



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

Каримов Хусниддин Холмаматович

Танч докторант, ЎзР ФА Микробиология институти

Рузиева Зарнигор Қахрамановна

Ўқитувчи, Қарши давлат университети

Камолов Луқмон Сирожиддинович

Доцент, Қарши давлат университети

Азимова Нодира Шойим қизи, Хамидова Хуршеда Муминовна

Катта илмий ходим, ЎзР ФА Микробиология институти

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 жидкости 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)-1,2,3,3а,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-1,4а-диола.

Калит сўзлар: *Trichoderma*, терпеноид, алкалоид, вторичный метаболит, микроорганизм.

Қириш. Кейинги йилларда ўсимликларда учрайдиган фитопатоген касалликлар нисбати сезиларли даражада ошиб бормоқда. Жумладан, турли хил зараркунанда хашаротлар ҳамда фитопатоген микроорганизмлар таъсирида жуда катта микдордаги қишлоқ хўжалик маҳсулотлари йўқотилмоқда. Биргина фитопатоген микроорганизмлар таъсирида қишлоқ хўжалиги соҳасида 1,4 триллион долларга тенг микдорда зарар етказиши, бу эса, умумий ялпи ички маҳсулотнинг 5% ни ташкил этиши, ҳамда, зараркунанда хашаротлар ва турли хил касалликлар оқибатида дунё бўйича тайёрланаётган қишлоқ хўжалик маҳсулотларининг 20-25% микдори йўқотилиши қайд этилмоқда. Шунингдек, 2030 йилга бориб эса, озиқ-овқат маҳсулотларига бўлган талаб 50% га ошиши, 2050 йилда эса, дунёда аҳолини қишлоқ хўжалиги ва чорвачилик маҳсулотларига бўлган талабини қондириш учун маҳсулотлар ишлаб чиқариш 60% гача ўсиши лозимлиги қайд этилмоқда. Бу борада ўсимликларни ҳимоя қилиш учун биологик самарали биофунгицидлардан фойдаланиш давр талабидир. Фитопатоген замбуруғларга қарши курашиш мақсадида кўплаб олимлар *Trichoderma* туркуми замбуруғлари устида илмий тадқиқот ишлари олиб бормоқда.

Адабиётлар таҳлили. *Trichoderma* замбуруғи ўзининг тижорат ферментлари, ўсимликларнинг ўсишини тезлаштирадиган фитогормонлар ва ўсимлик касалликларини бионазорат қилувчи антибиотиклар ишлаб чиқариш хусусияти билан истиқболли бўлиб,



саноат, қишлоқ хўжалиги ва дори ишлаб чиқаришни ривожлантиришда катта ҳисса кўшган [1-3]. Глобал миқёсда *Trichoderma* замбуруғи самарали биологик назорат препарати сифатида катта муваффақиятларга эришгани исботланди [4]. *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. virens* ва *T. viride* каби кўплаб *Trichoderma* турларидан дунё бўйлаб кучли бионазорат агентлари сифатида фойдаланилади [2]. *Trichoderma* замбуруғи турлари билвосита (озик моддаларни кидириш, атроф-муҳит шароитларини ўзгартириш, ўсимликларнинг ўсиши ва химоя реакцияларини рағбатлантириш) ёки тўғридан-тўғри (микопаразитизм) механизмлар орқали патоген микроорганизмларга қарши ажойиб бионазорат қобилятини намойиш этади [2]. Бундан ташқари, экологик таъсирлардан ташқари, *Trichoderma* микрозамбуруғи нафақат сигнал узатишда иштирок этадиган, балки турли организмлар билан алоқа ўрнатадиган иккиламчи метаболитларни ишлаб чиқариши мумкинлиги маълум [4-5]. Шунингдек, *Trichoderma* замбуруғининг бионазорат препаратларини синтез қилиш бўйича муваффақиятлари, ҳеч бўлмаганда қисман, уларнинг кўп иккиламчи метаболитларни ажратиш қобилятига боғлиқ [5]. Замбуруғлар инсоният тарихи давомида дори воситаларини кашф этишда ажралмас рол ўйнайди, чунки улар муҳим тиббий салоҳиятга эга бўлган турли иккиламчи метаболитларни синтез қилиш учун ноёб қобилятга эга [5].

