



**O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI HUDUDIDA O‘SUVCHI MAHALIY
O‘SIMLIKlardan ENDOFIT MIKROORGANIZMLAR AJRATIB OLISH VA
ULARNING XILMA-XILLIGI**

*Jamalova Feruza Abdusalamovna (1), Annayev Muxriddin G‘iyos o‘g‘li(2),
Bo‘riqulova Nurafzo Hidoyatulloevna(3), Bahodirova Madinabonu Baxtiyor qizi(4)*

feruza.zhamalova@yandex.ru

*1.Samarqand Davlat Tibbiyot Universiteti stajoyor assitenti, 2.Agrobiotexnologiyalar va
oziq-ovqat xavfsizligi institutining ish yurutuvchi kotibi, 3,4.Mirzo Ulug‘bek nomidagi
O‘zbekiston Milliy Universiteti talabalari*

Annatotsiya Mazkur tadqiqotda O‘zbekiston Respublikasi hududida o‘sovchi mahaliy o‘simliklardan endofitik achitqilarni ajratib olish va ularning xilma-xilligini o‘rganish maqsad qilindi. Tadqiqotda endofitik mikroorganizmlar, xususan, achitqilar o‘simliklarning ichki to‘qimalarida yashab, turli ekologik va biologik jarayonlarda faol ishtirok etadigan mikroblar sifatida ko‘rib chiqildi. Ushbu mikroorganizmlar, shu jumladan, achitqilar, qishloq xo‘jaligi va farmatsevtika sanoatida muhim ahamiyatga ega bo‘lib, ularning o‘sishi va rivojlanishi o‘simliklarning himoya mexanizmlarini mustahkamlashi, biokontrollar vositalarini ishlab chiqarish kabi foydali xususiyatlar bilan bog‘liqdir. Tadqiqotda o‘simliklarning gullari va mevalaridan ajratilgan endofitik achitqilar MALDI-TOF MS va molekulyar-genetik usullar (18S rRNA, ITS1, ITS2) yordamida identifikatsiya qilindi. Tadqiqot natijalari, shu jumladan, endofitik achitqilarni morfologik va genetik tahlil qilish orqali o‘simliklar orasida o‘zgaruvchanlik va xilma-xillikni aniqlashda muhim rol o‘ynaydi. Tadqiqot, shuningdek, endofitik mikroorganizmlar bilan bog‘liq yangi ilmiy ma‘lumotlarga hissa qo‘shib, ularning ekologik va iqtisodiy ahamiyatini yaxshiroq tushunishga yordam beradi.

Kalit so‘zlar. Endofit mikroorganizmlar, molekulyar-genetik usullar, *Heterobasidion* turlari, *Capsicum annuum*.

Kirish.

Endofit mikroorganizmlar o‘simliklarning ichki to‘qimalarida yashab, ularga turli ta‘sir ko‘rsatadi. Bu borada endofit mikroorganizmlar qatoriga bakteriyalar, zamburug‘lar, achitqilar kabilarni keltirish mumkin. Jumladan, endofit achitqilar nisbatan kam o‘rganilgan va ularning farmasivtika, qishloq xo‘jaligi, oziq-ovqat sanoatidagi ahamiyati toboro ortib bormoqda. Bundan tashqari endofit achitqilarning o‘simliklarning himoya mexanizmlarini mustahkamlashi, biologik nazorat vositalari, ikkilamchi metabolitlar ishlab chiqarishim kabi bir

