



**ILK G‘O‘ZA (*Gossypium hirsutum* L.) METABOLIK MUHANDISLIGI:
Artemisia annua cADS GENINING OVEREKSPRESSIYASI ORQALI
ARTEMIZININ BIOSINTEZINI TA‘MINLASH**

Raxmanov Baxtiyor Karimovich

k.i.x., O‘zRFA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent.

bakhtiyor.rakhmanov@gmail.com, +998883337907

Buriyev Zabardast Tojiboyevich

b.f.d. Prof., O‘zRFA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent

Shermatov Shuhrat Ermatovich

b.f.n., O‘zRFA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent

Ubaydullayeva Xurshida Abdullayevna

b.f.d., O‘zRFA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent

Abdurahmonov Ibrohim Yulchiyevich

b.f.d. akademik, O‘zRFA Genomika va bioinformatika markazi, Toshkent

Annotatsiya. Ushbu innovatsion metabolik muhandisligi tadqiqotida ilk bor *Artemisia annua* L. o‘simligining cADS geni yordamida g‘o‘za (*G. hirsutum*) o‘simligida artemizinin va arteannuin B heterologik biosintezini yo‘lga qo‘yishga qaratilgan tahlil natijalari keltirilgan. *In silico* 3D-strukturaviy tahlil AaADS va endogen GhCAD oqsillari o‘rtasida yuqori fazoviy gomologiyani (RMSD = 0,941 Å) ko‘rsatib, ekzogen fermentning funksional faolligini asosladi. Overekspression pBINPLUS:Aa-cADS vektori *A. tumefaciens* vositasida transformatsiya qilinib, somatik embriogenez orqali biotexnologik g‘o‘za liniyalari olindi. Molekulyar tahlillarda cADS genining g‘o‘za genomiga integratsiyasi va ekspressiyasi tasdiqlandi. UHPLC-QTOF-MS usulida o‘tkazilgan metabolomik tahlillar orqali transformant liniyalarda maqsadli metabolitlar (artemizinin va arteannuin B) sintezi aniqlandi.

Kalit so‘zlar: Metabolik muhandislik, AlphaFold2, RMSD, *G. hirsutum*, *A. annua*, cADS geni, agrobakteriya, biotexnologik g‘o‘za, UHPLC-QTOF-MS, artemizinin, arteannuin B.

Аннотация. Впервые приведены результаты инновационной метаболической инженерии хлопчатника (*G. hirsutum*), направленной на гетерологичный биосинтез артемизинина и артеаннуина Б с использованием гена *cADS* из *A. annua*. *In silico* 3D-структурный анализ показал высокую пространственную гомологию между AaADS и эндогенным белком GhCAD (RMSD = 0,941 Å), что обосновывает функциональную активность экзогенного фермента. Путем *A. tumefaciens*-опосредованной трансформации оверэкспрессионным вектором *pBINPLUS:Aa-cADS* и последующего соматического эмбриогенеза были получены биотехнологические линии хлопчатника. Молекулярный анализ подтвердил интеграцию и экспрессию гена *cADS* в геноме. Метаболомный анализ методом UHPLC-QTOF-MS выявил синтез целевых метаболитов (артемизинин и артеаннуин Б) в трансформантных линиях.

Ключевые слова: Метаболическая инженерия, AlphaFold2, RMSD, *G. hirsutum*, *A. annua*, ген *cADS*, агробактерия, биотехнологический хлопчатник, UHPLC-QTOF-MS, артемизинин, артеаннуин Б.

Abstract. For the first time, this study presents the results of innovative metabolic engineering of cotton (*G. hirsutum*) aimed at the heterologous biosynthesis of artemisinin and arteannuin B using the *cADS* gene from *A. annua*. *In silico* 3D structural analysis showed high spatial homology between AaADS and the endogenous GhCAD protein (RMSD = 0.941 Å), providing theoretical proof for the functional activity of the exogenous enzyme. Biotechnological cotton lines were generated via *A. tumefaciens*-mediated transformation with the overexpression vector *pBINPLUS:Aa-cADS* followed by somatic embryogenesis. Molecular analysis confirmed the genomic integration and expression of the *cADS* gene. UHPLC-QTOF-MS metabolomic profiling revealed the synthesis of target metabolites (artemisinin and arteannuin B) in the transformant lines.

Keywords: Metabolic engineering, AlphaFold2, RMSD, *G. hirsutum*, *A. annua*, *cADS* gene, agrobacterium, biotechnological cotton, UHPLC-QTOF-MS, artemisinin, arteannuin B.

Kirish. Artemizinin an'anaviy Xitoy tabobatida keng qo'llaniladigan bir yillik shuvoq (*Artemisia annua*) dorivor o'simligidan ilk bor ajratib olingan seskviterpen lakton endoperoksidi hisoblanadi [1]. Ushbu modda zamonaviy bezgakka qarshi kurashning asosiy vositasiga aylangan bo'lib, o'zining keng ko'lamli farmakologik faolligi [2] hamda bezgak, saraton, virusli va bakterial kasalliklarga qarshi terapevtik samaradorligi sababli ilmiy hamjamiyatning ortib borayotgan qiziqishiga sazovor bo'lmoqda [3, 4].