Trichoderma туркуми замбуруғлари турли яшаш муҳитларида кенг тарқалган. Бугунги кунга қадар денгиздан олинган *Trichoderma* турларидан микроалгал, антибактериал, антифунгал, цитотоксик ва ферментларни ингиберловчи хусусиятларга эга юздан ортик янги терпенлар, стероидлар, поликетидлар, алкалоидлар ва пептидлар олинган. Улар орасида *T. asperellum* энг маҳсулдор турлардан бири бўлиб, унинг денгиз сув ўтлари ва чўкиндиларидан изолатлари асосан ментан, бисаболан, циклонеран, харзиан, эргостан, оксазол, дикеиперазинни ўз ичига олган бир қанча янги терпенлар ва алкалоидлар ҳосил қилган. *T. asperellum* нинг денгиз алгиколоз штаммлари метаболитларининг юқори янгилиги ва хилма-хиллиги уларни янада тадқиқ қилиш бўйича амалий аҳамиятга эгадир.

Материал ва методлар. Бухоро вилояти Жондор тумани пахта даласи тупроқларидан ажратиб олинган *Trichoderma asperellum* Uz-A4 штамми агарли Мандельс муҳитида (пробиркада) 6 кун давомида ўстирилди ва 10^{6-7} спора/мл концентрациядаги суспензиясидан экув материали сифатида фойдаланилди.

Trichoderma asperellum Uz-A4 микроскопик замбуруғи ўзгартирилган Мандельс (г/л: KH_2PO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2,3; MgSO_4 – 0,5; CaCl_2 – 0,3; сахароза – 20; (рН 5,5)) озуқа муҳитида 500 мл ҳажмли Эрленмейер колбаларида 250 мл озуқа муҳитида, 180 марта айланиш/мин тезлигидаги чайқатгичда (IKA® KS 130 shakers), 24-26°C ҳароратда 14 кун давомида ўстирилди ва уларнинг культурал суюқлиги биомассасидан филтрлаш орқали ажратилди.

Мандельс озуқа муҳитида 14 кун давомида қачалкада ўстирилган *Trichoderma asperellum* Uz-A4 штаммининг биомассаси культурал суюқликдан ажратилди ва лиофилли вакуумли қуритиш ускунасида 15-20°C да замбуруғ биомассаси қуритилди. Қуритилган ва майдаланган 12,15 гр биомасса устига 50 мл метанол қуйилиб бир кун қолдирилди. Метанол биомассадан филтрланиб ажратилди ва бу жараён уч марта такрорланди. Ажратиб олинган метанол вакуумли роторли ҳайдаш ускуна билан эритувчи ажратилиб, экстракцион сумма олинди. Экстракцион сумма миқдори 6,45 гр ни ташкил қилди.

Культурал суюқлик, яъни сувли қисмини 0,1% натрий гидрокарбонат эритмаси билан рН=7 муҳитида келтирилиб, хлороформ билан экстракция қилинди. Экстракция жараёнидан ажратиб олинган хлороформ вакуумли роторли ҳайдаш ускуна ёрдамида



эритувчидан ажратилиб 0,99 гр куритилган экстракцион сумма олинди. ЮҚХ маълумотларига кўра иккала сумма ҳам бир хил таркибга эга эканлиги аниқланиб, метанолли ва хлороформли экстракцион суммалар бирга қўшилиб 7,34 гр экстракцион сумма олинди(1-жадвал).

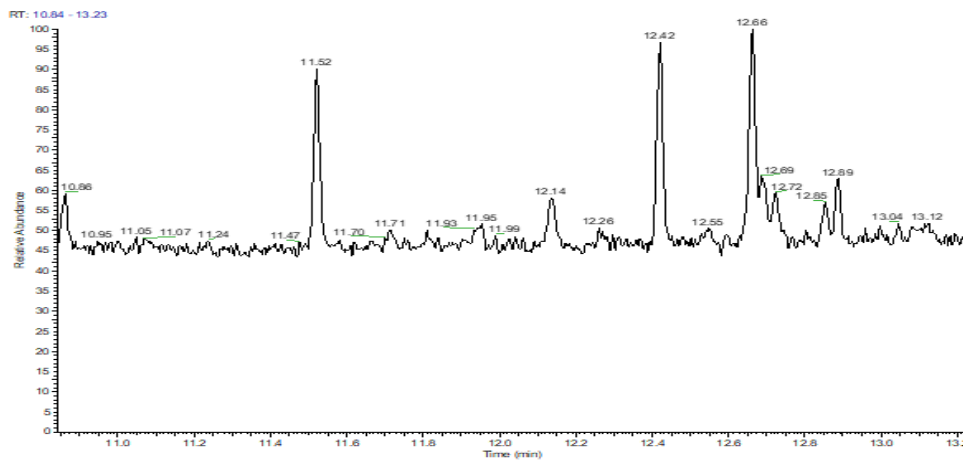
1-жадвал. *Trichoderma asperellum* Uz-A4 штаммининг иккиламчи метаболитларининг микдорий анализ натижалари

