



Husniddin KARIMOV,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti tayanch doktoranti
Email: karimov_h_kh@mail.ru
Zarnigor RUZIYEVA,
Qarshi davlat universiteti o'qituvchisi
Email: zarnigorruziyeva@mail.ru
Luqmon KAMOLOV,
Qarshi davlat universiteti dotsenti
Email: kamolov.luqmon@mail.ru
Nodira AZIMOVA,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi
Email: azimovanodira@mail.ru
Xursheda XAMIDOVA,
O'zR FA Mikrobiologiya instituti katta ilmiy xodimi,
Email: khamidovakh@mail.ru

O'zMU Biologiya fakulteti o'qituvchisi (RhD) Sh.Qo'ziyev taqrizi asosida

TRICHODERMA ASPERELLUM Uz-A4 MICROMYCETES – A SOURCE OF USEFUL SECONDARY METABOLITES

Annotation

The micromycete fungus *Trichoderma asperellum* Uz-A4 produces many important secondary metabolites with high biological activity. The article analyzes biomass extracts using mass spectral gas liquid chromatography (GX-MS). Data are given on volatile substances related to secondary metabolites formed in the culture liquid of *Trichoderma asperellum* Uz-A4. Using GSX-MS analysis, 3-isopropyl-7 α -methyl-1,4,5,6,7,7 α -hexahydro-2N-inden-2-one, 3,8-dimethyl-5-(propyl-1-ene - 2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydroazulene, 2-((1R,4R)-1,4,8-trimethyl-spirodecyl-7-en-1) propane-2. The presence of metabolites -ol,4-isopropyl-1-methyl-6-methylenedecahydro-naphthalene-1,4a-diol was determined.

Keywords: *Trichoderma*, terpenoid, alkaloid, secondary metabolite, microorganism.

TRICHODERMA ASPERELLUM Uz-A4 МИКРОМИЦЕТЫ-ИСТОЧНИК ПОЛЕЗНЫХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Аннотация

Гриб-микромикет *Trichoderma asperellum* Uz-A4 продуцирует множество важных вторичных метаболитов с высокой биологической активностью. В статье проведен анализ экстрактов биомассы с помощью масс-спектральной газовой жидкостной хроматографии (GX-MS). Приведены данные о летучих веществах, относящихся к вторичным метаболитам, образующимся в культуральной жидкости *Trichoderma asperellum* Uz-A4. Используя анализ GSX-MS, 3-изопропил-7 α -метил-1,4,5,6,7,7 α -гексагидро-2N-инден-2-он, 3,8-диметил-5-(пропил-1-ен - 2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-октагидроазулен, 2-((1R,4R)-1,4,8-триметил-спиродецил-7-ен-1)пропан-2. Было определено присутствие метаболитов-ол,4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидро нафталин-1,4a-диола.

Ключевые слова: *Trichoderma*, терпеноид, алкалоид, вторичный метаболит, микроорганизм.

TRICHODERMA ASPERELLUM Uz-A4 MIKROMITSETI-FOYDALI IKKILAMCHI METABOLITLAR MANBAI

Annotatsiya

Trichoderma asperellum Uz-A4 mikromitset zamburug'i yuqori biologik faollikka ega bo'lgan ko'plab muhim ikkilamchi metabolitlarni hosil qiladi. Maqolada biomassa ekstraktlarida mass-spektrli gaz xromatografiyasi (GX-MS) tahlillari olib borildi. *Trichoderma asperellum* Uz-A4 kultural suyug'ligida hosil bo'lgan ikkilamchi metabolitlarga mansub uchuvchan moddalar to'g'risida ma'lumotlar berildi. GX-MS analizi yordamida 3-izopropil-7 α -metil-1,4,5,6,7,7 α -geksagidro-2N-inden-2-on, 3,8-dimetil-5-(propil-1-yen-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidro azulen, 2-((1R,4R)-1, 4, 8-trimetil-spirodekil-7-en-1) propan-2-ol, 4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidro naftalin-1,4a-diol metabolitlarining mavjudligi aniqlandi.

Калит сўзлар: *Trichoderma*, терпеноид, алкалоид, ikkilamchi metabolit, mikroorganizm.

