilindi. Zamburug'lar koloniya hosil qilib o'sganidan sung ularning rangi, shakli va hajmiga qarab tozalandi. Toza ajratib olinga shtamm keying tajribalar uchun 4 C⁰ da saqlandi. Endofit zamburug'ning identifikatsiya qilishda Nei [14, 15] va boshqalarning metodlaridan foydalanildi. *Th. thermophile* XJF-9 shtammining 18S rRNK gen ketma-ketligi olindi va NCBI ma'lumotlar bazasi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) bilan solishtirildi.

Endofitik zamburug'ni etishtirish va ekstraksiya qilish

Endofit zamburug'i shtammi *Th. Thermophile* XJF-9 ni kartoshka ekstraktini suyuq fermentative muhitiga (kartoshka ekstrakti 4 g/l, D-glyukoza 20 g/l va 1 l distillangan suv) 28 kun davomida 28 °C da 160 aylanish tezligida inkubatsiya qilindi. Inkubatsiyadan keyin, zamburug'li kultira filtirlab olindi, hujayralardan holi supernatantlar etil asetat bilan ekstraksiya qilinib zamburug' ishlab chiqargan ikkilamchi metabolitlarning umumiy ekstrakti olindi [14, 16].

In-Vitro biologic faollik

Antimikrobiyal tahlil

Th. Thermophile XJF-9 ning umumiy ekstrakti antimikrob faolligini aniqlashda Rustamova va boshqalar tomonidan tasvirlangan metoddan foydalanildi [9, 16, 17]. Antimikrob faolligini tekshirishda uchta odam patogen mikroblari *S. aureus* (ATCC6538), *E. coli* (ATCC11229) va zamburug' *C. albicans* (ATCC10231) dan foydalanildi.

Sitotoksik faollik (MTT tahlili)

Endofitik zamburug' *Th. Thermophile* XJF-9 tomonidan ishlab chiqarilgan ikkilamchi metabolitlar rak kasalligiga nisbatan faolligi tekshirishda MTT tahlilidan foydalanildi [18-21]. Bunda MDA-MB-231 (ko'krak bezi saratoni), Hela (bachadon bo'yni saratoni) va HT-29 (yo'g'on ichak saratoni) kabi odam saraton hujayralari ishlatildi.

$$IR = \frac{(C - S)}{(C - B)} \times 100$$

Bu erda C - nazorat guruhining OD, S - tajriba guruhining OD, B - blankning OD.

Anti-diabet faolligi (PTP-1B inhibitor tahlili)

Endofitik zamburug' *Th. Thermophile* XJF-9 ning hujayrasiz supernatantining diabetga qarshi faolligi va tirozin fosfataza 1B (PTP1B) oqsiliga qarshi ekstrakti nashr etilgan tahlilga muvofiq baholandi [8]. Inhibirlash darajasi (IR) quyidagi tenglama yordamida hisoblab chiqilgan:

$$IR(\%) = \frac{P_C - P_S}{P_C} \times 100$$

bu yerda *PC* - nazorat elementining absorbsiyasi va *PS* - namunaning absorbsiyasi [18].

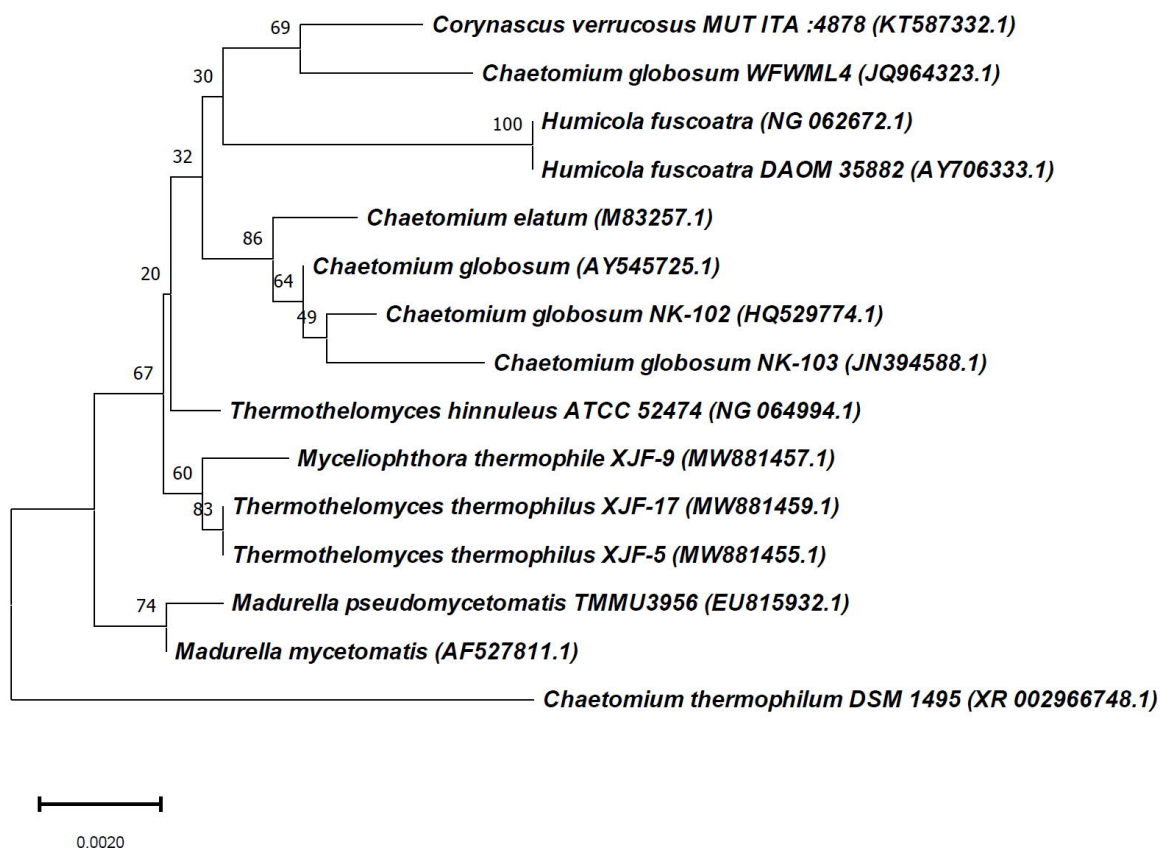
Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) tahlillari

Zamburug'ning ikki gram quruq umumiy ekstrakti metanolga eritilib HPLC SHIMADZU (XSELECT CSHTM Prep C18, 5 μm) da analiz qilindi. Erituvchi sifatida asetonitril (MeCN) va suv ishlatildi (10-100v/90-0).