Штаммининг ўсиш вақти (кун)	Культурал суюқлик ҳажми (мл)	Экстракцион сумма (гр)	Қуруқ биомасса (гр)	Экстракцион сумма (гр)	Жами экстракцион сумма (гр)
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-5MSколонкаси билан жиҳозланган YL 6900 ГХ / МС (Young In Chromass, Корея) (30 мх 0,25 мм ички диаметр, 0,25 мкм плёнканинг қалинлиги) ёрдамида YL 6900 ГХ/МС газ хроматографияси билан масс-спектрометрик детекторда номаълум учувчан моддалар аниқланди. Печнинг ҳарорати - дастлабки - 80°C/3,0 мин, иситиш тезлиги - 15°C/мин дан 250°C гача, ушлаб туриш - 3,0 мин, Гелий 1,0 мл/мин оқим тезлигида ташувчи газ сифатида ишлатилган. Буғлатувчи ҳарорати - 280°C, оқим бўлими - 1/20, таҳлил вақти - 17 мин. ни ташкил қилди. Суюқ намуналар испарителга 1 мкл ҳажмдаги микро шприц ёрдамида АОК қилинди. Узатиш линиясининг ҳарорати - 300°C, ионланиш кучланиши -70 эВ, ион манбаининг ҳарорати эса 230°C бўлди. Сканерлаш диапазони - 30-350 а.м.у. Компонентлар МС кутубхона НИСТ 2017-даги мавжуд спектрал маълумотлар билан таққослагандан сўнг ҳар бир компонентнинг масса спектрларидан аниқланди.

Тадқиқот натижалари. *Trichoderma* асосида яратилган биопрепаратлар сабзавотчиликда, полиз экинларини етиштиришда, ёпиқ грунт шароитида яъни иссиқхоналарда, боғдорчиликда, узумчиликда ва турли манзарали ўсимликлар ва дарахтларни етиштиришда ишлатилади. Ушбу микромицет ўсимликларни фитопатогенлардан химоялайди. Уруғнинг униб чиқиш қувватини оширади, ўсимликнинг ўсишини кучайтиради, моддалар алмашинувини оширади, барг пластинка сатҳини кенгайтиради, тупроқнинг структурасини яхшилади, ғоваклигини оширади, тупроқ ҳамда ўсимликка полефункционал таъсир механизмига эга самарадорлиги юқори бўлган биологик назорат агенти ҳисобланади. *Trichoderma* туркумига мансуб микромицетлар бир қатор биологик фаол моддаларни бирламчи метаболитлар (ферментлар), иккиламчи метаболитлар (фитогормонлар) ва 100 дан ортиқ антибиотикларни синтезлайди ҳамда биоконтрол агенти сифатида дунё миқёсида фойдаланилади.

Иккиламчи метаболитларини аниқлаш учун дастлаб *Trichoderma asperellum* Uz-A4 штамми экстракти масс-спектрли газ хроматографияси (ГХ-МС) таҳлиллари олиб борилди (1-расм).



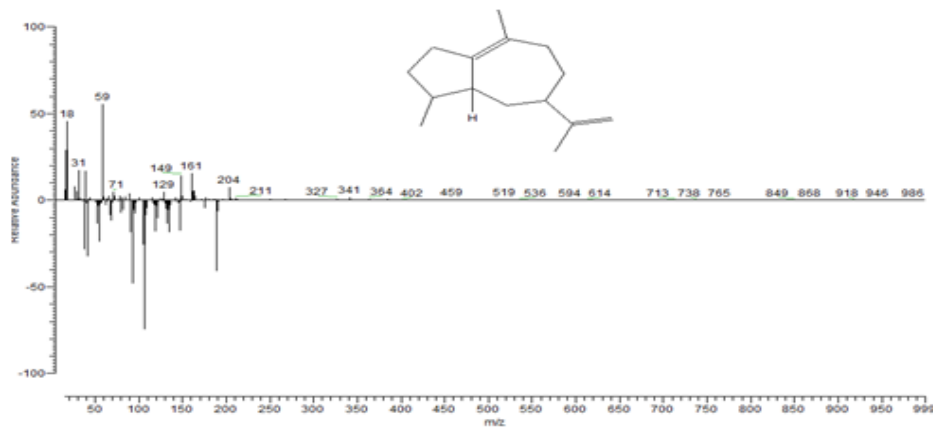
1-расм. *Trichoderma asperellum* Uz-A4 замбуруғ штамми культурал экстракти ГСХ хроматограммаси

Хроматограмма баъзи спектрлари ютилиш тезлигига қараб ГХ -МС кутубхона баъзаси билан солиштирилганда 3-изопропил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-он, 3,8-диметил-5-(пропил-1-ен-2)-1,2,3,3а,4,5,6,7-октагидроазулен,2-((1R,4R)-1, 4, 8-триметил спиро [4,5] декил-7-ен-1) пропан-2-ол , 4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидронафталин-1,4а-диолучувчан метаболитлари эканлиги аниқланди (1-жадвал).

