

转录因子调控青蒿素生物合成的作用机制研究进展

詹忠根

浙江经贸职业技术学院生物制药教研室, 浙江 杭州 310018

摘要: 青蒿素是从药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* 中分离的一种倍半萜内酯, 广泛应用于疟疾治疗, 野生资源含量较低。为缓解持续增加的需求, 尝试提高青蒿素含量或产量的研究成为热点课题。转录因子具有调节代谢途径中一个或多个基因表达的作用, 据报道, 已有多个转录因子家族参与调节青蒿素的生物合成和积累, 干预转录因子表达是提高青蒿素含量或产量的重要手段。从转录因子调控黄花蒿腺毛形成与发育和转录因子调控青蒿素生物合成 2 个方面综述青蒿素的生物合成机制, 以期为青蒿素代谢的转录调控研究提供参考。

关键词: 青蒿素; 转录因子; 生物合成; 腺毛发育; 激素信号; 光信号; 逆境胁迫

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)19-6258-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.031

Research progress on transcriptional regulation mechanism of artemisinin biosynthesis

ZHAN Zhong-gen

Biopharmaceutical Laboratory, Zhejiang Institute of Economics and Trade, Hangzhou 310018, China

Abstract: Artemisinin is an unusual novel endoperoxide sesquiterpene lactone isolated from medicinal plant *Artemisia annua*, has been widely used to treat falciparum malaria. Due to increasing international demand and low content in wild *A. annua* plants, trying to enhance the content or yield of artemisinin become a hotspot. Transcription factors play important roles in regulating a series of genes in the metabolic pathway, and several families of transcription factors have been reported to participate in regulating the biosynthesis and accumulation of artemisinin, and the intervention of transcription factor by genetic engineering is an important method in enhancing the content or yield of artemisinin. Therefore, biosynthesis mechanism of artemisinin from regulating the initiation and development of glandular trichomes and regulating the biosynthesis of artemisinin by transcription factors were reviewed in this paper, in order to provide reference for the transcriptional regulation of artemisinin metabolism.

Key words: artemisinin; transcription factor; biosynthesis; trichomes initiation; hormone signal; light signal; adversity stress

青蒿素是从药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中分离的一种含有“过氧桥”结构(1,2,4-三噁烷环)的倍半萜内酯(图1), 广泛应用于疟疾治疗。全球

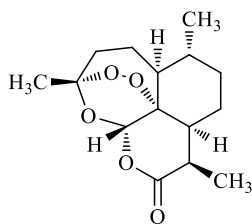


图1 青蒿素的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of artemisinin

每年新增疟疾病例连续多年超过 2 亿, 加之青蒿素及其衍生物还具有抗病毒、抗肿瘤、抗炎、抗氧化及治疗糖尿病、肺结核等潜力, 致使其国际需求持续增加^[1-2]。但青蒿素仅分布于黄花蒿叶片、芽和花表面的分泌性腺毛(glandular secretory trichomes, GSTs), 野生资源含量较低(占植物干质量的 0.1%~1.0%)且不稳定^[3]。为缓解日益突出的供需矛盾, 近年来尝试了多种方法试图提高青蒿素的含量或产量, 如成功培育青蒿素含量超过 2% (干质量) 的高产品种^[4], 利用酵母工程菌半合成青蒿素初步达到可商业化的工艺水平^[5], 抑制竞争代谢途径关键酶(鲨烯合成

收稿日期: 2022-06-09

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LGN18C200026); 浙江省省属高校基本科研业务费项目(21SBYB08)

作者简介: 詹忠根(1971—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: zhgz9321@163.com

酶)基因获得青蒿素质量分数为 31.4 mg/g 的高产转基因植株^[6], 过表达青蒿素生物合成关键酶基因或转录因子基因使青蒿素含量成倍增加^[7-8], 以及利用异源宿主^[9]或黄花蒿自交系非 GSTs 细胞合成青蒿素^[10]等研究为提高青蒿素产量做出了有益探索。

尽管上述研究未能从根本上解决青蒿素供应不足或有效降低青蒿素生产成本的难题, 却为人们深入了解青蒿素生物合成及其调控机制提供了很好的帮助。目前, 青蒿素生物合成途径已基本明确^[11], 黄花蒿基因组测序也已完成^[12], 但要进一步提高青蒿素生物合成能力仍缺乏良好的遗传转化体系, 通过串联表达等技术靶向生产青蒿素将同时面临鉴定大量结构基因和转化效率低等困难。青蒿素生物合成基因的时空表达受不同转录因子的严格调控, 随着青蒿素生物合成过程的基本阐明, 科学工作者更加注重青蒿素生物合成相关的转录因子研究并取得长足进展。因此, 本文从转录因子调控黄花蒿腺毛形成与发育和转录因子调控青蒿素生物合成 2 个方面综述其调控青蒿素生物合成的作用机制, 以期为青蒿素代谢的转录调控研究提供参考。

