

黄花蒿中青蒿素生物合成相关转录因子研究进展

李琦, 高晓悦, 陈万生, 谭何新*

海军军医大学药学院, 上海 200433

摘要: 以青蒿素为基础的联合疗法是疟疾的首选治疗方案, 而药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* 是青蒿素的唯一天然来源, 也是目前最主要的青蒿素来源, 因此培育高产青蒿素的黄花蒿一直是国际研究热点。青蒿素是黄花蒿的次生代谢产物, 在植物的次生代谢物合成过程中, 关键的转录因子可以调节代谢途径中某个或多个基因的表达, 从而调节代谢流的方向和速度, 决定着代谢物的产量, 因此关键转录因子的表达对于青蒿素的合成非常重要, 通过干预转录因子的表达也是提高青蒿素产量的重要手段。综述了黄花蒿中已研究的转录因子功能及调控机制, 特别是对筛选获得转录因子基因的方法进行总结, 以期揭示青蒿素合成调控网络奠定基础。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; 转录因子; 代谢调控; 次生代谢物

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1827-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.032

Research on transcription factors related to artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*

LI Qi, GAO Xiao-yue, ZHANG Lei, CHEN Wan-sheng, TAN He-xin

School of Pharmacy, Navy Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Artemisinin-based combination therapy is the preferred treatment for malaria. The medicinal plant *Artemisia annua* is the only natural source and the main source of artemisinin. It is a hotspot to cultivate a strain of *A. annua* with high artemisinin content. Artemisinin is a secondary metabolite of *A. annua*. In the process of plant secondary metabolism, transcription factors play important roles in regulating a series of genes in the metabolic pathway, thereby regulating the direction and speed of metabolic flow. Therefore, the intervention of transcription factor by genetic engineering is an important method to regulate plant secondary metabolism. This article summarizes the functions and regulatory mechanism of transcription factors had been studied in *A. annua*. In particular, the methods for screening these transcription factors genes were summarized in order to provide a reference for the finding of key functional genes.

Key words: *Artemisia annua* L.; artemisinin; transcription factor; metabolic regulation; secondary metabolite

据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 报道, 2018 年全球共有 2.28 亿疟疾病例报告, 其中 40.5 万例死亡, 2010~2018 年疟疾的发病率及死亡率均呈下降趋势, 特别是重灾区非洲的疟疾死亡率下降尤为明显, 这很大程度上归功于以青蒿素为基础的联合疗法 (artemisinin-based combination therapy, ACT) 的应用, 目前 ACT 仍为 WHO 推荐的疟疾首选治疗方案^[1]。如何高效获得青蒿素一直是国际研究热点, 化学合成方面, 早

在 1983 年瑞士科学家 Schmid 和 Hofheinz 就提出了青蒿素的化学全合成方案, 但反应步骤多、条件苛刻、试剂昂贵、得率低, 后续提出的化学合成方案均存在类似问题^[2]。合成生物学方面, Keasling 团队在青蒿酸生物合成方面的研究堪称合成生物学的典范, 然而由于青蒿素的最终合成需要特殊的油性氧化环境, 在酵母中难以实现, 因此目前较为成熟的方法仍为生物合成青蒿酸^[3]。Paddon 等^[4]提出以青蒿酸为原料的化学半合成方案, 最终青蒿素的

收稿日期: 2020-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673529); 科技部新药创制重大专项 (2017ZX09101002-003-002)

作者简介: 李琦 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药材品质改良。E-mail: liqi0121@163.com

*通信作者: 谭何新, 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药资源研究。Tel/Fax: (021)81871370 E-mail: hexintan@163.com

得率为 40%~45%，且存在分离纯化困难的问题。目前最为经济的获得青蒿素的方法仍为从植物中提取，而青蒿素在植株中的含量较低，仅占干质量的 0.1%~1%^[5]，随着青蒿素临床治疗应用的开发，其市场需求会进一步加大，因此需要提高青蒿素的产量。