Kirish. Keyingi yillarda o'simliklarda uchraydigan fitopatogen kasalliklar nisbati sezilarli darajada oshib bormoqda. Jumladan, turli xil zararkunanda hasharotlar hamda fitopatogen mikroorganizmlar ta'sirida juda katta miqdordagi qishloq xo'jalik mahsulotlari yo'qotilmoqda. Birgina fitopatogen mikroorganizmlar ta'sirida qishloq xo'jaligi sohasida 1,4 trillion dollarga teng miqdorda zarar yetkazishi, bu esa, umumiy yalpi ichki mahsulotning 5% ni tashkil etishi, hamda, zararkunanda hasharotlar va turli xil kasalliklar oqibatida dunyo bo'yicha tayyorlanayotgan qishloq xo'jalik mahsulotlarining 20-25% miqdori yo'qotilishi qayd etilmoqda. Shuningdek, 2030 yilga borib esa, oziq-ovqat mahsulotlariga bo'lgan talab 50% ga oshishi, 2050 yilda esa, dunyoda aholini qishloq xo'jaligi va chorvachilik mahsulotlariga bo'lgan talabini qondirish uchun mahsulotlar ishlab chiqarish 60% gacha o'sishi lozimligi qayd etilmoqda. Bu borada o'simliklarni himoya qilish uchun biologik samarali biofungitsidlardan foydalanish davr talabidir. Fitopatogen zamburug'larga qarshi kurashish maqsadida ko'plab olimlar *Trichoderma* turkumi zamburug'lari ustida ilmiy tadqiqot ishlari olib bormoqda.

Mavzuga oid adabiyotlar tahlili. *Trichoderma* zamburug'i o'zining tijorat fermentlari, o'simliklarning o'sishini tezlashtiradigan fitogormonlar va o'simlik kasalliklarini bionazorat qiluvchi antibiotiklar ishlab chiqarish xususiyati bilan istiqbolli bo'lib, sanoat, qishloq xo'jaligi va dori ishlab chiqarishni rivojlantirishda katta hissa qo'shgan [1-3]. Global miqyosda *Trichoderma* zamburug'i samarali biologik nazorat preparati sifatida katta muvaffaqiyatlarga erishgani isbotlandi [4]. *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. virens* ba *T. viride* kabi ko'plab *Trichoderma* turlaridan dunyo bo'ylab kuchli bionazorat agentlari sifatida foydalaniladi [2]. *Trichoderma* zamburug'i turlari bilvosita (oziq moddalarni qidirish, atrof-muhit sharoitlarini o'zgartirish, o'simliklarning o'sishi va himoya reaksiyalarini rag'batlantirish) yoki to'g'ridan-to'g'ri (mikoparazitizm) mexanizmlar orqali patogen mikroorganizmlarga qarshi ajoyib bionazorat qobiliyatini namoyish etadi [2]. Bundan tashqari, ekologik ta'sirlardan tashqari, *Trichoderma* mikrozamburug'i nafaqat signal uzatishda ishtirok etadigan, balki turli organizmlar bilan aloqa o'rnatadigan ikkilamchi metabolitlarni ishlab chiqarishi mumkinligi ma'lum [4-5]. Shuningdek, *Trichoderma* zamburug'ining bionazorat preparatlarini sintez qilish bo'yicha muvaffaqiyatlari, hech bo'lmaganda qisman, ularning ko'p ikkilamchi metabolitlarni ajratish qobiliyatiga bog'liq [5]. Zamburug'lar insoniyat tarixi davomida dori vositalarini kashf etishda ajralmas rol o'ynaydi, chunki ular muhim tibbiy salohiyatga ega bo'lgan turli ikkilamchi metabolitlarni sintez qilish uchun noyob qobiliyatga ega [5].

Trichoderma turkumi zamburug'lari turli yashash muhitlarida keng tarqalgan. Bugungi kunga qadar dengizdan olingan *Trichoderma* turlaridan mikroalgal, antibakterial, antifungal, sitotoksik va fermentlarni ingiberlovchi xususiyatlarga ega yuzdan ortiq yangi terpenlar, steroidlar, poliketidlar, alkaloidlar va peptidlar olingan. Ular orasida *T. asperellum* eng mahsuldor turlardan biri bo'lib, uning dengiz suv o'tlari va cho'kindilaridan izolatlar asosan mentan, bisabolan, sikloneran, xarzan, ergostan, oksazol, dikeiperazinni o'z ichiga olgan bir qancha yangi terpenlar va alkaloidlar hosil qilgan. *T. asperellum* ning dengiz algikoloz shtammlari metabolitlarining yuqori yangiligi va xilma-xilligi ularni yanada tadqiq qilish bo'yicha amaliy ahamiyatga egadir.

