



UDK573.6.086.83:547.94

<https://orcid.org/0009-0005-8254-2974>

**VINKA TURKUMIGA MANSUB O‘SIMLIKLARDAN AJRATILGAN ENDOFIT
ZAMBURUG‘LARDAN VINKA ALKOLOIDLARINI ISHLAB CHIQRISH
DINAMIKASI**

Otayeva Zarina Murotovna phd doktorant

Nasmetova Saodat Mamajanovna b.f.d.

Gulyamova Toshxon Gafurovna b.f.d. professor

O‘zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasi Mikrobiologiya instituti, Toshkent

zarina_mo@bk.ru

Annotatsiya Maqolada *Vinca* turkumidagi o'simliklardan avval ajratilgan endofit zamburug'lardan vinka alkaloidlari ishlab chiqarish dinamikasi tahlili keltirilgan. Tadqiqotning maqsadi makkajo'xori suyuq ozuqa muhitida, zamburug'larning 7, 10 va 13 sutka davomida o'sish jarayonidagi, vinkristin, vinblastin va vinkamin alkaloidlarini YSSX usuli yordamida aniqlash edi. Natijalar shuni ko'rsatdiki, makkajo'xori suyuq ozuqa muhitda biomassaning maksimal to'planishi zamburug' shtammlarni o'sishining 7-kunida kuzatildi, alkaloid ishlab chiqarish esa o'sishga aniq bog'liq emas va shtammning o'ziga xos xususiyatlari bilan belgilanadi.

Kalit so'zlar: *Vinca* turkumi o'simliklari, endofit zamburug'lar, ekstraktlar, vincristin, vinblastin, vinkamin, YSSX.

**ДИНАМИКА ПРОДУКЦИИ ВИНКА-АЛКОЛОИДОВ В ЭНДОФИТНЫХ
ГРИБАХ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ РОДА VINCA**

Аннотация В статье представлен анализ динамики продукции алкалоидов винка, полученных из эндофитных грибов, ранее выделенных из растений рода *Vinca*. Целью исследования было определение содержания алкалоидов винкрестина, винбластина и винкамина с помощью метода ВЭЖХ в процессе роста микромицетов на жидкой кукурузной среде в течение 7, 10 и 13 дней. Результаты показали, что на питательной среде на основе кукурузной муки максимальное накопление биомассы наблюдается на 7-й день культивирования штаммов, в то время как продукция алкалоидов не имеет выраженной зависимости от роста и определяется особенностями самого штамма.

Ключевые слова: растения рода *Vinca*, эндофитные грибы, экстракты, винкристин, винбластин, винкамин, ВЭЖХ.

DYNAMICS OF VINCA ALKALOID PRODUCTION IN ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM PLANTS OF THE GENUS VINCA

Annotation The article presents an analysis of the dynamics of the production of vinca alkaloids obtained from endophytic fungi previously isolated from plants of the genus *Vinca*. The aim of the study was to determine the content of vincristine, vinblastine and vincamine alkaloids using the HPLC method during the growth of micromycetes on liquid corn medium for 7, 10 and 13 days. The results showed that on a nutrient medium based on corn flour, the maximum accumulation of biomass is observed on the 7th day of strain cultivation, while the production of alkaloids has no pronounced dependence on growth and is determined by the characteristics of the strain itself.

Keywords: plants of the genus *Vinca*, endophytic fungi, extracts, vincristine, vinblastine, vincamine, HPLC.

Kirish

So‘nggi o‘n yilliklarda tabiiy terapevtik mahsulotlardan foydalanish, sintetik dorilarga qaraganda kamroq nojo‘ya ta‘sir qilishi aytilmoqda. O‘simliklar asosidagi bioaktiv birikmalar jahon bozorida mavjud bo‘lgan tabiiy dorilarning tahminan 80 % ini, so‘nggi yillarda dunyo bo‘yicha ishlab chiqarilayotgan dori preparatlarining 24,6 % tabiiy manbaalar hissasiga to‘g‘ri keladi

[1,2]. Aksincha, ushbu biofaol birikmalarning sintezi, sifati va biologik faolligi asosan o‘simlikning rivojlanish bosqichi, oziqlanishi, atrof-muhit va stress omillarga bog‘liq [3,4,5]. Biroq in-vitro sharoitda o‘simlik ko‘rsatkichlarini aniqlash va saqlash ba‘zan qiyin. Bundan tashqari, bunday o‘simlikka asoslangan tabiiy birikmalarning keng ko‘lamli sanoat talablari, kam miqdorda sintez, murakkab aralashmalardan ekstraksiya, atrof-muhitning buzilishiga sezgirlik (yorug‘lik yoki harorat tufayli) va faollikni yo‘qotish kabi cheklovlarga sabab bo‘ladi [6,7]. Hozirgi kunda, o‘simliklar asosidagi mikroorganizmlar va ularning tabiiy birikmalarini ishlab chiqarish arzon va yuqori yuqori samaradorlikka ega ekanligi adabiyotlardan ma‘lum.