Bezgakka qarshi faolligi

Artemizinin va uning hosilalari (artesunat, artemeter va digidroartemizinin kabi) asoratsiz va og'ir kechuvchi *Plasmodium falciparum* bezgagiga qarshi birinchi o'rinda tavsiya etiluvchi artemizinin asosidagi majmuaviy terapiya (ACT - Artemisinin-based Combination Therapies) hisoblanadi [1]. Ushbu birikmalar qondagi jinsiz va erta jinsiy kopayish bosqichlaridagi parazitlarni tezlik bilan yo'q qilib, global miqyosda bezgak bilan

kasallanish va o‘lim ko‘rsatkichlarining keskin kamayishiga salmoqli hissa qo‘shib kelmoqda [5]. Ularning ta’sir mexanizmi endoperoksid ko‘prigining temir ishtirokida parchalanishiga asoslanib, natijada parazit oqsillari va hujayra membranalariga shikast yetkazuvchi reaktiv kislorod turlari hosil bo‘ladi [1]. Asosan Kelch 13 oqsili propeller domenidagi mutatsiyalar bilan bog‘liq bo‘lgan rezistentlik dastavval Janubi-Sharqiy Osiyoda namoyon bo‘ldi va hozirda boshqa hududlarga tarqalmoqda, bu esa uzluksiz monitoring va davolashning yangi majmuaviy strategiyalarni ishlab chiqishni taqozo etadi [6]. Shunga qaramay, artemizinin asosidagi kombinatsiyalangan terapiya (ACT) to‘g‘ri qo‘llanilganda har yili millionlab insonlarning hayotini saqlab qolishda davom etmoqda [1].

Saratonga qarshi samaradorligi

Bezgakni davolashdan tashqari, artemizinin va uning hosilalari saraton hujayralarining keng ko‘lamli turlariga, jumladan o‘pka, kolorektal, jigar, tuxumdon, me‘da osti bezi va leykoz saratoni liniyalariga nisbatan selektiv (tanlab ta’sir etuvchi) sitotoksiklik namoyon etadi [1, 3]. Dastlabki kuzatuvlar shuni ko‘rsatdiki, digidroartemizinin transferrin bilan birgalikda qo‘llanilganda, normal hujayralarga zarar yetkazmagan holda, temir ionlariga boy bo‘lgan saraton hujayralarini selektiv ravishda yo‘q qiladi [1]. Saratonga qarshi ta’sirning ko‘plab mexanizmlari aniqlangan: oksidativ stress va ferroptozni rag‘batlantirish, hujayra siklini to‘xtatish (apoptoz), autofagiyaning modulyatsiya qilish, angiogenezni tormozlash hamda NF- κ B signal uzatish yo‘liga aralashish, shular jumlasidandir [3]. Klinik tadqiqotlar va preklinik modellar yordamida ushbu birikmalarning xavfsizligi va potentsial samaradorligi tasdiqlanib, artemizinin birikmalarini onkologiyada an’anaviy terapiya bilan birgalikda qo‘llash uchun qayta yo‘naltiriladigan istiqbolli nomzod davolash usullari sirasiga kiritilgan [3, 4].

Virus va bakteriyalarga qarshi faolligi

Artemizinin hosilalari bir qancha viruslarga, jumladan B va C gepatitlari, odam herpesviruslari, A grippi, HIV-1 va yaqin yillarda aniqlangan SARS-CoV-2 ga qarshi yuqori faolligi aniqlangan [3, 7]. Taxmin qilinayotgan ta’sir mexanizmlariga virusning hujayraga kirishiga to‘sqinlik qilish, NF- κ B signalizatsiyasini ingibirlash va virus replikatsiyasini izdan chiqarish kiradi [5]. Shuningdek, turli patogenlarga, jumladan sil va boshqa bakterial infeksiyalarga qarshi samaradorlik ko‘rsatilgan, biroq ushbu xususiyatlar bezgakka va saratonga qarshi xossalariga nisbatan kamroq o‘rganilgan [8]. Umuman olganda, ushbu birikmalar yuqumli kasalliklarni davolashda yordamchi yoki qayta yo‘naltirilgan agentlar sifatida katta istiqbolga ega [3, 4].

***Artemisia annua* biosintezi, genlari va biotexnologik yondashuvlar**

A. annua o‘simligida artemizininning tabiiy to‘planish darajasi juda past bo‘lib (odatda quruq barg vaznining 0,01–1% ini tashkil etadi), bu homashyo yetkazib berishni cheklaydi hamda mahsuldorlikni oshirishga qaratilgan tadqiqotlarni rag‘batlantiradi [9]. Biosintez yo‘li sitozol mevalonat (MVA) va plastida metileritritol fosfat (MEP) yo‘llari orqali yetkazib beriladigan izopentenil difosfat (IPP) va dimetilallil difosfat (DMAPP) dan boshlanadi.

Biosintezda ishtirok etuvchi asosiy spetsifik fermentlarga amorfa-4,11-dien sintaza (ADS), sitoxrom P450 monooksigenaza CYP71AV1 (o‘zining reduktazasi CPR bilan birga), artemizinin aldegid $\Delta 11(13)$ reduktaza (DBR2) va aldegid dehidrogenaza 1 (ALDH1) kiradi [9, 10].

A. annua genetik muhandisligi asosiy metabolik yo‘l genlarini (ADS, CYP71AV1, CPR, ALDH1, FPS, HMGR) overekspressiya qilishga, raqobatchi tarmoqlarni (masalan, skvalen sintaza) ekspressiyasini susaytirishga hamda transkripsiya omillarini (AaWRKY1, AaORA, AaMYC2, AaERF1/2) boshqarishga qaratilgan. Ko‘p genli ko-ekspressiya konstruksiyalari artemizinin miqdori 2 baravardan 3 baravargacha va undan ham yuqori bo‘lgan transgen liniyalarni olish imkonini bergan [11].

