

低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究

杨瑞仪*, 卢元媛, 杨雪芹, 冯丽玲, 曾庆平

广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405

摘要: **目的** 研究低温处理对黄花蒿中青蒿素及其他萜类合成通路的影响。**方法** 以 4 °C 为胁迫条件, 利用高效液相色谱法测定青蒿素量; 硫酸钛沉淀法和 *N,N*-二甲基-对-亚硝基苯胺漂白反应分别检测黄花蒿叶片过氧化氢 (H_2O_2) 和单线态氧 ($^1\text{O}_2$) 量; 紫外分光光度法检测过氧化氢酶 (CAT) 活性; 实时荧光定量 PCR 技术定量分析青蒿素合成途径及竞争途径关键酶基因的表达。**结果** 4 °C 处理 4 h 后黄花蒿叶片中 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 量升高, 并伴随着青蒿素量和 CAT 活性逐步提高, 4、24、48 h 后青蒿素量分别提高 20%、65%、80%; 4 °C 处理 24 h 后, 青蒿素合成相关基因 (*HMGR*、*FPS*、*ADS*、*CYP71AV1*、*CPR* 和 *DBR2*) 的表达普遍上调, 其中 *ADS* 基因的表达提高 16 倍; 而青蒿素合成竞争途径酶 (β -石竹烯合酶) 基因 (*CS*) 表达则下调近 20 倍。**结论** 低温刺激可能通过产生高浓度活性氧 (ROS) 促进青蒿素合成前体转化, 上调青蒿素合成相关基因表达并抑制竞争途径基因表达等途径促进青蒿素合成。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; 低温诱导; 活性氧; 基因表达

中图分类号: R282.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)02-0350-05

Biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* induced by low temperature and its mechanism

YANG Rui-yi, LU Yuan-yuan, YANG Xue-qin, FENG Li-ling, ZENG Qing-ping

Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of low temperature on the biosynthesis of artemisinin and other terpenoids in *Artemisia annua*. **Methods** After 4 °C treatment, *A. annua* leaves were collected for artemisinin analysis by HPLC. Hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) production were detected by $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ precipitation and the means of bleaching of *N,N*-dimethylnitrosoaniline. The catalase (CAT) activity was determined by ultraviolet spectrophotometry. The gene expressions of key enzymes in artemisinin biosynthetic and competitive pathways were quantitatively assayed by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results** At 4 °C after treatment for 4 h, the burst of $^1\text{O}_2$ and H_2O_2 was followed by the increase of CAT activity and artemisinin content. The concentrations of artemisinin were 20%, 65%, and 80% higher than those of the control group after treatment for 4, 24, and 48 h, respectively. The expression levels of artemisinin biosynthetic genes, comprising *HMGR*, *FPS*, *ADS*, *CYP71AV1*, *CPR*, and *DBR2*, were up-regulated compared with the control group at 4 °C after treatment for 24 h. The increment of *ADS* mRNA level was 16 times higher than those under 25 °C. Whereas the expression of β -caryophyllene synthase (*CS*) gene encoded the competitive enzyme utilizing the common precursor dramatically decreased about 20-fold. **Conclusion** These results indicate that low temperature could induce artemisinin biosynthesis by increasing the conversion of the precursors into artemisinin caused by the burst of reactive oxygen species (ROS), by the up-regulating the expression of genes involved in artemisinin biosynthesis, and by down-regulating the expression of gene involved in competitive pathway.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; low temperature-induced; reactive oxygen species (ROS); gene expression

青蒿素 (artemisinin) 是我国科学家于 20 世纪 70 年代首次发现的具有独特过氧桥结构的倍半萜内酯。青蒿素及其衍生物主要用于治疗疟疾, 尤其是抗药性和脑型疟疾^[1]。由于其安全性、有效性和速效性, 以青蒿素为基础的联合治疗方案被世界卫

生组织推荐在世界各大主要疟疾流行区推广应用。除此以外, 青蒿素类药物对于血吸虫病、乙型肝炎、白血病、乳腺癌、结肠癌、小细胞肺癌等也具有一定的疗效, 已被制成多种剂型^[2]。因此, 青蒿素的药用价值非常大。就目前而言, 从天然植物中提取

收稿日期: 2011-03-15

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (9145624536-4000003)