Dolzarbligi

Endofitlar - bu o‘simliklarning turli qismlarida yashaydigan mikroorganizmlar, odatda kasallik belgilarini keltirib chiqarmaydi. Endofitlar mezbon o‘simlik bilan simbioz, patogenez, antagonistik munosabatlar kabi turli xil assotsiatsiyalarni ko‘rsatadilar va o‘simliklarning o‘sishini rag‘batlantirib, stress sharoitlariga qarshi turishi va hatto har qanday patogen hujumiga qarshi o‘simliklarni himoya qilishi mumkin [8]. Ular o‘simlikka o‘xshash ikkilamchi metabolitlarni ishlab chiqarish orqali o‘zlarining mezbon o‘simlikning himoya mexanizmini oshiradilar va shuning uchun ham endofitlar ushbu birikmalarning o‘simlikdan tashqarida ham sintezlay olishi muhimdir [9]. Ushbu mikroblar tabiatda juda katta ahamiyatga ega, chunki ular

biologik faol ikkilamchi metabolitlarni ishlab chiqarishi ma'lum, ularning ko'pchiligi diabetga qarshi, antibakterial, antifungal va saratonga qarshi birikmalar sifatida ishlatilishi mumkin [10,11]. Qizig'i shundaki, bu birikmalar dastlab mezbond o'simliklar ichida ishlab chiqarilgan va tibbiyot sanoatida katta ahamiyatga ega bo'lgan kimyoviy birikmalar bilan bir xil. Ko'pincha, bu endofitlar o'zlarining xos o'simliklari tomonidan ishlab chiqarilgan biofaol ikkilamchi metabolitlarni in vivo jonli kuchaytirish uchun elisitorlar sifatida ishlaydi va shu bilan bunday birikmalarning ishlab chiqarish tezligini oshiradi [12].

Catharanthus roseus (L.) G. [Don Apocynaceae](#) oilasiga mansub manzarali va dorivor ahamiyatga ega o'simlik bo'lib, tarkibida ko'p miqdorda farmatsevtik faol birikmalar mavjud. Hindiston va Xitoy tabobatida eng ko'p o'rganilgan dorivor o'simliklardan biri bo'lib, eksperimental dalillar uning tarkibida ko'plab uglevodlar, flavonoidlar, saponinlar va alkaloidlar mavjudligini ko'rsatadi. Alkaloidlar *C. roseus*ning eng potentsiali faol kimyoviy tarkibiy qismi bo'lib, saratonga qarshi, diabetga qarshi, mikroblarga qarshi, yaraga qarshi, antigelmintik, diareyaga qarshi xususiyatlarga egaligi bilan mashhur [13,14]. *C. roseus*ning vinkristin (VCR) va vinblastin (VLB) kabi ikkita muhim terpen indol alkaloidining farmatsevtik ahamiyati va o'simlik qismlaridan kam miqdorda hosil bo'lishi, *C. roseus* o'simligining endofitlarini ham o'rganishni talab etadi. Vinka alkaloidlariga bo'lgan talabning ortib borishi tadqiqotchilarni muqobil ishlab chiqarish usullarini o'rganishga undadi. Adabiyotlarda Vinca turkumiga mansub o'simliklar endofitlarida ham vinca alkaloidlari borligi aniqlangan [15,16]. Tadqiqotlari shuni ko'rsatdiki, *C. roseus*dan ajratib olingan *Fusarium oxysporum* endofiti kulturalari 1litrda taxminan vinblastin 76 mkg va vinkristin 67 mkg sintezlagan [17]. *C. roseus* barglaridan ajratilgan *Curvularia verruculosa* endofit zamburug'i kulturalaridan 182 mkg/l vinblastin alkaloidi ajratib olingan. Bu o'simlikdagi vinblastin miqdoriga qaraganda ancha yuqori. [18].