Natijalar va muhokama

Endofit zamburug`ning ajratish va identifikatsiya qilish

Dorivor o`simlik *V. anthelmintica* ning bargidan umumiy 10 ta zamburug` shtammi ajratib olindi. Shulardan *Th. thermophile* XJF-9 ning ikkilamchi metabolitlarining biologik faolligini o`rganish uchun tanlab olindi. Chunki *The. Thermophile* XJF-9 ning etil acetate ekstarkti tastlabki tekshiruvlarda antimikrob faollikni namayon qildi. Zamburug` shtammi *The. thermophile* XJF-9 18S rRNA gen sekvens yordamida identifikatsiya qilindi va GenBank ga qo'shilish raqami (MW881457) orqali deposed qilindi. Ajratib olingan shatmm NCBI GenBank bazasidagi yaqin turlariga 99.55% o`xshashligi aniqlandi (Rasm 2)



Rasm 2 *V. anthelmintica* dan ajratib olingan endofitik zamburug` *Th. thermophile* XJF-9 18S rRNA gen ketma-ketligiga asoslangan filogenetik daraxt. NeighborJoining usuli yordamida tahlil qilingan

```
CATGTCTAGTATAAGCAATTATACAGCGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTA
TACATGGATAACCGTGGAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAGGGATGTAATTTATTAGATTAA
AAACCAATGCCCTTCGGGGCTCTCTGGTGATTCAATAAATCTCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCAT
TCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGACGGCTGGGTCTTGGCCAGCCGTGGTGACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCT
CGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCAATCCCGA
CACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCC
CTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCGGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTT
GTTGAGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTAGCCGGCCGGTCCGCTCACCAGCGTGCAGTGGCTCGGCTGG
GCCTTTCTTCTGGAGAACCGCTGCCCTTCACTGGGTGT
```

Rasm 3 *V. anthelmintica* barglaridan ajratilgan endofir zamburug` *Th. thermophile* XJF-9 ning 18S gen ketma-ketligi.

Endofit zamburug`ning xom ekstraktining mikroblarga qarshi faolligi

Ushbu tadqiqotda *Th. thermophile* XJF-9 endofitik zamburug`ning umumiy ekstraktining mikroblarga qarshi sinergetik ta'sirini o`ragnishga e'tibor qaratilgan. Etil asetatli umumiy ekstraktning mikroblarga qarshi faolligini tekshirishda uchta odam patogen mikroblardan foydalanildi: Gram-musbat *S. aureus*, Gram-manfiy *E. coli* va zamburug` *C. albicans*. *Th. thermophile* XJF-9 ning ekstrakti *S. aureus* va *E. coli* ga qarshi kuchli antibakterial ta'sir ko'rsatdi, 18 va 21 mm ingibirlanish zonalarini hosil qildi (1-jadval).

Biz bu ishimizda ilk bor *V. anthelminticaning* havo qismining endofitik zamburug`laridan olingan ekstraktlarni mikroblarga nisbatan faoligi o`rganildi. Ushbu yangi yondashuv kelajakda endofitik bakteriyalardan mikroblarga qarshi preparatlar ishlab chiqarish uchun asos bo'ladi.

Table 1. *Th. thermophile* XJF-9 ning antimikrob faolligi ingibirlash zonasini diametri (mm) baholandi

Sample	Namuna konsentratsi yasi	Namuna miqdori (μL)	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Ampitsillin	10 mg/ μL	5		20	
Ampitsillin	1 mg/ μL	5			27
Amfoterisin B	5 mg/ μL	20	17		
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	50 mg/ μL	20	15	21	18

Sitotoksik faollik

Th. thermophile XJF-9 ning umumiy etil asetat ekstraktining sitotoksik faolligi MDA-MB-231 (ko'krak bezi saratoni), Hela (bachadon bo'yni saratoni) va HT-29 (yo'g'on ichak saratoni) odam saraton hujayralariga tekshirildi. Endofitik zamburug`ning sinergetik ta'siri ko'p maqsadli bo`lib barcha turdagi rak hujayralarni ingibirladi. Ayniqsa

HT-29 va Hela rak hujayralarni kuchli ingibirladi, IC₅₀ qiymatlari mos ravishfa quyidagicha bo`ldi; 9.89 μg/mL ± 0.35 va 7.85 μg/mL ± 0.15 (Jadval 2). MDA-MB-231 rak hujayrasida sinovdan o'tkazilganda, qoniqli potentsial IC₅₀ qiymatlari 13,99 mkg/ml ± 0,69 bo'ldi. Ijibiy nazorat uchun doksorubitsin (DOX) ishlatiladi.

Jadval 2. Endofit zamburug`ning etil asetatli ekstraktining odam saraton hujayralari HT-29, MCF7 va Helaga sitotoksik faolligi

Namuna	Hujayralar IC ₅₀ (μg/mL)		
	HT-29	MDA-MB-231	HT-29
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	7.85 μg/mL ± 0.15	13.99 μg/mL ± 0.69	9.89 μg/mL ± 0.35
DOX	0.72 μg/mL ± 0.05	0.16 μg/mL ± 0.004	0.12 μg/mL ± 0.007

Antidiabetik faollik (PTP-1B ingibir tahlili)

PTP-1B ingibitori insulin signalizatsiyasini salbiy tartibga solishda juda muhim rol o'ynaydi. Zamburug`li endofitning umumiy etil asetat ekstrakti PTP-1B fermentiga qarshi *in vitro* inhibitor faolligi uchun o'lchandi. Bizning hisobotimizda endofitik zamburug` *Th. thermophile*

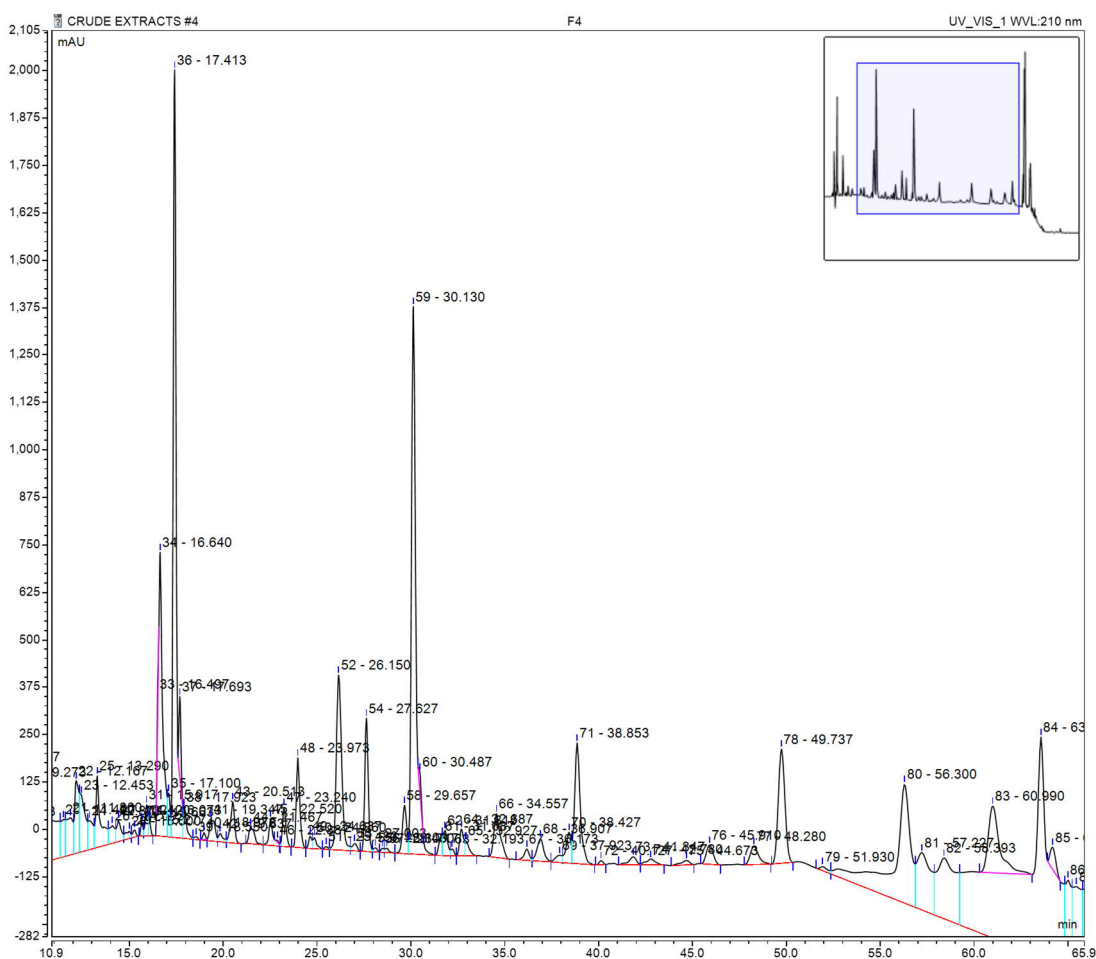
XJF-9 ning umumiy etil asetat ekstraktining antidiabetik faolligini tekshirdi. *Th. thermophile* XJF-9 ning xom ekstrakti IC_{50} qiymati $6,12 \pm 0,45$ $\mu\text{g/ml}$ bo'lgan PTP-1B ni sezilarli darajada inhibirladi.