作者简介: 杨瑞仪 (1972—), 女, 广东省广州市人, 医学博士, 副研究员, 主要从事中药生物工程和分子药理学研究。

*通讯作者 杨瑞仪 Tel: (020)36585100 E-mail: rysyry@gzhtcm.edu.cn

青蒿素是商品化生产的唯一途径,而黄花蒿 *Artemisia annua* L. 是目前发现的唯一能合成青蒿素的天然植物资源^[3],但青蒿素在黄花蒿中的量较低,一般只有干质量的 0.1%~1%。

有学者认为,在双氢青蒿酸前体向青蒿素转化的过程中,青蒿素可能承担着活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基储备池的角色,双氢青蒿酸则可能作为抗氧化剂淬灭 ROS 防止氧化胁迫造成的细胞损伤^[4]。Wallaart 等^[5]发现经过夜霜季节后,青蒿素量升高并伴随着双氢青蒿酸的下降,推测霜冻可能作为一种压力条件启动了双氢青蒿酸向青蒿素的转化。在环境胁迫(冷、热、强光、干旱、盐碱等)下,植物中由活性氧造成的氧化胁迫是一种普遍现象。虽然氧化胁迫诱导植物次生代谢产物合成的研究已先后在人参、红豆杉、丹参、长春花中报道,但关于氧化胁迫与青蒿素合成之间相互关系的研究相对较少。本研究以低温为胁迫条件,研究其对青蒿素合成的影响,通过测定 H_2O_2 、单线态氧(1O_2)、过氧化氢酶(CAT)等指标,探讨氧化胁迫介导黄花蒿高产青蒿素的分子机制。

1 材料

黄花蒿 *Artemisia annua* L. 种子(重庆酉阳,华阳2号)经广州中医药大学青蒿研究中心黄荣岗鉴定。青蒿素对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 13806ED); *N,N*-二甲基-对-亚硝基苯胺(日本东京化成工业株式会社,批号 3Q58C);组氨酸(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 423834);RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司);RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 中国公司);SYBR Green Realtime PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司产品);引物由 Invitrogen 公司合成;其他试剂均为国产分析纯。

P680 高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司);Ultrospec 3300 pro 紫外/可见分光光度计(美国 GE 公司);ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);SPX—250B—G 微电脑光照培养箱(上海博迅实业有限公司)。

2 方法

2.1 植物培养及低温处理

黄花蒿种子用 70%乙醇浸润 30 s, 3% NaOCl 浸泡 30 min, 无菌水漂洗 4~5 次, 均匀散播在 1/2 MS 培养基润湿的滤纸上, 避光发芽。种子发芽后移至含 0.8%琼脂的 1/2 MS 固体培养基, 25 ℃光照

培养(光照周期: 16 h 光/8 h 暗)。种子发芽 30 d 后, 选取长势均一的无菌苗移至 4 ℃光照培养箱进行低温处理(光照周期: 16 h 光/8 h 暗), 分别在 0、4、24、48 h 取叶片进行检测。

2.2 青蒿素的测定

青蒿素的测定参照文献方法^[6], 叶片于 50 ℃烘箱中烘 24 h, 烘干后研成细粉, 过筛, 精确称取 0.100 g 于 10 mL 量瓶中, 加入丙酮 10 mL, 超声提取 30 min, 用丙酮补足至 10 mL。提取液滤过后进样检测。同时, 精确称取青蒿素对照品 0.010 g, 加入甲醇溶解配成 0.298 mg/mL 溶液, 分别取 6、10、14、20、30 μ L 进样, 绘制标准曲线为 $Y=0.4833X+0.0079$, 线性范围为 1.788~8.940 μ g。色谱条件: Phenomenex BDS C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 以乙腈-水(48:52)为流动相, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 216 nm。以每克叶片干质量所含青蒿素量来表示青蒿素量(mg/g)。

2.3 H_2O_2 和 1O_2 测定

H_2O_2 的测定参照硫酸钛沉淀法^[7], 以每克叶片(鲜质量)中所含 H_2O_2 量来表示其水平, 单位为 μ mol/g。 1O_2 的检测参照文献方法^[6], 反应液中加入 *N,N*-二甲基-对-亚硝基苯胺作为 1O_2 的吸收剂, 通过 *N,N*-二甲基-对-亚硝基苯胺的漂白反应来检测 1O_2 的生成。5 mL 反应液(45 mmol/L pH 7.1 PBS、10 mmol/L 组氨酸、50 μ mol/L *N,N*-二甲基-对-亚硝基苯胺)中加入 150 mg 剪碎的叶片, 空白对照不加叶片。光照(3 000 lx)下反应 1 h, 反应液 10 倍稀释后读取波长 440 nm 处的吸光度(A)值。计算低温处理相对于对照条件(25 ℃) 1O_2 的生成率。

$$\text{生成率} = (A_{440(\text{空白})} - A_{440(4\text{ }^\circ\text{C})}) / (A_{440(\text{空白})} - A_{440(25\text{ }^\circ\text{C})})$$