Tadqiqot maqsadi: *Vinca* turkumiga mansub o'simliklar endofitlarining o'sish dinamikasi vinka alkaloidlarini miqdoriy tahlilini aniqlashdan iborat.

Materiallar va usullar

Tadqiqot ob'ekti sifatida O'zbekistonda o'sadigan *Vinca* — *V. minor* (kichik bo'rigul), *V. erecta* (to'g'ri bo'rigul) va *V. rosea* (256inbla bo'rigul) o'simliklarining turli qismlaridan avval ajratilgan endofit zamburug'larning sakkizta shtammi olindi: *Alternaria* sp. – VM85L, *Penicillium* sp. - VM86S, *Aspergillus terreus* – VE90R *Acremonium* sp. – VM96L, *Aspergillus terreus* – VR176L *Aspergillus amstelodami* – VR177L *Acremonium* sp. – VR179L, *Aspergillus terreus* – VE90R.

Shtammlar vinka alkaloidlarni ishlab chiqarish samaradorligiga qarab tanlanadi. Makkajo'xori ozuqa muhiti gr/l: K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 2, makkajo'xori ekstrakti – 2, pepton – 2, achitqi ekstrakti – 0,2, glyukoza – 20. Makkajo'xori ozuqa muhiti avvalgi tadqiqotlarda tanlab olingan. Shtammlar makkajo'xori suyuq ozuqa muhitida 7,10,13 sutka davomida Elpon 357-sheykerda (Polsha) 140 ayl/min va statsionar sharoitda 7 kun davomida mikrobiologik BD115 (AQSh) inkubatorida 28°C haroratda o'stirildi. Biomassa va kultural

suyuqlik liofil quritgichda muzlatildi va quritildi. Kukun holatidagi namunalar massalari aniqlandi.

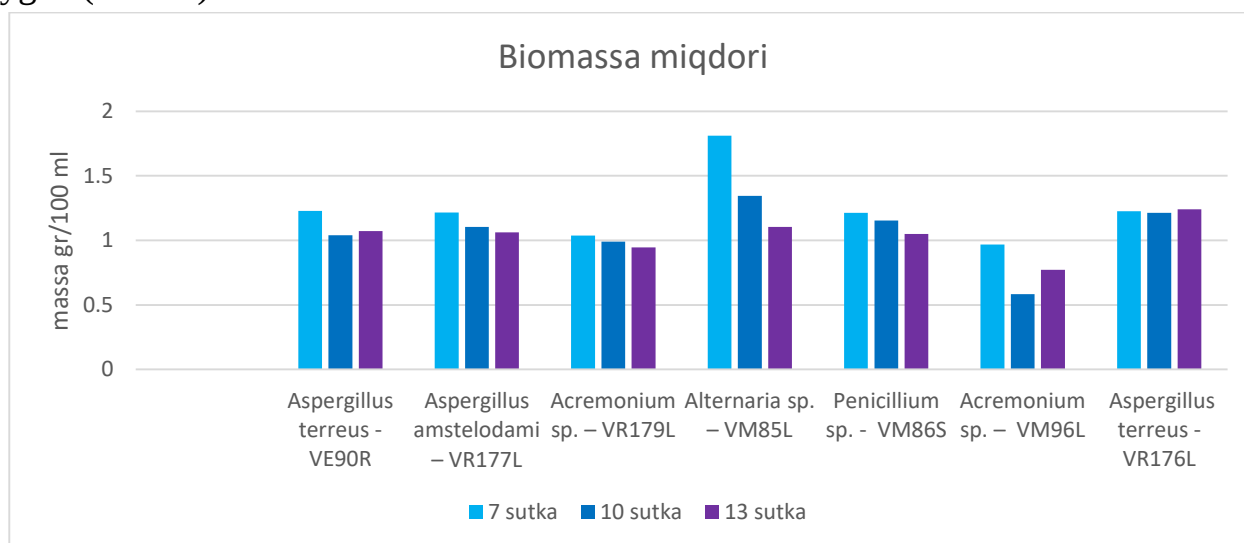
Endofit zamburug‘larning makkajo‘xori ozuqa muhitida to‘plagan biomassa miqdori Tahlil qilish uchun 500 mg quruq massa namunalari tanlab olindi, ular xloroform bilan 24 soat davomida 1:10 nisbatda ikki marta ekstraksiyalandi. Ekstraktsiyadan so‘ng eritma filtr qog‘ozi orqali filtrlanadi, so‘ngra filtrat rotorli bug‘latgich yordamida 5 ml hajmgacha konsentratsiyalanadi. So‘ngra 0,45 nm bo‘lgan membrana filtri orqali filtrlanadi. Endofit zamburug‘ ekstraktlarida Vinka alkaloidlari (vinkristin, vinblastin va vinkamin) aniqlash suyuq xromatografiya Agilent Technologies 1100 (AQSh) yordamida, Discovery hs-C18 3um ustunida, 2,7 mkm, 150X4,6 mm, UV detektorida amalga oshirildi. YSSX tizimi LC-15C nasoslari bilan jihozlangan. Eluentning tarkibi: asetonitril va 0,1% fosfor kislotasi (30:70 v/v). Standartlar sifatida tegishli ravishda vinblastine, vinkristin va vinkamin faol moddalarini o‘z ichiga olgan “Cytoblastin”, “Cyticristin “va” Vinebral “ (Hindiston) farmatsevtika preparatlari qo‘llanilgan.