Metabolik muhandislik va sintetik biologiya yondashuvlari metabolik yo‘lning muayyan qismlarini mikroorganizm-xojayinlarga o‘tkazish imkonini berdi. Genetik modifikatsiyalangan *Saccharomyces cerevisiae* shtammlari artemizinin o‘tmishdoshi bo‘lgan artemizinin kislotasining yuqori titrlarini (MVA yo‘li, ADS, CYP71AV1, CPR, CYB5, ADH1 va ALDH1 genlarini chuqur optimallashtirishdan so‘ng 25 g/l gacha) sintez qildi, ushbu kislota keyinchalik kimyoviy usulda artemizininga aylantirildi [9, 10]. Shuningdek, *Escherichia coli* va geterologik o‘simlik tizimlarida (masalan, *Artemisia annua*, *Physcomitrella patens*, tamaki *Nicotiana tabacum*, shuningdek *Escherichia coli* va *Saccharomyces cerevisiae*) artemizinin va uning oraliq mahsulotlarini olish bo‘yicha shunday muvaffaqiyatli natijalarga erishilgan [2, 11, 12, 13]. Yuzaga chiqayotgan zamonaviy usullar, jumladan tezlikni cheklovchi yoki raqobatchi genlarni aniq tahrirlash uchun CRISPR/Cas9 texnologiyasi, toqima kulturasi, ildizli hairy-root tizimlari va elisitorlar ishlab chiqarish imkoniyatlarini yanada kengaytirmoqda. Ushbu biotexnologik yutuqlar mahsulot yetkazib berishni barqarorlashtirish, tannarxni arzonlashtirish va kengroq terapevtik qo‘llanilishini qo‘llab-quvvatlashga qaratilgandir [11, 12, 13].

Artemizinin bezgakka qarshi almashtirib bo‘lmas asosiy vosita bo‘lib qolayotgani holda, saraton, virusli va bakterial kasalliklarga qarshi ham keng ko‘lamli terapevtik faollik namoyon etmoqda. Uning molekulyar ta’sir mexanizmlarini chuqurroq o‘rganish hamda *A. annua* va geterologik xojayinlarning metabolik muhandisligini takomillashtirish global ehtiyojni ta’minlash va yangi klinik davolash imkoniyatlarini ochishda hal qiluvchi ahamiyatga egadir.

Tadqiqot maqsadi. Mazkur tadqiqotning maqsadi *Artemisia annua* cADS genini overekspressiyalash orqali artemizinin moddasini sintezlovchi biotexnologik g‘o‘za liniyalarini olishdan iboratdir.

MATERIALLAR VA METODLAR

In silico bioinformatik va 3D strukturaviy tahlil

Artemisia annua ning AaADS hamda *Gossypium hirsutum* ning endogen (+)-delta-kadinen sintaza (GhCAD) oqsillarining uch o‘lchamli (3D) tuzilishi AlphaFold2 platformasi yordamida modellashtirildi. Oqsillarning fazoviy superpozitsiyasi, katalitik motivlari

_____ **Qo‘qon DPI. Ilmiy xabarlar 2026-yil 8-son** _____ **A seriya**
(DDXXD) hamda faol markaz topologiyasi UCSF ChimeraX dasturida tahlil qilinib, RMSD (Root Mean Square Deviation - o‘rtacha kvadrat og‘ish ildizi) qiymati hisoblandi.

O‘simlik materiallari va genetik konstruksiya

Tadqiqotda *Gossypium hirsutum* L. turiga mansub Coker-312 navining qismlari eksplant sifatida hamda *Artemisia annua* L. o‘simligidan foydalanildi. Artemizinin biosintezining asosiy fermenti bo‘lgan amorfa-4,11-dien sintazani kodlovchi *cADS* geni ekspressiyasi uchun *pBINPLUS:Aa-cADS* overekspression vektori konstruksiyasi qo‘llanildi. Konstruksiyada maqsadli gen 35S promoter nazorati ostida joylashtirilgan.

Agrobakterial transformatsiya va somatik embriogenez

G‘o‘za eksplantlarini genetik transformatsiya qilish *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 shtammi) vositasida amalga oshirildi. Transformatsiyalangan gipokotil kesimlaridan kallus to‘qimalarini hosil qilish hamda somatik embriogenez bosqichlari orqali regenerant o‘simliklarni (*Gh_ART* liniyalari) o‘stirish tanlov seleksion turli tarkibli ozuqa muhitlarida (kanamitsin va sefotaksim saqlagan MS muhiti) olib borildi.

Molekulyar-genetik tahlillar (PCR, RT-qPCR va Sekvenslash)

DNK va RNK ajratish: Transformant hamda nazorat o‘simliklarining barg to‘qimalaridan umumiy genom DNKsi CTAB usuli bilan va umumiy RNK Trizol reagentlar to‘plami yordamida ajratib olindi.

PZR tahlili: Maqsadli *cADS* geni integratsiyasini tasdiqlash uchun *cADS* geniga spetsifik praymerlar yordamida PZR tahlili o‘tkazildi.

RT-qPCR: Kiritilgan genning transkripsion ekspressiya darajasini baholash uchun teskari transkripsiya va real-vaqt rejimida miqdoriy PZR (RT-qPCR) tahlillari bajarildi.

