

## O'ZBEKISTONDA *HELOBDELLA* BLANCHARD, 1896 URUG'IGA MANSUB ZULUKLARNING MOLEKUYLAR IDENTIFIKATSIYASI

Kuchboyev A.E.<sup>1</sup>, Solijonov X.X.<sup>2</sup>, Izzatullayev Z.<sup>3</sup>, Umarov F.U.<sup>2</sup>, Usmonov S.X.<sup>2</sup>, Izzatullayev X.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>O'zR FA Zoologiya instituti, O'zbekiston, [a\\_kuchboev@rambler.ru](mailto:a_kuchboev@rambler.ru);

<sup>2</sup>Andijon davlat universiteti, O'zbekiston, [khsolijonov1991@gmail.com](mailto:khsolijonov1991@gmail.com)  
[usmonovsaloxiddin3@gmail.com](mailto:usmonovsaloxiddin3@gmail.com); [eco\\_umarov@mail.ru](mailto:eco_umarov@mail.ru)

<sup>3</sup>Samaqqand davlat universiteti, O'zbekiston, [zizzat@yandex.ru](mailto:zizzat@yandex.ru)

**Annotation.** GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Sciences, USA) was used to isolate DNA from species of *Helobdella* sp. to obtain pure and high-yield DNA, and the amount of DNA in it is sufficient for PCR-amplification. *Helobdella* leech specimens collected from Ferghana and Surkhandarya regions were examined using mtDNA COI gene primers and compared with the species in the international Genbank (NCBI) database, it was found that the related species are *Helobdella europaea* Kutschera, 1987 and *Helobdella stagnalis* (Linnaeus 1758).

Zuluklar parazit va yirtqich holda yashovchi gidrobiontlar bo'lib, ular Hirudinida turkumini tashkil qiluvchi 900 ortiq turlarni o'z ichiga oladi. Ular orasida Glossiphoniidae Vaillant, 1890 oilasiga 250 ga yaqin turlar orasida *Helobdella* Blanchard, 1896 urug'iga mansub turlar ham kiritilgan [3]. Uzoq yillardan buyon turlarni aniqlashda, xususan, zuluk namunalarning tashqi va ichki morfologik xususiyatlari asosida amalga oshirilmoqda. Shuningdek, hozirgi kunda fan-texnikaning taraqqiyoti natijasida yangi fan tarmoqlari kashf etildi. Ushbu yangi fanlar zamonaviyligi, aniqlik darajasi yuqori ekanligi hamda qisqa vaqt talab etishligi tadqiqotchilarga qulaylik bermoqda. Ayniqsa, molekulalar-genetik tahlil metodlari biologik izlanishlardan: turlarni aniqlash (identifikatsiyalash), kelib chiqish markazlarini topish, filogeniyasini o'rganish hamda turli populyatsiyalarning aloqadarlik qonuniyatlarini ishlab chiqishda muhim bo'lmoqda.

Zuluklardan genom DNKsini ajratish ko'pgina usullar bilan amalga oshirildi. Jumladan, DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, Kaliforniya) to'plami orqali to'qimalarning lizisi va DNKni tozalash ishlari uchun ishlatilgan, ammo Gavayidagi *Helobdella* zuluklari namunalardan DNK amplifikatsiyasi muvaffaqiyatsiz tugadi [2]. Boshqa bir tadqiqotda esa ishlab chiqaruvchi protokoli muvofiq Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA) to'plami yordamida zuluklarning orqa so'rg'ichlari to'qimalaridan DNK ajratilgan va mtDNK COI geni praymerlari yordamida amplifikatsiya qilingan [1]. Skandinaviyadagi zuluk namunalari uchun genom DNKsi Epicentre's QuickExtract DNK Extraction Solution 1.0 (Lucigen, Viskonsin, USA) to'plami yordamida ajratilgan va COI geni bilan Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) firmasi tomonidan sekvenirlangan. Mualliflar tomonidan O'zbekiston suv havzalarida tarqalgan *Helobdella* urug'iga mansub zuluklarining DNK ekstraksiyasi usullarini takomillashtirish va ularni molekulalar identifikatsiya qilish maqsad qilib olindi.