Table 3. Dorivor o'simlik *V. anthelmintica* ajratilgan endofitik zamburug'ning xom ekstraktining PTP1B fermentini ingibirlash

Namuna	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	6.12 ± 0.45
PTP1B ingibitor	1.76 ± 0.60

Th. thermophile XJF-9 zamburug'ining xom ekstraktining HPLC tahlili

Th. thermophile XJB-9 zamburug'I tomonidan ishlab chiqariladigan biofaol tabiiy birikmalarni HPLC da analiz qilindi. Natijalar shuni ko'rsatdiki umumiy ekstraktida fenolik, pirrol birikmalari, alkaloidlar va lakton hosilasi asosiy tarkibiy qismni tashkil etdi.



Rasm 4 *Th. thermophile* XJF-9 zamburug' tomonidan ishlab chiqarilgan ikkilamchi metabolitlarning HPLC tahlili

Xulosa

Endofitik zamburug' *V. anthelmintica* o'simligining barglaridan ajratib olindi. Ajratib olingan shtamm 99.55% *Th. thermophile* ga o'xshash. *Th. Thermophile* XJF-9 ning etil asetatli

ekstrakti bir qator; sititoksik, mikroblarga qarshi va antidiabetik biologik faolligi tekshirildi. Zamburug`ning umumiy ekstrakti odam bakterial patogenlari *S. aureus* va *E. coli* ga qarshi kuchli antibakterial ta'sir ko'rsatdi, mos ravishda 18 va 21 mm inhibirlash zonasini hosil qildi. Bundan tashqari, HT-29 va Hela rak hujayralariga IC₅₀ qiymati 9,89 mkg/ml $\pm$ 0,35 va 7,85 mkg/ml $\pm$ 0,15 kuchli sitotoksik faollikni namayon qildi.

Введение

Эндофитные грибы представляют собой чрезвычайно разнообразную группу микробиома растений, которые колонизируют здоровые растительные ткани своих растений-хозяев и не вызывают каких-либо негативных симптомов [1-3]. Эндофитные грибы являются одними из наиболее известных и важных производителей фармакологически активных вторичных метаболитов, которые могут влиять на физиологию растения-хозяина, его защиту и устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам [4, 5]. Биоактивные природные соединения проявляют несколько биологических активностей, таких как антимикробная [6, 7], антиоксидантная [8], цитотоксичность [9, 10] и ингибирующая активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [11], таким образом, они являются богатым источником фармакологически активных соединений, которые используются в фармакологии. и сельское хозяйство.

Это исследование является важным шагом в более глубоком изучении биологической активности эндофитов. Общий этилацетатный экстракт эндофитных грибов проявляет цитотоксическую активность в отношении нескольких линий раковых клеток человека, а также антимикробную и антидиабетическую активность. Результаты показывают, что предположительно его рассмотрение в качестве кандидата в лекарственные средства с терапевтическим потенциалом.

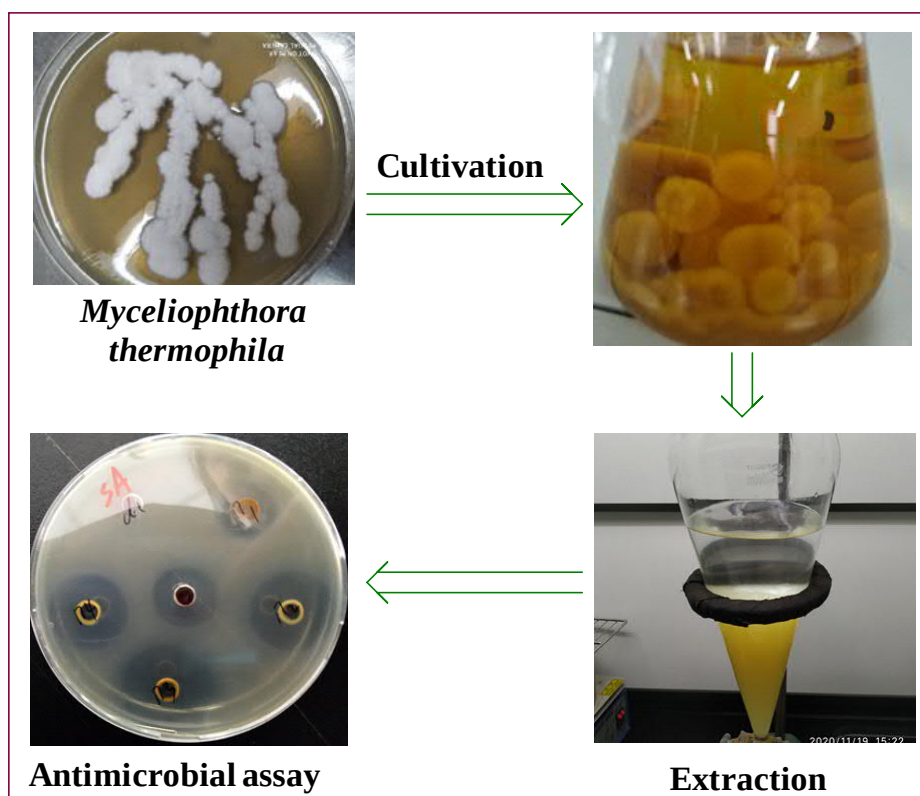


Рисунок 1. Основной подход, использованный в настоящем исследовании.

Материал и методы

Выделение и идентификация эндофитного гриба

Образцы растений были собраны на сухих почвенных участках района Хутань провинции Синьцзян Китайской Народной Республики. Эндофитный штамм выделяли известным методом, описанным Рустамовой и соавторами [12-14] относительно выделения и очистки эндофитного грибка с использованием среды с картофельно-декстрозным агаром (PDA) (картофельный экстракт 4 г/л, декстроза 20 г/л, агар 15 г/л и дистиллированная вода) и инокуляции при 28°C в течение недели. После роста колонии грибов их отделяли по цвету, форме и размеру и очищали. Чистую культуру гриба хранили при 4 °C для дальнейшего использования. Идентификацию эндофитного гриба проводили по методу Nei и соавт. [14, 15]. Полученную последовательность гена 18S рРНК штамма *Th. thermophile* XJF-9 XJF-9 сравнивали с базой данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Культивирование и экстракция эндофитного гриба

Штамм гриба *Th. thermophile* XJF-9 культивировали на ферментационной среде, содержащей картофельный экстракт 4 г/л, D-глюкозу 20 г/л и 1 л дистиллированной воды, в течение 28 дней при 28 °C при встряхивании 160 об/мин. После инкубации культуральная среда колебалась, затем бесклеточные супернатанты экстрагировали этилацетатом и получали неочищенный экстракт [14, 16].