1-жадвал. *Trichoderma asperellum* Uz-A4 замбуруғ штамми культурал экстракти ГСХ да олинган спектрларини МС кутубхонасидаги база билан аниқлаш

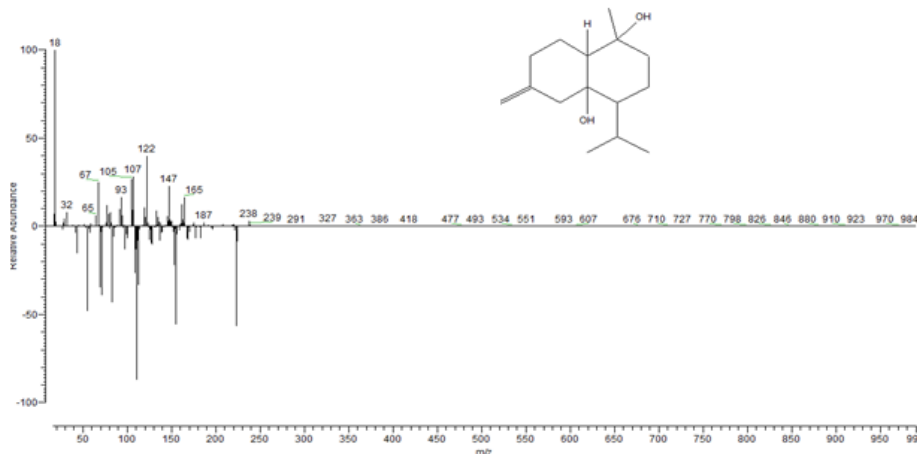
№	Метаболит номлари	Кимёвий формула	Молекуляр масса: г/моль кДа	Ютилиш вақти
1	3-изопропил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-он	C ₁₃ H ₂₀ O	192	12,85
2	3,8-диметил-5-(пропил-1-ен-2)-1,2,3,3а,4,5,6,7-октагидроазулен	C ₁₅ H ₂₄	204	12,14
3	2-((1R,4R)-1,4,8-триметилспиро декил-7-ен-1)пропан-2-ол	C ₁₅ H ₂₆ O	222	11,52
4	4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидронафталин-1,4а-диол	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	12,42

Trichoderma asperellum Uz-A4 замбуруғи биомассаси экстракти учувчан моддалар аниқланганда, 3-изопропил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-онмоддаси борлиги намоён бўлди. Ушбу модданинг ютилиш тезлиги 12,85 минут эканлиги хроматограммада намоён бўлди (2-расм). 3-изопропил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-онтабиатан учувчан модда бўлсада, *Trichoderma* туркуми замбуруғларининг антагонистлик қобилиятини янада ошириб беради. 3-изопропил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-он тадқиқотларда келтирилишича *F. incarnatum* ни 21.68% дан 74.29% гача ўсишини тўхтата олган [7].



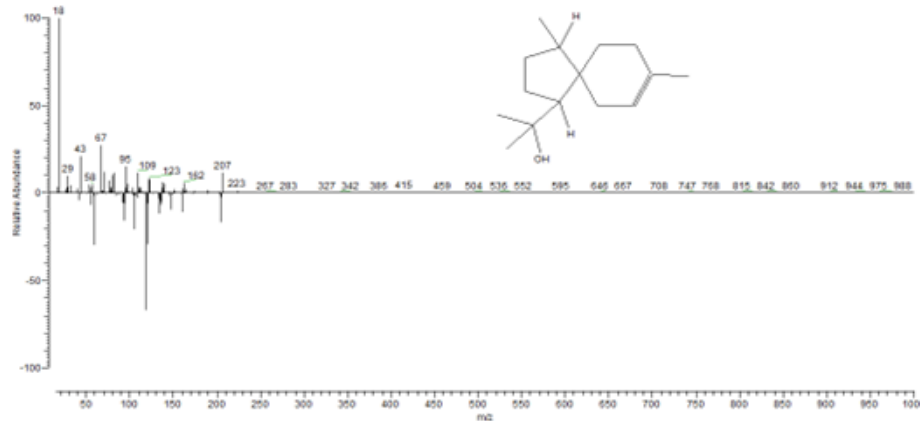
2-расм. 3-изопротил-7а-метил-1,4,5,6,7,7а-гексагидро-2Н-инден-2-онмасс-хроматограммаси

3,8-диметил-5-(пропил-1-ен-2)-1,2,3,3а,4,5,6,7-октагидроазулен иккиламчи метаболити 12,14 минутда ютилиш тезлигини намоён қилди (3-расм.). Адабиётлардан маълумки, 3,8-диметил-5-(пропил-1-ен-2)-1,2,3,3а,4,5,6,7-октагидроазулен бирикма *Trichoderma* туркуми замбуруғларининг фермент ҳосил қилишида иштирок этади[8].