2.4 CAT 活性测定^[8]

精确称取 0.500 g 鲜叶片, 加入少量石英砂、2 mL 2%聚乙烯吡咯烷酮、100 mg $CaCO_3$, 冰浴研磨成匀浆, 4 ℃ 12 000 $\times$ g 离心 5 min, 取上清加入 50 mmol/L pH 7.0 磷酸缓冲液定容至 10 mL, 此为 CAT 粗酶提取液。取 10 倍稀释的 CAT 粗酶提取液 1.00 mL, 加入 10 mmol/L H_2O_2 2.00 mL, 迅速混匀, 5 min 内连续读取波长 240 nm 处的 A 值, 计算每分钟的 A 值变化(ΔA_{240})。以 1.00 mL 10 倍稀释的 CAT 粗酶提取液与 2.00 mL H_2O 混合液为空白对照。用每克叶片(鲜质量)每分钟催化 H_2O_2 分解量来表示 CAT 活性, 单位为 μ mol/(min $\cdot$ g)。

2.5 实时荧光定量 PCR 检测基因表达

鲜叶片 100 mg, 按 RNApure pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen) 说明书提取总 RNA。取 1 μ g 总 RNA, 按照 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 说明书进行逆转录反应, 合成 cDNA。以 10 倍稀释的 cDNA 为模板与

SYBR Green Real time PCR Master Mix (Toyobo) 混合, RTFQ-PCR 反应在 ABI7300 实时荧光定量 PCR 仪上进行。各基因引物见表 1, 由 Invitrogen 公司合成。以 *actin* 基因为内参, 以目的基因与 *actin* mRNA 拷贝数的比值表示基因的相对转录水平。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Primers for real time fluorescence quantitative PCR

基 因	GenBank 收录号	引 物	引物序列	扩增片段 / bp
HMGR	RU14625	HMGR-3	5'-GCACAGTTGGAGGAGGGACA-3'	100
		HMGR-4	5'-TGAGCGTTTGAGCCTGGTG-3'	
FPS	U36376	FPS-3	5'-TTCTTTCATCTGCCCTTGGTT-3'	100
		FPS-4	5'-GGTTGCCCTCTGCGTGATG-3'	
ADS	DQ241826	ADS-7	5'-AGTTTGTAGAAACCTGATGGTTGAA-3'	105
		ADS-8	5'-GGTTAGCACCGCCAGTAATGA-3'	
CYP71AV1	DQ872632	CYP71AV1-3	5'-TGTTTCTGCCAAGAGAGTGC-3	102
		CYP71AV1-4	5'-GGTCCCTATTTATCGCAAAGACG-3'	
CPR	DQ984181	CPR-3	5'-GATAACGAAGACGGGACACCA-3'	102
		CPR-4	5'-GCTCAAAACATCGGCATAGGA-3'	
DBR2	EU848577	DBR-5	5'-CTCAAGGGGATGCTGATTTG-3'	150
		DBR-6	5'-GGTAATCCGTGTACCCAACG-3'	
SQS	AY445506	SQS-3	5'-CGGACTAAAACAATGGCTGATG-3'	104
		SQS-4	5'-GTGATGGTCGTTGGGCATT-3'	
FS	AY835398	FS-3	5'-CAGCCACAAGGAGGAACAAG-3'	295
		FS-4	5'-CATAGGGTGAACGAAGAACGA-3'	
CS	AF472361	CS-3	5'-CAGGTGGTGGAAAGGTCTTG-3'	229
		CS-4	5'-CGACCACCTTTGAATTGCTT-3'	
EPS	AJ001539	EPS-5	5'-GCAAGATGGGCAAAAGAAGA-3'	166
		EPS-6	5'-TGACAAGAGGAGGATTGGTGA-3'	
<i>actin</i>	EU531837	<i>actin</i> -5	5'-GCATCCCGTTCTTTGACTG-3'	317
		<i>actin</i> -6	5'-GCTCTGCTGTGGTGGTGAA-3'	