In-Vitro биологическая активность

Антимикробный анализ

Измеряли антимикробную активность сырого экстракта *Th. thermophile* XJF-9, используя метод, описанный Rustamova и соавт [9, 16, 17]. Для антимикробного скрининга использовали три типа патогенных для человека штаммов, таких как микробы *S. aureus* (ATCC6538), *E. coli* (ATCC11229) и гриб *C. albicans* (ATCC10231).

Цитотоксическая активность (анализ МТТ)

Вторичные метаболиты, продуцируемые исследуемым эндофитным грибом *Th. thermophile* XJF-9, были проверены на противораковую активность в отношении клеточных линий дерева рака человека, таких как: MDA-MB-231 (рак молочной железы), Hela (рак шейки матки) и HT-29 (рак толстой кишки) с использованием анализа МТТ по методу Бозорова и соавт [18-21]. Скорость ингибирования определяли по уравнению

$$IR = \frac{(C - S)}{(C - B)} \times 100$$

Здесь С — ОП контрольной группы, S — ОП экспериментальной группы, В — ОП бланка.

Противодиабетическая активность (анализ ингибирования РТР-1В)

Противодиабетическую активность бесклеточного супернатанта эндофитных грибов и экстракта в отношении протеинтирозинфосфатазы 1В (РТР1В) оценивали согласно опубликованному анализу [8]. Скорость ингибирования (IR) рассчитывали по следующему уравнению:

$$IR(\%) = \frac{P_c - P_s}{P_c} \times 100$$

Здесь P_c — поглощение контроля, а P_s — поглощение образца. [18].

Анализ высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Два грамма высушенного неочищенного экстракта растворяли в метаноле, затем анализы проводили с помощью ВЭЖХ SHIMADZU (XSELECT CSHTM Prep C18, 5 мкм) с градиентной элюирующей системой растворителей ацетонитрила (MeCN) и воды (10-100 об/90-0).

Результаты и обсуждение

Выделение и идентификация эндофитного гриба

Всего из листьев *V. anthelmintica* выделено 10 штаммов грибов, среди которых нами был выделен *Th. thermophile* XJF-9, для будущего исследования биологического анализа вторичных метаболитов. Первоначальный скрининг этого этилацетатного экстракта показал сильную антибактериальную активность. Штамм гриба *Th. thermophile* XJF-9 был идентифицирован по последовательностям гена 18S рРНК (Рисунок 3) и депонирован в GenBank под регистрационным номером MW881457. Изоляты штамма на 99,55% аналогичны штамму из GenBank NCBI (Рисунок 2).

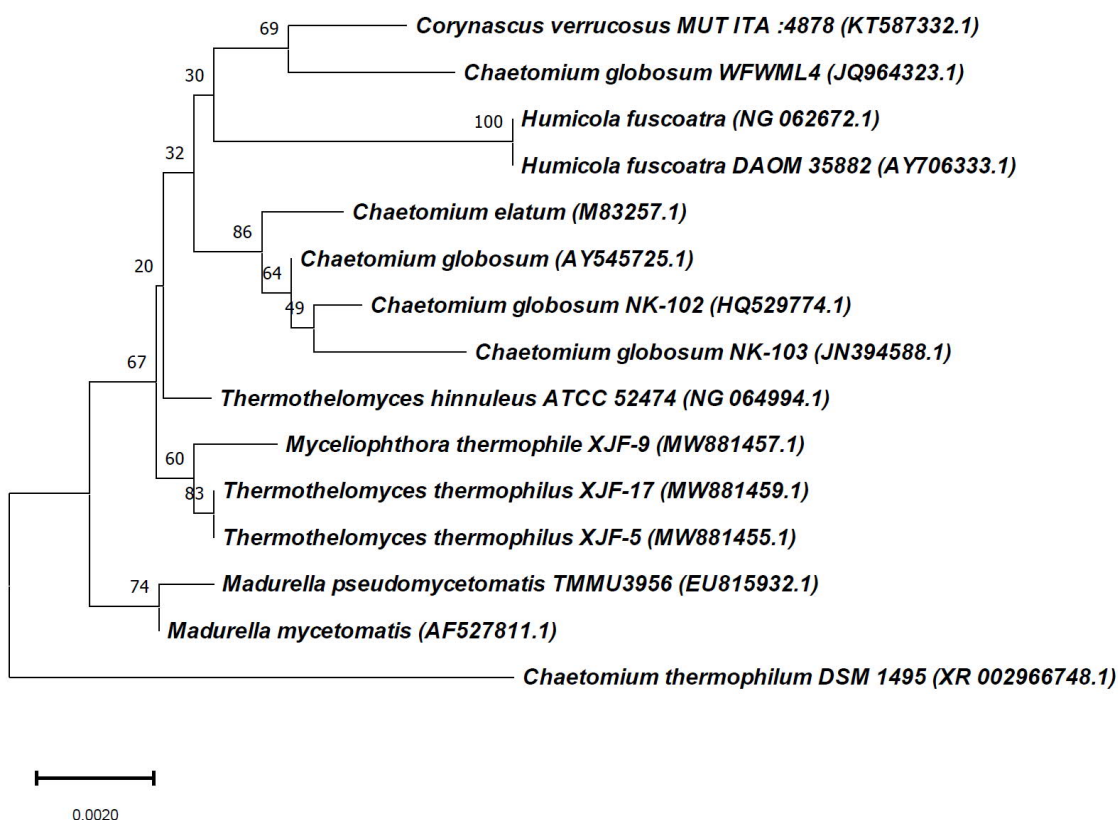


Рисунок 2 Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях генов 18S рРНК, выделенных из эндофитного гриба *Th. thermophile* XJF-9 *V. anthelmintica*, выведенного с использованием метода NeighborJoining

```
CATGTCTAGTATAAGCAATTATACAGCGAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTATA
CATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAGGGATGTATTTATTAGATTAAGAAA
CCAATGCCCTTCGGGGCTCTGCTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTTCATCAAA
TTTCTGCCSTATCAACTTCGACGGCTGGGTCTTGGCCAGCCGTGGTGACACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCC
GGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGA
GGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTTCCGGGTCTTGAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGG
AACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGGTAATTCGGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGAGGTTAAA
AAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCTAGCCGGCCGGTCCGCCTCACCGCGTGCAGTGGCTCGGCTGGGCCTTTCCTTCTGGA
GAACCGCTGCCCTTCACTGGGTGT
```

Рисунок 3 Последовательности гена 18S эндофитного гриба *Th. thermophile* XJF-9, выделенного из листьев *V. anthelmintica*.

Антимикробная активность неочищенного экстракта эндофитов

В настоящем исследовании основное внимание уделено синергетическому антимикробному действию тотального экстракта эндофитного гриба *Th. thermophile* XJF-9.

Антимикробную активность общего этилацетатного экстракта оценивали с использованием трех патогенных для человека микробов: грамположительных *S. aureus*, грамотрицательных *E. coli* и гриба *C. albicans*. Экстракт *Th. thermophile* XJF-9 проявлял сильное антибактериальное действие в отношении *S. aureus* и *E. coli* с зоной ингибирования 18 и 21 мм соответственно (Таблица 1). Наша работа является первым сообщением об антимикробном ингибировании экстрактов эндофитного гриба надземной части *V. anthelmintica*. Этот новый подход станет основой для будущего производства противомикробных препаратов из эндофитных грибов.

Таблица 1. Оценка антимикробной активности *Th. thermophile* XJF-9 по диаметру зоны ингибирования (мм).