Barcha tajribalar uch takrorlanishda o‘tkazildi va qiymatlarning o‘rtacha va standart xatosi (SE) Microsoft Excel-da hisoblab chiqildi.

Natijalar va ularning muhokamasi

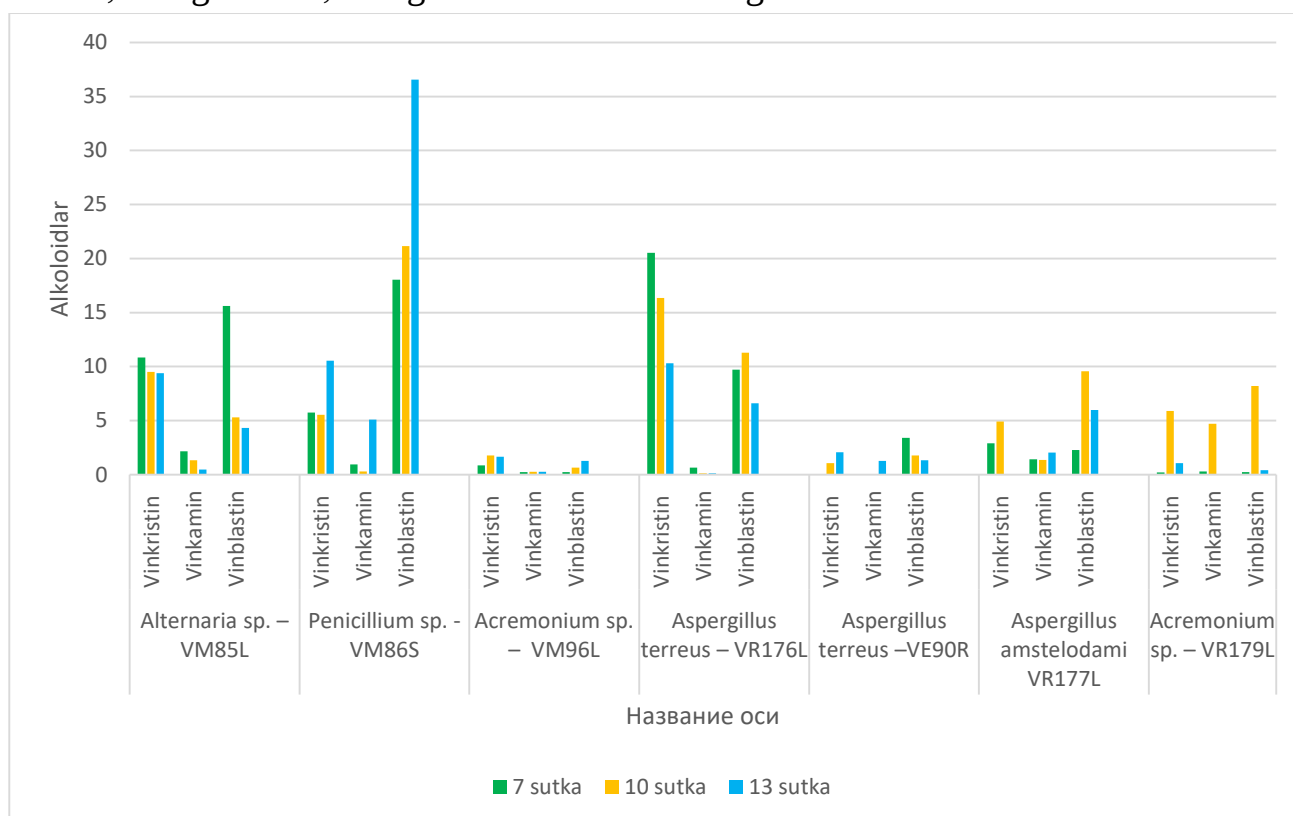
Mavjud adabiyotlarni tahlil qilish shuni ko‘rsatadiki, ozuqa muhitining tarkibi va mikroorganizmlar o‘shish dinamikasi endofit mikroorganizmlar tomonidan ikkilamchi metabolitlar sintezini belgilovchi eng muhim omillardir. Ushbu tadqiqot suyuq makkajo‘xori ozuqa muhitida endofit zamburug‘larning turli shtammlarini biomassa to‘plashi va vinka alkaloid sintezi samaradorligi aniqlandi.

