UO‘K 595.143.6 (575.113)

TABIIY SUV HAVZALARIDA TARQALGAN *HIRUDO VERBANA* CARENA 1820 ZULUGINING MOLEKULYAR GENETIK TAHLILI

X.X. Solijonov, M.S.Ayubov, Z.Izzatullayev, F.U. Umarov, S.X. Usmonov, D.O. Janbaz

Maqolada O‘zbekiston hududi tabiiy suv havzalarida tarqalgan dorixona tibbiyot zulugi Hirudo verbana Carena 1820 populyatsiyalarining GAT-xaritalari, morfologiyasi, biotoplarining ekologik xususiyatlari keltirilgan. Terilgan zuluk namunalari asosida turning molekulyar identifikatsiyasi amalga oshirilgan. Olingan natijalar asosida ushbu turning molekulyar genetik tahlili amalga oshirilib, filogenetik shajara daraxti ishlab chiqilgan. Olingan ma’lumotlar ilmiy jihatdan muhim bo‘lib, tadqiqotchilarga dunyoning turli mintaqalarida tarqalgan zuluk turlari bilan qiyoslagan holda filogenetik, zoogeografik, populyatsion tahlillarni masofadan amalga oshirish imkonini beradi.

Kalit so‘zlar: *Hirudo verbana, dorixona tibbiyot zulugi, GAT-xarita, tur populyasiyasi, molekulyar identifikatsiya, PZR, sekviyens, filogenetik tahlil.*

В статье представлены ГИС-карты распространения популяций медицинской пиявки Hirudo verbana Carena, 1820 в природных водоёмах Узбекистана, а также их морфологическая характеристика и экологические особенности биотопов. На основе собранных образцов проведена молекулярная идентификация вида, выполнен молекулярно-генетический анализ и построено филогенетическое древо. Полученные данные имеют научную значимость и расширяют возможности филогенетических, зоогеографических и популяционных исследований.

Ключевые слова: Hirudo verbana*, медицинская пиявка, ГИС-картирование, популяции, молекулярная идентификация, ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ*.

KIRISH

Gidroekotizimlarning bioxilmaxilligi ekologik muvozanatni ta’minlashda muhim ahamiyat kasb etadi. Ayniqsa, gidrobiont hayvonlardan zuluklar parazit-xo‘jayin va yirtqich-o‘lja biotik munosabatlaridagi ishtiroki ayrim turlarning populyatsion ko‘rsatkichlarini belgilab beradi. Bu, o‘z navbatida, bioxilmaxillikni saqlashda har bir turni tadqiq etish dolzarb ekanligidan dalolat beradi. Mamlakatimizda ham bu borada BMTning “Biologik xilmaxillik haqidagi” Konvensiyasi asosida bioxilmaxillikni saqlash va oqilona foydalanish bo‘yicha milliy dasturlar ishlab chiqildi. Dastlab 1998-yilda, keyin 2019-yilda hamda 2022-yil COP-15 doirasida Kunming-Monreal global bioxilmaxillik asosi (GBF) bo‘yicha kelishuv moslashtirilgan, 2024-yilda so‘nggi dastur yangi maqsadlar bilan boyitildi. Unga ko‘ra bioxilmaxillikni saqlashda “13-maqsad sifatida genetik manbalar va raqamli ketma-ketlik ma’lumotlaridan foydalanish”ni yo‘lga qo‘yish belgilangan. Qolaversa, O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2019-yil 30-oktabrdagi “2030-yilgacha bo‘lgan davrda O‘zbekiston Respublikasining Atrof-muhitni muhofaza qilish konsepsiyasini tasdiqlash to‘g‘risida”gi PF 5863-son Farmonida “biologik resurslarni saqlash va ko‘paytirish sohasida – noyob va yo‘qolib borayotgan yovvoyi hayvon turlarini genetik banklarda saqlash texnologiyasini joriy qilish” zarur ekanligi belgilangan [1, 2]. Molekulyar genetik tahlillar biologik xilmaxillikni tadqiq etishda eng zamonaviy usullardan biri bo‘lishi bilan birga, turlarni aniqlashda molekulyar darajada yondashilganligi bilan ilmiy ahamiyatli hisoblanadi. Ayniqsa, mahalliy tibbiyot zuluklarining genetik ma’lumotlarini tadqiq etish dunyoning turli mintaqalarida tarqalgan zuluk turlari bilan filogenetik, zoogeografik, populyatsion tahlillarini masofadan amalga oshirish imkonini beradi. Yuqoridagilardan kelib chiqqan holda tadqiqotlarimizda O‘zbekiston hududida tarqalgan *H.verbana* – tibbiyot zulugining genetik ma’lumotlar bazasini mitoxondrial DNKsi (mtDNK COI) asosida o‘rganishni maqsad qildik.

Adabiyotlar tahlil qilinganda, *H.verbana* zulugi zoogeografik jihatdan palearktika hududida keng tarqalganligi aniqlandi. Jumladan, Janubiy Yevropa (Ispaniya, Portugaliya, Italiya, Gretsiya, Chernogoriya, Bosniya, Serbiya, Albaniya, Bolgariya), Sharqiy Yevropa (Ukraina, Slovakiya, Vengriya, Ruminiya, Rossiya), Kavkaz va Yaqin Sharq, Markaziy Osiyo davlatlari suv havzalarida uchratish mumkin [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]. Ushbu zulukning molekulyar biologik tadqiqotlari hamda filogenetik tahlillar xorijiy olimlar tomonidan amalga oshirildi. Jumladan, Trontelj va Utevsky (2005, 2012) tomonidan *H. verbana* zulugining RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") usuli orqali *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 zulugidan mustaqil tur ekanini birinchi marta genetik asosda isbotlandi [11, 12]. Keyinchalik, Siddall va hammualliflari (2007) Yevropa tibbiy zuluklar bozorida katta miqdorda sotilayotgan *H. verbana* zulugini mitoxondrial sekvenslar asosida aniqlagan [13]. Arias va hammualliflari (2021) *H. verbana* zulugining Ispaniyada tarqalgan *H. verbana* populyatsiyalarining boshqa hududlardagi populyatsiyalardan ham morfologik, ham molekulyar darajada (COI, 12S, ITS2 fragmentlari asosida) farqlanishini tahlil qildi [4]. Natijada Iberiya populyatsiyalarida *Hirudo verbana bilineata* Arias et. al., 2021 kenja turi tarqalganligini keltirdi. So'nggi yillarda Popa va hammualliflari (2024) tomonidan Ruminiya zuluk populyatsiyalari, Serbiyadan Shimoliy Kavkazga qadar, shuningdek, Turkiya hududida tarqalgan *H. verbana* zulugining genetik xilmaxilligi tadqiq etildi [7].

