

- [17] Seshadri T R, Vydeeswaran S. Constitution of polyphyllin, a saponin isolated from the tubers of *Paris polyphylla* [J]. *Indian J Chem*, 1972, 10(6): 589-591.
- [18] 康利平, 马百平, 张 洁, 等. 重楼中甾体皂苷的分离与结构鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(1): 25-31.
- [19] Kimiko N, Kotaro M, Toshihiro N, et al. The constituents of *Paris verticillata* M. v. Bieb [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29(5): 1445-1451.
- [20] Indresh K, Seshadri R, Seshadri T R, et al. Constitution of polyphyllin-A & polyphyllin-B, the saponins isolated from the tubers of *Paris polyphylla* [J]. *Indian J Chem*, 1975, 13(8): 781-784.
- [21] 陈昌祥, 张玉童, 周 俊, 滇产植物皂素成分的研究 [J]. 云南植物研究, 1983, 5(1): 91-97.
- [22] 陈昌祥, 周 俊, 张玉童, 等. 滇重楼地上部分的甾体皂苷 [J]. 云南植物研究, 1990, 12(3): 323-329.
- [23] 陈昌祥, 连红兵, 李运昌, 等. 滇重楼种子中的甾体皂苷 [J]. 云南植物研究, 1990, 12(4): 452.
- [24] Hisashi M, Yutana P, Toshio M, et al. Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* on ethanol-or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structure requirement for activity and mode of action [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 1101-1106.
- [25] Toshihiro N, Yoshiki I, Haruko S, et al. Study on the constitutions of *Paris quadrifloris* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(5): 1851-1856.
- [26] 王 强, 徐国钧, 程永宝. 中药七叶一枝花类的抑菌和止血作用的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(4): 251.
- [27] 陈昌祥, 周 俊. 五指莲重楼的甾体皂苷(2) [J]. 云南植物研究, 1987, 9(2): 239-245.
- [28] Singh S B, Raghunath S, Thakur R S, et al. Furostanol saponins from *Paris polyphylla*: structure of polyphyllin G and H [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(8): 2079-2082.
- [29] 陈昌祥, 周 俊. 滇重楼的两个新甾体皂苷元 [J]. 云南植物研究, 1992, 14(1): 111-113.
- [30] 陈昌祥, 周 俊, Hiromichi N, 等. 滇重楼地上部分的两个微量皂苷 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 215-220.
- [31] 陈昌祥, 张玉童, 周 俊. 滇重楼地上部分的配醌体 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 473-478.
- [32] 黄 芸, 崔力剑, 王 强, 等. 南重楼 *Paris vietnamensis* 活性物质的分离与鉴定 [J]. 中国天然药物, 2006, 41(4): 361-364.
- [33] 黄 芸, 王 强, 叶文才, 等. 华重楼中一个新的类胆甾烷皂苷 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 138-140.
- [34] 刘 海, 张 婷, 陈筱清, 等. 云南重楼的甾体皂苷类成分 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(4): 264-267.
- [35] 徐敦海, 毛晓霞, 徐雅娟, 等. 云南重楼中的新甾体皂苷 [J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(12): 2303-2306.
- [36] 刘 海, 黄 芸, 张 婷, 等. 金线重楼的化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(5): 409-412.
- [37] 陈昌祥, 周 俊, 张玉童, 等. 滇产植物皂素成分的研究. 禄劝花叶重楼的甾体皂苷 [J]. 云南植物研究, 1983, 5(2): 219-223.
- [38] 崔 艳, 张秀凤, 刘 扬, 等. 七叶一枝花中薯蓣皂苷的分离及结构鉴定 [J]. 分析科学学报, 2006, 22(5): 563-566.
- [39] 陈昌祥, 周 俊. 滇产植物的皂素成分研究. 一滇重楼的甾体皂苷和 -蜕皮激素 [J]. 云南植物研究, 1981, 3(1): 89-93.
- [40] 王 羽, 高文远, 袁理春, 等. 滇重楼的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 17-20.
- [41] 姚新生. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [42] 高鸿宾. 有机化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [43] 田伟生, 许启海, 陈 玲, 等. 利用薯蓣皂苷元完整骨架合成偏诺皂苷元 [J]. 中国科学 B 辑化学, 2004, 34(1): 33-35.
- [44] 姜红祥主译. 药用天然产物的生物合成 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [45] 徐任生, 叶 阳, 赵维民. 天然产物化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.