青蒿素是来源于药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的次生代谢产物，其生物合成途径属于类异戊二烯途径（图 1），由质体中的异戊二烯（meth-ylerythritol phosphate, MEP）途径提供 1 个异戊烯基焦磷酸（isopentenyl phosphate, IPP）和细胞质中的甲羟戊酸（mevalonic acid, MVA）途径提供 1 个二甲基烯丙基焦磷酸（dimethylallyl diphosphate, DMAPP）和 IPP，然后 1 份 DMAPP 和 2 份 IPP 在法尼基焦磷酸合成酶（farnesyl diphosphate synthase, FPS）的催化下聚合生成法尼基焦磷酸（farnesyl diphosphate, FPP）^[6-7]。从 FPP 开始进入青蒿素合成特异的下游代谢途径，FPP 经紫穗槐二烯合成酶（amorpha-4,11-diene synthase, ADS）催化生成紫

穗槐二烯^[8]；紫穗槐二烯经过 3 步由细胞色素 P450 单氧化酶（Cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1）催化的反应，分别形成青蒿醇，青蒿醛和青蒿酸^[9-11]。青蒿醛可在青蒿醛双键还原酶[artemisinic aldehyde delta-11 (13) reductase, DBR2]^[12]和醛脱氢酶 1（aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1）^[13]的催化下先转化成二氢青蒿醛（dihydroartemisinic aldehyde），然后生成青蒿素的直接前体二氢青蒿酸（dihydroartemisinic acid, DHAA）。同时，青蒿醛也会在 CYP71AV1 和 ALDH1 的催化下生成青蒿酸（artemisinic acid）^[11, 13]；从 DHAA 到青蒿素（artemisinin），以及青蒿酸到青蒿素 B（arteannuin B）的转化目前认为是非酶促的光氧化反应^[14-17]。在植物的次生代谢过程中，转录因子可以调节代谢途径中的一系列基因，对转录因子的干预是一种有效的调控植物次生代谢产物的方法^[18]。本文按照获得转录因子基因的不同途径进行分类，综述了黄花蒿中转录因子的研究进展。

