

• 综 述 •

青蒿素代谢调控研究进展

肖 玲, 吕宗友, 谭何新, 周 正, 张 磊*

第二军医大学, 上海 200433

摘 要: 青蒿素是治疗疟疾的特效药并被广泛使用。黄花蒿中青蒿素的量很低, 远不能满足需求, 开展青蒿的代谢调控研究是提高青蒿素产量的有效手段。总结了影响青蒿素产量的多种因素, 包括青蒿素生物合成及支路途径关键酶基因、转录因子、植物激素、逆境、诱导因子和腺毛等。通过概述各因素在青蒿素代谢调控中的研究进展, 归纳出基于青蒿素生物合成途径的常规次生代谢调控策略和基于腺毛的新型代谢调控策略, 丰富了青蒿素代谢调控的路径, 为培育优质高产转基因青蒿品系和改良青蒿种质遗传提供新思路。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; 代谢调控; 次生代谢; 生物合成

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)05-1005-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.027

Research progress on metabolic regulation of artemisinin

XIAO Ling, LV Zong-you, TAN He-xin, ZHOU Zheng, ZHANG Lei

Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Artemisinin is widely used for the treatment of malaria. *Artemisia annua* fielded low artemisinin, which was far behind the requirements. The study on the metabolic regulation of *A. annua* is an effective way to improve the yield of artemisinin. Metabolic regulation of artemisinin is an effective approach to improve the yield of artemisinin. In this paper, the variety of factors that affect artemisinin content was summarized, including biosynthesis in artemisinin and its branch pathway of key enzyme genes, transcription factors, phytohormones, environmental stress, induction factors, trichomes, etc. By reviewing the research progress of these factors in metabolic regulation of artemisinin, new strategies in conventional secondary metabolic engineering were generalized based on artemisinin and its branch biosynthesis pathway and fresh metabolic engineering based on trichomes. These strategies enriched the pathway in metabolic regulation of artemisinin and put forward a new idea to cultivate transgenic strain of *A. annua* with good quality and high yield.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; metabolic regulation; secondary metabolism; biosynthesis

疟疾是由疟原虫引起的一种全球性疾病。据世界卫生组织(WHO)统计, 2015年有2.14亿例疟疾发生, 并有43.8万人死于疟疾^[1]。尽管在控制疟疾方面已经做了极大努力, 但疟疾在全球的发病率和死亡率仍然很高。以青蒿素为基础的联合用药(ACTs)在治疗疟疾方面疗效显著, 成为抗疟一线药物^[2]。

青蒿素(artemisinin)是一种含过氧桥基团结构的倍半萜内酯类化合物, 主要来源于我国传统药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. (以下简称“青蒿”)。目前, 青蒿素市场需求巨大, 然而青蒿中青蒿素的

量很低, 仅占干质量的0.01%~1%^[3]。为缓解青蒿素市场供求的巨大矛盾, 科学家就提高青蒿素的量进行了大量研究。本文对青蒿素代谢调控的研究进展进行了综述, 以期为提高青蒿素量提供新的思路, 并为培育优质、高产的青蒿品系奠定基础。

1 青蒿素及相关萜类生物合成途径

萜类起源于异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲基丙烯基焦磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP), 包含甲羟戊酸途径(MVA途径, 位于胞质)和磷酸甲基赤藓糖

收稿日期: 2016-10-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673529, 31670292); 国家自然科学基金青年项目(31300159)

作者简介: 肖 玲(1989—), 女, 硕士, 从事药用植物代谢调控研究。E-mail: 15721571087@126.com

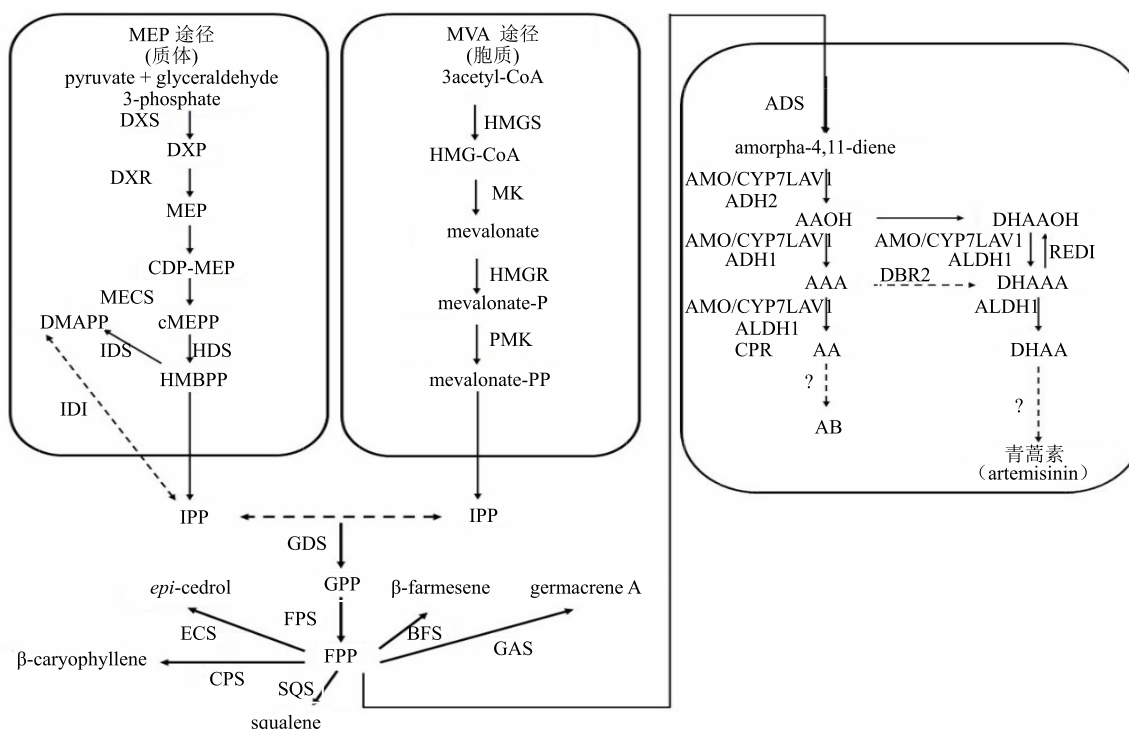
*通信作者 张 磊, 男, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药用植物代谢调控及中药生物工程研究。