MATERIAL VA USULLAR

Tadqiqot hududi

O'zbekiston hududi Markaziy Osiyoning markaziga to'g'ri keladi, uning shimoliy nuqtasi shimoli-sharqda – Ustyurt platosida, Orol dengizining g'arbiy sohilida, janubiy nuqtasi – Termiz shahri yonida, g'arbiy nuqtasi – Ustyurt platosida, sharqiy nuqtasi esa Farg'ona vodiysining sharqida joylashgan bo'lib, Qirg'iziston Respublikasi bilan chegaradosh hisoblanadi. O'zbekiston Respublikasi shimoliy yarimsharda, Yevrosiyo materigining o'rtasida, O'rta Osiyoning eng yirik daryolari – Amudaryo va Sirdaryo oralig'ida, mo'tadil va subtropik mintaqalarda, okeanlardan ancha uzoqda, janub va sharq tomonlaridan baland tog'lar bilan o'ralgan berk havzada joylashgan. Shu sababli O'zbekistonda o'xshash tabiiy sharoitga ega mamlakatlardan sezilarli farq qiladigan, o'ziga xos tabiiy sharoit tarkib topgan. Sirdaryo O'zbekiston hududida Farg'ona botig'idan oqib o'tib, respublika tashqarisiga oqib chiqadi. Daryo Bekobod shahri yaqinida yana respublika yerlariga oqib kiradi va Chinoz shahrigacha O'zbekiston hududidan oqadi. Amudaryo eng sersuv daryodir. Uning yuqori oqimida (Surxondaryo viloyati hududida) O'zbekiston Respublikasining Afg'oniston bilan chegarasi o'tadi. Mazkur uchastkada daryoga o'ng tomondan Surxondaryo va Sherobod daryolari kelib quyiladi. O'zbekistonning tog'li qismi daryolarga boy. Respublikaning eng yirik daryolari qatoriga Chirchiq, Ohangaron, Kosonsoy, Norin, Qoradaryo, Isfayramsoy, So'x, Isfara, Sangzor, Zarafshon, Qashqadaryo, Sherobod, Surxondaryo daryolari kiradi. Izlanishlar ushbu suv havzalari, daryolar va ularga yondosh suv ekotizimlarida olib borildi [14].

Namunalarni yig'ish va morfologik aniqlash

Tadqiqot materiallari 2020–2025-yillarda O'zbekiston suv havzalarining turli biotoplaridan yig'ildi. Namunalarning tarqalish hududlari "Maps.me" mobil ilovasi, "Google Earth" online dasturi orqali belgilab borildi. Ular asosida "ArcGIS 10.8" dasturi orqali turlarning tarqalish xaritasi shakllantirildi (1-rasm) [15]. Terilgan zuluk namunalarini fiksatsiya qilishda dastlab 20–30 daqiqa davomida 10% li etanol eritmasiga solinib, falajlantirildi, keyin 96% li etanol eritmasida molekulyar identifikatsiya qilish uchun saqlandi. Turni aniqlashda Lukin (1976), Nesemann, Neubert (1999) ishlaridan foydalanildi [16, 17]. Zuluklar hajmini (uzunligi, kengligi) o'lchashda shtangensirkul, tashqi morfologik belgilarini tahlil qilishda "ZEISS Stemi 508" stereomikroskopidan (Germaniya) foydalanildi.

Molekulyar tahlil

DNK ajratish.

Zuluklarni molekulyar-genetik jihatdan o'rganish uchun spirtning 96 % eritmasida saqlangan zuluk namunalaridan foydalanildi. Molekulyar tahlillar O'zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi Genomika va bioinformatika markazining "Bioinformatika" laboratoriyasida amalga oshirildi. Dastlab namunalar disstillangan suvda yuvilib, o'tkir skalpel orqali orqa so'rg'ichidan 20 mg miqdorda bo'lak kesib olindi va suyuq azot solingan chinni havonchalarda maydalandi. Namunalar 1,5 ml hajmdagi ependorf probirkalariga o'tkazildi. Namunalardan umumiy DNK ekstratlarini ajratishda "GeneJET™ Genomic DNK" tozalash to'plami (Thermo Fisher Scientific, Litva) dan foydalanildi. Barcha jarayonlar ishlab chiqaruvchi protokoli asosida amalga oshirildi. Ajratilgan DNK sifati va konsentratsiyasi dastlab spektrofotometrda (rusumi: "Implen NP80") tahlil qilindi, so'ngra 0,9% li agaroza gelida elektroforezda tekshirildi.

PZR amplifikatsiya qilish.