DNK Sekvenslash: Maqsadli gen ketma-ketligining to‘g‘riligi va nukleotidlar ketma-ketligidagi integratsiya aniqligi sekvenslash orqali tasdiqlandi.

Metabolomik va xromatografik tahlillar (UHPLC-MS)

Biotexnologik g‘o‘za liniyalarida (*Gh_ART2*, *Gh_ART5*) artemizinin va uning o‘tmishdoshi bo‘lgan arteannuin B biosintezini hamda metabolik profili tahlil qilish uchun ultra-yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi va kvadрупol-mass-spektrometriya (UHPLC-QTOF-MS) usulidan foydalanildi.

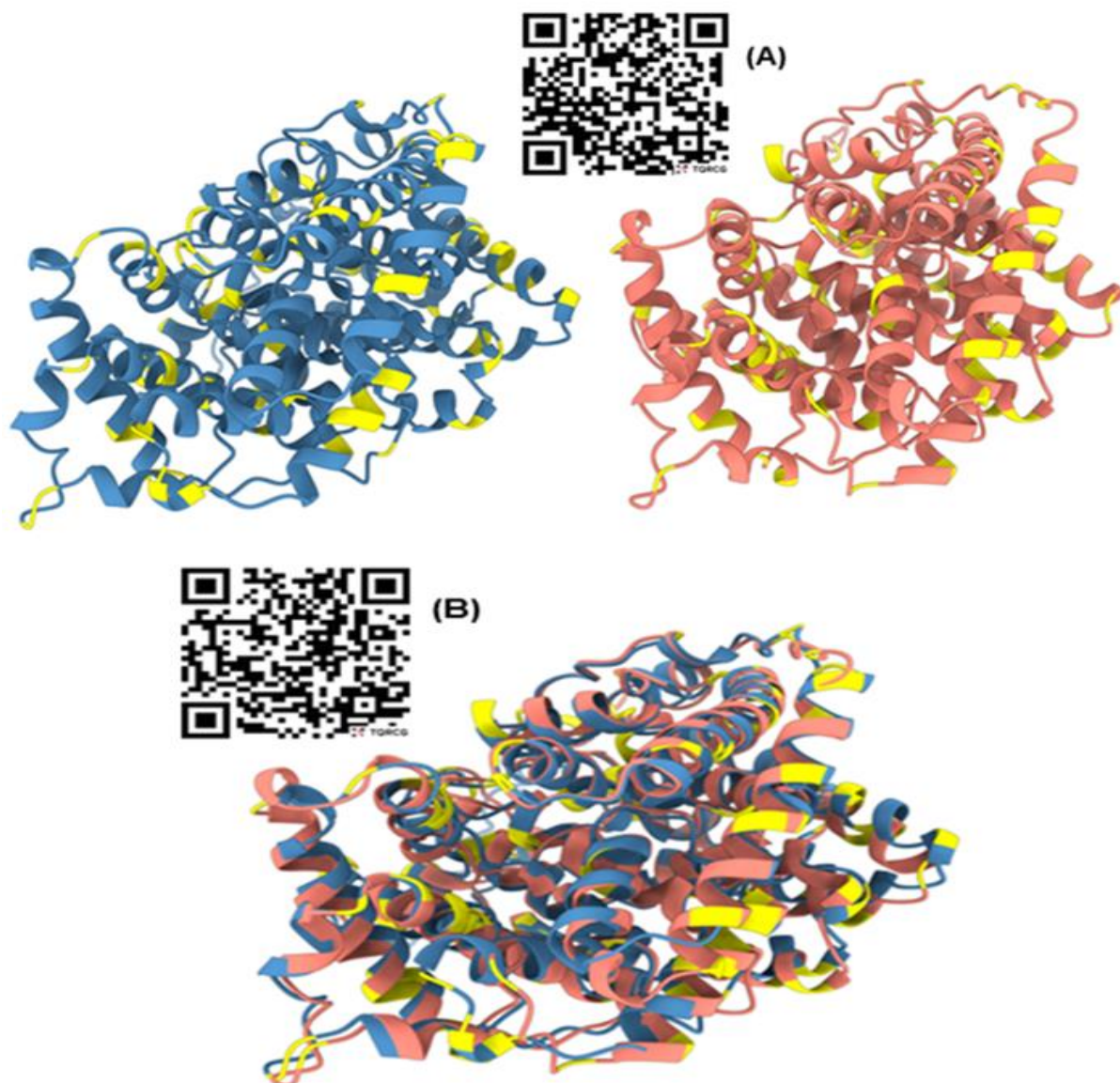
Statistik tahlil

Tadqiqot natijalari kamida uch karra takroriylikda bajarildi. Statistik ma’lumotlarni qayta ishlash hamda grafik model va gistogrammalarni shakllantirish tadqiqotda foydalanilgan AlXphaFold2 va UCSF ChimeraX hamda UHPLC-QTOF-MS maxsus dasturlarining algoritmlari vositasida amalga oshirilgan.

TADQIQOT NATIJALARI VA ULARNING MUHOKAMASI

AaADS va GhCAD oqsillarining in silico 3D-strukturaviy tahlili muhokamasi. AlphaFold2 va UCSF ChimeraX dasturlarida o‘tkazilgan 3D-strukturaviy tahlil shuni ko‘rsatdiki, ekzogen AaADS va endogen GhCAD oqsillarining uchlamchi arxitekturasini va katalitik motivlari (DDXXD) yuqori darajada gomologikdir. C alpha-atamlari bo‘yicha superpozitsiyada RMSD = 0,941 Å ga teng bo‘ldi (1-A, B rasmlar).