qancha xususiyatlari ham o‘z ahamiyati jihatdan muhim hisoblanadi (Jong et al., 2008; Waller et al., 2012). *Heterobasidion* turlari, masalan, *H. annosum* va *H. insulare*, o‘rmon daraxtlarida ildiz chirishi kasalligini keltirib chiqaradi va o‘rmon xo‘jaligi uchun katta iqtisodiy zararlarni keltirib chiqarishi mumkin (Garbelotto et al., 2001; Stenlid et al., 2004). Chili qalampiri (*Capsicum annuum* L.) endofitik mikroorganizmlar va ularning o‘simliklar bilan o‘zaro aloqalari bo‘yicha tadqiqotlar uchun yangi maydon yaratadi. Bu o‘simlikda yangi turlarni aniqlash, shu jumladan *Heterobasidion* turining mavjudligi, biologik xilma-xillikni va endofitik organizmlar bilan o‘zaro aloqalarni yaxshiroq tushunishga yordam beradi (Vargas et al., 2007; Martinez et al., 2011). *Heterobasidion* turlarining filogenetik tahlillari, masalan, *H. annosum* ning Yevropa, Xitoy va Yaponiya populyatsiyalari orasidagi o‘xshashlikni o‘rganish, endofitik mikroorganizmlarning o‘zgarishini va tarqalishini aniqlashda yordam beradi (Linaldeddu et al., 2009; Dai et al., 2010). Jumaladan, o‘simliklardan endofit achitqilar ajratib olish bo‘yicha yana bir qancha ishlar amalga oshirilib borilmoqda. Shu sababdan ham Respublika hududida o‘svuvchi mahaliy o‘simliklarda ham aniqlangan, ajratib olingan endofit achitqilarni o‘rganish, ularni identifikatsiya qilishni tadqiqotlarimiz maqsadi etib belgilab oldik.

2. Tadqiqot metodlari

2.1. Endofit achitqilarni ajratib olish, aniqlash.

Endofit achitqilarni ajratib olish uchun o‘simliklarning gullari 2024-yil bahor oylarida Toshkentning Yunusobod tumanidan, mevalari esa respublikaning turli hududlaridan may va iyun, sentabr oylarida keltirilgan va ulardan olingan endofit achitqilar asosida keyingi ishlar davom ettirilgan. O‘simliklar morfologik belgilariga ko‘ra identifikatsiya qilingan.

Ozuqa muhit sifatida Saburo muhiti tarkibi (g/l): glyukoza - 40.0, pepton – 10.0, pH-6.5±1 ishlatilgan. Endofit achitqilar o‘simliklarning yangi mevalari va generativ qismlaridan Abdel-Hafez va boshqalar usul bilan ajratildi [7].

Ishda bevosita ajratish va suyuq ozuqa muhitga chuqur ekish usuli qo‘llanilgan. O‘rganilgan namunalar aseptik sharoitda, turli xil kombinatsiyalangan sterilizatsiya vositalaridan (etanol 70%, NaOCl 3%) va sirt sterilizatsiyasi uchun ta'sir qilish muddatidan foydalangan holda maydalangan. Mevalar 3-5 daqiqa davomida strelizatsiya qilindi, namunalari 5 mmgacha kichik bo‘laklarga bo‘lindi va maydalangan namunalar kolbalarga olindi. Ozuqa muhitga bakteriya rivojlanishga to‘sqinlik qilishi uchun 200 mkg/l miqdorda sefotaksim qo‘shildi. Ekishda bakteriyalarga qarshi antibiotik sifatida sefatksim (200mkg/ml)dan foydalandik.

Inkubatsiya 5-14 kun davomida, 28-30C haroratda, kolbalarda termostatik sharoitda va 180 aylanish tezligidagi tebratgichda o‘tkazildi. Shundan so‘ng visual o‘zgarishlar (loyqalik, gaz hosil bo‘lishi) paydo bo‘lgandan so‘ng, shtrix usuli bilan petrilarga olindi. Petrilardagi achitqiga o‘xshash koloniyalar mikroskopik tekshiruvlardan o‘tkazildi va bir xil muhitli, antibiotiksiz kasaklarga olindi

Olingan izolyatlar dastlab Kurtzman va boshqalar (2000) ma’lumotlariga ko‘ra tasniflandi. So‘ng MALDI-TOF va DNK amplifikatsiyasi va sekvenlash usuli orqali identifikatsiya qilindi.