Ajratib olingan DNK namunalaridan turlarni identifikatsiya qilish maqsadida mitoxodrial DNK stixrom oksidaza I (mtDNK COI) fragmenti polimer zanjirli reaksiyasini amalga oshirish uchun Folmer (1994) universal praymerlaridan LCO1490, 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' va HCO2198, 5'TAAACTTCAGG GTGACCAAAAAATCA-3'dan foydalanildi [18]. Har bir reaksiya uchun 10 µl umumiy hajmda foydalanildi: 7,02 µl disstillangan suv (dH_2O), 1 µl 10× DreamTaq PZR buferi, 0,08 µl dNTP Mix 10 mMli, 0,3 µl TaqPolimeraza, har bir praymerdan 0,3 µl (forward, reverse) hamda 1 µl DNK namunasidan iborat bo'ldi. PZR jarayoni quyidagi tartibda amalga oshirildi: 1-bosqich 94 °C (3 daqiqa), 2-bosqich 94 °C (30 soniya), 3-bosqich 52 °C (30 soniya), 4-bosqich 72 °C (1 daqiqa), 5-bosqich 72 °C (10 daqiqa), reaksiya so'ngida 10 °C bo'ldi. Jarayon davomida 2–4-bosqichlar 35 marta takrorlandi. PZR mahsulotlarida DNK fragmentining mavjudligini aniqlash 7 µl Etidium bromid solingan 100 ml hajmdagi 1,5 % li agaroza gelida 120 V kuchlanish bilan (35 daqiqa) gel-elektroforezi amalga oshirildi. Nukleotidlar juftligi miqdorini aniqlashda GeneRuler 100 bp DNK markeridan ("Thermo Fisher Scientific", Litva) foydalanildi.

Sekvenirlash jarayoni.

PZR mahsulotini foydalanilmagan praymer va keraksiz nukleotidlardan tozalash uchun "ExoSAP-IT™" tozalash protokoli ("ExoSAP-IT PCR Product Cleanup", "Thermo Fisher Scientific", Litva) asosida PZR mahsulotidan 5 µl va 2 µl ExoSAP regentidan aralashtirildi. Inkubatsiya dastlab 37 °C da (15 daqiqa), so'ngra 80°C da (15 daqiqa) amalga oshirildi. Tozalangan PZR mahsulotining "Cycle sequencing" jarayoni "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" protokoli asosida bajarildi. Jarayon 5 bosqichda: 1-bosqich 94 °C (2 daqiqa), 2-bosqich 94 °C (30 soniya), 3-bosqich 50 °C (30 soniya), 4-bosqich 60 °C (1 daqiqa), 5-bosqich 4 °C bo'ldi, shuningdek, 2–4-bosqichlar 35 marta takrorlandi. Olingan mahsulot 96 % va 70 % li etanol eritmalari orqali tozalandi hamda 10 µl hajmda Hi-Di formamid aralashtirilib, 96 °C da (3 daqiqa) PZR amplifikatsiya qilindi. Sekvens jarayoni uchun "SeqStudio™" genetik analizatoridan (Thermo Fisher Scientific, AQSH) foydalanildi.

Filogenetik tahlil.

Filogenetik tahlillarni amalga oshirish uchun dastlab "SnapGene" bioinformatik dasturi orqali sekvens natijalaridagi har bir (forward, reverse) zanjirni mos holda birlashtirib, mtDNK COI gen fragmentlari yig'ildi va saqlab olindi. Olingan natijalar "GenBank" ma'lumotlar bazasida tahlil (blast) qilindi hamda nukleotidlar ketma-ketligini taqqoslash "Clustal W" dasturida amalga oshirildi. Filogenetik tahlillar MEGA 11 dasturidan foydalangan holda turlarning mtDNK COI geni sohasining maksimal ehtimollik (GTR+G+I) modeli asosida Bayes xulosasi (BI) orqali filogenetik shajara daraxti shakllantirildi [19].

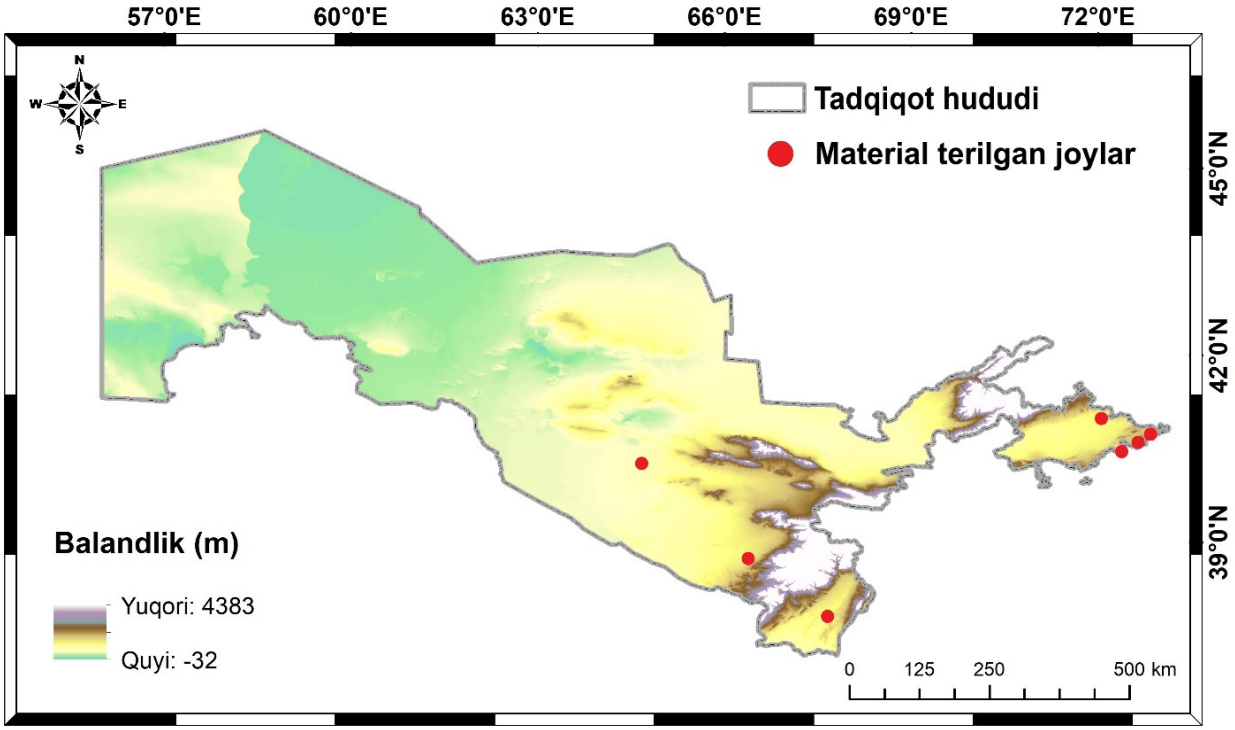
NATIJALAR VA MUHOKAMA

Izlanishlar natijasida O'zbekistonning 4 ta (Andijon, Navoiy, Qashqadaryo, Surxondaryo) viloyatlari hududidagi 6 ta (Xo'jaobod, Qo'rg'ontepa, Izboskan, Qiziltepa, Qamashi, Qumqo'rg'on) tumanda dorixona tibbiyot zulugi *H.verbana* populyatsiyalari tarqalganligi aniqlandi va ularning koordinatalari asosida GAT-xaritasi ishlab chiqildi (1-jadval, 1-rasm).