Tel: (021)81871307 E-mail: zhanglei@smmu.edu.cn

途径(MEP 途径, 位于质体)。法尼基焦磷酸(farnesyl iphosphate, FPP)是合成多种次生代谢产物的底物, Schramek 等^[4]通过 $^{13}\text{CO}_2$ 同位素标记证明, 一分子 MEP 途径的 IPP 和一分子 MVA 途径的 DMAPP 生成一分子牻牛儿基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP), 然后 GPP 进入胞质(cytoplasm), 与一分子 MEP 途

径的 IPP 结合生成一分子 FPP。如图 1 所示, FPP 是多种萜类化合物生物合成的关键中间体。

在青蒿素生物合成途径中, 第一步特异性反应是由 FPP 生成紫穗槐二烯(amorpha-4,11-diene)。MVA 和 MEP 途径共同提供青蒿素生物合成所需的 IPP, 2 分子 IPP 结合 DMAPP 生成 GPP, 最后形成



ADS-紫穗槐二烯合成酶 ALDH1-醛脱氢酶 1 AMO/CYP71AV1-紫穗槐-氧化酶 AAOH-青蒿醇 AAA-青蒿醛 AA-青蒿酸 AB-青蒿素 B
ECS-雪松醇合酶 SQS-角鲨烯合酶 GAS-大根香叶烯 A 合成酶 BFS-β-法尼烯合酶 CPS-β-石竹烯合酶 CPR-细胞色素 P450 还原酶
RED1-二氢青蒿醛还原酶 CYP71AV1-细胞色素 P450 单氧化酶 DBR2-青蒿醛双键还原酶 ADH1-乙醇脱氢酶 1 ADH2-乙醇脱氢酶 2
DHAAOH-双氢青蒿醇 DHAAA-二氢青蒿醛 DHAA-二氢青蒿酸 DMAPP-二甲基烯丙基焦磷酸酯 FPS-法尼基焦磷酸合成酶 FPP-法尼
基焦磷酸 GPP-牻牛儿基二磷酸 HMGR-3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶 HMGS-3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 合成酶 IPP-异戊烯基焦
磷酸 IDS-IPP/DMAPP 合成酶 MVA-甲羟戊酸 CDP-MEP-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藻糖醇-2-磷酸 cMEPP-2-甲基-D-赤藻糖醇-2,4-环二
磷酸酯 DXP-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 DXR-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构化酶 DXS-1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 GDS-牻牛儿基二磷酸
合成酶 HDS-4-羟基-2-甲基-2-E-丁烯基-4-焦磷酸合酶 HMBPP-1-羟基-2-甲基-2-丁烯基-4-焦磷酸 MECS-2-C-甲基-D-赤藻糖醇-2,4-环焦磷酸合
酶 MEP-2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸 MK-甲羟戊酸激酶 PMK-二氧磷基甲羟戊酸激酶

ADS-amorpha-4,11-diene synthase ALDH1-aldehyde dehydrogenase 1 AMO/CYP71AV1-amorphadiene-12-hydroxylase AAOH-artemisinic
alcohol AAA-artemisinic aldehyde AA-artemisinic acid AB-artemisinin B ECS-*epi*-cedrol synthase SQS-squalene synthase GAS-germacrene
synthase A BFS-β-farnesene synthase CPS-β-caryophyllene synthase CPR-cytochrome P450 reductase RED1-dihydroartemisinic aldehyde
reductase CYP71AV1-amorphadiene-12-hydroxylase DBR2-artemisinic aldehyde Δ11(13) reductase ADH1-alcohol dehydrogenase 1 ADH2-
alcohol dehydrogenase 2 DHAAOH-dihydroartemisinic alcohol DHAAA-dihydroartemisinic aldehyde DHAA-dihydroartemisinic acid
DMAPP-dimethylallyl-diphosphate FPS-farnesyl diphosphate synthase FPP-farnesyl diphosphate GPP-geranyl diphosphate HMGR-3-
hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase HMGS-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A synthase IPP-isopentenyl diphosphate IDS-
IPP/DMAPP-isopentenyl diphosphate isomerase-isopentenyl diphosphate/dimethylallyl-diphosphate MVA-mevalonate pathway CDP-MEP-2-
phospho-4-(cytidine5-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol cMEPP-2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate DXP-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate
DXR-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase DXS-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase GDS-geranyl diphosphate synthase
HDS-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase HMBPP-hydroxyl-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate MECS-2-C-methyl-D-erythritol-
2,4-cyclodiphosphate MEP-2-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway MK-mevalonate kinase PMK-phosphomevalonate kinase

图 1 青蒿中的异戊二烯合成途径

Fig. 1 Isoprenoid biosynthetic pathways in *A. annua*

FPP。FPP 经紫穗槐二烯合成酶 (amorpho-4,11-diene synthase, ADS) 催化, 生成紫穗槐二烯^[5]; 紫穗槐二烯经由细胞色素 P450 单氧化酶 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1) 催化的 3 步反应, 分别形成青蒿醇 (artemisinic alcohol, AAOH)、青蒿醛 (artemisinic aldehyde, AAA) 和青蒿酸 (artemisinic acid, AA)^[6-8]。其中, AAOH 可以被催化形成二氢青蒿醇 (dihydroartemisinic alcohol, DHAAOH)^[9]; AAA 可以被青蒿醛双键还原酶 [artemisinic aldehyde delta-11(13) reductase, DBR2] 催化形成二氢青蒿醛 (dihydroartemisinic aldehyde, DHAAA)^[9]; AA 可以生成终产物青蒿素, 也可经青蒿烯形成终产物青蒿素 B^[10-11]。另外, DHAAOH 被 CYP71AV1 和 ALDH1 催化形成 DHAAA, 后经二氢青蒿酸 (dihydroartemisinic acid, DHAA) 形成青蒿素^[11]; DHAAA 一方面可被醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) 催化形成 DHAA^[12], 另一方面也能由二氢青蒿醛还原酶 (dihydroartemisinic aldehyde reductase, RED1) 还原形成 DHAAOH^[13]。虽然 DHAA 已经被证实为青蒿素的直接前体, 但这一转化在生物体内是否为酶促反应仍然存在争议^[11]。