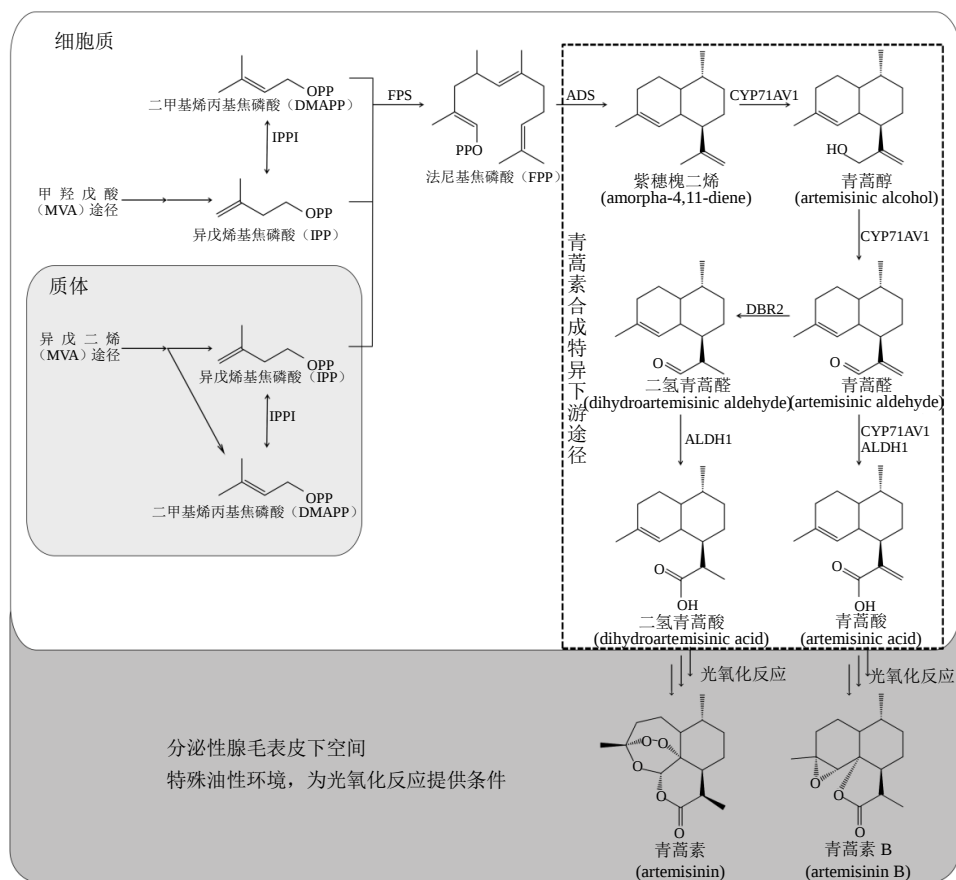


图 1 青蒿素生物合成途径

Fig. 1 Biosynthesis pathway of artemisinin

1 激素响应转录因子

1.1 脱落酸 (abscisic acid, ABA) 对黄花蒿 *bZip1* 基因 (*AabZip1*) 的影响

ABA 的处理能提高青蒿素积累^[19], 在模式植物拟南芥中 A 类 *bZip* 家族转录因子响应 ABA 信号^[20]。Zhang 等^[21]通过 *bZip* 家族保守结构域查询黄花蒿公共 cDNA 数据库, 得到 145 个候选基因, 其中 64 个能在分泌性腺毛中表达, 通过与拟南芥 A 类 *bZip* 转录因子基因构建系统进化树, 筛选得到 6 个黄花蒿 A 类 *bZip* 转录因子基因, 再通过在烟草中进行双荧光素酶实验验证能否激活 *ADS* 及 *CYP71AV1* 的表达, 获得目的基因 *AabZip1*。后续实验表明 *AabZip1* 受 ABA、干旱、高盐胁迫的诱导表达, *AabZip1* 通过激活 *ADS* 和 *CYP71AV1* 的表达影响青蒿素的合成, 其过表达可使青蒿素和二氢青蒿酸含量分别提高 40%~60%、41%~53%。

1.2 茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 和茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA)

1.2.1 黄花蒿 *MYC2* 基因 (*AaMYC2*) *bHLH* 家族的 *MYC2* 类转录因子被认为是参与 JA 信号通路的核心因子^[22-23]。Shen 等^[24]在黄花蒿叶片 cDNA 文库中发现 5 个 *MYC2* 类转录因子片段序列, 其中 1 条与 MeJA 处理后的拟南芥中的 *MYC2* 基因的表达模式相同, 用 RACE 方法获得其全长序列, 命名为 *AaMYC2*。后续研究表明过表达 *AaMYC2* 能提高 *CYP71AV1* 和 *DBR2* 的转录水平, 可使青蒿素和二氢青蒿酸含量分别提高 23%~55%、17%~217%。

1.2.2 黄花蒿 *HD1* 基因 (*AaHD1*) JA 能促进黄花蒿分泌性腺毛起始^[25], JAZ 蛋白是茉莉酸信号通路的重要调控因子, 在拟南芥中能影响腺毛的起始^[26], Yan 等^[27]用 *AaJAZ8* 筛选黄花蒿幼叶 cDNA 文库, 发现 1 个 *HDZip* 家族转录因子 *AaHD1* 能与 *AaJAZ8* 相互作用, 且受茉莉酸的正调控。后续研究表明过表达 *AaHD1* 能在不影响植物生长的情况下增加成熟叶片表面分泌性腺毛密度, 使青蒿素含量提高 50%。

1.2.3 黄花蒿 *ERF1*、*ERF2* 基因 (*AaERF1*、*AaERF2*) *AP2/ERF* 家族转录因子参与植物激素信号响应及次生代谢^[28]。Yu 等^[29]通过在分泌性腺毛 cDNA 文库中查找 *AP2/ERF* 家族转录因子保守结构域, 获得 7 个片段序列, 其中 2 个符合在花中表达、且受 MeJA 诱导的表达模式, 用 RACE 的方法获得这 2 条序列的全长, 即 *AaERF1* 和 *AaERF2*。后续研究表明