2.6 数据分析

每个指标的测定均重复 6 个样本, 每个样本测定均重复 3 次。数据采用 SPSS 11.5 软件进行统计, 采用配对 *t* 检验进行显著性分析。

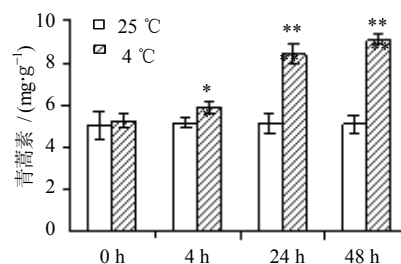
3 结果

3.1 低温诱导青蒿素生物合成

由图 1 可以看出, 经过 4 $^{\circ}$ C 低温处理 4 h 后, 青蒿素量开始上升 ($P < 0.05$), 24 h 后上升幅度加大 ($P < 0.01$)。与对照 (25 $^{\circ}$ C) 培养相比, 冷刺激 4、24、48 h 后青蒿素量分别提高 20%、65%、80%。

3.2 低温对黄花蒿 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 生成的影响

在 4 $^{\circ}$ C 处理过程中, 黄花蒿叶片 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 的量都是先升高后降低, 在 4 h 后即达到最大值。以 $^1\text{O}_2$ 相对生成率 (4 $^{\circ}$ C/25 $^{\circ}$ C) 来表示低温处理下 $^1\text{O}_2$ 的生成变化, 处理 4 h 后 $^1\text{O}_2$ 上升 1 倍, 随后下降, 在 24、48 h 分别比对照升高 40%、30% (图 2); H_2O_2 量在 4 h 时为对照的 1.6 倍, 并维持至 24 h, 处理 48 h 后, H_2O_2 量回落至略高于对照水平 (图 3)。



与 25 $^{\circ}$ C 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 25 $^{\circ}$ C control group, same as below

图 1 低温对青蒿素合成的影响

Fig. 1 Effects of low temperature on artemisinin synthesis

3.3 低温对 CAT 活性的影响

由图 4 可以看出, 与 25 $^{\circ}$ C 对照相比, CAT 活性在 4 $^{\circ}$ C 处理 4 h 后提高了 2.2 倍, 并进一步升高, 在 24 h 达到最大值, 为对照的 5.3 倍。48 h 后 CAT 活性有所下降, 但维持在对照的 2.8 倍水平。

3.4 低温诱导青蒿素生物合成基因表达

经过 4 $^{\circ}$ C 低温处理 24 h 后, 青蒿素合成相关基因: *HMGR*、*FPS*、*ADS*、*CYP71AV1*、*CPR* 和 *DBR2*

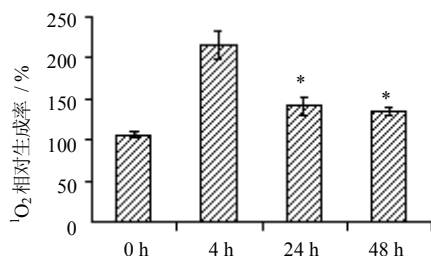


图 2 低温处理对 $^1\text{O}_2$ 生成率的影响

Fig. 2 Effects of low temperature treatment on $^1\text{O}_2$ production rate

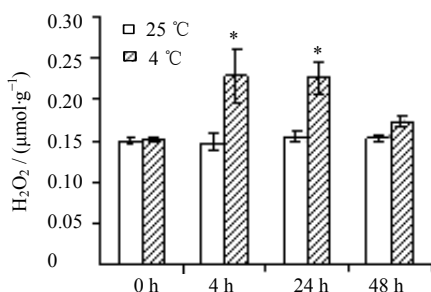


图 3 低温处理对 H_2O_2 生成量的影响

Fig. 3 Effects of low temperature treatment on H_2O_2 production

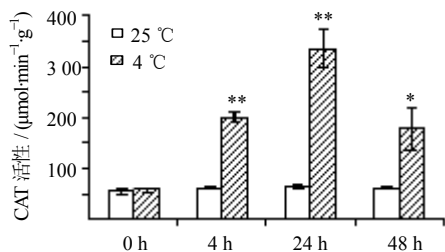


图 4 低温处理对 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of low temperature treatment on activities of CAT

的表达都普遍上调 (表 2)。其中 *ADS* 和 *HMGR* 的上调幅度较大, 转录水平比对照增加 16 倍和 3.2 倍。*CYP71AV1*、*DBR2*、*CPR*、*FPS* 的 mRNA 水平分别为对照的 2.8、2.5、1.9、1.5 倍。