Образец	Концентрация образца	Объем образца (мкл)	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Ампициллин	10 mg/ μ L	5		20	
Ампициллин	1 mg/ μ L	5			27
Амфотерицин В	5 mg/ μ L	20	17		
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	50 mg/ μ L	20	15	21	18

Цитотоксическая активность

Цитотоксическая активность суммарного этилацетатного экстракта грибкового эндофита *Th. thermophile* XJF-9 была исследована относительно нескольких линий человеческих раковых клеток MDA-MB-231 (рак молочной железы), Hela (рак шейки матки) и HT-29 (рак толстой кишки). Синергетический эффект эндофитного гриба был многоцелевым и ингибировал все раковые клетки. Сырой экстракт *Th. thermophile* XJF-9 сильно проявлял линии HT-29 и Hela со значениями IC₅₀ 9,89 мкг/мл $\pm$ 0,35 и 7,85 мкг/мл $\pm$ 0,15 соответственно. При тестировании на MDA-MB-231 был получен удовлетворительный потенциал со значениями IC₅₀ 13,99 мкг/мл $\pm$ 0,69. Для положительного контроля использовали доксорубин (ДОКС).

Таблица 2. Цитотоксическая активность этилацетатных экстрактов, полученных из эндофитов грибов, на линиях раковых клеток человека HT-29, MCF7 и Hela.

Образец	Сотовые линии IC ₅₀ (μ g/mL)		
	HT-29	MDA-MB-231	HT-29
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	7.85 μ g/mL $\pm$ 0.15	13.99 μ g/mL $\pm$ 0.69	9.89 μ g/mL $\pm$ 0.35
DOX	0.72 μ g/mL $\pm$ 0.05	0.16 μ g/mL $\pm$ 0.004	0.12 μ g/mL $\pm$ 0.007

Противодиабетическая активность (анализ ингибирования РТР-1В)

РТР-1В играет чрезвычайно важную роль в негативной регуляции передачи сигналов инсулина. Общий этилацетатный экстракт грибкового эндофита измеряли на ингибирующую активность *in vitro* в отношении фермента РТР-1В. В нашем сообщении мы исследовали противодиабетическую активность общего этилацетатного экстракта эндофитного гриба *Th. thermophile* XJF-9. Неочищенный экстракт *Th. thermophile* XJF-9

демонстрировал значительное ингибирование РТР-1В со значениями $IC_{50} 6,12 \pm 0,45$ мкг/мл.

Таблица 3. Ингибирующая активность фермента РТР1В сырых экстрактов, выбранных эндофитных грибов и экстракта лекарственного растения *V. Anthelmintica*

Sample	IC_{50} (μg/mL)
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	6.12 ± 0.45
РТР1В inhibitor	1.76 ± 0.60

Анализ ВЭЖХ неочищенного экстракта гриба *Th. thermophile* XJB-9

Биоактивные природные соединения, продуцируемые *Th. thermophile* XJB-9, анализировали с помощью ВЭЖХ. Результаты показали, что основной экстракт эндофита содержит фенольные, пиррольные соединения, алкалоиды и производные лактона.

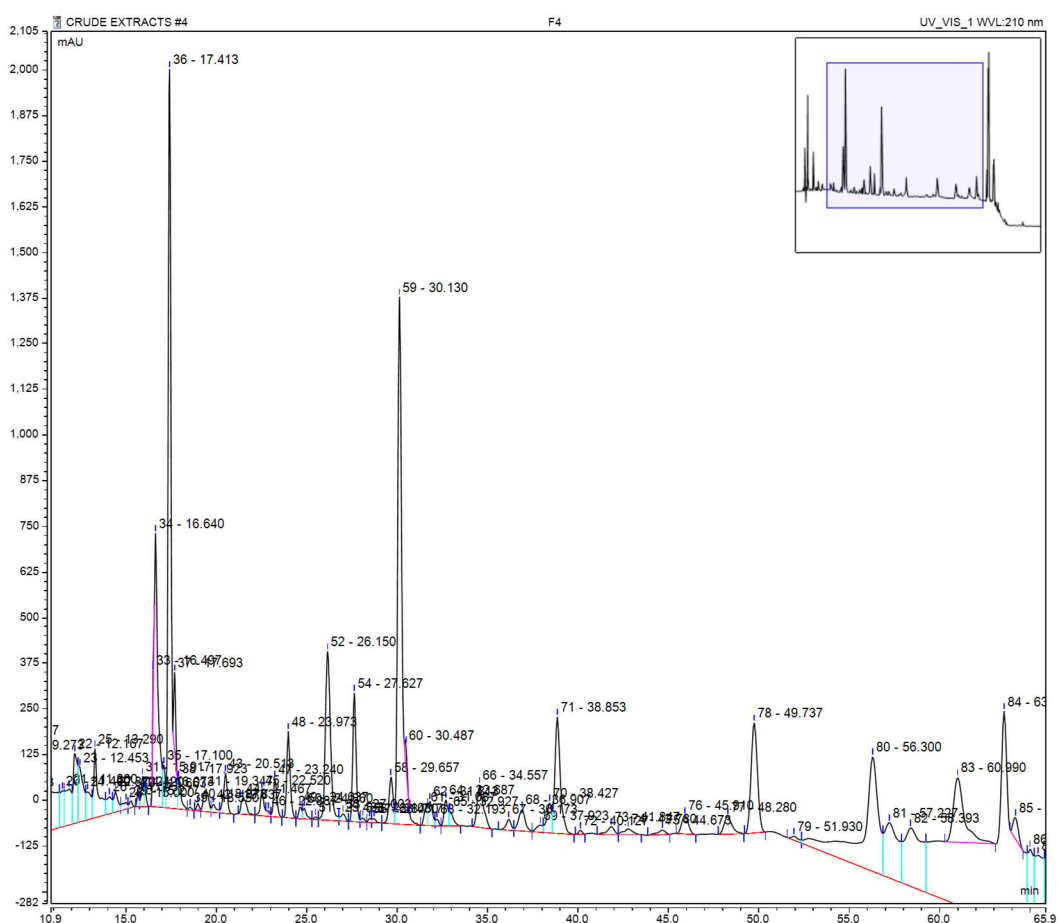


Рисунок 4. Анализ ВЭЖХ вторичных метаболитов, продуцируемых эндофитным грибом *Th. thermophile* XJF-9

Вывод

Эндофитный гриб был выделен из листьев *V. anthelmintica*. Изолированный штамм имеет 99,55% сходства с *Th. thermophile* XJF-9. Этилацетатный экстракт *Th. thermophile* XJF-9 прошел скрининг нескольких биологических анализов на цитотоксическую,

противодиабетическую и противомикробную активность. Общий экстракт гриба проявлял сильную антибактериальную активность в отношении бактериальных патогенов человека *S. aureus* и *E. coli* с зонами ингибирования 18 и 21 мм соответственно. Кроме того, он проявлял мощную цитотоксическую активность на линиях HT-29 и Hela со значениями IC_{50} 9,89 мкг/мл $\pm$ 0,35 и 7,85 мкг/мл $\pm$ 0,15 соответственно.

Introduction

Endophytic fungi are a highly and diverse group of plant microbiome that colonize healthy plant tissues of their host plants and without causing any negative symptoms [1-3]. Endophytic fungi are one of the most prominent and important producers of pharmacological active secondary metabolites and that produced bioactive secondary metabolites can affect host plant physiology, defense and tolerance against biotic and abiotic stresses [4, 5]. Bioactive natural compounds displayed several biological activities such as antimicrobial [6, 7], antioxidant [8], cytotoxicity [9, 10] and acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity [11], thus are rich source of pharmacologically active compounds that exploitation in pharmacology and agriculture. This study is a significant step in deeper investigation of biological activities of endophytes. Total ethyl acetate extract of endophytic fungi exhibits cytotoxicity activity on several human cancer cell lines, in addition antimicrobial and anti-diabetic activity. The results show that, which suggest its consideration as a drug candidate with therapeutic potential.