Liyofilizatsiyadan so‘ng, 100 ml ozuqa muhitda to‘plagan biomassa shtammga qarab 0,584 g dan 1,810 g gacha bo‘lgan. Biomassaning eng katta to‘planishi, asosan ko‘pchilik shtammlar uchun o‘shishning 7-kunida qayd etilgan, 10 va 13-kunlarda esa bu ko‘rsatkich pasaygan (1-rasm).



1-rasm. Endofit zamburug‘larning makkajo‘xori suyuq ozuqa muhitida to‘plagan biomassa miqdori (n=3)

2-rasmda keltirilgan ma'lumotlardan kelib chiqadiki, o'rganilgan barcha endofitlar vinka alkaloidlarini har xil darajada sintez qila oladi, shu bilan birga ularning ishlab chiqarish samaradorligi har bir shtamm uchun individualdir. Masalan, *Aspergillus terreus* — VR176L shtammi uchun eng ko'p vinkristin ishlab chiqarish 7-kuni qayd etilgan va 20,54 mg/l ni tashkil etgan bo'lsa, 10-kuni vinkristin darajasi 16,36 mg/l ga, 13-kuni esa 10,31 mg/l ga tushgan. shu bilan birga, vinkristin darajasi 20,54 mg / l ni tashkil etdi. Ushbu shtammida vinblastin sintezi 10-kunga kelib 11,2 mg/l ni tashkil etdi. Vinblastin sintezining yuqori darajasi *Penicillium sp* shtammida o'sishning 13-kunida kuzatilgan. *Vinca minordan* ajratilgan VM86S, bu yerda vinblastin konsentratsiyasi 36,57 mg/l ni tashkil etdi. shu bilan birga, 7-va 10-kunlarda mos ravishda 18,05 mg/l va 21,16 mg/l vinblastin sintezlangan.



2-rasm. *Vinca* turkumi o'simliklari endofitlarining vinca alkaloid sintezlash dinamikasi (n=3).

Bundan tashqari, vinka alkaloid sintezi *Acremonium sp* - VM96L kabi boshqa tekshirilgan endofitlarda *A. terreus* — VE90RVA *A. amstelodami* — VR177L ham qayd etilgan, ammo ularning mahsuldorligi asosiy shtamlarga nisbatan past edi. Masalan, *Acremonium sp* - VR179L shtammida o'rganilgan barcha alkaloidlar (vinkristin, vinkamin va vinblastin) 10-kuni eng ko'p miqdorda sintezlanib, mos ravishda 5,9 mg/l, 4,7 mg/l va 8,2 mg/l ni tashkil etdi. Keyingi kunlarda bu alkaloidlarning sintezi sezilarli kamaydi.

Xulosa

Ushbu tadqiqot natijalari shuni ko'rsatdiki, *Vinca* turkumidagi o'simliklardan ajratilgan endofit mikroorganizmlar vinka alkaloidlarini sintez qilish qobiliyatiga ega, ammo ularning ishlab chiqarish samaradorligi shtamm va madaniyat sharoitlariga qarab o'zgaradi. Vinka-

alkaloidlar, xususan vinkristin va vinblastin sintezi bo'yicha eng yuqori samaradorlik *Aspergillus terreus* — VR176L va *Penicillium sp* - VM86S shtammlarida qayd etilgan. Olingan natijalar ozuqa muhitining tarkibi va o'sish dinamikasi ikkilamchi metabolitlar sinteziga ta'sir qiluvchi muhim omillar ekanligini tasdiqlaydi va vinka alkaloidlarini biotexnologik ishlab chiqarishda endofitik zamburug'lardan foydalanish istiqbollarini ochadi.