3.5 低温对其他萜类合成基因表达的影响

在黄花蒿萜类合成中, FPP 不仅是 *ADS* 的底物, 同时也是 *SQS*、*CS*、*FS* 以及 *EPS* 的底物。经过 4 °C 低温处理 24 h 后, *ADS* 基因表达大幅上调 (表 3) 的同时, 各竞争途径的萜类合酶基因的表达在低温诱导条件下也呈现不同的变化。从表 3 可见, *SQS* 和 *FS* 基因对低温诱导无应答, 诱导前后表达水平无明显差异, 而 *EPS* 基因的表达提高 3 倍, *CS* 基因的表达则显著下降近 20 倍。

4 讨论

植物的大多数生理生化过程都有 ROS 的产生。一般认为 ROS 是一种有害的氧代谢中间物, 是引起细胞结构和功能损伤的主要因素; 但同时 ROS 也是一种普遍存在的信号分子, 参与植物的防御反应、基因表达调控等。Wallaart 等^[4,9]从黄花蒿中检测到双氢青蒿酸及其氢过氧化物, 首次提出双氢青蒿酸可能充当 ROS 清除剂的假设, 并认为双氢青蒿酸可能通过参与氧自由基催化的非酶促反应转化成青蒿素。双氢青蒿酸等青蒿素合成前体在黄花蒿中的量相对较为丰富, 但进一步的过氧化反应似乎成为青蒿素合成的“瓶颈”, $^1\text{O}_2$ 等 ROS 在此过程中起重要作用。有研究发现, 在黄花蒿褐变的老叶中检测到 $^1\text{O}_2$ 浓度爆发式增长, 同时青蒿素前体转化成青蒿素的速率加快, 青蒿素产量提高^[10-11]。一些

表 2 低温处理对青蒿素生物合成基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of low temperature treatment on gene expressions of artemisinin biosynthesis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	相对转录水平					
	<i>HMGR</i>	<i>FPS</i>	<i>ADS</i>	<i>CYP71AV1</i>	<i>CPR</i>	<i>DBR2</i>
25 °C	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.05 ± 0.02	1.58 ± 0.25	2.05 ± 0.33
4 °C	0.35 ± 0.03**	0.28 ± 0.18*	2.92 ± 0.19**	0.13 ± 0.03**	2.95 ± 0.29**	5.04 ± 1.68**

表 3 低温处理对黄花蒿萜类合成基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of low temperature treatment on gene expressions of terpenoids biosynthesis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	相对转录水平			
	<i>SQS</i>	<i>CS</i>	<i>FS</i>	<i>EPS</i>
25 °C	0.51 ± 0.06	0.68 ± 0.19	0.29 ± 0.05	0.31 ± 0.14
4 °C	0.54 ± 0.18	0.03 ± 0.01**	0.32 ± 0.05	1.21 ± 0.39**

人工模拟的胁迫条件, 如高浓度盐和重金属^[12]、寡糖诱激子^[13]等也同样可以通过促进 ROS 生成而有利于青蒿素的积累。在本实验中, 经过 4 °C 低温处理后, 黄花蒿中 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 浓度逐渐上升, 但 48 h 后伴随着 CAT 活性和青蒿素量的提高, 浓度开始下降。Pu 等^[7]用水杨酸处理黄花蒿发现 H_2O_2 和超氧阴离子浓度在 4 h 迅速升高, 促使双氢青蒿酸向青蒿素转化, 而后随着青蒿素量的逐渐上升而逐步下