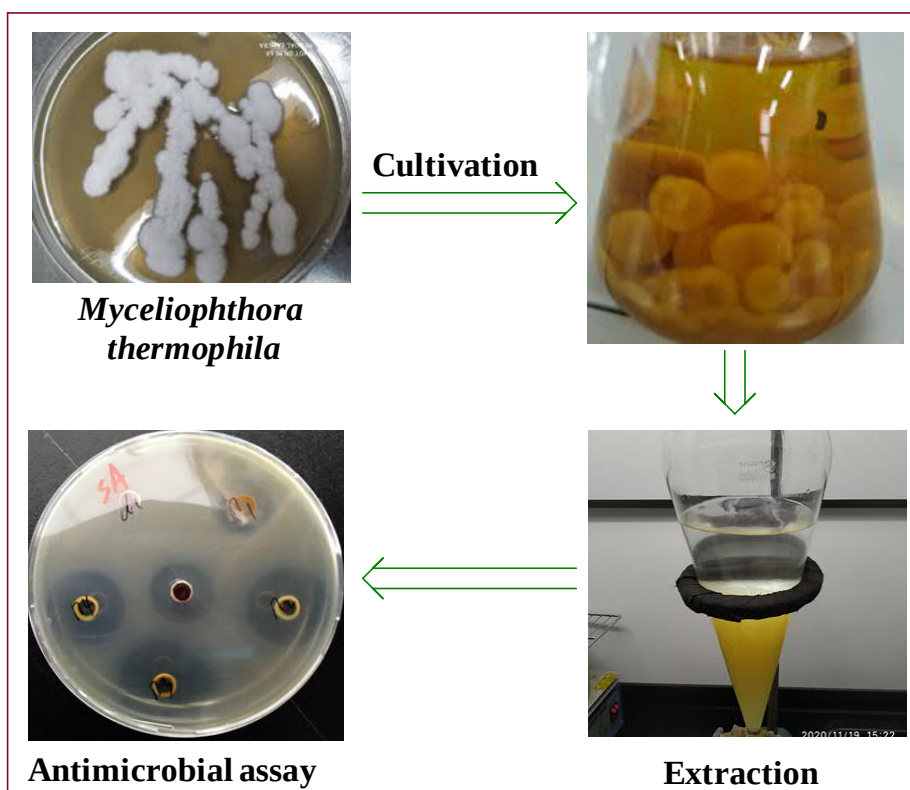


Figure 1 Main approach used in the present study

Material and methods

Isolation and identification of endophytic fungus

The plant samples were collected from the dry soil sites of Hutun region of the Xinjiang Province, People Republic of China. The endophytic strain was isolated with known method described by Rustamova et al [12-14]. Regarding of isolation and purification of endophyte

fungus using potato dextrose agar (PDA) medium (potato extract 4g/L, dextrose 20g/L, agar 15g/L and distilled water) plates, and inoculated at 28C⁰ for a week. After growth fungal colonies was separated and cleaned according to color, shape and size. The pure fungal culture was stored at 4 C⁰ for using further. The identification of endophytic fungus was performed by the method of Nei et al. [14, 15]. The 18S rRNA gene sequence of strain *Th. thermophile* XJF-9 obtained was compared with the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Cultivation and extraction of endophytic fungus

The fungal strain *Th. thermophile* XJF-9 cultivated on the fermentation medium which contained potato extract 4g/L, D-glucose 20g/L and 1L distilled water, for 28 days at 28 °C at 160 rpm shaking. After incubation culture medium faltered, then cell free supernatants were extracted with ethyl acetate and to give crude extract [14, 16].

In-Vitro biological activities

Antimicrobial assay

Crude extract of *Th. thermophile* XJF-9 was measured antimicrobial activity, using the method described by Rustamova et al [9, 16, 17]. For antimicrobial screening were used tree types of human pathogenic strains, such as *S. aureus* (ATCC6538), *E. coli* (ATCC11229) and the yeast *C. albicans* (ATCC10231).

Cytotoxic activity (MTT assay)

The secondary metabolites produced by endophytic fungus *Th. thermophile* XJF-9 under investigation was screened for anticancer activity against tree human cancer cell lines such as: MDA-MB-231 (breast cancer), Hela (cervical cancer), and HT-29 (colon cancer) using the MTT assay was performed by the method of Bozorov et al. [18-21]. The inhibition rate was determined by the equation

$$IR = \frac{(C - S)}{(C - B)} \times 100$$

where C is the OD of the control group, S is the OD of the experimental group, and B is the OD of the blank.

Anti-diabetic activity (PTP-1B inhibition assay)

The Anti-diabetic activity of the cell-free supernatant of endophytic fungi and the extract against protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) were evaluated according to the published assay [8]. The inhibition rate (IR) was calculated using the following equation:

$$IR(\%) = \frac{P_C - P_S}{P_C} \times 100$$

where P_C is the absorbance of the control and P_S is the absorbance of the sample [18].

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses

Two grams of dried crude extract dissolved in methanol, then analyses were using analyse HPLC SHIMADZU (XSELECT CSHTM Prep C18, 5 μm) with gradient elution solvent system of acetonitrile (MeCN) and water (10-100v/90-0).

Results and discussion

Isolation and identification of endophytic fungus

A total of 10 fungal strains were isolated from the leaves of *V. anthelmintica*, among them we have been selected *Th. thermophile* XJF-9, for future investigation biological assay of secondary metabolites. The initially screening of that ethyl acetate extract strongly exhibited antibacterial activity. The fungal strain *Th. thermophile* XJF-9 was identified by 18S rRNA gene sequences (Fig.3) and deposited in the GenBank under accession number MW881457. The isolates strain 99.55% similar strain from the NCBI GenBank (Fig. 2).