Dastlabki a'naviy klassifikatsiya uchun achitqi koloniyasi shakli, rangi, katta-kichikligi, hujayrasining morfologik tuzulishi o'rganildi. Bunda petri likopchachasida o'stirilgan 3-5 kunlik achitqi koloniyalaridan foydalanildi. MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) mikrobiologik klinik laboratoriyada patogen bakteriyalarni, ayniqsa mikroaeroblar, anaeroblar, mikobakteriyalar va zamburug'larni aniqlash uchun qo'llanilayotgan va keng tarqalgan metod hisoblanadi. Namuna olish uchun (inkubatsiya 25°C, 3-5 kun), ajratilgan koloniyalar muhitdan olinib, 300 µL steril distillangan suvga solib, aralashtiriladi. Keyin, 900 µL etanol qo'shib, aralashma 13 000 × g tezlikda 2 daqiqa davomida sentrifugalanadi. Pellet olinib, xona haroratida qurutiladi. Qurutilgan pelletga 10 µL formik kislota qo'shib, aralashtiriladi va 10 µL asetonitril qo'shib, aralashma yaxshilab qamrab olinadi. MALDI-TOF Mass Spectrometry usulida formik kislota namunalarni tayyorlanishida ishlatiladi, chunki u mikrobial hujayralar yoki ularning komponentlarini optimal holatda fragmentatsiya qilishga yordam beradi. Bu kislota tarkibidagi protonlar orqali proteinlarning ionizatsiyasini yaxshilanadi, bu esa spektrni aniqroq olish imkonini beradi. Ushbu aralashma yana maksimal tezlikda 2 daqiqa sentrifugalanadi va supernatantning 1 µL si silliq, maxsus MALDI plastinkasiga tomiziladi. So'ng, har bir joyga 1 µL matrisa eritmasi qo'shib, havoda qurutiladi. Namuna MALDI-TOF MSda flex Control dasturi v3.4 yordamida ishlanadi va natijalar Realtime Classification dasturi (RTC) v3.1 yordamida tahlil qilinadi [8]. MALDI-TOFF MS da identifikatsiya qilinmagan ba'zi shtammlar zamonaviy genetika usullari yordamida aniqlandi. Bunda 18S rRNA, ITS1 va ITS2 genlarining sekvensiyalarini o'rganish orqali amalga oshirildi. Dastlab achitqi namunalari 48-72 soat suyuq ozuqa muhitda o'stirilib, DNK ajratib olish uchun namunalar to'plandi, ular DNK ekstraksiyalash orqali olindi. 18S rRNA, ITS1 va ITS2 regionlarining qisman va to'liq ketma-ketliklarini olish uchun polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) usuli qo'llaniladi. Buning uchun yuqorida keltirilgan genlar va ITS (Internal Transcribed Spacer) hududlarining maxsus primerlari tanlanadi.

18S rRNA, ITS1 va ITS2 regionlarining qisman va to'liq ketma-ketliklarini olish uchun polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) usuli qo'llaniladi. Buning uchun yuqorida keltirilgan genlar va ITS (Internal Transcribed Spacer) hududlarining maxsus primerlari tanlanadi. Amplifikatsiya natijalarini agaroz gel elektroforezida tekshirildi. Amplifikatsiya qilingan mahsulotlar Sanger sekvenslash usuli yordamida to'liq ketma-ketlikka aylantiriladi. Bu usul yordamida molekulyar ma'lumotlar aniqlanadi va natijalar sekvensiyaning uzunligi va sifatini baholash uchun oqimlar ko'rsatiladi. Boshqa sekvencing tizimlari (masalan, Illumina yoki PacBio) ham ishlatilishi mumkin, ammo Sanger usuli oddiy va an'naviy usul sifatida keng qo'llaniladi. Sekvenlangan ketma-ketliklar gen banklari, masalan, NCBI (National Center for Biotechnology Information) yoki GenBank ma'lumotlar bazasi yordamida taqqoslanadi. Raqamli taxminiy tahlil va filogenetik daraxtlar qurish uchun ma'lumotlar asosida phylogenetik tahlil, BLAST qidiruvi va boshqa bioinformatik vositalar ishlatiladi.

Natija va muhokama

MALDI-TOF MS usuli orqali endofitik achitqalarning ba'zi guruhlarini aniqlash mumkin bo'lsa ham, ba'zi shtammlarni aniqlash qiyin bo'lganligi sababli molekulyar-genetik usullar, masalan, 18S rRNA geni, ITS1 va ITS2 ketma-ketliklari orqali aniqlash amalga oshirildi. Ushbu usullar mikrobial genetik tahlil va taksonomik tasniflashda muhim rol o'ynaydi.