1 黄花蒿转录因子研究概况

由于基因扩张, 黄花蒿中的转录因子数量众多, 基因组中发现 2717 个, 尤其是香豆酸-3-羟化酶 (p-coumarate 3-hydroxylase, C3H)、远红色受损应答 1 (far-red impaired response 1, FAR1) 和根瘤起始类蛋白 (nodule inception-like protein, NLP) 3 个转录因子家族数量远超其他物种^[12], 转录组中检测到 55 个家族的 1588 个转录因子, 其中乙烯响应因子 (ethylene responsive factor, ERF) 家族成员最多, 达 123 个, 且碱性螺旋-环-螺旋转录因子 (basic helix-loop-helix transcription factors, bHLH)、C2H2 锌指结

构转录因子 (Cys2/His2-type zinc finger protein, C2H2)、NAC 转录因子 (NAM-ATAF1/2-CUC2, NAC)、C3H、WRKYGQK 结构域锌指型转录因子 (WRKYGQK domain zincfinger motif, WRKY)、MYB 转录因子、碱性亮氨酸拉链转录因子 (basic leucine zipper, bZIP) 和 GRAS 转录因子家族成员也超 60 个^[13]。由于转录因子能有效调节植物次生代谢的生物合成, 为厘清青蒿素生物合成转录调控网络, 近年来基于基因组数据^[12]、转录组测序^[13]、文库筛选^[14]相继发现 AP2/ERF、bHLH、MYB、NAC、WRKY 和 bZIP 等多个转录因子家族成员参与青蒿素的生物合成调控。如 Shen 等^[12]应用热力图从黄花蒿全基因组数据中鉴定了 15 个调控青蒿素生物合成的转录因子, Hao 等^[13]发现 ERF、MYB、bHLH、HD-ZIP、赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶 (lysine specific demethylase, LSD) 和 E2F/DP 家族成员介导光照下茉莉酸 (jasmonate, JA) 处理的青蒿素生物合成, Pan 等^[15]用基因芯片检测到 WRKY 家族成员 AaWRKY11、AaWRKY14 参与 UV-B 辐照处理后的青蒿素生物合成, 在光与赤霉素 (gibberellins, GA) 协同提升青蒿素生物合成的研究中发现 NAC、bHLH、MYB、AP2-EREBP、WRKY 等 179 个转录因子基因与紫穗槐二烯合成酶 (amorpha-4,11-diene synthase, ADS) 基因共表达, MYB、NAC、bHLH、AP2-EREBP 等 161 个转录因子基因与细胞色素 P450 依赖性羟化酶基因 (cytochrome P450 monooxygenase, CYP71AV1) 共表达^[16]。此外, 还对 AaMYB1^[17]等近 40 个转录因子的调控功能进行了较为详尽的研究 (表 1), 为揭示转录因子调控青蒿素生物合成机制及利用基因工程技术提高青蒿素含量打下了坚实的研究基础。

表 1 青蒿素生物合成相关转录因子

Table 1 Transcription factors of artemisinin biosynthesis

类型	转录因子名称	功能	文献
MYB	AaMYB1	可激活腺毛形成必需基因 <i>GL1</i> 、 <i>GL2</i> 表达及 GA4 合成与降解, 共同促进 GSTs 形成, 促进 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>ADS</i> 基因表达	17
	AaMYB2	AaMYB2 过表达植株中, <i>AaHD1</i> 、 <i>AaMYB1</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 基因表达量下降, 腺毛密度降低	18
	AaMYB4	响应 UVB 辐照, 正调控 <i>ADS</i> 、 <i>DBR2</i> 基因表达	19
	AaMYB5/AaMYB16	AaMYB5 响应 JA 刺激, 抑制腺毛形成, 形成 AaHD1-AaMYB5 复合体调控 AaGSW2 转录因子; AaMYB16 促进腺毛形成, 形成 AaHD1-AaMYB16 复合体调控 AaGSW2 转录因子	20
	AaMYB15	响应暗处理和 JA 刺激, 负调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 和 <i>AaORA</i> 基因表达	21
	AaMYB17	正调控 GSTs 形成	22
	AaMIXTA1	通过促进角质层、蜡质形成, 进而正调控腺毛发育	23