除青蒿素生物合成途径外, FPP 经由不同的酶催化可以形成其他 4 个倍半萜和 1 个三萜。以 FPP 为底物, 经雪松醇合酶 (*epi-cedrol synthase*, ECS) 可催化生成 β -雪松醇倍半萜^[14]; 经另一个关键酶 β -石竹烯合酶 (β -caryophyllene synthase, CPS), 可催化 FPP 生成 β -石竹烯倍半萜^[15]; 而经大根香叶烯合酶 (germacrene A synthase, GAS) 基因编码的酶能催化 FPP 合成大根香叶烯 A 倍半萜^[16]; 另外, FPP 经 β -法尼烯合酶 (β -farnesene synthase, BFS) 能催化产生单一的 β -法尼烯倍半萜^[17-18]; 除此之外, 研究已经证明 FPP 还可被角鲨烯合酶 (squalene synthetase, SQS) 催化形成角鲨烯三萜或甾体^[19-20]。

2 青蒿素相关合成途径关键酶基因对青蒿素合成的影响

随着分子生物学技术的发展, 已经克隆到众多青蒿素及其相关合成途径的关键酶基因。通过过量表达青蒿素生物合成途径的关键酶基因及抑制合成代谢支路途径等手段, 可在一定程度上增加通往青蒿素生物合成途径的代谢流, 提高青蒿中青蒿素的量。基于目前已经报道的青蒿素及相关萜类生物合成途径, 本文归纳了所有可以进行

代谢调控的基因, 结果见表 1。其中, 已进行单基因过表达的青蒿素生物合成途径相关基因有 HMGR、FPS、DXR、DBR2、ALDH1 和 ADS; 已进行多基因过表达的基因组合形式有 HDR/ADS^[28]、FPS/ADS^[29]、CYP71AV1/CPR、HMGR/ADS、HMGR/FPS、ADS/CYP71AV1/CPR 和 FPS/CYP71AV1/CPR 等^[29]。也有研究证明抑制青蒿素合成的竞争支路途径基因 SQS、CPS、BFS、GAS 等, 也能提高青蒿素的量^[27]。

早期研究已经证实, 青蒿素由分泌型腺毛产生^[30-32]。目前所报道的青蒿素合成相关的基因都在腺毛中高表达或特异性表达^[33]; 此外, 一些腺毛相关或特异性表达的基因通过调控腺毛或青蒿素生物合成相关基因, 继而影响青蒿素的合成^[34]; 腺毛还具备青蒿素生物合成所必需的特殊油性氧化环境^[35]。研究表明, 分泌型腺毛密度与青蒿素量呈正相关^[5,36-37]; 糖苷水解酶 (β -glucosidase) 转基因青蒿可通过调控腺毛密度增加青蒿素的量^[38]。

DHAA 是青蒿素合成的直接前体, 其合成后的转运对于青蒿素的合成十分关键。近期的研究结果表明, 脂质转运蛋白 3 (AaLTP3) 和多向耐药性转运蛋白 (AaPDR2) 能提高 (DH) AA 在烟草叶质外体中的积累量, 防止 (DH) AA 从质外体到细胞的逆向流, 最终从总体上增强 AB 和青蒿素的代谢流。这说明转运蛋白也可作为调控青蒿素生物合成的靶标基因^[39]。

另外, 在青蒿次生代谢调控中, 启动子也是一个关键因素。Han 等^[40]的实验结果表明, CYP71AV1 启动子和 CaMV35S 启动子分别调控 FPS/ADS 基因组合表达时, CaMV35S 启动子驱动的基因的表达量较高, 但腺毛特异性启动子 CYP71AV1 能驱动青蒿素合成途径基因在腺毛中特异表达, 更利于青蒿素的合成。该结果表明, 在青蒿次生代谢调控中使用青蒿素生物合成关键基因的启动子, 如 CYP71AV1 启动子, 更有利于转基因植株中青蒿素的积累。

3 转录因子对青蒿素合成的影响

转录因子 (transcription factor, TF) 是一类能特异结合基因启动子的蛋白质, 是植物代谢工程中的一种重要手段。转录因子通过与基因启动子上相应的顺式作用元件结合, 从而激活目标基因的转录。目前在青蒿素生物合成过程中发现有多种转录因子参与, 包括 WRKY (1 个)、NAC (1 个)、bHLH (2 个)、bZIP (2 个) 和 AP2/ERF (4 个) 转录因子

表 1 青蒿素合成途径及支路途径关键酶基因

Table 1 Genes of artemisinin synthesis pathway and branch pathway

基因名称	基因全称	功能	参考文献
HMGR	3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A	催化 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 生成甲羟戊酸	21
DXS1	1-脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 1	催化丙酮酸和 3-磷酸甘油醛生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸	22
DXR1	1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构化酶 1	催化 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸生成 2-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸	22
MECS	2-C-甲基-D-赤藓糖-2,4-环焦磷酸合酶	催化二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藻糖醇-2-磷酸生成 2-甲基-D-赤藻糖醇-2,4-环二磷酸酯	9
FPS	法尼基焦磷酸合酶	催化异戊烯焦磷酸生成法尼基焦磷酸	23
ADS	紫穗槐二烯合成酶	催化法尼基焦磷酸生成紫穗槐二烯	5
CYP71AV1	细胞色素 P450 单氧化酶	催化生成青蒿醇、青蒿醛、青蒿酸和二氢青蒿酸	6-8
DBR2	青蒿醛双键还原酶	催化青蒿醛生成二氢青蒿酸	9
RED1	二氢青蒿醛还原酶	催化二氢青蒿醛生成二氢青蒿醇	13
ADH1	乙醇脱氢酶 1	催化青蒿醇生成青蒿醛	24
ALDH1	醛脱氢酶 1	催化生成青蒿酸、二氢青蒿醛和二氢青蒿酸	12
ADH2	乙醇脱氢酶 2	催化紫穗槐二烯合成酶生成青蒿醇	25
CPR	细胞色素 P450 还原酶	细胞色素 P450 单氧化酶的伴体	26
SQS	角鲨烯合酶	催化法尼基焦磷酸生成角鲨烯	19-20,27
ECS	雪松醇合酶	催化法尼基焦磷酸生成雪松醇	14
GAS	大根香叶烯合酶 A	催化法尼基焦磷酸生成大根香叶烯	16,27
BFS	β -法尼烯合酶	催化法尼基焦磷酸生成 β -法尼烯	17-18,27
CPS	β -石竹烯合	催化法尼基焦磷酸生成 β -石竹烯	15,27