18S rRNA geni: 18S rRNA geni, eukaryotik hujayralarda ribosomada joylashgan va protein sinteziga yordam beradigan zaruriy molekula hisoblanadi. U yuqori darajada saqlangan va ko'plab eukaryotik organizmlarda o'xshash tuzilishga ega. Shu sababli, 18S rRNA genini tizimli tasniflash va identifikatsiya qilishda keng qo'llaniladi. Bu gen sekanslanib, polimeraza zanjiri reaksiyasi (PCR) yordamida amplifikatsiyalanadi, keyin esa sekanslangan DNA ketma-ketliklari bioinformatik tahlil yordamida turli organizmlar bilan taqqoslanadi.

ITS1 va ITS2: Internal Transcribed Spacer (ITS) mintaqalari — ribosomal genlar (18S, 5.8S, va 28S) orasida joylashgan va transkripsiya qilinmaydigan qismlar bo'lib, ularning o'zgaruvchanligi ularni taksonomik tasniflashda samarali qilishga imkon beradi. ITS1 va ITS2 bu mintaqalarning birinchi va ikkinchi qismlari bo'lib, ular o'zgarmas, lekin turli organizmlar orasida taxonomik farqlarni aniqlashda muhim rol o'ynaydi. Bu qismlar yuqori darajada o'zgaruvchan, shuning uchun tahlil qilishda ishonchli identifikatsiya ta'minlanadi, lekin ba'zan yuqori darajadagi o'zgarishlar bo'lishi mumkin, bu esa tahlilni murakkablashtiradi. Bu metodlar o'zgaruvchan qismlarni tahlil qilish orqali yuqori darajada aniqlik bilan organizmlarni identifikatsiya qilishni ta'minlaydi.

Endofit mikroorganizmlarning morfologik xarakteristikasi

	Izolyat	Izolyatsiya manbai	Koloniya shakli	Koloniya rangi	Hujayrasining morfologiyasi
1	CVP	<i>Cerasus vulgaris</i>	Chetlari notekis to'liqinsimon, ustki qismida bo'rtmasi bor	Och qo'ng'ir	Ellipssimon, cho'ziq 6-7 mkm
2.	FCP	<i>Ficus carica</i>	Yumaloq, chegaralangan, ustki qismi burmali	Sarg'ish-oq	Yumaloq-tuxumsimon, 5-6 mkm
3.	A1	<i>Ficus carica</i>	Chetlari burmali, yumaloq, ustki qismida izlari bor	Och malla	Yumaloq, yassi, 5-6 mkm
4.	A3	<i>Ficus carica</i>		Och malla	3-5 mkm, tuxumsimon, cho'zilgan
5.	D1	<i>Crateagus pontica L</i>	Chetki qismi to'liqinsimon, yumaloq, usti donador	Malla	Yumaloq, yassi, 5-6 mkm

6.	D2	<i>Crateagus pontica L</i>	Donador, chegaralangan, dumaloq	Och sariq	3-5 mkm, tuxumsimon, cho‘zilgan
7.	D3	<i>Crateagus pontica L</i>	Ustki qismi naqshsimon, cheti burmali, yumaloq	Sarg‘ish	Ellipssimon, cho‘ziq 6-7 mkm
8.	PCP	<i>Prunus domestica</i>	Yumaloq, chegaralangan, donador	Oq	ovalsimon, yirik, 4-5 mkm
9.	M1	<i>Rubus idaeus</i>	Donador, yumaloq, chegaralangan	Och qo‘ng‘ir	Uzun yumaloq, 5-6 mkm
10.	M2	<i>Rubus idaeus</i>	Yumaloq, chetlari patsimon, chegaralangan	Sarg‘ish-oq	Ellipsimon, cho‘ziq, 4-5 mkm
11.	PAP	<i>Pyrus armeniacifolia</i>	Yumaloq, chegaralangan, ustki qismida izlari bor	Oq	Limonsimon, cho‘ziq 3-4 mkm

Ushbu jadvaldan k‘orinib turibdiki, endofit mikroorganizmlarning dastlab morfologik jihatdan tahlil qilib, keyin ularni zamonaviy usullarda identifikatsiyasi amalga oshirilishi maqsadga muvofiq ekanini ko‘rishimiz mumkin.