Algoritmik kichik RMSD qiymati AaADS fermentining g‘o‘za sitoplazmatik muhitida biofizik barqaror va funksional faol konformatsiyani egallay olishini nazariy va strukturaviy jihatdan asoslaydi. Faol markaz mikropografiyasidagi ayrim aminokislota almashinuvlari esa fermentning mahsulot spetsifikligini ta‘minlab, g‘o‘zada artemizinin va arteannuin B biosintez yo‘li muvaffaqiyatli shakllanishiga imkon yaratgan.

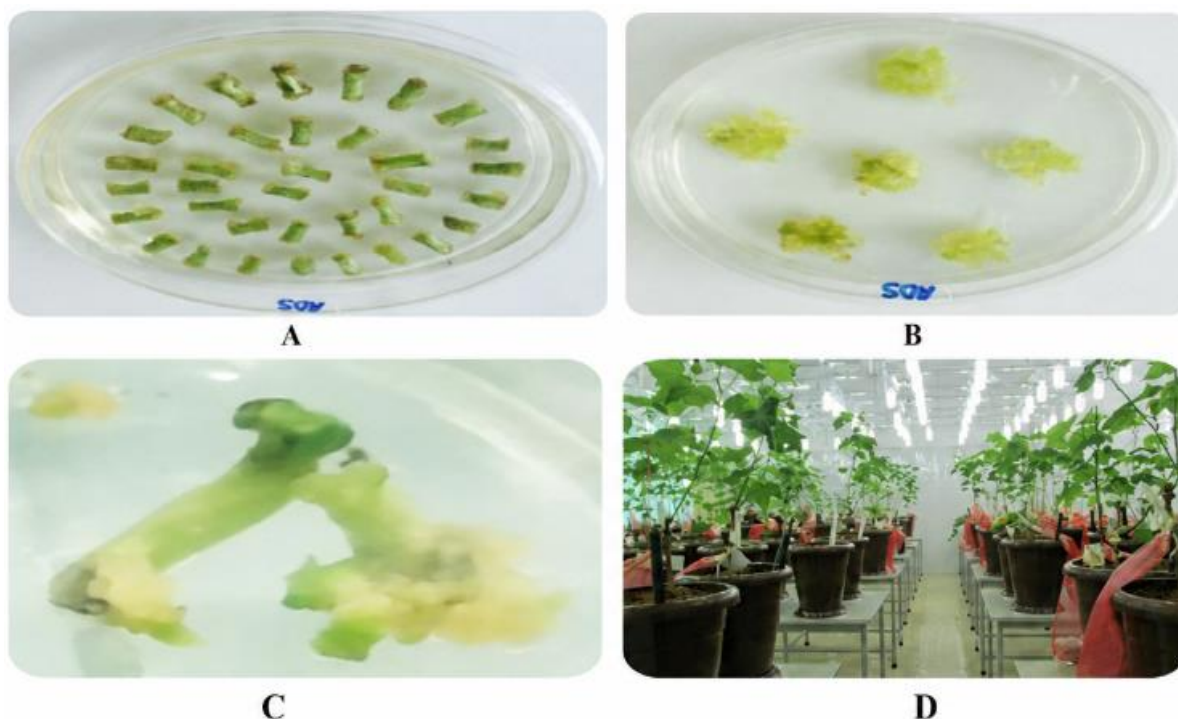


1-rasm (A, B): (A)- AaADS va GhCAD oqsillarining uchlamchi tuzilmalari va (B)- ularning strukturaviy superpozitsiyasi.

Ushbu 1-rasmda (A, B), *Artemisia annua* ning AaADS va g‘o‘zaning GhCAD oqsillarining AlphaFold va ChimeraX tahlillari yordamida bashorat qilingan uchlamchi tuzilmalari keltirilgan. Ko‘k rang GhCAD g‘o‘za oqsilini va pushti rang AaADS bir yillik shuvoq oqsilini, sariq rang esa ikkala oqsilda ham saqlanib qolgan konservativ aminokislota qoldiqlarini ifodalaydi. Tahlil natijasida konservativ aminokislota qoldiqlarining fazoviy joylashuvi va joylashish tartibi AaADS hamda GhCAD oqsillarida deyarli bir xil ekanligi aniqlandi. Bu holat katalitik markazning evolyutsion jihatdan konservativ saqlanganini va ikki oqsilning funksional o‘xshashligini ko‘rsatadi.

ChimeraX dasturida (1B-rasm) bajarilgan strukturaviy superpozitsiya natijasi ko‘rsatilgan. Superpozitsiya natijasida RMSD (o‘rtacha kvadrat og‘ish ildizi) 0,941 Å va 448 ta atom juftligi mos tushgani aniqlanib, AaADS va GhCAD oqsillari o‘rtasidagi yuqori darajadagi strukturaviy o‘xshashlik tasdiqlandi. Bu natijalar g‘o‘zaga kiritish rejalangan *Artemisia annua* cADS genining g‘o‘zada samarali funksional faol bo‘lishi uchun mos molekulyar asos mavjudligini nazariy jihatdan tasdiqlaydi.