家族。它们通过调控青蒿素生物合成途径基因的表达或青蒿表面腺毛的密度,最终影响青蒿素的合成。

3.1 WRKY 家族转录因子

WRKY 是植物特有的转录因子家族, AaWRKY1 是最早在青蒿中发现的转录因子, 研究表明该基因可与 ADS 和 CYP71AV1 启动子区域的 W-box 结合, WRKY1 过表达可提高转基因植株中 HMGR、DBR2、ADS 和 CYP71AV1 基因的表达水平, 增加青蒿素的积累^[41-42]。

3.2 NAC 家族转录因子

NAC 类转录因子是植物中最大类转录因子之一, 该家族的转录因子 AaNAC1 受水杨酸 (salicylic acid, SA)、茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 和干旱诱导, 在青蒿中过表达该基因, 导致青蒿素合成途径基因 ADS 的表达量升高, 青蒿素量增加^[43]。

3.3 bHLH 家族转录因子

AabHLH1 和 AaMYC2 属于 helix loop-helix (bHLH) 类转录因子。AabHLH1 从青蒿分泌型腺毛的 cDNA 文库中分离获得, 研究证明该基因可与

ADS 和 CYP71AV1 启动子区域的 E-box 顺式作用元件结合, 在青蒿中过表达 AabHLH1 可提高 HMGR、ADS 和 CYP71AV1 基因的表达水平^[44]。Shen 等^[45]在青蒿中克隆获得 AaMYC2 转录因子, 证明该基因受 JA 诱导, 可与 CYP71AV1 和 DBR2 启动子中的 G-box like 结构域结合, 过表达 AaMYC2 基因上调了 CYP71AV1 和 DBR2 基因的转录水平, 增加了青蒿素的量; 另有研究表明, 在青蒿倍半萜合成中, JA 与 GA 之间的信号传导依赖 AaMYC2-DELLA 蛋白的相互作用^[46]。

3.4 bZIP 家族转录因子

AabZIP1 和 AaHD1 同属于 bZIP 类转录因子家族, 具有基本的 DNA 结合区域和亮氨酸拉链结构。研究证明, AabZIP1 基因通过与 ADS 和 CYP71AV1 启动子区域的 ABA 反应元件 (ABRE) 结合, 上调了 ADS、CYP71AV1、DBR2 和 ALDH1 基因的转录水平, 影响青蒿素的生物合成^[47]; AabZIP1 将 ABA 信号通路与青蒿素生物合成联系起来。而 AaHD1 与 JA 信号传导相关, 该基因通过结合

AaJAZ8 (jasmonate ZIM-domain 8), 影响 JA 活性, 调控青蒿中腺毛的形成, AaHD1 过表达可显著增加青蒿分泌型腺毛的密度, 最终提高青蒿中青蒿素的量^[48]。

3.5 AP2/ERF 家族转录因子

AP2/ERF 转录因子家族在青蒿转录调控中研究较多, 目前已经报道的 AaERF1、AaERF2、AaORA 和 AaTAR1 均属于该家族。Yu 等^[49]研究表明 AaERF1 和 AaERF2 为乙烯和 JA 响应的 AP2 转录因子, 与 ADS 和 CYP71AV1 启动子区域的 CRTDREHVCBF2 (CBF2) 和 RAV1AAT (RAA) 结合, 调控 ADS 和 CYP71AV1 基因的表达, 提高了青蒿素的量。Lu 等^[50]通过实验证明, AaORA 可调控腺毛形成, 通过防御标志基因 PDF1.2、HEL 和 B-CHI 影响青蒿对灰霉菌 *Botrytis cinerea* 的抵抗作用, 正向调节 DBR2、ADS、CYP71AV1 和 AaERF1 的转录水平, 增加青蒿素的量。本课题组克隆了另一个 AP2/ERF 转录因子——AaTAR1, 证明该基因可影响青蒿腺毛发育及蜡质合成, 还可通过与 ADS 和 CYP71AV1 启动子区域的 CBF2 和 RAA 结合, 调控青蒿素的生物合成^[51]。另外, Wang 等^[52]通过对 ALDH1 启动子的克隆, 证明 AaORA 和 AaERF2 也可与 RAA 结构域相互作用, 影响青蒿素的合成。

转录因子种类繁多, 除以上已经报道的转录因子家族外, 最近还报道了 2 个在青蒿腺毛中特异性表达的其他家族转录因子 AaGL2 和 AaMIXTA-Like1^[53]。转录因子在植物次生代谢调控中具有不可替代的作用, 目前已经报道的在青蒿中表达的转录因子有 10 个左右, 一些重要的更有潜力的转录因子可发掘作为青蒿代谢调控的靶标基因。

4 植物激素对青蒿素合成的影响

植物激素是一种信号分子, 可以调节特定的细胞进程, 对于植物生长发育具有十分重要的作用。植物内源性信号分子 JA、赤霉素 (gibberellins, GA)、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 和 SA 可通过转录因子调控青蒿素生物合成和腺毛的发育, 影响青蒿素的合成。

4.1 JA 对青蒿素合成的影响

JA 属于脂类衍生物, 为保守的植物次生代谢激发因子^[54-55]。青蒿中已经报道的多种转录因子均受 JA 诱导, 包括 AaNAC1^[43]、AaMYC2^[45]、AaERF1 和 AaERF2^[49]等。这些转录因子经 JA 诱导后表达量增加, 从而正向调控青蒿素生物合成途径中的多个关键酶基因, 提高青蒿素的量。此外, JA 还可影响青蒿

腺毛密度。由于青蒿素和腺毛密度密切相关^[56-57], JA 可通过影响腺毛相关基因, 如 TFAR1 (trichome-specific fatty acyl-CoA reductase 1), 调控腺毛数量^[57]; JA 还可借助 bZIP 类转录因子家族的 AaHD1 诱导腺毛的形成^[48]。

4.2 ABA 对青蒿素合成的影响

ABA 是一种倍半萜类植物激素, 在非生物胁迫应答中起重要作用^[58]。研究表明, 用 ABA 处理青蒿悬浮细胞^[59], 可使青蒿素合成途径关键基因 HMGR、FPS、CYP71AV1 的表达量显著升高, 继而增加青蒿素产量。Zhang 等^[60]在青蒿中克隆出了 ABA 受体 AaPYL9, 并证明在青蒿中过表达 AaPYL9 能提高青蒿素合成途径基因 FPS、ADS 和 CYP71AV1 的转录水平, 增加青蒿中青蒿素和二氢青蒿酸的量。Zhang 等^[47]又在青蒿中克隆获得 ABA 途径的 ABF 类转录因子——AabZIP1, 该基因能直接结合青蒿素合成途径基因 ADS 和 CYP71AV1 的启动子, 提高青蒿素的生物合成能力。