转基因技术在药用植物中的应用

董 燕, 张雅明, 周 联, 王培训*

(广州中医药大学免疫与分子生物学研究室, 广东 广州 510405)

摘 要: 药用植物是我国中药宝库的重要组成部分, 应用植物转基因技术提高植株抗病性, 优化中药植物种质资源, 培育药效成分量高的新型转基因药材, 或以基因工程细胞生产药用价值高、来源有限的中药活性成分, 对中药现代化和可持续性发展具有重要意义。结合转基因植物的历史发展与植物转基因技术现状, 论述了基因工程技术在传统中药材中的应用和发展前景。

关键词: 药用植物; 中药; 基因技术

中图分类号: R282.71; Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)03-0489-04

Application of transgene technology in medicinal plants

DONG Yan, ZHANG Ya-ming, ZHOU Lian, WANG Pei-xun

(Department of Immunology and Molecular Biology, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Key words: medicinal plant; Chinese materia medica; gene technology

中药的不良反应小, 对慢性、消耗性疾病具有独特的、西药不可取代的作用。据世界卫生组织统计, 发展中国家超过

80%的人口使用药用植物来维持基本的健康需要, 而发达国家的用量也在逐年上升^[1]。我国野生药用植物种质资源

* 收稿日期: 2008-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30772737); 广东省自然科学基金资助项目(5004272)

作者简介: 董 燕(1969—), 女, 副研究员, 博士, 从事分子生物学技术在中医药研究中的应用方向教学与科研工作。

Tel: (020) 36585479 E-mail: dondy001@gzhtcm.edu.cn

丰富,而采挖野生资源已造成许多中药资源濒于枯竭^[2]。巨大的需求和消耗使得供求矛盾越来越突出,进一步推动了中药材生产基地规范化种植的发展,但中药材大面积集中种植存在着病害严重的问题,而以常规育种手段获得抗病品种是很困难的,基因工程技术在经济作物的抗病育种研究中已获得成功并推广应用,将其应用于中药材的抗病育种研究具有良好的发展前景。

1983 年世界首例转基因植物培育成功,标志着人类用转基因技术改良植物的开始。10 年后,世界上转基因成功的植物就已突破 60 种。转基因技术已成为普及应用最快的先进农作物改良技术之一。

随着转基因技术的不断发展和各种基因信息的不断获得,转基因技术在植物抗逆工程、品种改良等方面将取得更大的突破。而植物生物反应器是植物基因工程发展的又一重要领域,其优点是投资少、成本低,避免传统发酵生产出现的产物聚集不溶或产品易被污染现象,同时可使生产的药物活性更高,更易被直接利用^[3]。未来的转基因植物有可能成为制造药物、营养食品、有益化学产品的植物工厂,利用植物生产医用口服疫苗、重组抗体、脂肪酸、药物等已成为人们关注的热点。当前,虽然世界上关于转基因植物安全性问题争论得比较激烈,但许多国家都认为发展转基因植物将是挑战饥饿、突破增产极限、改善食物品质、防止环境污染、生产生物工程药物的重要手段,转基因植物正成为一类新型的知识经济产物。中药的有效成分主要是其次生代谢产物,而有效成分减少、品种退化是人工栽培中存在的问题,应用基因工程技术改善代谢途径、提高其活性成分等,对优化中药种质资源和可持续发展具有重要意义。

1 植物转基因技术

当前常用转基因技术按其是否需要通过组织培养再生植株可分为两大类:第一类需要通过组织培养再生植株,常用的方法有农杆菌介导转化法、基因枪法;另一类不需要通过组织培养,目前比较成熟的主要有花粉管通道法。

农杆菌介导的基因转化是利用其细胞内质粒上有一段 T-DNA,农杆菌通过侵染植物伤口,其 T-DNA 可插入到植物基因组中。人们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 中,借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移并与染色体整合,然后通过组织培养技术,再生出转基因植株。