1-jadval

***H.verbana* populyatsiyalari aniqlangan hudud ma'lumotlari**

Viloyat nomi	Tuman/shahar nomi	Qishloq nomi	Shimoliy kenglik	Sharqiy uzunlik
Andijon	Xo'jaobod	Kamabar ata	40.584082	72.753007
Andijon	Qo'rg'ontepa	Sultonobod	40.766387	72.986194
Andijon	Qo'rg'ontepa	Qorasuv	40.725910	72.909103
Andijon	Izboskan	Daryo bo'yi	40.884312	72.325211
Navoiy	Qiziltepa	Sho'raobod	39.808056	64.646139
Qashqadaryo	Qamashi	Chim	38.869799	66.282296
Surxondaryo	Qumqo'rg'on	Yangiqishloq	37.668750	67.497694



1-rasm. Dorixona tibbiyot zulugining *(H.verbana)* GAT-xaritasi.

Morfologiyasi. *Hirudo verbana* yirik hajmli zuluk hisoblanadi. Yosh individlarning tanasi odatda 30–50 mm uzunlikda va 5–7 mm kenglikda bo‘ladi, voyaga yetganlarida esa o‘rtacha 80–120 mm uzunlik va 9–14 mm kenglikka yetadi. Ko‘zlari 5 juftdan iborat. Tana shakli chuvalchangsimon: orqa (dorsal) qismi qavariq, qorin (ventral) qismi esa nisbatan yassilashgan. Harakatlanish jarayonida tana cho‘zilib, ingichkalashadi. Tana chetlari tekis. Orqa so‘rg‘ichi o‘rtacha kattalikda bo‘lib, tananing keng qismidan yarmidan ko‘prog‘ini egallaydi; tana nisbatan qalin. Orqa tomoni yashil-qoramtir rangda, dorsal bo‘ylab sariq-qo‘ng‘ir naqshlar va ikki chetida sariq chiziqlar mavjud (2-rasm). Ventral tomoni yashil-zaytun rangda bo‘lib, ikki yonida qoramtir chiziqlar kuzatiladi; boshqa tibbiy zuluk turlaridan farqli o‘laroq, qoramtir to‘q dog‘lar bo‘lmaydi. Oldingi qismidagi so‘rg‘ich ichida og‘iz joylashgan bo‘lib, unda jami uchta jag‘ mavjud: bittasi yuqorida, ikkitasi pastda, yon tomonlarda. Har bir muskulli jag‘da 68–84 ta tish bo‘lib, ular old tomonga qarab kattalashib boradi. Ko‘payishda suv yuzasidan yuqoridagi qirg‘oq tuproqlariga yoki suv o‘simliklariga pilla qo‘yiladi.

Biotoplarining ekologik xususiyatlari. *Hirudo verbana* termofil tur bo‘lganligi sababli odatda iliq biotoplarda uchraydi. Biroq 7-29 °C oraliqdagi harorat ta’sirida ham yashay oladi, ular uchun optimal harorat 22-27 °C hisoblanadi. U asosan sayoz, turg‘un yoki sekin oqadigan, tubi loyqa va ifloslanmagan suv havzalarida tarqaladi. Tadqiqotda zuluk namunalari 20-25 °C li suv havzalaridan yig‘ildi. Mazkur biotoplarda o‘simliklardan qamish va suvo‘tlar, hayvonlardan esa baliqlar, ko‘l baqalari va suv mollyuskalariga duch kelindi (2-rasm). Kuzatishlar shuni ko‘rsatdiki, zuluk ko‘proq suv yuzasi iliq, tubi esa salqin bo‘lgan havzalarda uchraydi. Ekologik valentligining torligi tufayli *H. verbana* stenobiont ekologik guruhga mansubdir [20].



2-rasm. *H.verbana* namunalari yig‘ilgan suv biotoplari.

Filogenetik tahlil natijalari va muhokamasi.

Filogenetik tahlillarni amalga oshirishda “GenBank” bazasiga *Hirudo verbana* turining mtDNK COI qismi bo‘yicha Sharqiy Yevropa hududlaridan kiritilgan hamda *Hirudo* urug‘iga mansub boshqa turlar: *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758, *Hirudo troctina* Johnson, 1816, *Hirudo orientalis* Utevsky & Trontelj, 2005, *Hirudo sulukii* Saglam, Saunders, Lang & Shain, 2016, *Hirudo verbana bilineata* Arias et. al., 2021, *Hirudo tianjinensis* Lui, 2022 zuluklari bilan taqqoslandi. Olingan filogenetik daraxt *Hirudo* urug‘idagi turli turlar va populyatsiyalar o‘rtasidagi qarindoshlik munosabatlarining mavjudligini aks ettirdi. Tahlil natijalariga ko‘ra, *H. verbana* barcha namunalarini qamrab olgan monofiletik klad sifatida shakllangan. Ukraina, Turkiya va Ruminiya populyatsiyalari o‘zaro yaqin bo‘lib, Sharqiy Yevropa arealida genetik almashuv kuchli ekanligini ko‘rsatdi. Aksincha, Iberiya populyatsiyasi (*Hirudo verbana bilineata*) boshqa *H. verbana* guruhlaridan ancha uzoqda joylashgan bo‘lib, bu hududda alohida subklad rivojlanganidan dalolat berdi. Tadqiqotlarda olingan namunalardan *Hirudo verbana1,2,4,6,7* asosiy guruhga yaqin joylashsa-da, *Hirudo verbana1,5* namunalarining mustaqil tarmoqlarda chiqishi ularning genetik jihatdan farq qilishini ko‘rsatadi. Bu holat ehtimoliy subklad mavjudligini yoki ma’lumot sifatiga oid omillarni anglatishi mumkin, shu bois ularni kelgusi tadqiqotlarda batafsil boshqa gen qismlari bilan o‘rganish lozim.