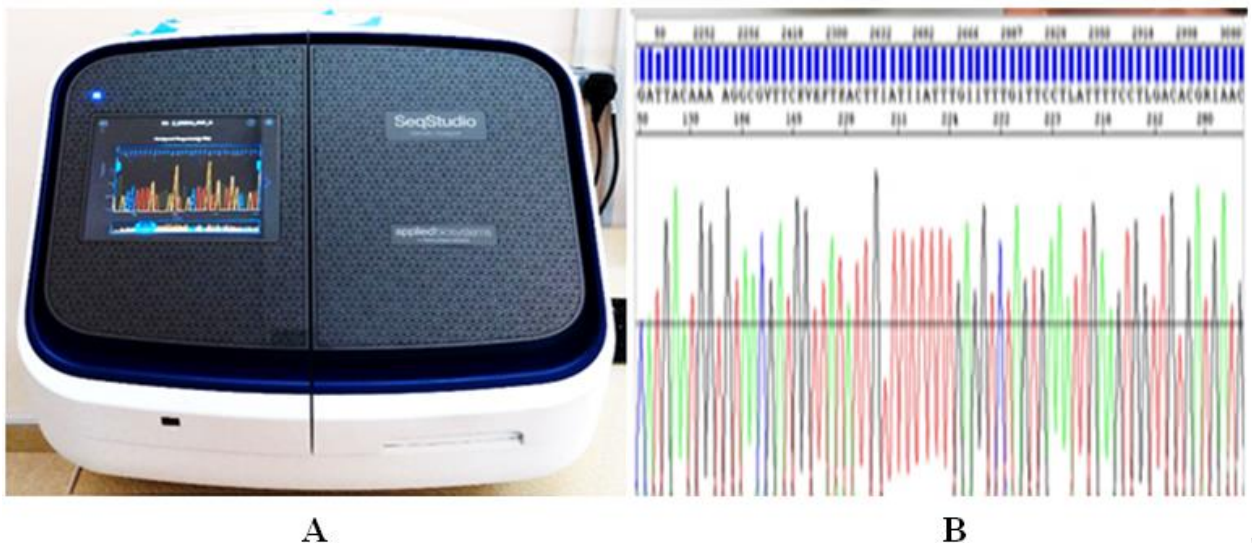
Artemisia annua cADS geni asosidagi transformatsiya va regenerant liniyalarning olinishi. *Agrobacterium tumefaciens* yordamida pBINPLUS:Aa-cADS overekspression recombinant vektor konstruksiyasini *G. hirsutum* turiga mansub Coker-312 navi gipokotillarini transformatsiya qilish va somatik embriogenez orqali regeneratsiya jarayonida kanamitsin seleksiyasiga chidamli kallus to‘qimalari va embroidlar shakllandi. Natijada maqsadli cADS genini o‘zida tutgan biotexnologik g‘o‘za liniyalari (Gh_ART2 va Gh_ART5) ajratib olindi va vegetativ o‘sish bosqichigacha yetishtirildi.



2-rasm (A, B, C, D). *Agrobacterium tumefaciens* vositasida transformatsiya qilish va somatik embriogenez usuli orqali biotexnologik g‘o‘za liniyalarini olish bosqichlari: A-

G‘o‘zaning biotexnologik liniyalarini olish jarayoni somatik embriogenezga asoslangan *Agrobacterium tumefaciens* transformatsiya usuli orqali amalga oshirildi (2-rasm). Dastlabki bosqichda gomogen gipokotil eksplantlari *pBINPLUS:Aa-cADS* overekspression vektorini tutgan *A. tumefaciens* bilan inokulyatsiya qilinib, ko-kultuvatsiya bosqichidan o‘tkazildi (2-rasm, A). Selektiv oziq muhitida o‘stirilgan eksplantlarning kesim yuzalarida seleksiyaga chidamli morfogenetik faollikka ega morfologik jihatdan zich va yashil kallus to‘qimalarining hosil bo‘lishi va faol proliferatsiyasi kuzatildi (2-rasm, B). Subkultura jarayonida ushbu kallus to‘qimalaridan somatik embrionlar shakllanib, ikki qutbli strukturaviy differensiallashuv bosqichidan o‘tdi va regenerant o‘simliklar shakllandi (2-rasm, C). In vitro sharoitida to‘liq ildiz otgan va rivojlangan biotexnologik g‘o‘za liniyalari fitotron xonasida tuproq substratiga muvaffaqiyatli adaptatsiya qilinib, in-vivo sharoitida vegetatsiya va generativ rivojlanish jarayoni davom ettirildi (2-rasm, D).