基因枪介导转化法是利用火药爆炸或高压气体加速,将包裹了目的基因的高速微粒弹直接送入完整的植物组织和细胞中,然后通过细胞和组织培养技术,再生出植株,选出其中转基因阳性植株。与农杆菌法相比,其主要优点是不受受体植株范围的限制,而且其载体质粒的构建也相对简单,因此也是一种应用较为简便有效的方法。

花粉管通道法是在授粉后向子房注射含目的基因的 DNA 溶液,利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道,将外源基因 DNA 导入到受体细胞的基因组中,随着受精卵的发育而成为转基因的新个体。该法的最大优点是不依赖于组织培养再生植株,技术简单,不需要装备精良的实

验室,常规育种工作者易于掌握。

研究表明,转基因受体材料的生长状态、农杆菌感染能力等因素,以及添加创伤反应诱导物、改变创伤方式、增强受体材料被感染能力对转化频率影响较大。因此,研究者在农杆菌介导转化方面发展了一些新技术,如超声波辅助农杆菌介导法、低能离子束与农杆菌介导结合法、基因枪与农杆菌介导结合法以及负压与农杆菌介导结合法等,均可提高转化效率。如用基因枪轰击烟草和向日葵顶端分生组织,造成细小的伤口,再进行农杆菌侵染,取得了比刀切等方法提高近 100 倍的转化效率^[4]。先用 X 射线(5~15 Gy)处理 4 种受体植物细胞(烟草、矮牵牛、黑芥和豇豆),再进行转基因处理,发现转化频率提高了 3~7 倍^[5]。

上述方法中农杆菌介导法仍是目前应用最多、方法最成熟的基因转化方法,迄今所获得的转基因植物有 80% 以上是利用根癌农杆菌转化系统产生的。在以农杆菌介导法和基因枪法进行的大麦转基因研究中,以荧光原位杂交技术分析了外源基因的整合位点和拷贝数,发现农杆菌法转化的外源基因拷贝数均在 1~3,且大部分遗传稳定;而基因枪法转化植株的 60% 超过了 8 个拷贝,在 T1 代植株中基因沉默发生率高^[6]。基因枪法导入的外源基因为多拷贝,而农杆菌导入外源基因的拷贝数低,有利于避免重复序列产生的基因沉默现象。此外,基因枪法转入的外源基因易整合于异染色质区域,而农杆菌介导法导入的基因多进入染色体的末端,有利于外源基因正常表达,所以,农杆菌介导法优于基因枪法。

2 药用植物的外源基因转化研究

药用植物中以农杆菌介导基因转化为主要方法,而建立植物离体再生系统是进行农杆菌介导基因转化的前提条件。目前,已对愈来愈多的药用植物进行了组织培养方面的系统研究,如巴戟天、阳春砂仁、枳壳、党参、黄芪等,不仅有利于药用植物种质保存、繁殖和育种研究,也为离体再生系统的建立和基因转化奠定了基础。

我国在中药领域的转基因研究已涉及多种植物,主要是提高抗病性或提高其药用价值。如利用根癌农杆菌将半夏凝集素基因导入百合基因组中,培育抗蚜虫能力增强的转基因植株^[7];将天蚕抗菌肽 B 基因转入广藿香,提高广藿香抗青枯病能力^[8];将小鼠金属硫蛋白-1 基因导入枸杞中^[9],以培育富集锌的集枸杞药用价值与锌元素的营养价值于一身的新型枸杞品种。亦有将重组人 γ -干扰素基因与趋化因子 Rantes 基因在苦瓜和夏枯草细胞中表达,探讨培育抗病毒尤其是抗艾滋病中药植物的研究^[10]。此外,在巴戟天、枳壳、黄芪、菘蓝等其他中药植物中也进行了转基因研究;对既是食品也是药用植物的辣椒进行转抗菌肽基因研究,获得的转基因植株已进行了初步的食用安全性与营养质量评价^[11],为转基因药用植物的安全性评价研究提供了一定的参考。

近年国外学者也开展了对中国传统中药植物的遗传转化研究。在农杆菌介导外源报道基因 GUS(-葡萄糖醛糖苷酶)转化北玄参^[12]和唐松草^[13]研究中,鉴定了 GUS 基因的表达及该酶活性,且转 GUS 基因唐松草根部的小檗碱量未