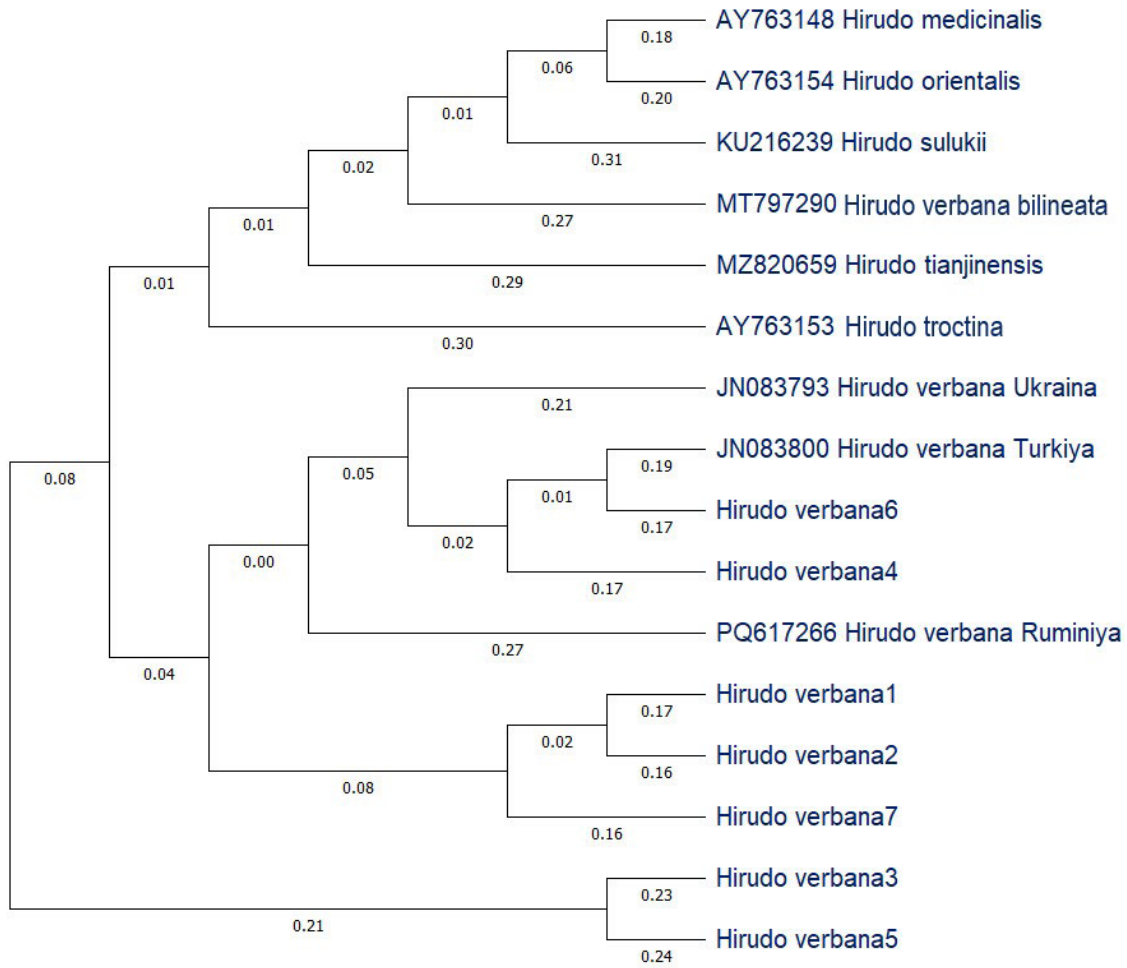
2-jadval

Filogenetik tahlil uchun namunalarning nomi, “GenBank”dagi identifikatsiya raqami (ID), geografik joylashuvi, manbasiga oid ma’lumotlari [4, 7, 11, 13, 21, 22].

Tur (namuna) nomi	Namuna ID	Hudud	Manba
Hirudo medicinalis	AY763148	Germaniya	Trontelj and Utevsky, 2005
Hirudo nipponia	AY763153	Janubiy Koreya	Trontelj and Utevsky, 2005
Hirudo orientalis	AY763154	Ozarbayjon	Trontelj and Utevsky, 2005
Hirudo troctina	AY763155	Marokash	Trontelj and Utevsky, 2005
Hirudo verbana	JN083793	Ukraina	Siddall et al., 2007
Hirudo verbana	JN083800	Turkiya	Trontelj and Utevsky, 2005
Hirudo sulukii	KU216239	Turkiya	Saglam et al., 2016
Hirudo verbana bilineata	MT797290	Ispaniya	Arias et al., 2021
Hirudo tianjinensis	MZ820659	Xitoy	Wang et al., 2022
Hirudo verbana	PQ617266	Ruminiya	Popa et al., 2021
Hirudo verbana1	SUB15531844	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot

Hirudo verbana2	SUB15531855	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot
Hirudo verbana3	SUB15563875	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot
Hirudo verbana4	SUB15564158	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot
Hirudo verbana5	SUB15608318	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot
Hirudo verbana6	SUB15608325	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot
Hirudo verbana7	SUB15608349	O‘zbekiston	Ushbu tadqiqot

Tahlillar uchun ajratib olingan *Hirudo* urug‘ining boshqa turlari filogenetik jihatdan yaxshi ajraldi. *H. medicinalis* va *H. orientalis* juda yaqin qarindosh bo‘lib, *H. sulukii* bilan birga bitta katta klad hosil qiladi. *H. tianjinensis* esa mustaqil tarmoqqa ega bo‘lib, boshqa turlardan sezilarli darajada farqlandi. Ushbu natijalar *Hirudo* urug‘ida tur ichidagi genetik xilmaxillik yuqori ekanligini va ayrim populyatsiyalar orasida izolyatsiya mavjudligini tasdiqlaydi.