Material va metodlar. Buxoro viloyati Jondor tumani paxta dalasi tuproqlaridan ajratib olingan *Trichoderma asperellum* Uz-A4 shtammi agarli Mandels muhitida (probirkada) 6 kun davomida o'stirildi va 10^{6-7} spora/ml konsentratsiyadagi suspenziyasidan ekuv materiali sifatida foydalanildi.

Trichoderma asperellum Uz-A4 mikroskopik zamburug'i o'zgartirilgan Mandels (g/l: $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 2,3$; $\text{MgSO}_4 - 0,5$; $\text{CaCl}_2 - 0,3$; saxaroza - 20; (pH 5,5)) ozuqa muhitida 500 ml hajmli Erlenmeyner kolbalarida 250 ml ozuqa muhitida, 180 marta aylanish/min tezligidagi chayqatgichda (IKA® KS 130 shakers), 24-26°C haroratda 14 kun davomida o'stirildi va ularning kultural suyuqligi biomassasidan filtrlash orqali ajratildi.

Mandels ozuqa muhitida 14 kun davomida kachalkada o'stirilgan *Trichoderma asperellum* Uz-A4 shtammining biomassasi kultural suyuqlikdan ajratildi va liofilli vakuumli quritish uskunasida 15-20°C da zamburug' biomassasi quritildi. Quritilgan va maydalangan 12,15 gr biomassa ustiga 50 ml metanol quyilib bir kun qoldirildi. Metanol biomassadan filtrlanib ajratildi va bu jarayon uch marta takrorlandi. Ajratib olingan metanol vakuumli rotorli haydash uskuna bilan erituvchi ajratilib, ekstraksiyon summa olindi. Ekstraksiyon summa miqdori 6,45 gr ni tashkil qildi.

Kultural suyuqlik, ya'ni suvli qismini 0,1% natriy gidrokarbonat eritmasi bilan pH=7 muhitida keltirilib, xloroform bilan ekstraksiya qilindi. Ekstraksiya jarayonidan ajratib olingan xloroform vakuumli rotorli haydash uskuna yordamida erituvchidan ajratilib 0,99 gr quritilgan ekstraksiyon summa olindi. YUQX ma'lumotlariga ko'ra ikkala summa ham bir xil tarkibga ega ekanligi aniqlanib, metanolli va xloroformli ekstraksiyon summalar birga qo'shib 7,34 gr ekstraksiyon summa olindi (1-jadval).

1-jadval

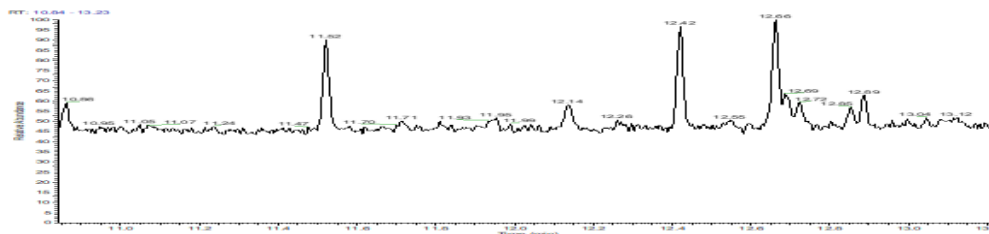
Trichoderma asperellum Uz-A4 shtammining ikkilamchi metabolitlarining miqdoriy analiz natijalari

Shtammining o'sish vaqti (kun)	Kultural suyuqlik hajmi (ml)	Ekstraksiyon summa (gr)	Quruq biomassa (gr)	Ekstraksiyon summa (gr)	Jami ekstraksiyon summa (gr)
3	10 000	0,62	6,6	2,25	2,87
7	10 000	0,73	9,2	3,56	4,29
14	10 000	0,89	12,15	6,45	7,34
20	10 000	0,48	14,52	4,46	4,94

DB-5MSkolonkasi bilan jihozlangan YL 6900 GX / MS (Young In Chromass, Koreya) (30 m× 0,25 mm ichki diametr, 0,25 mkm plyonkaning qalinligi) yordamida YL 6900 GX/MS gaz xromatografiyasi bilan mass-spektrometrik detektorda noma'lum uchuvchan moddalar aniqlandi. Pechning harorati - dastlabki - 80°C/3,0 min, isitish tezligi - 15°C/min dan 250°C gacha, ushlab turish - 3,0 min, Geliy 1,0 ml/min oqim tezligida tashuvchi gaz sifatida ishlatilgan. Bug'latuvchi harorati - 280°C, oqim bo'limi - 1/20, tahlil vaqti - 17 min. ni tashkil qildi. Suyuq namunalar isparitelga 1 mkl hajmdagi mikro shprits yordamida AOK qilindi. Uzatish liniyasining harorati - 300°C, ionlanish kuchlanishi -70 eV, ion manbaining harorati esa 230°C bo'ldi. Skanerlash diapazoni - 30-350 a.m.u. Komponentlar MS kutubxona NIST 2017-dagi mavjud spektral ma'lumotlar bilan taqqoslagandan so'ng har bir komponentning massa spektrlaridan aniqlandi.