检测到明显变化,所建立的遗传转化系统为进一步的遗传改良打下基础。发根农杆菌 Ri 质粒中与诱根有关的 rol 基因在植物中表达能导致大量毛状根形成,在蒲公英的 rol 基因转化研究中转基因植株的形态学明显改变,具有丰富的侧生根,有望提高次生代谢物产量^[14]。此外,表达外源抗真菌蛋白几丁质酶的转基因美国洋参植株以及表达抗除草剂草丁膦乙酰转移酶基因的转基因人参植株也已经获得^[15,16]。

利用转基因技术将优良性状基因导入药用植物体内,赋予其新的有利特性,提高植株的抗病性和抗逆性,是实现遗传改良和培育新品种的重要技术方法。目前转基因药用植物研究涉及的植物和基因种类越来越多,而研究的深度和系统性还远远不及水稻、大豆、棉花等经济作物,但同时也预示着巨大的发展潜力。

3 药用植物的代谢工程研究

药用植物中的有效成分如生物碱、皂苷、黄酮、萜类等,通常量很低,仅利用栽培途径大幅度提高有效成分的量是难以实现的,而利用基因工程技术可改善代谢途径、提高代谢产物的产量。次生代谢产物是药用植物的特殊分化细胞在酶的作用下,经过多个反应步骤生成的。而酶的合成受基因调节控制,因此,在掌握次生代谢途径分子机制的基础上,借助转基因技术来调节基因的表达和酶的合成,是提高目标产物量的有效途径。

近年来,随着基因工程技术的发展,药用植物基因克隆研究在世界范围内迅速展开,已经克隆了抗肿瘤药物紫杉醇、长春新碱、长春花碱,抗菌药紫草宁,抗疟疾药青蒿素及镇痛药吗啡等次生代谢产物的生物合成相关酶的基因^[17~21]。紫杉醇是一种新型的抗癌药物,已通过同源引物 PCR 等方法克隆了 11 个与紫杉醇合成相关的基因。紫杉烯是生成紫杉醇代谢途径中重要的中间产物,在大肠杆菌中表达 4 个紫杉烯合成相关酶,可有效合成紫杉烯,产率达到 1.3 mg/L,提示可通过代谢工程在非生成紫杉醇的生物中生产紫杉醇^[22,23]。在对薄荷代谢途径的研究中,已获得关键酶 4s-柠檬烯合成酶、芳樟醇合成酶、香叶烯合成酶等的 cDNA 克隆^[24,25],并用于改善代谢途径、提高薄荷挥发油产量的研究^[26]。用关键酶 4s-柠檬烯合成酶基因转化薄荷,获得高单萜量的转基因植株,同时薄荷酮的量也相应提高^[27]。药用植物松果菊是流行于西方的“免疫”草药,具有抗感染和免疫促进作用。查耳酮合成酶是黄酮类代谢产物生物合成的关键酶,为改善代谢途径用该基因转化松果菊,在转基因植株中已鉴定该基因的整合与表达^[28]。以莨菪毛状根培养生产抗胆碱药东莨菪碱研究中,转化单个限速酶天仙子胺 6-羟化酶(H6H)基因提高其表达量,东莨菪碱产量(184 mg/L)明显高于野生型(43 mg/L),在此基础上将上游限速酶四甲烯二胺-N-甲基转移酶基因和下游限速酶 H6H 基因同时转化共表达,产量可达 411 mg/L^[29]。为增大青蒿植株中的青蒿素产量,通过基因打靶,调整代谢流向,在转基因青蒿植株中,以突变型青蒿鲨烯合酶(SS)基因取代野生型 SS 基因已取得初步成功^[30]。产青蒿素中间体紫穗

槐-4,11-二烯和青蒿酸的大肠杆菌工程菌和酵母工程菌也已经构建^[31,32]。

由于大部分次生代谢途径目前还不十分清楚,因此代谢产物基因工程研究成功的例子尚不多见。随着对代谢途径限速步骤的阐明和基因工程的发展,通过关键酶基因的转化,或对基因启动子的转换,构建强有力的组成型启动子,使限速酶在转基因细胞中高效表达,或采用激活剂激活关键酶基因的表达,可实现对代谢途径的调节,从而大大提高代谢物产量。