AaERF1、*AaERF2* 均能激活 *ADS*、*CYP71AV1* 的表达, 过表达 *AaERF1* 可使青蒿素和青蒿酸的含量提高 19%~67%、11%~76%, 过表达 *AaERF2* 为 24%~51%、17%~121%, 且 *AaERF1* 基因可能通过 JA 和乙烯信号通路, 激活部分防御基因, 提高黄花蒿对灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers. 的抗性^[30]。

1.3 水杨酸 (Salicylic acid, SA) 对黄花蒿 *TGA6* 基因 (*AaTGA6*)

SA 在植物对病原菌的防御响应中起重要作用^[31], 在拟南芥的 SA 信号通路中 *TGA2*、*NPR1* 是重要调节因子^[32-33]。Lv 等^[34]分析黄花蒿转录组数据, 发现有 6 条 *TGA* 类转录因子序列, 通过与拟南芥 *TGA* 转录因子基因构建系统进化树, 同源性最高的为 *AaTGA6*。后续研究表明 *AaTGA6* 的表达能被 *AaNPR1* 增强, 被 *AaTGA3* 抑制, 同时 *AaTGA6* 能调控 *AaERF1* 基因的表达, 过表达可使青蒿素含量提高 90%~120%。

2 通过分析启动激活元件获得转录因子

2.1 黄花蒿 *WRKY1* 基因 (*AaWRKY1*)

Han 等^[35]分析 *ADS* 基因的启动子发现其含有 2 个 W-box, 可能受 *WRKY* 家族转录因子调控, 通过比对分泌性腺毛的 cDNA 文库, 发现其中有 1 条 *WRKY* 转录因子的片段序列, 用 RACE 方法获得全长序列, 命名为 *AaWRKY1*。后续研究表明 *AaWRKY1* 能提高 *ADS*、*CYP71AV1* 及其它青蒿素合成途径基因的表达, 且 *AaWRKY1* 在腺毛中特异的过表达比在植物中广泛的过表达能更有效的提高青蒿素的积累。

2.2 黄花蒿 *MYB1* 基因 (*AaMYB1*)

Matías-Hernández 等^[36]发现多数青蒿素合成途径基因启动子区域均含有 *MYB* 家族转录因子结合位点, 推测有 *MYB* 家族转录因子参与调控青蒿素生物合成。分析公共黄花蒿分泌性腺毛 cDNA 文库, 发现 1 个符合 *R2R3-MYB* 转录因子特征的片段, 用 RACE 的方法获得全长序列命名为 *AaMYB1*。后续研究表明, *AaMYB1* 的过表达可以提高青蒿素合成途径基因的表达水平, 增加分泌性腺毛数量及密度, 提高青蒿素的积累。

2.3 黄花蒿 *bHLH1* 基因 (*AabHLH1*)

Ji 等^[37]发现 *ADS*、*CYP71AV1* 基因启动子区域均含有 *bHLH* 家族转录因子结合的 E-box, 推测可能被 *bHLH* 家族转录因子调控, 在黄花蒿分泌性腺毛 cDNA 数据库中分析发现 3 条可能的 *bHLH* 家族

转录因子基因片段, 用 RACE 方法能获得了其中 2 条基因的全长, 酵母单杂交实验及 EMSA 实验证明 AabHLH1 能与 E-box 结合, 因此选定 *AabHLH1* 为目的基因。后续研究表明, AabHLH1 能结合 *ADS*、*CYP71AV1* 的启动子并提高青蒿素合成途径基因的转录水平。

2.4 黄花蒿 HD8 基因 (*AaHD8*)

Yan 等^[38]分析 *AaHD1* 的启动子发现含有 L1-box, 预测可能被 HD-Zip 家族转录因子结合, 利用酵母单杂交、双荧光素酶实验筛选已获得的 HD-Zip IV 亚家族转录因子基因, 获得 *AaHD8*。后续研究表明 *AaHD8* 能激活 *AaHD1* 的表达, 从而起始分泌性腺毛的发育, 另外 *AaHD8* 还能与 *AaMIXTA1* 相互作用, 调节腺毛发育及角质层形成。