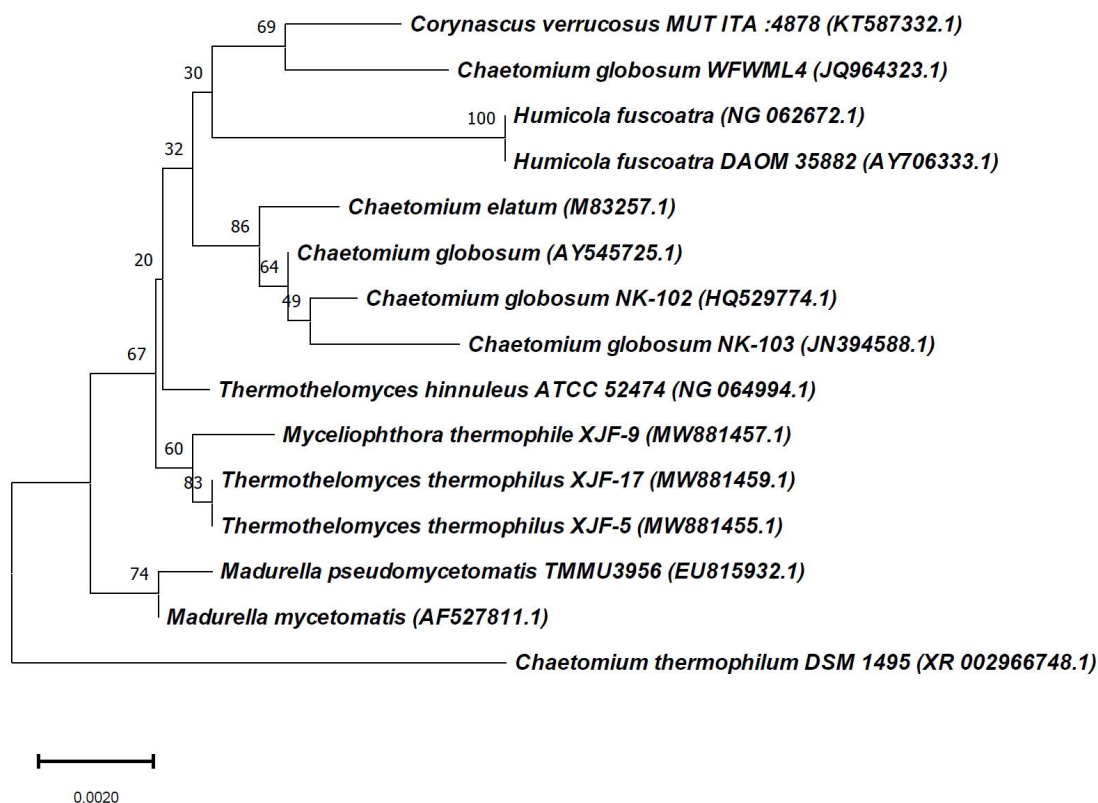


Figure 2 The phylogenetic tree based on 18S rRNA gene sequences isolated from endophytic fungus *Th. thermophila* XJF-9 of *V. anthelmintica*, inferred using the NeighborJoining method

CATGCTAGTATAAGCAATTATACAGCGAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTGATAGTACCTTATA
CATGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAGGGATGTATTATTAGATTAAAAA
CCAATGCCCTTCGGGGCTCTCTGGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAA
ATTTCTGCCCTATCAACTTTCGACGGCTGGGTCTTGCCAGCCGTGGTGACAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACC
CCGGAGAAGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGG
GAGGTAGTGACAATAAATACTGATACAGGGCTCTTCGGGTCTGTGAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGA
GGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGAGGTT
AAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTAGCCGCGCGGTCCGCCTACCGCGTGCCTGCTCGGCTGGGCCTTTCCTTC
TGGAGAACCCTGCCCTTCACTGGGTGT

Figure 3 18S gene sequences of endophytic fungus *Th. thermophila* XJF-9 isolated from the leaves of *V. anthelmintica*.

Antimicrobial activity of crude extract of endophytes

In the present study focused on the synergetic antimicrobial effect of total extract of endophytic fungus *Th. thermophila* XJF-9. Fungal strain was isolated from the *V. anthelmintica* leaves. The antimicrobial activity of the total ethyl acetate extract was evaluated using three human-pathogenic microbes, Gram-positive *S. aureus*, Gram-negative *E. coli* and the yeast *C. albicans*. The extract of *Th. thermophila* XJF-9 strongly exhibited antibacterial against the *S. aureus* and *E. coli* with inhibition zone 18 and 21 mm respectively (Table 1). Our work is the first report of antimicrobial inhibition of extracts from endophytic fungus of the *V. anthelmintica* aerial part. This new approach will be the basis for future production of antimicrobial drugs from endophytic bacteria.

Table 1. Antimicrobial activity of *Th. thermophile* XJF-9 evaluated by the diameter of inhibition zone (mm).

Sample	Sample concentration	Sample amount (μL)	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Ampicillin	10 mg/ μL	5		20	
Ampicillin	1 mg/ μL	5			27
Amphotericin B	5 mg/ μL	20	17		
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	50 mg/ μL	20	15	21	18

Cytotoxic activity

The cytotoxic activity of total ethyl acetate extract of fungal endophyte *Th. thermophile* XJF-9 was screened several human cancer cells MDA-MB-231 (breast cancer), Hela (cervical cancer), and HT-29 (colon cancer) lines. The synergistic effect of endophytic fungus was multi-targeted and inhibited all cancer cells. Crude extract of *Th. thermophile* XJF-9 strongly exhibited HT-29 and Hela lines with IC₅₀ values of 9.89 μg/mL ± 0.35 and 7.85 μg/mL ± 0.15 respectively. When tested on MDA-MB-231, satisfactory potential resulted with IC₅₀ values 13.99 μg/mL ± 0.69. For positive control used doxorubicin (DOX).

Table 2. Cytotoxic activity of ethyl acetate extracts obtained from fungal endophytes on human cancer cell lines HT-29, MCF7 and Hela.

Sample	Cell lines		
	IC ₅₀ (μg/mL)		
	HT-29	MDA-MB-231	HT-29
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	7.85 μg/mL ± 0.15	13.99 μg/mL ± 0.69	9.89 μg/mL ± 0.35
DOX	0.72 μg/mL ± 0.05	0.16 μg/mL ± 0.004	0.12 μg/mL ± 0.007

Anti-diabetic activity (PTP-1B inhibition assay)

PTP-1B display a very important role in the negative regulation of insulin signaling. The total ethyl acetate extract of fungal endophyte was measured for in vitro inhibitory activity against the enzyme PTP-1B. In our report, we investigated antidiabetic activity of total ethyl acetate extract of endophytic fungus *Th. thermophile* XJF-9. The crude extract of *Th. thermophile* XJF-9 exhibited significant inhibition of PTP-1B with IC₅₀ values of 6.12±0.45 μg/mL.

Table 3. PTP1B enzyme inhibition activity of the selected endophytic fungus crude extracts and medicinal plant *V. anthelmintica* extract

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)
<i>Th. thermophile</i> XJF-9	6.12±0.45
PTP1B inhibitor	1.76±0.60

HPLC analyses of crude extract of fungus *Th. thermophile* XJF-9

Bioactive natural compounds produced *Th. thermophile* XJB-9 was analyzed by HPLC. The results showed total extract of endophyte contained phenolic, pyrrole compounds, alkaloids and lactone derivative are main compounds.