降,与本课题组的结果相符,揭示 ROS 可能作为信号分子促进青蒿素的转化。

另外,本研究还发现经过低温处理后青蒿素合成相关基因的表达普遍上调,尤其是编码青蒿素特异合成途径的第一个关键限速酶——ADS 的基因的表达上升幅度最大。本课题组在以往的研究中也发现 4℃处理黄花蒿苗 30 min 后,ADS、CYP71AV1 和 CPR 的表达量上调^[14],但上调幅度不如作用 24 h 高。在蛋白表达水平上也证实,经过冷诱导后 ADS 与 CYP71AV1 这两个酶的浓度分别上升 50%和 80%^[15]。用水杨酸处理黄花蒿同样也可见 ADS 和 HMGR 表达量提高,而青蒿酸、双氢青蒿酸和青蒿素量也相应提高^[7]。可见,低温胁迫可通过直接诱导青蒿素合成相关基因表达而促进青蒿素合成。在黄花蒿中,以 FPP 为底物可以在不同的萜类合酶的作用下开始不同的萜类合成,调控这些萜类合酶的表达,比如过量表达 ADS 基因,同时抑制与青蒿素合成竞争底物的酶的基因表达,对于增加青蒿素生物合成途径的代谢流量,促进青蒿素合成有积极的意义。本课题组利用农杆菌介导的基因转化法将反义 SQS 整合于黄花蒿基因组,通过表达反义 SQS 来阻遏 SQS 表达,减少类固醇合成途径对底物 FPP 的竞争性利用,获得了高产青蒿素的转基因株,其 SQS 表达水平最高下降 90%,ADS 表达水平为原来的 3 倍,表明在压力作用下萜类合成的代谢流量会发生变化^[16]。本研究发现,低温条件一方面可促进青蒿素合成途径 ADS 的表达,另一方面可抑制青蒿素合成竞争途径 β-石竹烯合酶基因的表达,以改变代谢流方向。

综合起来,短暂的低温刺激可能通过以下途径提高青蒿素的合成:(1)产生高浓度 ROS 促进青蒿素合成前体的转化;(2)诱导青蒿素合成相关基因尤其是特异酶基因表达,促进青蒿素前体合成;(3)刺激青蒿素生物合成途径,抑制竞争途径,藉此增加青蒿素合成途径的代谢流量。病虫害感染、创伤、冷、热、强光、缺氧、干旱、盐碱等氧化胁迫条件都能诱发 ROS 生成,研究结果对于今后利用氧化胁迫条件提高青蒿素产量有重要意义。

参考文献

- [1] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28.
- [2] 王乃婕,邱琳,杜丰,等.青蒿素贴剂的制备研究[J].*现代药物与临床*, 2009, 24(3): 163-166.
- [3] 周洁,张霁,郭兰萍,等.稀土元素镧对黄花蒿光

合作用及青蒿素积累的影响[J].*中草药*, 2010, 41(8): 1371-1374.

- [4] Wallaart T E, van Uden W, Lubberink H G, *et al.* Isolation and identification of dihydroartemisinic acid from *Artemisia annua* and its role in the biosynthesis of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(3): 430-433.
- [5] Wallaart T E, Pras N, Beekman A C, *et al.* Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes [J]. *Planta Med*, 2000, 66(1): 57-62.
- [6] Guo X X, Yang X Q, Yang R Y, *et al.* Salicylic acid and methyl jasmonate but not rose Bengal enhance artemisinin production through invoking burst of endogenous singlet oxygen [J]. *Plant Sci*, 2010, 178(4): 390-397.
- [7] Pu G B, Ma D M, Chen J L, *et al.* Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(7): 1127-1135.
- [8] 陈晓敏.测定切花中过氧化氢酶活性的 3 种常用方法的比较[J].*热带农业科学*, 2002, 22(5): 13-16.
- [9] Wallaart T E, Pras N, Quax W J. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthesis precursor of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(3): 1160-1162.
- [10] Lommen W J, Schenk E, Bouwmeester H J, *et al.* Trichome dynamics and artemisinin accumulation during development and senescence of *Artemisia annua* leaves [J]. *Planta Med*, 2006, 72(4): 336-345.
- [11] Feng L L, Yang R Y, Yang X Q, *et al.* Synergistic re-channeling of mevalonate pathway for enhanced artemisinin production in transgenic *Artemisia annua* [J]. *Plant Sci*, 2009, 177(1): 57-67.
- [12] Irfan Q M, Israr M, Abdin M Z, *et al.* Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt-induced oxidative stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2005, 53(2): 185-193.
- [13] Zheng L P, Guo Y T, Wang J W, *et al.* Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(1): 49-55.
- [14] 尹录录,赵昌,黄瑛,等.非生物胁迫诱导青蒿素生物合成基因的表达[J].*应用与环境生物学报*, 2008, 14(1): 1-5.
- [15] Zeng Q P, Zeng X M, Yin L L, *et al.* Quantification of three key enzymes involved in *Artemisia annua* by polyclonal antisera-based ELISA [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 50-57.
- [16] Yang R Y, Feng L L, Yang X Q, *et al.* Quantitative transcript profiling reveals down-regulation of a sterol pathway relevant gene and overexpression of artemisinin biogenetic genes in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Planta Med*, 2008, 74(12): 1510-1516.