ADABIYOTLAR RO'YHATI

1. References Singh, R., Dubey, A., 2015. Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. Indo Glob. J. Phram. Sci. 5 (2), 106–116.
2. Newman, D.J., Cragg, G.M., 2020. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. J. Nat. Prod. 83 (3), 770–803
3. Dudeja, S.S., Giri, R., 2014. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. Afr. J. Microbiol. Res. 8 (15), 1562–1572.
4. Chandra, S., 2012. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. Appl. Microbiol. Biotechnol. 95 (1), 47–59.
5. Dudeja, S.S., Giri, R., 2014. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. Afr. J. Microbiol. Res. 8 (15), 1562–1572.
6. Namdar, D., Charuvi, D., Ajampura, V., Mazuz, M., Ion, A., Kamara, I., Koltai, H., 2019. LED lighting affects the composition and biological activity of Cannabis sativa secondary metabolites. Ind. Crop. Prod. 132, 177–185.
7. Albuquerque, B.R., Heleno, S.A., Oliveira, M.B.P., Barros, L., Ferreira, I.C., 2021. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. Food Funct. 12 (1), 14–29.
8. Bryda, O., Stadnytska, N., 2021. Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: advantages and limitations. Ann. Rom. Soc. Cell Biol. 25 (5), 1737–1751. <<http://annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/4697>> .
9. Khare E., Mishra J., Arora NK Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. Old. Mikrobiol. 2018;9:2732. Doi: 10.3389/fmicb.2018.02732. [[DOI](#)] [[PMC bepul maqola](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Fadji A.E., Babalola O.O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. Front. Bioeng. Biotechnol. 2020;8:467. Doi: 10.3389/fbioe.2020.00467. [[DOI](#)] [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Pham H.N.T., Vuong Q.V., Bowyer M.C., Scarlett C.J. Phytochemicals derived from Catharanthus roseus and their health benefits. Technologies. 2020;8:80. Doi: 10.3390/technologies8040080. [[DOI](#)] [[Google Scholar](#)]

11. Tiwari P., Nithya R., Mahalingam G. Antidiabetic activity of endophytic fungi isolated from *Ficus religiosa*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2017;10:59. Doi: 10.22159/ajpcr.2017.v10i4.14718. [DOI] [Google Scholar].
12. Pandey S.S., Singh S., Babu C.S.V., Shanker K., Srivastava N.K., Shukla A.K., Kalra A. Fungal endophytes of *Catharanthus roseus* enhance vindoline content by modulating structural and regulatory genes related to terpenoid indole alkaloid biosynthesis. *Sci. Rep.* 2016;6:26583. Doi: 10.1038/srep26583. [DOI] [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
13. Suddhasuchi Das and Amit B Sharangi, Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(5): 1695-1701 2017
14. J.N.Mishra, N. K. Verma. A brief study on *Catharanthus Roseus*: A review *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. March 2017; Page No. 20-23
15. Emanuela Martinoa , Giuseppe Casamassima , Sonia Castiglione , Edoardo Cellupica , Serena Pantaloni , Francesca Papagni , Marta Ruib , Angela Marika Siciliano , Simona Colli. nab, Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* Volume 28, Issue 17, 15 September 2018, Pages 2816-2826
16. Ashoka H, Hegde P, Madihalli C et al (2017) Isolation and detection of vinca alkaloids from endophytes isolated from *Catharanthus roseus*. *Eur J Biomed Pharm Sci* 10:675–683
17. Kumar A, Patil D, Rajamohan PR, Ahmad A (2013) Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. *PLoS ONE* 8(9): e71805. doi:10.1371/journal.pone.0071805. September 2013 | Volume 8 | Issue 9 | e7180
18. R.Parthasarathy ^a, R.Shanmuganathan ^b, A.Pugazhendhi ^c Vinblastine production by the endophytic fungus *Curvularia verruculosa* from the leaves of *Catharanthus roseus* and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa cell line. *Analytical Biochemistry*. Volume 593, 15 March 2020, 113530. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113530>.]