Tadqiqot natijalari. *Trichoderma* asosida yaratilgan biopreparatlar sabzavotchilikda, poliz ekinlarini yetishtirishda, yopiq grunt sharoitida ya'ni issiqxonalarda, bog'dorchilikda, uzumchilikda va turli manzarali o'simliklar va daraxtlarni yetishtirishda ishlatiladi. Ushbu mikromitset o'simliklarni fitopatogenlardan himoyalaydi. Urug'ning unib chiqish quvvatini oshiradi, o'simlikning o'sishini kuchaytiradi, moddalar almashinuvini oshiradi, barg plastinka sathini kengaytiradi, tuproqning strukturasini yaxshilaydi, g'ovakligini oshiradi, tuproq hamda o'simlikka polefunktional ta'sir mexanizmiga ega samaradorligi yuqori bo'lgan biologik nazorat agenti hisoblanadi. *Trichoderma* turkumiga mansub mikromitsetlar bir qator biologik faol moddalarni birlamchi metabolitlar (fermentlar), ikkilamchi metabolitlar (fitogormonlar) va 100 dan ortiq antibiotiklarni sintezlaydi hamda biokontrol agenti sifatida dunyo miqyosida foydalaniladi.

Ikkilamchi metabolitlarini aniqlash uchun dastlab *Trichoderma asperellum* Uz-A4 shtammi ekstrakti mass-spektrli gaz xromatografiyasi (GX-MC) tahlillari olib borildi (1-rasm).



1-rasm. *Trichoderma asperellum* Uz-A4 zamburug' shtammi kultural ekstrakti GCX xromatogrammasi

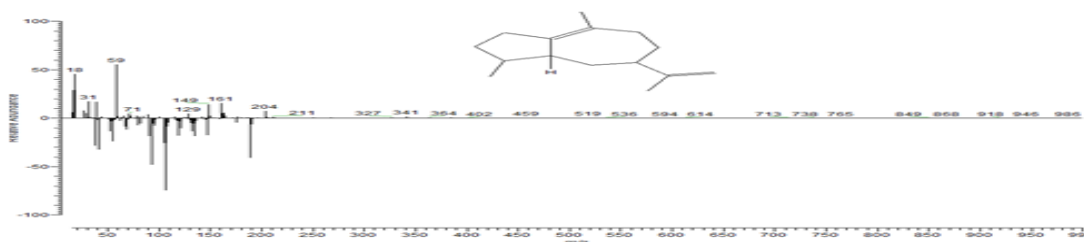
Xromatogramma ba'zi spektrlari yutilish tezligiga qarab IX -MC kutubxona ba'zasi bilan solishtirilganda 3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2H-inden-2-on, 3,8-dimetil-5-(propil-1-en-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidroazulen, 2-((1R,4R)-1,4,8-trimetil-spiro [4,5]dekil-7-en-1)propan-2-ol, 4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidronaftalin-1,4a-diol uchuvchan metabolitlari ekanligi aniqlandi (1-jadval).

1-jadval.

Trichoderma asperellum Uz-A4 zamburug' shtammi kultural ekstrakti GSX da olingan spektrlarini MS kutubxonasidagi baza bilan aniqlash