3 与已知功能基因同源的黄花蒿转录因子基因

3.1 拟南芥

3.1.1 黄花蒿 *ERF3* 基因 (*AaERF3*) 拟南芥 *ORA59* 能在植物防御中整合 JA 和乙烯信号^[39]。Lu 等^[40]通过拟南芥 *ORA59* 基因序列在黄花蒿分泌性腺毛 cDNA 文库中查询, 得到 1 个同源性最高的片段, 用 RACE 方法获得其全长序列, 即 *AaERF3*。后续研究表明 ABA 处理、创伤、寒冷能显著提高 *AaERF3* 的转录水平, MeJA、乙烯处理也能轻微的诱导 *AaERF3* 表达, 从而参与植物抗逆。

3.1.2 黄花蒿 *MIXTA1* 基因 (*AaMIXTA1*) MYB 家族转录因子中 MIXTA 或 MIXTA 样转录因子能控制多种植物的细胞形态、腺毛发育和起始等, 如拟南芥 *AtMYB16* 和 *AtMYB106* 调控腺毛分枝及表皮细胞形态^[41]。Shi 等^[42]以拟南芥已知 MYB 家族转录因子序列在黄花蒿各组织的转录组数据库中查询, 获得的序列与拟南芥及其他物种已知的 MIXTA 或 MIXTA 样转录因子共同构建系统进化树, 筛选获得与拟南芥 *AtMYB16*、*AtMYB106* 同源性最高的序列, 即 *AaMIXTA1*。后续研究表明 *AaMIXTA1* 可以调控分泌性腺毛的数量和角质层的生物合成, 过表达 *AaMIXTA1* 可以在不影响分泌性腺毛结构的情况下提高青蒿素的积累。

3.1.3 黄花蒿 *bHLH112* 基因 (*AabHLH112*) 青蒿素的生物合成量在低温处理后显著升高^[43-44], 而拟南芥中 2 个低温相关的转录因子 *AtICE1* 和 *AtICE2* 均属于 bHLH 家族^[45-46]。Xiang 等^[47]以 bHLH 保守结构域在青蒿基因组数据库中查询, 得到基因组中 205 个结果、转录组中 122 个, 按 bHLH 家族转录

因子特征进行分类, 其中属于与青蒿素合成相关的 V 家族转录因子 15 个, 与拟南芥 bHLH 转录因子共同构建系统进化树, 2 条序列与拟南芥 *AtICE1*、*AtICE2* 同源性最高, 其中仅 *AabHLH112* 受低温诱导。后续研究表明, *AabHLH112* 能调控 *AaERF1* 的表达, 从而提高青蒿素合成途径基因的转录水平, 过表达 *AabHLH112* 的株系中青蒿素及二氢青蒿酸含量均显著上升。

3.2 其他

3.2.1 黄花蒿 *ORA* 基因 (*AaORA*) 长春花 *ORAC3* 的过表达可以增加萜类化合物的积累^[48]。Lu 等^[49]以长春花 *ORCA3* 序列作为查询序列在黄花蒿叶片 cDNA 文库中比对, 获得一条片段序列, 用 RACE 方法获得全长序列, 即 *AaORA*。后续研究表明 *AaORA* 在分泌型腺毛中特异性表达, 对 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*、*AaERF1* 有正调控作用, 过表达 *AaORA* 青蒿素及二氢青蒿酸含量分别上升 40%~53% 和 22%~35%, 同时能提高黄花蒿对灰霉病菌的抗性。

3.2.2 黄花蒿 *YABBY5* 基因 (*AaYABBY5*) 薄荷 *MsYABBY5* 与萜类合成相关^[50]。Kayani 等^[51]以 YABBY 家族转录因子保守结构域在黄花蒿基因组数据库中查询, 将获得的序列与 *MsYABBY5* 构建系统进化树, 同源性最高的序列即 *AaYABBY5*。后续研究表明 *AaYABBY5* 能受 MeJA 的诱导, 直接结合 *CYP71AV1*、*DBR2* 的启动子, 提高青蒿素合成途径基因当的转录水平, 过表达 *AaYABBY5* 可以使青蒿素及二氢青蒿酸的含量升高。