4.3 SA 对青蒿素合成的影响

SA 是一种酚类化合物, 也能影响植物中次生代谢产物的合成。研究表明, 向青蒿植株喷洒外源 SA 时, 青蒿素生物合成途径关键基因 ADS 的表达量增加, 青蒿素和二氢青蒿酸的量增加^[61-62]。研究表明, SA 在青蒿中可能通过 2 种途径增加青蒿素的量: 一是提高活性氧 (ROS) 的量, 促进二氢青蒿酸向青蒿素转化; 二是影响青蒿素生物合成相关的酶基因^[1]。但 SA 提高青蒿素的分子机制还有待进一步研究。

4.4 GA 对青蒿素合成的影响

GA 属于二萜类酸, 是目前发现能促进青蒿素生物合成的最重要的植物激素^[1]。内源性 GA 可诱导 AA 向青蒿素转化^[63]; GA 能提高青蒿素生物合成途径中 FDS、ADS 和 CYP71AV1 基因的表达量^[57,64]。早期的研究也表明, 当用内源性 GA 处理青蒿后, 青蒿素的量增加了 3~4 倍, 同时腺毛数量增加^[65]。但目前基于 GA 调控青蒿素生物合成及腺毛的分子机制的研究还未见报道。

JA、GA、ABA 和 SA 这几种植物激素虽然有其特定的生物合成途径及信号传导通路, 但它们之间也存在相互作用网络。JA 与 GA 之间可依赖 AaMYC2-DELLA 基因的相互作用进行信号传导^[46]; GA 诱导 DELLA 蛋白生长抑制因子降解, 提高 ROS 和 SA 的积累, 削弱 JA 信号通路^[66]; JA 与 SA 信号相互拮抗^[56-67]。

5 逆境及诱导因子对青蒿素合成的影响

5.1 逆境对青蒿素合成的影响

各种环境胁迫因子可作为增加植物次生代谢产物的诱导因子。当植物在细胞水平上识别刺激信号后,即产生应激反应。环境胁迫信号如温度(高、低),高盐,水(干旱、洪灾),射线,化学物质,金属及生物胁迫通常会诱导苯丙烷类物质的累积^[67]。

将青蒿暴露在不同的诱导因子下,研究青蒿素的产量及其生物合成途径相关基因转录水平的变化。研究^[67]显示,寒冷可以增加青蒿素的产量,主要是通过增加青蒿素合成途径基因 ADS、CYP71AV1 和 DXS 的表达量;夜雾和干旱也能提高青蒿素的产量。高盐对青蒿素产量的影响具有两面性,在植物生长早期主要通过增加氧化应激促进 AA 向青蒿素的转化,提高青蒿素的量;在植物的生长后期,高盐却抑制青蒿素的合成。另外,与营养丰富的生长环境相比,低钾环境更有利于青蒿素的合成。相比之下,适当浓度的硼、砷、镉胁迫可促进青蒿素的积累,而过高的金属元素胁迫则会抑制青蒿素的合成^[67]。生物胁迫也能增加青蒿素的产生,大果球囊霉 *Glomus macrocarpum* 可增加腺毛密度及青蒿素产量^[67]。

JA、ABA 和 SA 在植物应答逆境胁迫过程中发挥着至关重要的作用,是重要的应答非生物胁迫的调控因子。JA 和植物受胁迫有关,当植物受盐、干旱、伤及紫外线等胁迫时,植物体内的 JA 信号增强^[54];ABA 通过依赖或非依赖的信号传导途径调节渗透压^[58];SA 参与了植物的干旱胁迫、冷应激、热应激和重金属离子胁迫的应答^[68]。JA 生物合成相关基因(LOX1、LOX2、AOC 和 JAR1)受冷胁迫的诱导,冷胁迫通过增加内源性 JA 提高青蒿素的产量,表明环境胁迫通过激素介导的信号通路影响青蒿素合成及腺毛密度^[69]。

5.2 诱导因子对青蒿素合成的影响

除以上因素外,内生真菌诱导因子、化学信号诱导因子、糖类、二甲基亚砜(DMSO)、光照等也能影响青蒿素的合成。

5.2.1 内生真菌诱导因子 内生真菌共生可作为一种次生代谢诱导剂,促进植物次生代谢产物的产生^[70]。研究证明,在青蒿不定根中引入内生真菌炭疽病 *Colletotrichum* sp.^[71-72],青蒿素的量提高到 13 mg/L。另有报道指出,印度梨形孢(DSM 11827)和固氮菌(W-5)通过增加青蒿植株高度、干质量

和叶子生物量实现总生物量的增加,最终影响青蒿素的产量^[73]。

5.2.2 化学信号诱导因子 NO 及 ROS 作为一种信号应答因子,能促进次生代谢产物的产生。在青蒿素生物合成中,NO 和 ROS 促使 DHAA 转变成青蒿素,从而使青蒿素量增加^[74-75]。

5.2.3 糖类 寡糖、寡半乳糖醛酸诱导因子促使根产生大量 NO 和 ROS^[74,76],提高青蒿素的量;葡萄糖^[77-78]能促进青蒿素的合成,但果糖能抑制青蒿素的合成。

5.2.4 DMSO DMSO 是由海洋微生物产生的,其可通过增加根苗中 ROS 和 H₂O₂ 浓度,促进青蒿素的合成^[79-80]。

5.2.5 光照 青蒿素的合成与光合作用有关。将拟南芥中调节光信号的蓝光受体(CRY1)转入青蒿中,青蒿素合成途径关键基因 FPS、ADS 和 CYP71AV1 的表达量均增加,青蒿素量也提高 30%~40%^[81]。此外,还有研究表明,白光能增加青蒿不定根培养过程中青蒿素的形成^[82];进一步实验证明,在白光、红光、蓝光、黄光和绿光中,红光更能促进青蒿不定根培养过程中青蒿素的合成^[80]。

6 展望

青蒿素及其衍生物具有多种生物活性。除能用于对抗疟疾外,青蒿素类药物还能杀灭血吸虫、弓形虫、利什曼原虫等多种寄生虫,治疗红斑狼疮及类风湿性关节炎等免疫性疾病,对多种人源性肿瘤细胞具有较大的杀伤力^[83]。虽然青蒿素可通过化学合成、生物半合成^[84]、悬浮细胞培养^[85]、毛状根培养^[86]等方式获得,但青蒿素的主要来源仍然是通过青蒿植株获得。鉴于青蒿原植物中青蒿素的量很低,因此可通过各种代谢调控手段提高青蒿素的量。