Xulosa

Mazkur tadqiqotning natijalari O‘zbekiston hududidagi turli mahaliy o‘simliklardan ajratilgan endofitik achitqilarni aniqlashda MALDI-TOF MS va molekulyar-genetik usullarni qo‘llash samaradorligini ko‘rsatdi. Endofitik achitqilar o‘simliklar bilan o‘zaro aloqada bo‘lib, o‘zgaruvchan genetik belgilar va morfologik xususiyatlarga ega. Ushbu tadqiqot endofitik mikroorganizmlarning turli o‘simliklarda qanday xilma-xillikka ega ekanligini va ular o‘simliklarning ekologik va biotik jarayonlaridagi rolini tushunishda katta ahamiyat kasb etadi. Endofitik achitqilarni o‘rganish qishloq xo‘jaligi va farmatsevtika sohalarida ularni qo‘llashning yangi imkoniyatlarini ochib beradi. Tadqiqotda keltirilgan metodlar yordamida endofitik mikroorganizmlarning keng spektrli o‘rganilishi, ularning xilma-xilligini va potentsialini aniqlashda muhim qadamdir.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR.

- Doty, S.L. (2013). Endophytic Yeasts: Biology and Applications. In: Aroca, R. (eds) Symbiotic Endophytes. Soil Biology, vol 37. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39317-4_17
- Ling, L., Tu, Y., Ma, W. et al. A potentially important resource: endophytic yeasts. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 110 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02889-0>

3. Jamal, A., Farhat, H., Urooj, F. *et al.* Characterization of endophytic yeast and its suppressive effect on root rotting fungi of tomato under neem cake soil amendment. *Egypt J Biol Pest Control* 31, 152 (2021). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00493-4>
4. Bhuyan, B., Hansepi, P. K., Akhtar, S., Ahmed, R., Laskar, R. A., & Tayung, K. (2023). Isolation of yeast endophytes from healthy seeds of *Capsicum annuum* L. and assessment of their antimicrobial activity. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 11, 111-116.
5. Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2014). Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal biology*, 118(8), 683-694.
6. Kachalkin, A., Glushakova, A., & Streletskii, R. (2022). Diversity of endophytic yeasts from agricultural fruits positive for phytohormone IAA production. *BioTech*, 11(3), 38.
7. Abdel-Hafez, S. I. I. (1981). Phyllosphere and phylloplane fungi of wheat cultivated in Saudi Arabia. *Mycopathologia*, 75(1), 33-38.
8. Attila, K. Ą., Hutková, J., & Petrová, J. (2015). Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 5(3), 282-285.
9. Schmit, J. P., & Lodge, D. J. (2005). Classical methods and modern analysis for studying fungal diversity. *Mycology Series*, 23, 193.
10. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011) Chapter 7 methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *Yeasts* 1(14):87–110
11. Ling L. et al. Identification of novel endophytic yeast strains from tangerine peel //Current Microbiology. – 2019. – T. 76. – C. 1066-1072.
12. Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
13. Lachance, M. A. (2018). CP Kurtzman's evolving concepts of species, genus and higher categories. *FEMS yeast research*, 18(8), foy103.
14. Hoggard, M., Vesty, A., Wong, G., Montgomery, J. M., Fourie, C., Douglas, R. G., ... & Taylor, M. W. (2018). Characterizing the human mycobiota: a comparison of small subunit rRNA, ITS1, ITS2, and large subunit rRNA genomic targets. *Frontiers in microbiology*, 9, 2208.
15. Polomska, X., Juszczuk, P., Cadez, N., Raspor, P., Robak, M., & Wojtatowicz, M. (2007). Comparison of physiological and PCR-RFLP rDNA identification of yeast species commonly found in cheese. *Polish journal of food and Nutrition Sciences*, 57(2), 221-226.