3-rasm. Mahalliy *Hirudo verbana* zulugining boshqa populyatsiyalar va turlar bilan filogenetik shajara daraxti.

XULOSA

O‘zbekistonning 4 viloyatidagi 6 tumanda dorixona tibbiyot zulugi *H. verbana* populyatsiyalari tarqalgan bo‘lib, ichki va tashqi morfologik xususiyatlari adabiyotlarda keltirilgan tavsiflarga mos keldi. Biotoplarining tahlili *H. verbana* zulugi sayoz, turg‘un yoki sekin oqimli, osti loyqa substratli va kimyoviy ifloslanmagan suv havzalarida uchrashini ko‘rsatdi. Molekulyar jihatdan identifikatsiyasi va filogenetik tahlillar *H. verbana* zulugining monofiletikligini ko‘rsatib, bu o‘z navbatida zoogeografik omillar bilan izohlandi. Tahlillarda Sharqiy Yevropa populyatsiyalari o‘zaro yaqin tarmoqlandi, Iberiya populyatsiyasi (*H. verbana bilineata*) esa alo-

hida subklad sifatida ajraldi. O‘zbekiston namunalarining bir qismi asosiy kladga yaqin, ayrimlari esa mustaqil tarmoqlarda joylashdi. Ushbu natijalar bioxilmaxillikni saqlash, genetik tahlillar qilish va tibbiy maqsadlarda foydalaniladigan populyatsiyalar monitoringi uchun muhim hisoblanadi.

Minnatdorchilik. *Ushbu tadqiqot Innovatsion rivojlanish agentligining “Akademik harakatchanlik” tanlovi doirasidagi AK-25-36 sonli loyiha asosida amalga oshirildi. Molekulyar tahlillarda metodik yordami uchun Genomika va bioinformatika markazining “Bioinformatika” laboratoriyasi ilmiy xodimlariga samimiy minnatdorchiligimizni bildiramiz.*

Adabiyotlar:

1. *Zagrebin S.* Biologik xilma-xillikni saqlashning yangi milliy maqsadlari. – Toshkent: BMT taraqqiyot dasturi, 2025. – 32 b.

2. O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2019-yil 30-oktabrdagi “2030-yilgacha bo‘lgan davrda O‘zbekiston Respublikasining Atrof-muhitni muhofaza qilish konsepsiyasini tasdiqlash to‘g‘risida”gi PF 5863-son Farmoni [Internet manba]. URL: https://lex.uz/docs/-4574008 (Murojaat etilgan sana: 25.08.2025).

3. *Utevsky S., Zagmajster M., Atemasov A., Zinenko O., Utevska O., Utevsky A.* Distribution and status of medicinal leeches (genus *Hirudo*) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? // Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems. – 2009. – Vol. 20. Iss. 2. – P. 198–210.

4. *Arias A., Surugiu V., Carballeira R., Popa O.P., Popa, L.O., Utevsky S.* Unravelling the extent of diversity within the iberian medicinal leeches (Hirudinea: *Hirudo*) using molecules and morphology // Biology. – 2021. – Vol. 10. Iss. 4. – P. 1–22.

5. *Marrone F., Canale D. E.* Occurrence, distribution and bibliography of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea, Hirudinidae) in Sicily (Italy) // Biogeograph. – 2019. – № 34. – P. 33–38.

6. *Vecchioni L., Bellucci D., Novaga R., Faraone F. P., Utevsky S., Marrone F.* Further evidence of the southern Mediterranean medicinal leech *Hirudo verbana* (Annelida, Hirudinea) feeding on fish, with a review of the use of fish hosts by *Hirudo* spp. // Limnetica. – 2024. – Vol. 44. Iss. 1. – P. 101–111.

7. *Popa O. P., Ștefan A., Baltag E. Ș., Stratan A. A., Popa L. O., Surugiu V.* High genetic diversity of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida: Hirudinea: Hirudinidae) in Romania confirms that the Balkans are refugia within refugium // Diversity. – 2024. – № 16(12). – P. 1–15.

8. *Živić I., Radosavljević T., Stojanović K. et al.* The first molecular characterization of the genus *Hirudo* on the territory of Serbia: estimation of endangerment // Aquatic Ecology. – 2015. – № 49. – P. 81–90.

9. *Suvad L., Mirzeta K. Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida, Hirudinidae) nxlova vrsta pijavice u bosni i hercegovini // Uzizaž biospeld. – 2012. – Vol. 8. – P. 1–6.

10. *Cséfalvay R., Janák M., Immerová B.* First reliable records of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida: Hirudinida) from Slovakia and notes on its syntopy with *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 // Folia faunistica Slovaca. – 2017. – № 22. – P. 63–66.

11. *Trontelj P., Utevsky S. Y.* Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*) // Molecular phylogenetics and evolution. – 2005. – № 34(3). – P. 616–624

12. *Trontelj P., Utevsky S. Y*. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): fast dispersal and shallow genetic structure // Molecular phylogenetics and evolution. – 2012. – № 63(2). – P. 475–485.

13. *Siddall M. E., Trontelj P., Utevsky S.Y., Nkamany M., Macdonald K. S*. Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis* // Proceedings: Biological Sciences. – 2007. – № 22. – P. 1481–1487.

14. *Abdullayev T.M*. O‘zbekiston milliy atlasi. I jild. – Toshkent: O‘zbekiston Milliy ensiklopediyasi, 2020. – 275 b.

15. *ArcGIS* Geographic Information System. https://www.arcgis.com ArcGIS 10.8 2019 [Internet manba]. URL: https://www.arcgis.com/index.html (Murojaat etilgan sana: 25.08.2025).

16. Лукин Е.И. Пиявки пресных и солоноватых водоёмов // В серии: Фауна СССР. Пиявки. Т. I. – *Ленинград*: Наука, 1976. – 484 с.