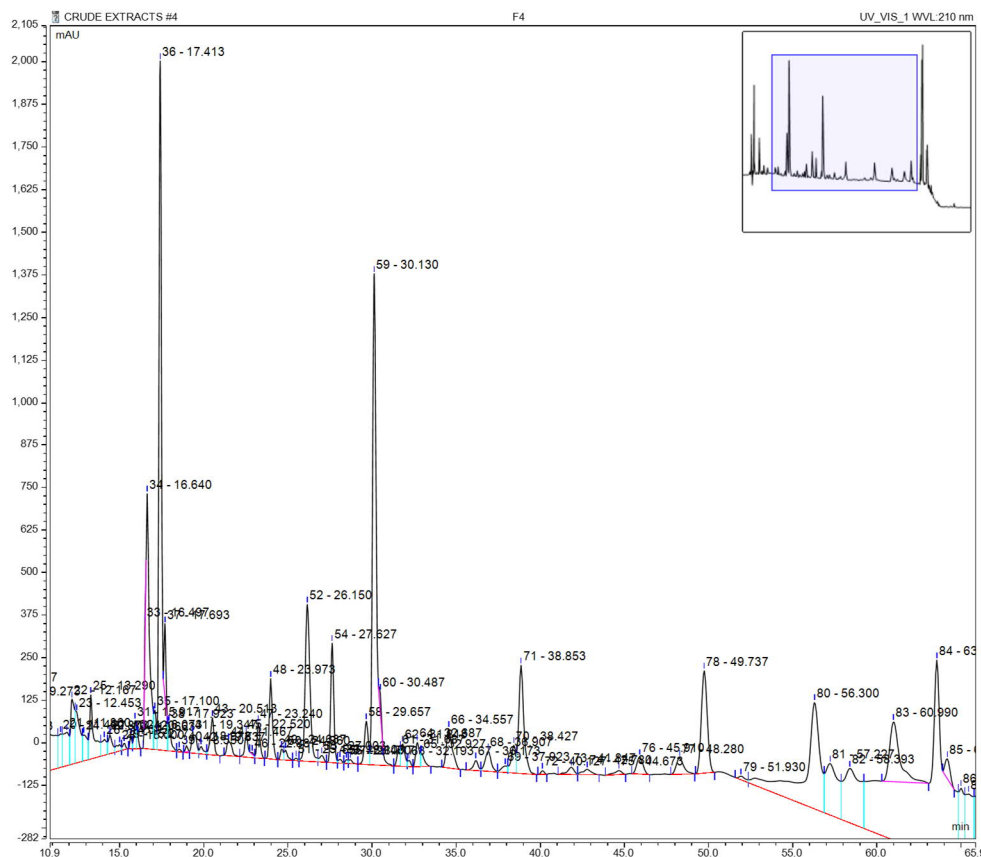


Figure 4 HPLC analyses of secondary metabolites produced by endophytic fungus *Th. thermophile* XJB-9

Conclusion

The endophytic fungus was isolated from the leaves of *V. anthelmintica*. The isolate strain 99.55% similarity to *Th. thermophile* XJB-9. The ethyl acetate extract of *Th. thermophile* XJB-9 screened several biological assay as cytotoxic, antidiabetic and antimicrobial activities. Total extract of fungus exhibited strongly antibacterial activity against human bacterial pathogens *S. aureus* and *E. coli*, with inhibition zona 18 and 21mm respectively. Moreover, displayed powerful cytotoxic activity on HT-29 and Hela lines with IC_{50} values of $9.89 \mu\text{g/mL} \pm 0.35$ and $7.85 \mu\text{g/mL} \pm 0.15$ respectively.

References

1. Rustamova N, Bozorov K, Efferth T, Yili A (2020a) Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *Phytochem Rev* 19:425-448
2. Chowdhary, K., and Kaushik, N. (2015). Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PloS one* 10, e0141444.
3. Dhayanithy, G., Subban, K., and Chelliah, J. (2019). Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC Microbiology* 19, 22.

4. Rustamova N, Bobakulov K, Begmatov N, Turak A, Yili A, Aisa HA (2019) Secondary metabolites produced by endophytic *Pantoea ananatis* derived from roots of *Baccharoides anthelmintica* and their effect on melanin synthesis in murine B16 cells. *Nat Prod Res* 35: 796-801
5. Rahaman, M.S., Siraj, M.A., Sultana, S., Seidel, V., and Islam, M.A. (2020). Molecular Phylogenetics and Biological Potential of Fungal Endophytes From Plants of the Sundarbans Mangrove. *Frontiers in microbiology* 11, 570855-570855.
6. Nath, A., Chattopadhyay, A., and Joshi, S.R. (2015). Biological Activity of Endophytic Fungi of *Rauwolfia serpentina* Benth: An Ethnomedicinal Plant Used in Folk Medicines in Northeast India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 85, 233-240.
7. Ratnaweera, P.B., de Silva, E.D., Williams, D.E., and Andersen, R.J. (2015). Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15, 220.
8. Rustamova N, Wubulikasimu A, Mukhamedov N, Gao Y, Egamberdieva D, Yili AJCm (2020d) Endophytic bacteria associated with medicinal plant *Vernonia anthelmintica*: Diversity and characterization. *Curr Microbiol* 77: 1457–1465
9. Rustamova N, Gao Y, Zhang Y, Yili A (2020c) Biological Activity of Endophytic Fungi from the Roots of the Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*. *Microorganisms* 8: 586
10. Tian, W., Liao, Z., Zhou, M., Wang, G., Wu, Y., Gao, S., Qiu, D., Liu, X., Lin, T., and Chen, H.J.F. (2018). Cytoskyrin C, an unusual asymmetric bisanthraquinone with cage-like skeleton from the endophytic fungus *Diaporthe* sp. 128, 253-257.
11. Zhao, J.-W., Yang, Z.-D., Zhou, S.-Y., Yang, L.-J., Sun, J.-H., Yao, X.-J., Shu, Z.-M., and Li, S.J.P.L. (2019). Wortmannine F and G, two new pyranones from *Talaromyces wortmannii* LGT-4, the endophytic fungus of *Tripterygium wilfordii*. 29, 115-118.
12. Kuo, J., Chang, C.-F., and Chi, W.-C. (2021). Isolation of endophytic fungi with antimicrobial activity from medicinal plant *Zanthoxylum simulans* Hance. *Folia Microbiologica* 66, 385-397.
13. Kim, Y., Cho, J.-Y., Kuk, J.-H., Moon, J.-H., Cho, J.-I., Kim, Y.-C., and Park, K.-H. (2004). Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from *Fermented Soybean, Chungkook-Jang*. *Current Microbiology* 48, 312-317.
14. Nei, M., and Saitou, N. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
15. Cazar, M.E., Schmeda-Hirschmann, G., and Astudillo, L. (2005). Antimicrobial Butyrolactone I Derivatives from the Ecuadorian Soil Fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 1067-1075.
16. Rasulov, B., Rustamova, N., Yili, A., Zhao, H.-Q., and Aisa, H.A.J.F.m. (2016). Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low and high molar mass exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 36 and its antimicrobial activity against some pathogens. *Folia Microbiologica*. 61, 283-293.
17. Bozorov, K., Ma, H.-R., Zhao, J.-Y., Zhao, H.-Q., Chen, H., Bobakulov, K., Xin, X.-L., Elmurodov, B., Shakhidoyatov, K., and Aisa, H.A. (2014). Discovery of diethyl 2,5-diaminothiophene-3,4-dicarboxylate derivatives as potent anticancer and antimicrobial agents and screening of anti-diabetic activity: Synthesis and in vitro biological evaluation. Part 1. *European Journal of Medicinal Chemistry* 84, 739-745.

18. Bozorov, K., Zhao, J.y., Nie, L.F., Ma, H.-R., Bobakulov, K., Hu, R., Rustamova, N., Huang, G., Efferth, T., and Aisa, H.A. (2017). Synthesis and in vitro biological evaluation of novel diaminothiophene scaffolds as antitumor and anti-influenza virus agents. Part 2. RSC Advances 7, 31417-31427.
19. Bozorov, K.A., Mamadalieva, N.Z., Elmuradov, B.Z., Triggiani, D., Egamberdieva, D., Tiezzi, A., Aisa, H.A., and Shakhidoyatov, K.M. (2013). Synthesis of substituted thieno[2,3- D]pyrimidin-4-ones and their testing for evaluation of cytotoxic activity on mammalian cell models. Journal of Chemistry.
20. Rashid, H., Rasool, S., Ali, Y., Khan, K., and Martines, M.A.U. (2020). Anti-cancer potential of sophoridine and its derivatives: Recent progress and future perspectives. Bioorganic Chemistry 99, 103863.

AUTHOR BIOGRAPHIES

Nigora A. Rustamova, Samarkand State University

Associate Professor of the Department of Biology, Doctor of Philosophy in Biological Sciences (PhD)

Kahramon D. Davranov, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan

Doctor of Biological Sciences, Laboratory of Enzymology

Haji Akber Aisa, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences

Professor (PhD), Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry in Arid Regions

Abulimiti Yili, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences

Doctor of Pharmacological Sciences, Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry in Arid Regions