4 转录组、基因组数据分析

4.1 黄花蒿 *TAR1* 基因 (*AaTAR1*)

Graham 等^[52]对黄花蒿的遗传图谱进行分析的文章中, 预测了 7 个可能与腺毛发育相关的基因, Tan 等^[53]通过分析黄花蒿转录组数据及同源比对, 筛选出其中的 1 个 AP2/ERF 家族转录因子, 命名为 *AaTAR1*。后续研究表明 *AaTAR1* 可以控制蜡质、角质物质的合成, 能直接影响分泌型腺毛的形态发育, 并通过结合青蒿素合成路径上的 *ADS*、*CYP71AV1* 基因启动子, 来控制青蒿素的合成。过表达 *AaTAR1* 能提高青蒿素合成途径基因的转录水平, 并提高黄花蒿叶片和花蕾中青蒿素、青蒿酸及二氢青蒿酸的含量。

4.2 黄花蒿 *SPL2* 基因 (*AaSPL2*)

在模式植物拟南芥中, 有研究表明 SPL 转录因

子参与调控植物的次生代谢^[54-55]。Lv 等^[56]以 SPL 家族转录因子保守结构域在黄花蒿转录组数据库中查询, 得到 14 个结果, 其中含有 MicroRNA156 识别位点的 9 条; 用 JA 处理黄花蒿, 检测 9 条 SPL 转录因子基因的表达水平发现 *AaSPL2* 和 *AaSPL13* 响应了 JA 信号, 其中 *AaSPL2* 的表达模式与青蒿素合成途径基因的表达模式更为接近, 因此选择 *AaSPL2* 作为目的基因。后续研究表明, *AaSPL2* 基因可激活 *DBR2* 的转录, 从而介导 JA 对青蒿素合成的调控, 过表达 *AaSPL2* 能提高青蒿素合成途径基因的转录水平, 使青蒿素和二氢青蒿酸的含量提高 33%~86% 和 26%~159%。

4.3 黄花蒿 *GSW1* 基因 (*AaGSW1*)

多条 WRKY 家族转录因子已被证实参与调控青蒿素的生物合成, 但它们均非腺毛特异表达转录因子, Chen 等^[57]以 WRKY 保守结构域序列在青蒿各组织转录组数据库中比对, 共获得 122 条序列, 其中 42 条能在腺毛中表达, 通过与腺毛特异表达基因, 如 *ADS*、*CYP71AV1* 等, 在各组织中的表达模式进行比较, 获得表达模式最为接近的 1 条, 命名为 *AaGSW1*。后续研究表明 *AaGSW1* 是腺毛特异表达转录因子, 受 JA 信号途径中的 *AaMYC2* 和 ABA 信号途径的 *AaZip1* 调控, 过表达 *AaGSW1* 能提高 *CYP71AV1* 及 *AaORA* 的转录水平, 使青蒿素含量提高 39%~43%。

4.4 黄花蒿 *NAC1* 基因 (*AaNAC1*)

NAC 家族转录因子在提高植物对灰霉病菌抗性, 及调控萜类物质合成方面发挥作用^[58-59]。Lv 等^[60]分析分泌性腺毛转录组数据库, 选出 RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) 值最高的 10 条 NAC 家族转录因子基因序列, 其中 *AaNAC1* 能受 SA 和 MeJA 的诱导, 作为目的基因进行研究。后续研究发现 *AaNAC1* 能受脱水、低温、SA、MeJA 的诱导, 过表达 *AaNAC1* 能使青蒿素和二氢青蒿酸的含量升高, 提高黄花蒿对干旱、灰霉病菌的抗性。

5 展望

青蒿素是中医药对世界的重大贡献, 随着新适应症的开发, 青蒿素的需求量会进一步增大, 解析青蒿素的合成路径及调控网络, 并利用分子育种的手段获得高青蒿素含量的黄花蒿意义重大。青蒿素的产量与分泌性腺毛的发育情况密切相关, 同时黄花蒿也被认为是研究分泌性腺毛发育的潜在模式