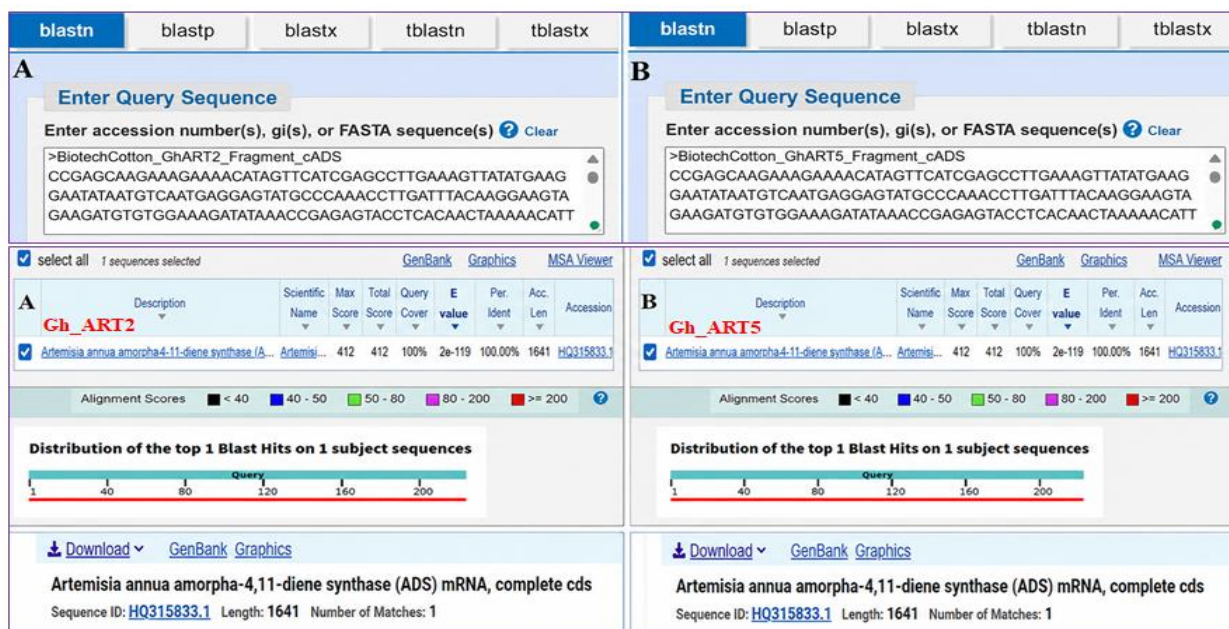
PZR va sekvenslash tahlili: Transgen *Gh_ART* liniyalari genom DNKsidan *cADS* a spetsifik praymerlar juftligi yordamida o'tkazilgan PZR tahlili nazorat o'simliklarida ilmagani amplikonga ega bo'lib, *cADS* geni g'o'za genomiga muvaffaqiyatli integrasiya anligini tasdiqladi. DNK sekvenslash natijalari esa kiritilgan gen donor maqsadli gen otid ketma-ketliklari bilan 100% identikligi tasdiqlandi. Bu natijalar yangi olingan ormant goza liniyalarining maqsadli genni tutgani muvaffaqiyatli tasdiqlandi.



85

sekvenslash va molekulyar tahlil qilish: A- SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) kapillyar sekvenatori uskunasi; B- Sanger usulida sekvenslash natijasida olingan nukleotidlar ketma-ketligining xromatogrammasi.

Genomga integratsiyalashgan *cADS* genining aniq nukleotidlar ketma-ketligi va strukturaviy yaxlitligini tasdiqlash maqsadida Sanger usulida sekvenslash tahlili o‘tkazildi (3-rasm). Sekvenslash reaksiyasi SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems) kapillyar sekvenatori yordamida amalga oshirildi (3-rasm, A). Olingan xromatogramma ma’lumotlari fluorestsent belgilangan nukleotidlarning yaqqol, aniq va shovqinlarsiz (*high signal-to-noise ratio*) piklarini namoyon etdi (3-rasm, B). Ushbu nukleotidlar ketma-ketligi *Artemisia annua* L. o‘simligining ma’lumotlar bazasidagi *cADS* geni ketma-ketligi (*Reference sequence*) bilan bioinformatsion tekshirilganda, transformant g‘o‘za liniyalarda gen strukturasi 100% spetsifikligi va kiritilgan maqsadli ketma-ketlikning to‘liq saqlanib qolganligi tasdiqlandi.



4-rasm (A, B). Biotexnologik g‘o‘za liniyalarida kiritilgan *Aa-cADS* geni fragmentining NCBI BLASTn vositasida lokal tekshirish (alignment) tahlili: A- Gh_ART2 va B- Gh_ART5 biotexnologik g‘o‘za liniyalaridan olingan *cADS* geni nukleotid ketma-ketliklarining GenBank ma’lumotlar bazasidagi *Artemisia annua amorpha-4,11-diene synthase* (HQ315833.1) geni bilan 100% gomologiyasi.

Sanger usulida sekvenirlash natijasida olingan *cADS* geni nukleotidlar ketma-ketligini bioinformatsion tahlil qilish va aniqlashtirish maqsadida NCBI (National Center for Biotechnology Information) bazasining BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) algoritmidan tekshirildi (4-rasm, A, B).

Tahlil natijalari shuni ko‘rsatdiki, Gh_ART2 (4-rasm, A) va Gh_ART5 (4-rasm, B) biotexnologik g‘o‘za liniyalaridan ajratib olingan va sekvenirlangan nukleotidlar ketma-

ketliklari GenBank ma'lumotlar bazasidagi *Artemisia annua* o'simligining ma'lum bo'lgan *amorpha-4,11-diene synthase* (ADS) geni (Accession No: HQ315833.1) bilan 100% identiklikni (Percent Identity = 100%) hamda to'liq qamrovni (Query Coverage = 100%) namoyon etdi. Yuqori statistik ishonchlilik ko'rsatkichi (Max Score = 412, E-value = 2e-119) kiritilgan *Aa-cADS* geni transformant g'o'za liniyalari genomiga aniq va nukleotid mutationlarisiz (o'zgarishlarsiz) to'liq va barqaror integratsiyalashganligini tasdiqladi.

RT-qPCR: Transkripsion darajadagi ekspressiya tahlili (RT-qPCR) *Gh_ART2* va *Gh_ART5* liniyalarida *cADS* genining yuqori mRNK transkripsiya darajasini ko'rsatdi.