随着人们对青蒿素生物合成过程的认识,大量青蒿素相关基因被克隆鉴定,基于过表达生物合成关键基因、抑制支路基因及多基因组合表达的次生代谢工程策略在青蒿素代谢调控中获得长足发展;另外,转录因子、植物激素、逆境及诱导因子对青蒿素积累的研究正在不断深入,不同影响因素对青蒿素合成的分子机制逐步被揭示,这些成果的取得对利用植株获得青蒿素具有重要的指导意义。腺毛是青蒿素生物合成的场所,通过调控腺毛的形态或数量,可从青蒿素合成的特定部位提高青蒿素的产量,从而实现优质品种的培育。

图 2 总结了影响青蒿素合成的因素,包括外界

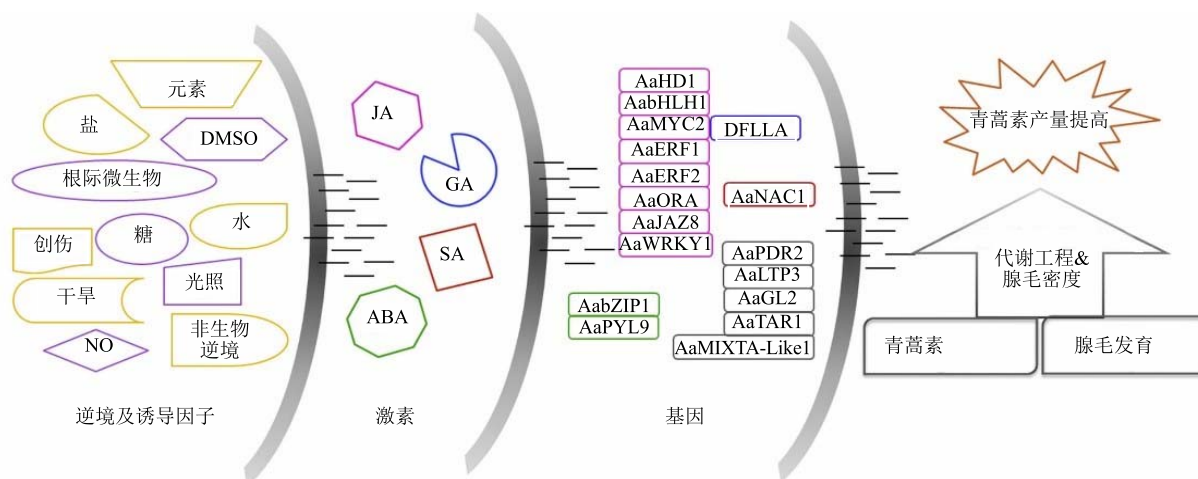


图 2 青蒿素代谢工程示意图

Fig. 2 Sketch map of artemisinin metabolic engineering

环境刺激、激素和非青蒿素生物合成的其他相关基因。其中，外界环境刺激包括逆境（黄色线条中标识的内容）和诱导因子（紫色线条中标识的内容）；激素包括 JA、GA、SA 和 ABA；基因主要为已证明与青蒿素产量相关的转录因子及其相关蛋白，另外也包括与腺毛发育相关（黑色标识）和与青蒿素转运相关（黑色标识）的基因。同时，图 2 还用颜色区分了激素与基因之间的关系，激素能调控相同颜色标志的基因表达；从左到右，左边的因素能影响右边的因素，最后通过基因影响青蒿素生物合成及腺毛发育。可通过对左边 3 种因素的调控，开展基于青蒿素生物合成途径的常规次生代谢调控策略和基于腺毛的新型代谢调控策略，提高青蒿素的产量。

青蒿素代谢调控可从青蒿素生物合成及支路途径、转录因子、植物激素、逆境、诱导因子和腺毛方面入手，具体包含以青蒿素生物合成途径为基础的常规次生代谢调控和以腺毛为基础的新型代谢调控（图 2）。基于此，本文提出几点新的常规次生代谢工程策略：探究最佳的基因组合表达形式（新的合成途径基因之间及其与支路途径之间的组合），同时结合转运蛋白并应用最适特异启动子；加强多个转录因子联合调控青蒿素产量的研究，全面实现对多个青蒿素生物合成及支路途径的共同调控；联合应用植物激素、逆境及诱导因子，同时调控多个青蒿素生物合成相关转录因子和青蒿素生物合成及支路途径的多个不同作用的基因。另一方面，开展基于腺毛密度的新型代谢工程策略：联合调控腺毛发育相关的转录因子、植物激素、逆境及诱导因子，促进多个腺毛发育相关基因的表达，实现青蒿素代谢

宏观调控。随着青蒿素生物合成及相关影响因素分子机制的深入研究，多因素青蒿代谢调控得以合理实现，这将为优质高产转基因青蒿品系的培育和青蒿种质遗传改良奠定基础。

参考文献

- [1] Pulice G, Pelaz S, Matías-Hernández L. Molecular farming in *Artemisia annua*, a promising approach to improve anti-malarial drug production [J]. *Front Plant Sci*, 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00329.
- [2] Van Noorden R. Demand for malaria drug soars [J]. *Nature*, 2010, 466(7307): 672-673.
- [3] 张小波, 郭兰萍, 黄璐琦. 我国黄花蒿中青蒿素含量的气候适宜性等级划分 [J]. *药学学报*, 2011, 46(4): 472-478.
- [4] Schramek N, Wang H, Römisch-Margl W, et al. Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A $^{13}\text{CO}_2$ study [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 179-187.
- [5] Nguyen K T, Arsenault P R, Weathers P J. Trichomes + roots + ROS = artemisinin: regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *In Vitro Cell Dev Pl*, 2011, 47(3): 329-338.
- [6] Wang H, Han J, Kanagarajan S, et al. Trichome-specific expression of the amorpha-4,11-diene 12-hydroxylase (cyp71av1) gene, encoding a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*, as reported by a promoter-GUS fusion [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(1/2): 119-138.
- [7] Wang Y, Yang K, Jing F, et al. Cloning and characterization of trichome specific promoter of cpr71av1 gene involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Biol*, 2011, 45(5): 817-824.
- [8] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, et al. *Artemisia annua* L. (Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the

- biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin [J]. *Febs Lett*, 2006, 580(5): 1411-1416.
- [9] Wu T, Wang Y, Guo D. Investigation of glandular trichome proteins in *Artemisia annua* L. using comparative proteomics [J]. *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0041822.
- [10] Muangphrom P, Seki H, Fukushima E O, et al. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium* parasites [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(3): 318-334.
- [11] Suberu J, Gromski P S, Nordon A. Multivariate data analysis and metabolic profiling of artemisinin and related compounds in high yielding varieties of *Artemisia annua* field-grown in Madagascar [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 117: 522-531.
- [12] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, et al. Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Botany*, 2009, 87(6): 635-642.
- [13] Ryden A M, Carolien R S, Quax W, et al. The molecular cloning of dihydroartemisinic aldehyde reductase and its implication in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Planta Med*, 2010, 76(15): 1778-1783.
- [14] Mercke P, Crock J, Croteau R, et al. Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua* L. [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 369(2): 213-222.
- [15] Cai Y, Jia J W, Crock J, et al. A cDNA clone for [beta]-caryophyllene synthase from *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(5): 523-529.
- [16] Berteau C M, Voster A, Verstappen F W A, et al. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 448(1/2): 3-12.
- [17] Brown G D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao) [J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 7603-7698.
- [18] Picaud S, Brodelius M, Brodelius P E. Expression, purification and characterization of recombinant (E)-[beta]-farnesene synthase from *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(9): 961-967.
- [19] Zhang L, Jing F, Li F, et al. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing [J]. *Biotechnol Appl Bioc*, 2009, 52(3): 199-207.
- [20] Yan L, Ye H C, Wang H, et al. Molecular cloning, *Escherichia coli* expression and genomic organization of squalene synthase gene from *Artemisia annua* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(5): 608-613.
- [21] Nafis T, Akmal M, Ram M, et al. Enhancement of artemisinin content by constitutive expression of the HMG-CoA reductase gene in high-yielding strain of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2011, 5(5): 53-60.
- [22] Olsson M E, Olofsson L M, Lindahl A L, et al. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(9): 1123-1128.
- [23] Banyai W, Kirdmanee C, Mii M, et al. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2010, 103(2): 255-265.
- [24] Polichuk D, Teoh K H, Zhang Y, et al. Nucleotide sequence encoding an alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua* and uses thereof: WO, 2010012074 [P]. 2011-06-30.
- [25] Polichuk D R, Zhan Y S, Reed D W, et al. A glandular trichome-specific monoterpene alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(11-12): 1264-1269.
- [26] Shen Q, Chen Y F, Wang T, et al. Overexpression of the cytochrome P450 monooxygenase (cyp71av1) and cytochrome P450 reductase (cpr) genes increased artemisinin content in *Artemisia annua* (Asteraceae) [J]. *Gen Mol Res*, 2012, 11(3): 3298-3309.
- [27] Lv Z, Zhang F, Pan Q, et al. Branch pathway blocking in *Artemisia annua* is a useful method for obtaining high yield artemisinin [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(3): 588-602.
- [28] 王亚雄, 龙世平, 曾利霞, 等. 过表达 *HDR* 和 *ADS* 基因对青蒿素生物合成的影响 [J]. *药学学报*, 2014(9): 1346-1352.
- [29] Tang K, Shen Q, Yan T, et al. Transgenic approach to increase artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(4): 605-615.
- [30] Duke S O, Paul R N. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. [J]. *Int J Plant Sci*, 1993, 154: 107-118.
- [31] Duke M V, Paul R N, Elsohly H N, et al. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. [J]. *Int J Plant Sci*, 1994, 155(3): 365-372.
- [32] Olofsson L, Lundgren A, Brodelius P E. Trichome isolation with and without fixation using laser microdissection and pressure catapulting followed by RNA amplification: expression of genes of terpene metabolism in apical and sub-apical trichome cells of *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Sci*, 2012, 183(1): 9-13.
- [33] Bryant L, Patole C, Cramer R. Proteomic analysis of the medicinal plant *Artemisia annua*: data from leaf and trichome extracts [J]. *Data Brief*, 2016, 7: 325-331.
- [34] Xiao L, Tan H, Zhang L. *Artemisia annua* glandular secretory trichomes: the biofactory of antimalarial agent artemisinin [J]. *Sci Bull*, 2016, 61(1): 26-36.
- [35] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of

- artemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(18): 9548-9566.
- [36] Graham I A, Besser K, Blumer S, *et al.* The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin [J]. *Science*, 2010, 327(5963): 328-331.
- [37] Arsenault P R, Vail D, Wobbe K K, *et al.* Reproductive development modulates gene expression and metabolite levels with possible feedback inhibition of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 958-968.
- [38] Singh N D, Kumar S, Daniell H. Expression of β -glucosidase increases trichome density and artemisinin content in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(3): 1034-1045.
- [39] Wang B, Kashkooli A B, Salles A, *et al.* Transient production of artemisinin in *Nicotiana benthamiana*, is boosted by a specific lipid transfer protein from *A. annua* [J]. *Metab Eng*, 2016, 38: 159-169.
- [40] Han J, Wang H, Kanagarajan S, *et al.* Promoting artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* plants by substrate channeling [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(6): 946-948.
- [41] Han J, Wang H, Lundgren A, *et al.* Effects of overexpression of *AaWRKY1* on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Phytochemistry*, 2014, 102(6): 89-96.
- [42] Ma D, Pu G, Lei C, *et al.* Isolation and characterization of *AaWRKY1*, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpho-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [43] Lv Z, Wang S, Zhang F, *et al.* Overexpression of a novel NAC domain-containing transcription factor gene (*AaNAC1*) enhances the content of artemisinin and increases tolerance to drought and *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(9): 1961-1971.
- [44] Ji Y, Xiao J, Shen Y, *et al.* Cloning and characterization of *AabHLH1*, a bHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(9): 1592-1604.
- [45] Shen Q, Lu X, Yan T, *et al.* The jasmonate-responsive *AaMYC2* transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, 210(4): 1269-1281.
- [46] Shen Q, Cui J, Fu X Q, *et al.* Cloning and characterization of DELLA genes in *Artemisia annua* [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 10037-10049.
- [47] Zhang F, Fu X, Lv Z, *et al.* A basic leucine zipper transcription factor, *AabZIP1*, connects abscisic acid signaling with artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 163-175.
- [48] Yan T, Chen M, Shen Q, *et al.* Homeodomain protein 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, doi: 10.1111/nph.14205.
- [49] Yu Z X, Li J X, Yang C Q, *et al.* The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 353-365.
- [50] Lu X, Zhang L, Zhang F, *et al.* AaORA, a trichome-specific AP2/ERF transcription factor of *Artemisia annua*, is a positive regulator in the artemisinin biosynthetic pathway and in disease resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *New Phytol*, 2013, 198(4): 1191-1202.
- [51] Tan H, Xiao L, Gao S, *et al.* Trichome and artemisinin regulator 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1396-411.
- [52] Wang H, Liu W, Qiu F, *et al.* Molecular cloning and characterization of the promoter of aldehyde dehydrogenase gene from *Artemisia annua* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, doi: 10.1002/bab.1520.
- [53] Jindal S, Longchar B, Singh A, *et al.* Promoters of AaGL2 and AaMIXTA-Like1 genes of *Artemisia annua* direct reporter gene expression in glandular and non-glandular trichomes [J]. *Plant Signal Behav*, 2015, doi: 10.1080/15592324.2015.1087629.
- [54] Wasternack C. Action of jasmonates in plant stress responses and development-applied aspects [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(1): 31-39.
- [55] De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, *et al.* Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 349-359.
- [56] Liu S, Tian N, Li J, *et al.* Isolation and identification of novel genes involved in artemisinin production from flowers of *Artemisia annua* using suppression subtractive hybridization and metabolite analysis [J]. *Planta Med*, 2009, 75(14): 1542-1547.
- [57] Maes L, Van Nieuwerburgh F C, Zhang Y, *et al.* Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants [J]. *New Phytol*, 2010, 189(1): 176-189.
- [58] Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 21(21C): 133-139.
- [59] Jing F, Zhang L, Li M, *et al.* Absciscic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway [J]. *Biologia*, 2009, 64(2): 319-323.
- [60] Zhang F, Lu X, Lv Z, *et al.* Overexpression of the *Artemisia* orthologue of ABA receptor, AaPYL9, enhances ABA sensitivity and improves artemisinin Content in *Artemisia annua* L. [J]. *PLoS One*, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0056697.