17. *Nesemann H., Neubert E. Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea* // In: Süßwasserfauna von Mitteleuropa (Schwoerbel, J.; Zick, P.; eds.) Bd 6/2. Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag, – 1999. – P. 192.

18. *Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular marine biology and biotechnology. – 1994. – Vol. 3. Iss. 5. – P. 294–299.

19. *Tamura K., Stecher G., Kumar S.* MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // Molecular biology and evolution. – 2021. – P. 3022–3027.

20. *Solijonov X.X.* Farg'ona vodiysi zuluklari (Hirudinea)ning tur tarkibi va ekologik xususiyatlari (O'zbekiston). Biol.fan.bo'yicha falsafa doktori (PhD) dissertatsiyasi avtoreferati – Andijon, 2023. – 48 b.

21. *Saglam N., Saunders R., Lang S.A. et al.* A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches // BMC Zoology. – 2016. – Vol. 1 Iss. 5. – P. 1–12.

22. *Wang H, Meng F-M, Jin S-J, Gao J-W, Tong X-R, Liu Z-C* A new species of medicinal leech in the genus *Hirudo* Linnaeus, 1758 (Hirudiniformes, Hirudinidae) from Tianjin City, China // ZooKeys. – 2022. – № 1095. – P. 83–96.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF *HIRUDO VERBANA* CARENA, 1820 OCCURRING IN NATURAL WATER BODIES

Khayrulla Kh. Solijonov[1,2], Mirzakamol S. Ayubov[3], Zuvayd Izzatullaev[4], Farrukh U. Umarov[1], Salokhiddin Kh. Usmonov[1], Diyora O. Janbaz[1]

Ilmiy xabarnoma. Seriya: Biologik tadqiqotlar – Scientific Bulletin. Series: Biological Research. 2025. 8(92). 38-47.

[1]Andijan State University, Andijan, 170100, str. University, 129 (Uzbekistan). E-mail: agsu_info@edu.uz

[2]Research Institute of Environment and Nature Protection Technologies, Tashkent, 100043, str. Bunyodkor, 7a (Uzbekistan). E-mail: ecoilm@umail.uz

[3]Center of Genomics and Bioinformatics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, 111215, str. University, 2 (Uzbekistan). E-mail: info@genomics.uz

[4]Samarkand State University, Samarkand, 140100, blv. University, 15 (Uzbekistan). E-mail: devonxona@samdu.uz

Keywords: *Hirudo verbana*, *medicinal leech, GIS map, species population, molecular identification, PCR, sequence, phylogenetic analysis.*

Investigating the parasite-host and predator-prey biotic interactions of leeches among hydrobiont animals in aquatic ecosystems is essential for conserving biodiversity and analysing population-level metrics. The use of modern approaches in biodiversity research is crucial for achieving high efficiency. In particular, molecular identification methods for delineating species diversity and the development of GIS maps based on the delineation of population "hotspots" across different ecosystems are of scientific importance. These methods enable remote phylogenetic, zoogeographic and population analyses of taxa distributed across different regions of the world. In this context, our study aimed to characterise the genetic dataset of the medicinal leech Hirudo verbana in Uzbekistan using mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI), and to generate GIS maps of its distribution.

In this study, the range, morphology, ecological characteristics of biotopes and genetic diversity of the pharmacy medicinal leech *H. verbana* Carena, 1820 in natural water bodies of Uzbekistan were assessed systematically. Samples collected between 2020 and 2025 from seven districts of Andijan, Navoi, Kashkadarya and Surkhandarya provinces were georeferenced and incorporated into GIS maps. The morphological descriptions of *H. verbana* were congruent with classical literature, including large body size, yellow-brown dorsal patterns, an olive-coloured ventral surface and a three-jawed oral apparatus. Genomic DNA was extracted from tissues preserved in 96% ethanol. The mitochondrial COI marker was amplified using universal Folmer primers via polymerase chain reaction (PCR), and the results were confirmed by sequencing. Sequence reads were aligned and compared with GenBank records. Phylogenetic analyses were per-

formed in MEGA 11, and a phylogenetic tree was reconstructed.

The results confirmed that *H. verbana* forms a monophyletic clade. Eastern European populations (Ukraine, Türkiye and Romania) clustered closely, indicating a high likelihood of gene flow across the range. The Iberian population (*H. verbana* bilineata) formed a distinct subclade. Uzbek samples partly grouped near the main clade, whereas some formed independent branches. The study provides primary information on the distribution, ecological preferences and genetic structure of H. verbana in Uzbekistan. The findings have direct practical significance for national biodiversity-conservation strategies, genetic banking and the monitoring of medicinal leech populations. The GIS maps will aid population protection, resource planning and the targeting of future field expeditions. Future work should expand molecular identification with additional genetic markers to refine population-level inferences.

References:

1. Zagrebin, S. (2025). *Biologik xilma-xillikni saqlashning yangi milliy maqsadlari* [New national targets for biodiversity conservation]. Tashkent: BMTTD.

2. *O‘zbekiston Respublikasi Prezidentining 2019-yil 30-oktabrdagi “2030-yilgacha bo‘lgan davrda O‘zbekiston Respublikasining Atrof-muhitni muhofaza qilish konsepsiyasini tasdiqlash to‘g‘risida”gi PF 5863-son Farmoni* [Decree of the President of the Republic of Uzbekistan PF No.5863 of October 30, 2019, ‘On Approval of the Concept of Environmental Protection of the Republic of Uzbekistan for the Period up to 2030’]. [Online]. URL: https://lex.uz/docs/-4574008 (Date of Access: August 25, 2025).

3. Utevsky, S., Zagmajster, M., Atemasov, A., Zinenko, O., Utevska, O., Utevsky, A. (2009). Distribution and status of medicinal leeches (genus Hirudo) in the Western Palaearctic: anthropogenic, ecological, or historical effects? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*,. Vol. 20. Issue 2. Pp. 198-210.