Tadqiqot materiallar 2023-2024 yillar davomida Farg'ona va Surxondaryo viloyatlari suv havzalaridan terildi. Ularni saqlash va molekulalar identifikatsiya qilish maqsadida etanolning 96%li eritmasiga fiksatsiya qilindi. Laboratoriya sharoitida stereomikroskop (Model: Carl Zeiss Stemi 508, Germaniya) orqali ichki va tashqi morfologik belgilari asosida namunalarni urug' darajasigacha aniqlandi. So'ngra kerakli namunalar tanlab olindi va molekulalar identifikatsiyasi odatiy bosqichlarda amalga oshirildi.

**DNK ajratish.** Tirik va spirtli konservatsiyalangan zuluk namunalari distillangan suv bilan 3-4 marta chayildi va yumshoq to'qimali qog'ozda bir daqiqa quritiladi (quritish muhim, chunki zuluklarning nam terisi to'qimalarning maydalanishini biroz qiyinlashtiradi). GeneJET Genomik DNK Purification Kit (Thermo Fisher Sciences, USA) to'plami (protokoli) asosida genom DNKni ajratib olishda ishlatildi. Biz foydalangan voyaga etgan zuluklar to'qimalari alohida-alohida 1,5 ml mikrotsentrifuga probirkalariga joylashtirildi. Ajratilgan genom DNKsi konsentratsiyasi nanofotometr (NanoDrop) bilan o'lchandi.

**PZR amplifikatsiyasi.** Ekstraksiya qilingan zuluklar DNKsi namunalari ribosomal DNK mtDNK COI geni LCO 1490 F-(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') va R- (HCO 21985'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer *et al.*, 1994) praymerlari yordamida PZR amplifikatsiya qinindi. PZR amplifikatsiyasi ProFlex PCR tizimi (Applied Biosystems, USA) yordamida amalga oshirildi. Har bir 15 µl reaksiya hajmida 1 µl F va R primerlari, 1 µl DNK bufferi, tahminan 7,5 µl PCR master aralashmasi, jumladan Taq DNK polimeraza, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, reaksiya buferlari va 4,5 µl nukleazsiz suv (Termo) mavjud edi.

PZR-amplifikatsiyasini o'tkazish uchun harorat rejimi quyidagi tartibda amalga oshirildi; 1 – bosqich – 3 daqiqa davomida DNK ning 94°C sharoitda denaturatsiyalanishi, 2 – bosqich – DNKning 94°C sharoitda 30 soniya davomida denaturatsiyalanishi, 3 – bosqich – DNKda 52°C sharoitda 30 soniya davomida praymerlarning yumshatilishi, 4 – bosqich – 72°C sharoitda 1 daqiqa davomida elongatsiyalanishi, 5 – bosqich – 72°C sharoitda 5 daqiqa davomida zanjirning elongatsiyalanishi. Ikkinchidan to'rtinchi bosqichgacha jarayon sikli 35 martagacha takrorlandi.

PZR qilingan namunalar konsentratsiyasi va sifatini aniqlash uchun 1% agaroz gelida elektroforez usuli qo'llaniladi va geldagi fragmentlar UV nurlari ostida vizualizatsiya qilindi.

**Sekvenirlash.** PZR mahsuloti namunasini rDNK 18S va mtDNK COI genlari sohasini sekvens qilishda ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 reaktivlari to'plami yordamida amalga oshirildi. PZR mahsulotlari SeqStudio

Genetic Analyzer, Applied biosystems (Thermo Fisher Scientific) sekvenatorda qayd qilindi. Sekvenerlash natijalariga BioEdit dasturlash paketi yordamida ishlov beriladi. Sekvenirlangan xromotogramma tahlili uchun BioEdit dasturidan foydalaniladi.

Organizmlarning identifikatsiyalashda nukleotidlar ketma-ketligi tahlili asosida Milliy biotexnologiya axborot markazi (NCBI) BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ko'p marotabalik to'g'irlash dasturi yordamida ma'lumotlar bazasida GenBank o'tkaziladi. Filogenetik tahlil MEGA 11 dasturidan foydalangan holda maksimal haqiqatga o'xshashlik usuli amalga oshirildi [4]. DNK markyorlari fragmentlarini o'xshashligini BLAST dasturi yordamida tahlil qilindi.