4 药用植物基因工程存在的问题

将转基因技术应用于药用植物进行遗传改良的研究成果不断涌现,但仍有一些问题成为限制其发展的瓶颈。在转基因技术中,设计重组 DNA、建立适当的植物转化体系是转基因的前提,而外源基因在植物细胞内出现转基因沉默现象是普遍存在的一个问题。转基因沉默的内在原因归结起来有两种:一是 DNA 甲基化引起的失活,二是共抑制造成的转基因沉默。为了克服转基因沉默,世界各国对转基因沉默机制及其预防策略开展了广泛的研究,积累了不少经验,目前主要从去甲基化^[33]、选择单拷贝转基因植株^[34]、在转基因侧翼接上核基质结合序列 MAR(matrix attachment region)^[35]、优化转基因密码子和转化载体、利用优良的转化和重组系统等几个方面来开展工作。除了克服转基因沉默,同时还要通过其他途径提高外源基因在转基因植物中的表达效率,如选择特异性或诱导型启动子,降低外源基因的拷贝数以减少基因沉默现象,利用引导肽进行表达产物的定位等。

此外,转基因植物的安全性问题是当前争论的热点问题之一。虽然通过安全性评价和严格管理,到目前为止,还没有证据表明转基因作物比传统作物不安全,当然对转基因作物尚缺乏足够长期的安全性评估。将转基因技术应用于中药材中更要考虑外源基因的导入对药材的品质是否有影响,如果插入外基因导致药材某些化学成分,甚至药效成分改变,则丧失了原有药用价值。鉴于此,对转基因中药应持谨慎态度,对转基因中药的评价更显得尤为重要,必须进行系统而深入的研究,才能为研究开发转基因中药提供依据。

5 展望

转基因作物发展迅速,基因转化已被证明是改良经济作物产量和品质的有效途径,并带来巨大经济效益。天然药物正被世界上越来越多的人接受,因此药用植物需求量越来越大,人工种植的品种越来越广泛,正发展成为一类新型经济作物。虽然药用植物的遗传转化研究起步相对较晚,但可以预见世界上对转基因药用植物的研究范围和深度将迅速发展。我国是药用植物资源大国,将基因工程技术应用于提高药用植物的抗病性、提高种植产量、改善代谢途径、提高其活性成分的量等方面,既有利于发展人工种植,也有利于保护濒危珍贵品种,是药用植物可持续发展的需要。为实现基因工程技术在中药植物中的健康发展,在今后的研究中可考虑从以下 3 个方面入手:加强对我国道地药材活性成分合成途径的研究,克隆生物合成途径相关酶基因并对其进行功能

鉴定,以应用于代谢工程研究; 加强转基因中药安全性评价研究,建立相关技术平台和评价标准; 建立转基因模式药用植物,由于我国中药植物资源丰富,发展过程中应集中对少数几种代表性中药植物进行深入系统的研究,从离体再生、遗传转化到安全性评价,为中药转基因研究提供可借鉴的模型和方法。

参考文献:

- [1] Canter P H, Thomas T, Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(4): 180-185.
- [2] 刘建党,张今今. 我国西部发展药用植物种植的机遇与对策 [J]. 西北农林科技大学学报: 社会科学版, 2003, 3(1): 69-71.
- [3] 邵宏波. 转基因植物药物的开发研究评述 [J]. 广西科学, 2002, 9(1): 60-63.
- [4] Bidney D, Scelonge C, Martich J, et al. Microprojectile bombardment of plant tissues increase transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 301-313.
- [5] Kohler F, Cardon G, Pohlman M, et al. Enhancement of transformation rates in higher plants by low-dose irradiation: Are DNA repair systems involved in the incorporation of exogenous DNA into the plant genome? [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 12(2): 189-199.
- [6] Travella S, Ross S M, Harden J, et al. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and agrobacterium-mediated techniques [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 780-789.
- [7] 唐东芹,钱虹妹,唐克轩,等. 根癌农杆菌介导半夏凝集素基因 pBIXPTA 对百合的转化 [J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2004, 22(2): 135-136.
- [8] 周鹏,郑学勤,陈向民. 天蚕抗菌肽 B 基因在广藿香抗病育种中的应用 [J]. 热带作物学报, 1998, 19(2): 27-31.
- [9] 赵亚华,何平,高向阳. 根癌农杆菌介导的 mMT-I cDNA 转化枸杞及其表达的研究 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(2): 92-97.
- [10] 曾庆平,冯丽玲,杨瑞仪,等. 重组人细胞因子基因在转基因中药细胞中的瞬时表达 [J]. 中草药, 2003, 34(1): 63-66.
- [11] 邓平建,刘建军,赵锦,等. 转抗菌肽基因辣椒食用安全性和营养质量评价 [J]. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(1): 13-17.
- [12] Park S U, Chae Y A, Facchini P J. Genetic transformation of the figwort, *Scrophularia Miq*, an oriental medicinal plant [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 1194-1198.
- [13] Samanani N, Park S U, Facchini P J. *In vitro* regeneration and genetic transformation of the berberine-producing plant, *Thalictrum flavum* ssp. *glaucum* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 116(1): 79-86.
- [14] Lee M H, Yoon E S, Jeong J H, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 822-827.
- [15] Chen W, Punja Z. *Agrobacterium*-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, 20(11): 1039-1045.
- [16] Choi Y E, Jeong J H, In J K, et al. Production of herbicide-resistant transgenic *Panax ginseng* through the introduction of the phosphinothricin acetyl transferase gene and successful soil transfer [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(6): 563-568.
- [17] Walker K, Fujisaki S, Long R, et al. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase the functions in taxol biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12715-12720.
- [18] Van Der Fits L, Hilliou F, Memelink J. T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species [J]. *Transgenic Res*, 2001, 10(6): 513-521.
- [19] Grothe T, Lenz R, Kutchan T M. Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(33): 30717-30723.
- [20] Yazaki K, Kuniyama M, Fujisaki T, et al. Geranyl diphosphate: 4-Hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(8): 6240-6246.
- [21] Wallaert T E, Bouwmeester H J, Hille J, et al. Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin [J]. *Planta*, 2001, 212(3): 460-465.
- [22] Huang K X, Huang Q L, Wildung M R, et al. Overproduction, in *Escherichia coli*, of soluble taxadiene synthase, a key enzyme in the taxol biosynthetic pathway [J]. *Protein Expr Purif*, 1998, 13(1): 90-96.
- [23] Huang Q, Roessner C A, Croteau R, et al. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of taxol [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(9): 2237-2242.
- [24] Dudareva N, Cseke L, Blanc V M. Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(7): 1137-1148.
- [25] Bohlman J, Steele C L, Croteau R. Monoterpene synthase from grand fir (*Abies grandis*): cDNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)- (4S)-limonene synthase, and (-)-(1S, 5S)-pinene synthase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(35): 21784-21792.
- [26] Diemer F, Jullien F, Faure O, et al. High efficiency transformation of peppermint (*Mentha piperita* L.) with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Plant Sci*, 1998, 136: 101-108.
- [27] Diemer F, Caissard J C, Moja S, et al. Altered monoterpene composition in transgenic mint following the introduction of 4S-limonene synthase [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2001, 39: 603-614.
- [28] Wang H M, To K Y. *Agrobacterium*-mediated transformation in the high-value medicinal plant *Echinacea purpurea* [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 1087-1096.
- [29] Zhang L, Ding R X, Chai Y R, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *PNAS*, 2004, 101(17): 6786-6791.
- [30] 冯丽玲,杨瑞仪,杨雪芹. 青蒿素烯合酶基因打靶研究 [J]. 中草药, 2006, 37(12): 1857-1861.
- [31] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940-943.
- [32] Newman J D, Marshall J, Chang M, et al. High-level production of amorpho-4, 11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 95(4): 684-691.
- [33] Manfred K, Manorama C J, Crowell N D. Rapid induction of genetic demethylation and T-DNA gene expression in plant cells by 5-azacytosine derivations [J]. *Plant Molec Biol*, 1989, 12: 413-423.
- [34] 邹永梅,施季森,诸葛强,等. 遗传转化植物中沉默基因的消除 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 95-102.
- [35] George C A, Hall G, Michalowski J S. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 889-913.