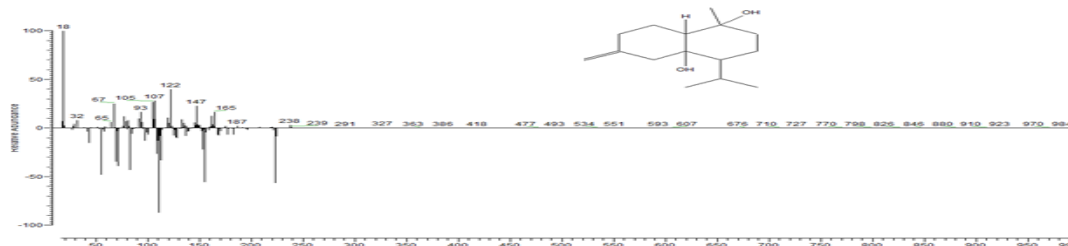
№	Metabolit nomlari	Kimyoviy formula	Molekulyar massa: g/mol kDa	Yutilish vaqti
1	3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2N-inden-2-on	C ₁₃ H ₂₀ O	192	12,85
2	3,8-dimetil-5-(propil-1-yen-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidroazulen	C ₁₅ H ₂₄	204	12,14
3	2-((1R,4R)-1,4,8-trimetilspiro dekil-7-en-1)propan-2-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	11,52
4	4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidronaftalin-1,4a-diol	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	12,42

Trichoderma asperellum Uz-A4 zamburug'i biomassasi ekstrakti uchuvchan moddalar aniqlanganda, 3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2N-inden-2-on moddasi borligi namoyon bo'ldi. Ushbu moddaning yutilish tezligi 12,85 minut ekanligi xromatogrammada namoyon bo'ldi (2-rasm). 3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2N-inden-2-on tabiatan uchuvchan modda bo'lsada, *Trichoderma* turkumi zamburug'larining antagonistlik qobiliyatini yanada oshirib beradi. 3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2N-inden-2-on tadqiqotlarda keltirilishicha *F. incarnatum* ni 21.68% dan 74.29% gacha o'sishini to'xtata olgan [7].



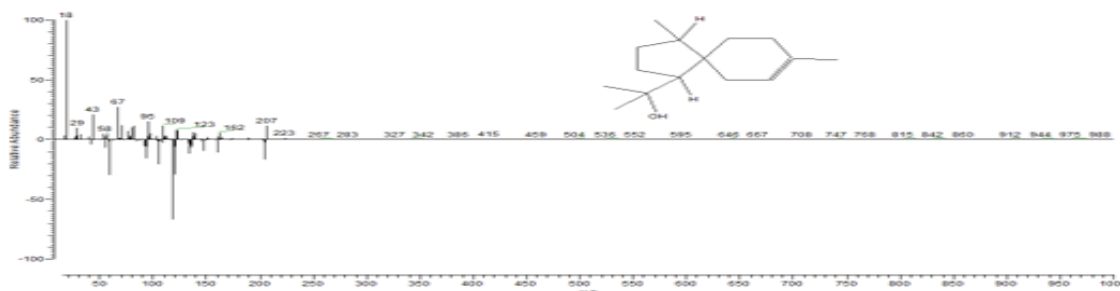
2-rasm. 3-izopropil-7a-metil-1,4,5,6,7,7a-geksagidro-2N-inden-2-on mass- xromatogrammasi

3,8-dimetil-5-(propil-1-yen-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidroazulen ikkilamchi metaboliti 12,14 minutda yutilish tezligini namoyon qildi (3-rasm.). Adabiyotlardan ma'lumki, 3,8-dimetil-5-(propil-1-yen-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidroazulen birikma *Trichoderma* turkumi zamburug'larining ferment hosil qilishida ishtirok etadi [8].



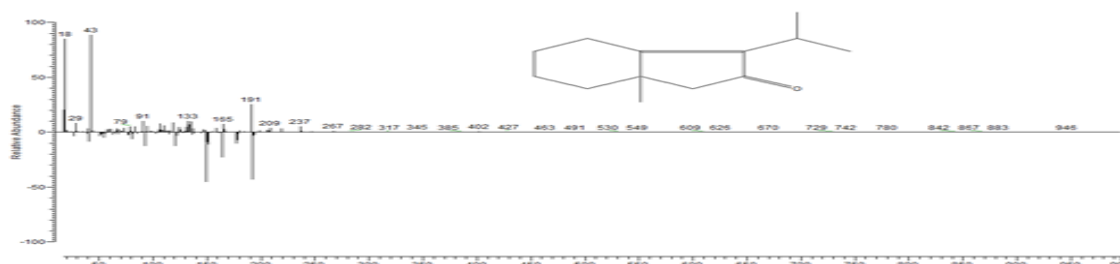
3-rasm. 3,8-dimetil-5-(propil-1-yen-2)-1,2,3,3a,4,5,6,7-oktagidroazulen mass - xromatogrammasi

2-((1R,4R)-1,4,8-trimetilspiro[4.5]dekil-7-en-1)propan-2-ol GX xromatogrammasida 11,52 minutda yutilish tezligini ko'rsatdi (4-rasm). Mazkur modda hozirgi vaqtda meva-sabzavotlarni saqlashda, qadoqlashda, kosmetikada ishlatilib kelinmoqda [9].