Molekulyar tadqiqotlar uchun birinchi qadam tegishli texnikalardan foydalangan holda genom DNKsini ekstraksiya qilishdir. Sof va yuqori hajmda DNKni olish uchun to'g'ri DNK ekstraksiya protokolini tanlash kerak. Zuluklar populyatsiyalarida molekulyar genetik tahlillar bazida DNK ekstraksiya protokoli yo'qligi va ekstraksiya uchun zarur bo'lgan vaqt, shuningdek namunalardan olingan DNK sifati tufayli cheklangan. Tadqiqotimizda zuluklar uchun mavjud bo'lgan DNK ekstraksiya usullarini takomillashtirish va soddalashtirish edi. Biz bu ishda yangi va spirtida bilan saqlangan namunalardan foydalangan holda optimallashtirilgan GeneJET Genomik DNK Purification Kiti (Thermo Fisher Sciences) yordamida (protokoli) DNK ajratishni taklif qildik. Protokol nisbatan sodda va u yuqori DNK konsentratsiyasini berdi (96.4 -100 ng/μl). Chiqarilgan DNK yaxshi sifatga ega va PZR yordamida osonlik bilan amplifikatsiya qilindi. DNK genlarining yuqori amplifikatsion foizi va PZR mahsulotlari uchun keyingi ketma-ketlik tahlili tavsiya etilgan optimallashtirilgan usul zuluk namunalari molekulyar tahlil qilish uchun ishonchli ekanligini ko'rsatdi.

O'tkazilgan molekulyar tadqiqotlar natijasiga ko'ra Farg'ona viloyatidagi yigilgan *Helobdella* sp.1. va Surxondaryo viloyatidan *Helobdella* sp.2. zuluklar namunalari 500-530 j.n. uzunlikdagi mtDNKning COI geni nukleotidlar ketma-ketligi fragmentlari ajratib olindi. Olingan ketma-ketlik natijalari BLAST dasturi (NCBI) orqali xalqaro Genbank bazasidagi mavjud *Helobdella* turlari ma'lumotlari bilan solishtirilib, mazkur namunadagi turlarga aniqlik kiritildi. Natijada COI geni asosida *Helobdella* sp.1 namunasiga eng yaqin bo'lgan tur *Helobdella europaea* (MN 335875) turiga 98,7 % o'xshash bo'ldi. *Helobdella* sp.2 namunasi *Helobdella stagnalis* (KM095095) bilan 100% o'xshash va boshqa namunalar bilan 99,7% yaqin kelganligi aniqlandi. Olingan bu ma'lumotlar Farg'ona vodiysidagi namunalar *Helobdella europaea* turi va Surxondaryo viloyatidagi namunalar esa *H. stagnalis* turi ekanligi bilan izohlaydi.

Zuluklardan genom DNKsini ajratishda GeneJET Genomik DNK Purification Kit (Thermo Fisher Sciences) yaxshi natija berdi va undagi DNK miqdori PZR-amplifikatsiya ishlari uchun yetarli hisoblandi. Farg'ona va Surxondaryo suv havazlaridan yig'ilgan *Helobdella* avlodiga mansub zuluk namunalari mtDNK COI geni praymerlari yordamida tekshirildi va xalqaro Genbank (NCBI) bazasidagi turlar bilan solishtirildi, natijada bular tegishli *Helobdella europaea* va *H. stagnalis* turlari ekanligi ma'lum bo'ldi.

#### Foydalanilgan adabiyotlar ro'yhati

1. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3(5): 294-299.
2. Siddall M., Budinoff R., Borda E. 2005. Phylogenetic evaluation of systematics and biogeography of the leech family Glossiphoniidae. *Invertebrate Systematics* 19 (2). <https://doi.org/10.1071/is04034>
3. Solijonov Kh., Umarov F.U. 2022. Ecology of leeches and gastropods of the lower Ak-Buura River, Fergana Valley, Uzbekistan. *Bulletin of the Iraq Natural History Museum* 17(3): 459-468. <https://doi.org/10.26842/binhm.7.2023.17.3.0459>
4. Tamura K., Stecher G., and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>