- [61] Pu G, Ma D, Chen J, *et al.* Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(7): 1127-1135.
- [62] Aftab T, Khan M M A, Idrees M, *et al.* Methyl jasmonate counteracts boron toxicity by preventing oxidative stress and regulating antioxidant enzyme activities and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Protoplasma*, 2011, 248(3): 601-612.
- [63] Zhang Y S, Ye H C, Liu B Y, *et al.* Exogenous GA3 and flowering induce the conversion of artemisinic acid to artemisinin in *Artemisia annua* plants [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2005, 52(1): 58-62.
- [64] Banerjee S, Zehra M, Gupta M M, *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Artemisia annua*: production of transgenic plants [J]. *Planta Med*, 1997, 63(5): 467-469.
- [65] Paniego N, Giulietti A. Artemisinin production by *Artemisia annua* L. transformed organ cultures [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1996, 18(7): 526-530.
- [66] Robert-Seilanianantz A, Grant M, Jones J D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2011, 49(1): 317-343.
- [67] Pandey N, Pandey-Rai S. Updates on artemisinin: an insight to mode of actions and strategies for enhanced global production. [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(1): 15-30
- [68] Rivas-San Vicente M, Plasencia J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(10): 3321-3338.
- [69] Liu W, Wang H, Chen Y, *et al.* Cold stress improves the production of artemisinin depending on the increase of endogenous jasmonate [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, doi: 10.1002/bab.1493.
- [70] Tan R X, Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites [J]. *Nat Prod Rep*, 2001, 18(4): 448-459.
- [71] Lu H, Zou W X, Meng J C, *et al.* New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.* an endophytic fungus in *Artemisia annua* [J]. *Plant Sci*, 2000, 151(1): 67-73.
- [72] Wang Y, Zhang H, Zhao B, *et al.* Improved growth of *Artemisia annua* L. hairy roots and artemisinin production under red light conditions [J]. *Biotechnol Lett*, 2001, 23(23): 1971-1973.
- [73] Arora M, Saxena P, Choudhary D K, *et al.* Dual symbiosis between *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* enhances the artemisinin content in *Artemisia annua* L. [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2016, doi: 10.1007/s11274-015-1972-5.
- [74] Zheng L P, Zhang B, Zou T, *et al.* Nitric oxide interacts with reactive oxygen species to regulate oligosaccharide-induced artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(9): 758-766.
- [75] Wang J W, Zheng L P, Zhang B, *et al.* Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2009, 85(2): 285-292.
- [76] Zhang B, Zou T, Lu Y H, *et al.* Stimulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy roots by oligogalacturonides [J]. *Afr J Biotechnol*, 2010, 9(23): 3437-3442.
- [77] Weathers P J, DeJesus-Gonzalez L, Kim Y J, *et al.* Alteration of biomass and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by media sterilization method and sugars [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 23(6): 414-418.
- [78] Wang Y. Sugar control of artemisinin production [D]. Massachusetts: Worcester Polytechnic Institute, 2006.
- [79] Mannan A, Liu C, Arsenault P R, *et al.* DMSO triggers the generation of ROS leading to an increase in artemisinin and dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* shoot cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(2): 143-152.
- [80] Wallaart T E, Pras N, Quax W J. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthetic precursor of artemisinin [J]. *J Nat Prod*, 1999, 62(8): 1160-1162.
- [81] Hong G J, Hu W L, Li J X, *et al.* Increased accumulation of artemisinin and anthocyanins in *Artemisia annua* expressing the *Arabidopsis* blue light receptor *CRY1* [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27(3): 334-341.
- [82] Liu C, Guo C, Wang Y, *et al.* Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. [J]. *Process Biochem*, 2002, 38(4): 581-585.
- [83] 尹纪业, 王和枚, 丁日高. 青蒿素及其衍生物毒理学研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(2): 309-314.
- [84] 方欣, 卢山, 于宗霞, 等. 青蒿素的生物合成研究 [J]. 科技导报, 2015, 33(20): 31-35.
- [85] Di Sansebastiano G P, Rizzello F, Durante M, *et al.* Subcellular compartmentalization in protoplasts from *Artemisia annua* cell cultures: engineering attempts using a modified SNARE protein [J]. *J Biotechnol*, 2015, 202: 146-152.
- [86] Patra N, Srivastava A K. Use of model-based nutrient feeding for improved production of artemisinin by hairy roots of *Artemisia annua* in a modified stirred tank bioreactor [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(2): 373-388.