植物, 而转录因子无论在青蒿素的生物合成途径中, 还是在腺毛的发育过程中均具有关键的调控作用, 因此转录因子是研究的重要靶标。目前对黄花蒿转录因子的研究虽然已经涉及到 AP2/ERF、WRKY、MYB、bZip、bHLH 等多个家族, 但植物转录因子数量庞大, 调控网络复杂, 当前对黄花蒿转录因子调控作用的认识仍相对有限。随着研究技术手段的发展, 特别是转录组、基因组等组学技术及单细胞测序等最新技术开始应用在黄花蒿的研究中, 将更有利于发掘重要的功能基因, 完善对青蒿素生物合成、分泌性腺毛发育等重要科学问题的认识。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] World Health Organization. *World Malaria Report 2019* [M]. Geneva: WHO, 2019.
- [2] Schmid G, Hofheinz W. Total synthesis of qinghaosu [J]. *J Am Chem Soc*, 1983, 105: 624-625.
- [3] 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(7086): 940-943.
- [4] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [5] Mutabingwa T K. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): Best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! [J]. *Acta Trop*, 2005, 95(3): 305-315.
- [6] Schramek N, Wang H, Römisch-Margl W, et al. Artemisinin biosynthesis in growing plants of *Artemisia annua*. A ¹³CO₂ study [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(2/3): 179-187.
- [7] Ma D M, Li G, Alejos-Gonzalez F, et al. Overexpression of a type-I isopentenyl pyrophosphate isomerase of *Artemisia annua* in the cytosol leads to high artemisinin B production and artemisinin increase [J]. *Plant J*, 2017, 91(3): 466-479.
- [8] Wallaart T E, Bouwmeester H J, Hille J, et al. *Amorpha*-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.
- [9] Wang H Z, Han J L, 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.
- [10] 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: Mosk*, 2011, 45(5): 817-824.
- [11] 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.
- [12] Zhang Y S, Teoh K H, Reed D W, *et al.* The molecular cloning of artemisinic aldehyde Delta11(13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(31): 21501-21508.
- [13] Teoh K, Polichuk D, Reed D, *et al.* Molecular cloning of an aldehyde dehydrogenase implicated in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Botany*, 2009, 87: 635-642.
- [14] Lommen W J, Elzinga S, Verstappen F W, *et al.* Artemisinin and sesquiterpene precursors in dead and green leaves of *Artemisia annua* L. crops [J]. *Planta Med*, 2007, 73(10): 1133-1139.
- [15] 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.
- [16] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of dihydroartemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(5): 1139-1159.
- [17] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of artemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(38): 9548-9566.
- [18] Verpoorte R, Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(2): 181-187.
- [19] Jing F Y, Zhang L, Li M Y, *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.
- [20] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, *et al.* bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(3): 106-111.
- [21] 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* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 163-175.
- [22] Dombrecht B, Xue G P, Sprague S J, *et al.* MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(7): 2225-2245.
- [23] Zhang H B, Bokowiec M T, Rushton P J, *et al.* Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(1): 73-84.
- [24] Shen Q, Lu X, Yan T X, *et al.* The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, 210(4): 1269-1281.
- [25] Maes L, van Nieuwerburgh F C, Zhang Y S, *et al.* Dissection of the phytohormonal regulation of trichome formation and biosynthesis of the antimalarial compound artemisinin in *Artemisia annua* plants [J]. *New Phytol*, 2011, 189(1): 176-189.
- [26] Qi T C, Song S S, Ren Q C, *et al.* The Jasmonate-ZIM-domain proteins interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB complexes to regulate Jasmonate-mediated anthocyanin accumulation and trichome initiation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(5): 1795-1814.
- [27] Yan T X, Chen M H, Shen Q, *et al.* HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2017, 213(3): 1145-1155.
- [28] Brown R L, Kazan K, McGrath K C, *et al.* A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 1020-1032.
- [29] 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.
- [30] Lu X, Jiang W M, Zhang L, *et al.* AaERF1 positively regulates the resistance to *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57657.
- [31] Raskin I, Skubatz H, Tang W, *et al.* Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants [J]. *Ann Bot*, 1990, 66(4): 369-373.
- [32] Fan W H, Dong X N. *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1377-1389.
- [33] Rochon A, Boyle P, Wignes T, *et al.* The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3670-3685.
- [34] Lv Z, Guo Z, Zhang L, *et al.* Interaction of bZIP transcription factor TGA6 with salicylic acid signaling modulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(15): 3969-3979.
- [35] Han J L, Wang H Z, Lundgren A, *et al.* Effects of overexpression of AaWRKY1 on artemisinin biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* plants [J]. *Phytochemistry*, 2014, 102: 89-96.
- [36] Matías-Hernández L, Jiang W M, Yang K, *et al.* AaMYB1 and its orthologue AtMYB61 affect terpene metabolism and trichome development in *Artemisia annua* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2017, 90(3): 520-534.