4-rasm. 2-((1R,4R)-1,4,8-trimetilspiro [4.5]dek-7-en-1) propan-2-ol xromatogrammasi

4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidronaftalin-1,4a-diol moddasining uchuvchanligi nisbatan yuqori bo'lib, xromatogrammada 12,42 minutda yutilish tezligini hosil qildi (5-rasm). Adabiyotlardan ma'lumki 4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidronaftalin-1,4a-dioltabiyan organik mahsulot bo'lib yog'li spirt sanaladi. Mikroorganizm metabolitlari sifatida *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus flavus* mikromitset zamburug'lari ham etilatsetatda ekstraksiya qilinib, GX-MS qilinganda metabolitlar tarkibida mavjudligi aniqlangan [10].



5-rasm. 4-izopropil-1-metil-6-metilendekagidronaftalin-1,4a-diol xromatogrammasi

Xulosa. Ushbu tadqiqot natijalari shuni ko'rsatdiki, *Trichoderma asperellum* Uz-A4 mikromitset zamburug'i yuqori biologik faollikka ega bo'lgan ko'plab muhim ikkilamchi metabolitlarni hosil qiladi. Mazkur 5 turdagi ikkilamchi metabolitlar adabiyotlarda keltirilganidek antifungal, fermentativ, toksiklik, bioaktivlik xususiyatlarni namoyon qiladi. Ko'pgina mikrobiologik kasalliklarni davolash, dori sanoati, fermentativ ozuqa ishlab chiqarish uchun *Trichoderma asperellum* Uz-A4 zamburug'ining metabolitlaridan foydalanishni yo'lga qo'yish zarur. *Trichoderma* turlari tomonidan ishlab chiqarilgan metabolitlarni tozalash va sanoat miqyosida ishlab chiqarish bugungi kunning muhim foydali tarmoqlariga aylanishi mumkin.

ADABIYOTLAR

1. Cai F., Yu G., Wang P., Wei Z., Fu L., Shen Q. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, 73, -p. 106–113.
2. Bhardwaj N., and Kumar J. Characterization of volatile secondary metabolites from *Trichoderma asperellum*. *J. Appl. Nat. Sci.*, 2017, 9, -p.954–959.
3. McMullin D. R., Renaud J. B., Barasubiye T., Sumarah M. W., and Miller J. D. Metabolites of *Trichoderma* species isolated from damp building materials. *Can. J. Microbiol.* 2017, 63, -p. 621–632.
4. Keswani C., Mishra S., Sarma B. K., Singh S. P., and Singh H. B. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014, -v.98, -p. 533–544.
5. Zeilinger S., Gruber S., Bansal R., and Mukherje P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal Biol Rev.*, 2016, -v.30, -p. 74–90.
6. Saravanakumar, K., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Kathiresan, K., Oh, D.-H., & Wang, M.-H. (2018). Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microbial Pathogenesis*, 115, 338–342. doi:10.1016/j.micpath.2017.12.081.
7. Bahaa T. Shawky, Mohammed Nagah, Mosad A. Ghareeb, Gamal M. El-Sherbiny, Saad A. M. Moghannem and Mohamed S. Abdel-Aziz/ Evaluation of Antioxidants, Total Phenolics and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extracts From Fungi Grown on Rice Straw/ *JRM*, 2019, vol.7, no.7/ DOI: 10.32604/jrm.2019.04524.
8. Yang Libin, Song Ruiqing, Deng Xun, Li Chongwei /Active Components of Extracts from the Fermentation Liquid of *Trichoderma harzianum* Strain T28 and Their Inhibiting Activities to *Phytophthora infestans*/ *Scientia silvae sinicae*. Vol. 49 , No. 7Jul. , 2013/doi: 10. 11707/j. 1001-7488. 20130717.
9. Nutan Kaushik, Carmen E. Diaz, Hemraj Chhipa, L. Fernando Julio, M. Fe Andriis and Azucena Gonzlez-Coloma/ Chemical Composition of an Aphid Antifeedant Extract from an Endophytic Fungus, *Trichoderma* sp. *EF1671/ Microorganisms* 2020, 8, 420; doi:10.3390/microorganisms8030420.
10. Mosma N Shaikh and Digambar N Mokat./Bioactive metabolites of rhizosphere fungi associated with *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf/ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(6): 2289-2293.