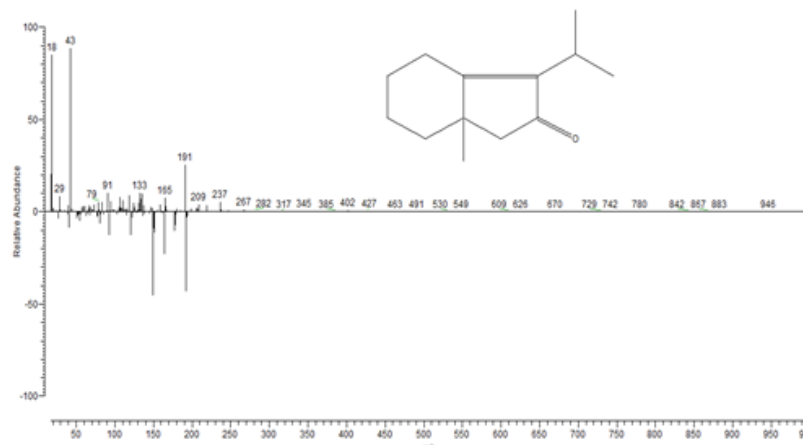
3-расм.3,8-диметил-5-(пропил-1-ен-2)-1,2,3,3а,4,5,6,7-октагидроазуленмасс - хроматограммаси

2-((1R,4R)-1,4,8-триметилспиро[4.5]декил-7-ен-1)пропан-2-олГХ хроматограммасида 11,52 минутда ютилиш тезлигини кўрсатди (4-расм). Мазкур модда ҳозирги вақтда мева-сабзавотларни сақлашда, қадоқлашда, косметикада ишлатилиб келинмоқда [9].



4-расм. 2-((1R,4R)-1,4,8-триметилспиро [4.5]декил-7-ен-1) пропан-2-олхроматограммаси

4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидронафталин-1,4а-диол моддасининг учувчанлиги нисбатан юкори бўлиб, хроматограммада 12,42 минутда ютилиш тезлигини ҳосил қилди (5-расм). Адабиётлардан маълумки 4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидронафталин-1,4а-диолтабиатан органик маҳсулот бўлиб ёғли спирт саналади. Микроорганизм метаболитлари сифатида *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus flavus* микромицет замбуруғлари ҳам этилацетатда экстракция қилиниб, ГХ-МС қилинганда метаболитлар таркибида мавжудлиги аниқланган [10].



5-расм. 4-изопропил-1-метил-6-метилендекагидронафталин-1,4а-диол хроматограммаси

Хулоса. Ушбу тадқиқот натижалари шуни кўрсатдики, *Trichoderma asperellum* Uz-A4 микромицет замбуруғи юкори биологик фаолликка эга бўлган кўплаб муҳим иккиламчи метаболитларни ҳосил қилади. Мазкур 5 турдаги иккиламчи метаболитлар адабиётларда келтирилганидек антифунгал, ферментатив, токсиклик, биоактивлик хусусиятларни намоён қилади. Кўпгина микробиологик касалликларни даволаш, дори саноати, ферментатив озуқа ишлаб чиқариш учун *Trichoderma asperellum* Uz-A4 замбуруғининг метаболитларидан фойдаланишни йўлга қўйиш зарур. *Trichoderma* турлари томонидан ишлаб чиқарилган метаболитларни тозалаш ва саноат миқёсида ишлаб чиқариш бугунги куннинг муҳим фойдали тармоқларига айланиши мумкин.



Фойдаланилган адабиётлар

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. 7 Jul. , 2013 /doi: 10. 11707 /j. 1001-7488. 20130717.
9. Nutan Kaushik, Carmen E. Dñaz, Hemraj Chhipa, L. Fernando Julio, M. Fe Andršs and Azucena Gonzlez-Coloma/ Chemical Composition of an Aphid Antifeedant Extract from an Endophytic Fungus, *Trichoderma* sp. EFI671/ *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.