- [37] Ji Y P, Xiao J W, Shen Y L, *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.
- [38] Yan T, Li L, Xie L, *et al.* A novel HD-ZIP IV/MIXTA complex promotes glandular trichome initiation and cuticle development in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2018, 218(2): 567-578.
- [39] Pré M, Atallah M, Champion A, *et al.* The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(3): 1347-1357.
- [40] Lu X, Jiang W, Zhang L, *et al.* Characterization of a novel ERF transcription factor in *Artemisia annua* and its induction kinetics after hormones and stress treatments [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(10): 9521-9527.
- [41] Oshima Y, Shikata M, Koyama T, *et al.* MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(5): 1609-1624.
- [42] Shi P, Fu X Q, Shen Q, *et al.* The roles of AaMIXTA1 in regulating the initiation of glandular trichomes and cuticle biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2018, 217(1): 261-276.
- [43] Liu W, Wang H, Chen Y, *et al.* Cold stress improves the production of artemisinin depending on the increase in endogenous jasmonate [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2017, 64(3): 305-314.
- [44] 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.
- [45] Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, *et al.* ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [46] Fursova O V, Pogorelko G V, Tarasov V A. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 2009, 429(1/2): 98-103.
- [47] Xiang L E, Jian D Q, Zhang F Y, *et al.* The cold-induced transcription factor bHLH112 promotes artemisinin biosynthesis indirectly via ERF₁ in *Artemisia annua* [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(18): 4835-4848.
- [48] van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, 289(5477): 295-297.
- [49] Lu X, Zhang L, Zhang F Y, *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.
- [50] Wang Q, Reddy V A, Panicker D, *et al.* Metabolic engineering of terpene biosynthesis in plants using a trichome-specific transcription factor MsYABBY₅ from spearmint (*Mentha spicata*) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(7): 1619-1632.
- [51] Kayani S I, Shen Q, Ma Y N, *et al.* The YABBY family transcription factor AaYABBY₅ directly targets cytochrome P450 monooxygenase (CYP71AV1) and double-bond reductase 2 (DBR2) involved in artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1084.
- [52] 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.
- [53] Tan H X, Xiao L, Gao S H, *et al.* TRICHOME AND ARTEMISININ REGULATOR 1 is required for trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(9): 1396-1411.
- [54] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, *et al.* Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1512-1522.
- [55] Yu Z X, Wang L J, Zhao B, *et al.* Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in *Arabidopsis* and Patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(1): 98-110.
- [56] Lv Z, Wang Y, Liu Y, *et al.* The SPB-box transcription factor AaSPL2 positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 409.
- [57] Chen M H, Yan T X, Shen Q, *et al.* GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY 1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2017, 214(1): 304-316.
- [58] Bu Q, Jiang H, Li C B, *et al.* Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses [J]. *Cell Res*, 2008, 18(7): 756-767.
- [59] Nieuwenhuizen N J, Chen X, Wang M Y, *et al.* Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: Transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and ETHYLENE-INSENSITIVE3-like transcription factors [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(4): 1243-1258.
- [60] Lv Z, Wang S, Zhang F Y, *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.

[责任编辑 时圣明]