4. Arias, A., Surugiu, V., Carballeira, R., Popa, O.P., Popa, L.O., Utevsky, S. (2021). Unravelling the Extent of Diversity within the Iberian Medicinal Leeches (Hirudinea: Hirudo) Using Molecules and Morphology. *Biology*. Vol. 10. Pp. 1-22.

5. Marrone, F., Canale, D. E. (2019). Occurrence, distribution and bibliography of the medicinal leech *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea, Hirudinidae) in Sicily (Italy). *Biogeograph*. 34. Pp. 33-38.

6. Vecchioni, L., Bellucci, D., Novaga, R., Faraone, F.P., Utevsky, S., Marrone, F. (2024). Further evidence of the southern Mediterranean medicinal leech *Hirudo verbana* (Annelida, Hirudinea) feeding on fish, with a review of the use of fish hosts by Hirudo spp. *Limnetica.* 44(1). Pp. 101-111.

7. Popa, O.P., Ștefan, A., Baltag, E. Ș., Stratan, A.A., Popa, L.O., Surugiu, V. (2024). High Genetic Diversity of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida: Hirudinea: Hirudinidae) in Romania Confirms That the Balkans Are Refugia Within Refugium. *Diversity*. 16(12). Pp. 1-15.

8. Živić, I., Radosavljević, T., Stojanović, K. et al. (2015). The first molecular characterization of the genus *Hirudo* on the territory of Serbia: estimation of endangerment. *Aquatic Ecology.* 49. Pp. 81-90.

9. Suvad, L., Mirzeta, K. (2012). *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Hirudinea: Arhynchobdellida, Hirudinidae) nx1ova vrsta pijavice u bosni i hercegovini. uzizaž biospeld Vol. 8 Broj stranica: 1-6 [The first record of a leech species in Bosnia and Herzegovina] Uzizaž Biospeld. 8. Pp. 1-6.

10. Cséfalvay, R., Janák, M., Immerová, B. (2017). First reliable records of *Hirudo verbana* Carena, 1820 (Annelida: Hirudinida) from Slovakia and notes on its syntopy with *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758. *Folia faunistica Slovaca.* 22. Pp. 63-66.

11. Trontelj, P., Utevsky, S.Y. (2005). Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Molecular phylogenetics and evolution molecular phylogenetics and evolution*. 34(3). Pp. 616-624.

12. Trontelj, P., Utevsky, S.Y. (2012). Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): fast dispersal and shallow genetic structure. *Molecular phylogenetics and evolution.* 63(2). Pp. 475-485.

13. Siddall, M.E, Trontelj, P., Utevsky, S.Y, Nkamany, M., Macdonald, K.S. (2007). Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Molecular marine biology and biotechnology*. 22. Pp. 1481-1487.

14. Abdullayev, T.M. va boshqalar. (2020). O‘zbekiston milliy atlasi [National Atlas of Uzbekistan]. Vol. I. Tashkent: O‘zbekiston Milliy ensiklopediyasi.

15. ArcGIS Geographic Information System. https://www.arcgis.com. ArcGIS 10.8 2019. [Online]. URL: https://www.arcgis.com/index.html (Date of Access: August 25, 2025)

16. Lukin, E.I. (1976). Piyavki presnyh i solonovatyh vodoyomov [Leeches of fresh and brackish water bodies]. In: *Fauna SSSR. Piyavki* [Fauna of the USSR. Leeches]. Vol. I. Leningrad: Science.

17. Nesemann, H., Neubert, E. (1999). Annelida, Clitellata: Branchiobdellida, Acanthobdellea, Hirudinea. In: *Freshwater fauna of Central Europe* (Schwoerbel, J.; Zick, P.; eds.). Bd 6/2. Heidelberg, Berlin. Spektrum Akademischer Verlag.

18. 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. *Molecular marine biology and biotechnology*. Vol. 3. Issue 5. Pp. 294-299.

19. Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. (2021). P. 3022-3027.

20. Solijonov, X.X. (2023). *Farg'ona vodiysi zuluklari (Hirudinea)ning tur tarkibi va ekologik xususiyatlari (O'zbekiston)* [Species composition and ecological characteristics of Ferghana Valley leeches (Hirudinea) (Uzbekistan). PhD dissertation abstract. – Andijan.

21. Saglam, N., Saunders, R., Lang, S.A. et al. (2016). A new species of *Hirudo* (Annelida: Hirudinidae): historical biogeography of Eurasian medicinal leeches. *BMC Zoology.* Vol. 1. Issue 5. Pp. 1-12.

22. Wang, H., Meng, F-M., Jin, S-J., Gao, J-W., Tong, X-R., Liu, Z-C. (2022). A new species of medicinal leech in the genus *Hirudo* Linnaeus, 1758 (Hirudiniformes, Hirudinidae) from Tianjin City, China. *ZooKeys.* 1095: Pp. 83-96.

Mualliflar haqida ma'lumot:

SOLIJONOV Xayrulla Habibulla o'g'li – biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori, Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi dotsenti; Atrof-muhit va tabiatni muhofaza qilish texnologiyalari ilmiy tadqiqot instituti doktoranti. E-mail: khsolijonov1991@gmail.com

AYUBOV Mirzakamol Sobitjonovich – biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori, Genomika va bioinformatika markazi "Bioinformatika" laboratoriyasi mudiri, katta ilmiy xodim. E-mail: mirzoayubov@gmail.com

IZZATULLAYEV Zuvayd – biologiya fanlari doktori, Samarqand davlat universiteti Ekologiya va hayot faoliyati xavfsizligi kafedrasi professori. E-mail: zizzat@yandex.ru

UMAROV Farrux Ulug'bekovich – biologiya fanlari bo'yicha falsafa doktori, Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi dotsenti. E-mail: eco_umarov@mail.ru.

USMONOV Salohiddin Homidjon o'g'li – Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi doktoranti. E-mail: usmonovsaloxiddin3@gmail.com.

JANBAZ Diyora Odiljon qizi – Andijon davlat universiteti Ekologiya va barqaror rivojlanish kafedrasi magistranti. E-mail: canercanbaz7832@gmail.com.