Metabolomik va xromatografik (UHPLC-QTOF-MS) tahlili

G'o'za barg namunalarining UHPLC-QTOF-MS usulida olib borilgan metabolomik tahlillari tadqiqotda somatik embriogenez usulida olingan va maqsadli genni tutgan transformant *Gh_ART2* va *Gh_ART5* g'o'za genotiplarida endogen seskviterpenlar profili o'zgarganligini hamda heterologik metabolitlar artemizinin va uning prekursori arteannuin B biosintezi amalga oshganligini tasdiqladi. Salbiy nazorat hisoblangan Coker-312 va notransformant regenerant g'o'za o'simliklarida ushbu metabolitlar aniqlanmadi.

Xulosalar. Bioinformatik 3D-modellashtirish yordamida *AaADS* fermentining g'o'za proteomidagi endogen *GhCAD* geni bilan konformatsion o'xshashligi va barqarorligi (RMSD = 0,941 Å) tasdiqlandi hamda g'o'zada metabolik muhandislik orqali yangi farmatsevtik birikmalar biosintezini yo'lga qo'yish imkoniyati ilmiy jihatdan asoslandi.

Artemisia annua L. o'simligining maqsadli *cADS* genini tutgan *pBINPLUS:Aa-cADS* overekspression vektori va *Agrobacterium tumefaciens* vositasida *Gossypium hirsutum* L. o'simligining barqaror hamda funksional biotexnologik liniyalari olindi.

Molekulyar-genetik tahlillar (PZR, RT-PZR, Sanger sekvenslash va BLASTn alignment) orqali kiritilgan *Aa-cADS* genining g'o'za genomiga barqaror integratsiyalashgani va transkripsion faolligi tasdiqlandi.

UHPLC-QTOF-MS usulidagi metabolomik tahlillar yordamida dunyoda birinchi marta biotexnologik g'o'za liniyalarida artemizinin va arteannuin B metabolitlarining heterologik biosintezi va to'planishi isbotlandi.

Tadqiqotda olingan natijalar g'o'za (*Gossypium hirsutum* L.) o'simligini nafaqat tola va moy beruvchi qishloq xo'jaligi ekini, balki qimmatbaho farmatsevtik va ikkilamchi metabolitlarni (artemizinin va arteannuin B) sintez qiluvchi innovatsion o'simlik-bioreaktor sifatida foydalanishning nazariy hamda amaliy imkoniyatlarini namoyon etdi.

FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. Artemisinins: their growing importance in medicine. Trends Pharmacol Sci. 2008 Oct;29(10):520-7. doi: 10.1016/j.tips.2008.07.004.
2. Rakhmanov BK, Usmonov DE, Imamkhodjaeva AS, Zakiryaeva SI, Ubaydullaeva KA, Shermatov SE, Ayubov MS, Buriev ZT, Abdurakhmonov IY.

Therapeutic potential of *Artemisia annua* and artemisinin in viral infections, cancer and global health advancements. *Plant Sci Today*. 2025;12(1):1-9. doi: 10.14719/pst.3111.

3. Guan L, Wang H, Xu X, Fan H. Therapeutical Utilization and Repurposing of Artemisinin and Its Derivatives: A Narrative Review. *Adv Biol (Weinh)*. 2023 Aug;7(8):e2300086. doi: 10.1002/adbi.202300086.

4. Huang Y, Yang Y, Liu G, Xu M. New clinical application prospects of artemisinin and its derivatives: a scoping review. *Infect Dis Poverty*. 2023 Dec 11;12(1):115. doi: 10.1186/s40249-023-01152-6. Erratum in: *Infect Dis Poverty*. 2024 Feb 9;13(1):14. doi: 10.1186/s40249-024-01180-w.

5. World Health Organization. (2021). World malaria report 2021. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>.

6. Siddiqui FA, Boonhok R, Cabrera M, et al. Role of *Plasmodium falciparum* Kelch 13 Protein Mutations in *P. falciparum* Populations from Northeastern Myanmar in Mediating Artemisinin Resistance. *mBio*. 2020;11(1):e01134-19. Published 2020 Feb 25. doi:10.1128/mBio.01134-19.

7. Efferth T. Beyond malaria: The inhibition of viruses by artemisinin-type compounds. *Biotechnol Adv*. 2018 Nov 1;36(6):1730-1737. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.001.

8. Patel YS, Mistry N, Mehra S. Repurposing artemisinin as an anti-mycobacterial agent in synergy with rifampicin. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 Mar;115:146-153. doi: 10.1016/j.tube.2019.03.004.

9. Paddon, C J et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* vol. 496,7446 (2013): 528-32. doi:10.1038/nature12051.

10. Ro, Dae-Kyun et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* vol. 440,7086 (2006): 940-3. doi:10.1038/nature04640.

11. Shi P., Fu X., Liu M., Shen Q., Jiang W., Li L., et al. (2017). Promotion of artemisinin content in *Artemisia annua* by overexpression of multiple artemisinin biosynthetic pathway genes. *Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC)* 129, 251–259. doi: 10.1007/s11240-017-1173-z.

12. Hassani D, Taheri A, Fu X, et al. Elevation of artemisinin content by co-transformation of artemisinin biosynthetic pathway genes and trichome-specific transcription factors in *Artemisia annua*. *Front Plant Sci*. 2023;14:1118082. Published 2023 Feb 21. doi:10.3389/fpls.2023.1118082.

13. Zhao L, Zhu Y, Jia H, et al. From Plant to Yeast-Advances in Biosynthesis of Artemisinin. *Molecules*. 2022;27(20):6888. Published 2022 Oct 14. doi:10.3390/molecules27206888.