续表 1

类型	转录因子名称	功能	文献
MYB	AaTLR1/AaTLR2	在 AaWOX1 介导下与 LFY 转录因子 TLR2 结合, 通过抑制 GA 合成, 下调腺毛形成 正调控转录因子 <i>AaMYB1</i> 、 <i>AaMIXTA1</i> 和 <i>AaHDI</i> 基因表达等负调控 GSTs 形成; 并 下调 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达, 进一步抑制青蒿素生物合成	24
	AaTAR2	调控腺毛发育; 抑制 <i>AaTAR2</i> 基因表达, GSTs 和 TNGs2 种腺毛形态发生剧烈变化, 腺 毛细胞皱缩, 缺乏支持	25
HD-ZIP IV	AaHD1	响应 JA 刺激, 调控 AaGSW2、AaTAR2 活性, 正调控腺毛形成	26
	AaHD8	响应 JA 刺激, 正调控腺毛形成; 与 AaMIXTA1 形成复合体, 增强对角质层形成及 AaHD1 的调控效果; 调控 AaGSW2、AaTAR2 活性, 促进 GSTs 形成	27
WRKY	AaWRKY1	响应 MeJA 刺激, 调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 和 <i>DBR2</i> 等基因表达	28
	AaWRKY9	响应光和 JA 刺激, 被 AaHY5 激活, 正调控 <i>DBR2</i> 、 <i>AaGSW1</i> 基因表达	29
	AaWRKY17	响应 JA、MeJA 刺激, 直接与 <i>ADS</i> 启动子 W-box 基序结合, 正调控基因表达; 提高植 株对丁香假单胞菌抗性	30
	AaWRKY40	响应 MeJA 刺激, 类似于 AaWRKY1, 提高青蒿素含量	31
	AaGSW1	直接上调 <i>CYP71AV1</i> 基因表达或通过 AaORA 间接上调 <i>ADS</i> 、 <i>DBR2</i> 基因表达	32
AP2/ERF	AaGSW2	与 AaHD1、AaHD8 相互作用, 正调控腺毛形成	33
	AaTAR1	调控腺毛形态, 正调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 基因表达	34
	AaERF1/AaERF2	响应 JA 刺激, 与 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 启动子 CBF2、RAA 基序结合, 正调控基因表达	35
	AaORA	响应 JA 刺激, 正调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>AaERF1</i> 基因和 <i>PDF1.2</i> 、 <i>ChiB</i> 防御基 因表达	36
bZIP	AabZIP1	响应 ABA 刺激, 与 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 启动子 ABRE 基序结合, 正调控基因表达	37
	AabZIP9	正调控 <i>ADS</i> 基因表达	38
	AaABF3	响应 ABA 刺激, 正调控 <i>ALDH1</i> 基因表达	39
	AaTGA3/AaTGA6	AaTGA3 与 AaTGA6 形成异二聚体, 负调控 AaTGA6 与 AaERF1 相互结合; AaTGA6 与 AaERF1 结合进而促进 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 基因表达	40
	AaHY5	响应光刺激, 通过 AaGSW1、AaORA 间接正调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基 因表达	41
bHLH	AaPIF3	通过调控 AaERF1 活性, 间接正调控 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达	42
	AabHLH1	响应 ABA、MeJA、真菌和壳聚糖刺激, 直接与 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 启动子 E-box 结合, 正调控基因表达	43
	AabHLH112	激活 AaERF1, 间接上调青蒿素生物合成基因表达	44
	AaMYC2	响应 JA 刺激, 与 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 启动子 G-box-like 基序结合, 正调控基因表达	45
	AaMYC2-like	响应 MeJA、ABA、2,4-二氯苯氧乙酸刺激, <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达	46
TCP	AaTCP14	形成 AaTCP14-AaORA 复合体, 协同增强 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达	47
	AaTCP15	形成 AaTCP15-AaORA 复合体, 协同增强 <i>DBR2</i> 或直接激活 <i>DBR2</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达	48
SPL	AaSPL2	正调控 <i>DBR2</i> 基因表达	49
YABBY	AaYABBY5	与启动子结合, 直接促进 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 基因表达或以间接方式提高 <i>ADS</i> 、 <i>ALDH1</i> 基因表达	50
EIN3/EIL	AaEIN3	通过促进叶片衰老基因 <i>AaNAC2</i> 、 <i>AaSAG12</i> 表达, 加速黄花蒿叶片衰老, 进而减弱 <i>ADS</i> 、 <i>CYP71AV1</i> 、 <i>DBR2</i> 和 <i>AaAOR</i> 基因表达, 降低青蒿素积累	51
NAC	AaNAC1	响应 JA、MeJA 和干旱、冷刺激, 正调控 <i>ADS</i> 基因表达	52

HDI-同源结构域蛋白 1 GSW2-GST-特异性 WRKY 转录因子 TLR1/TLR2-腺毛负调节因子 1/2 TAR2-腺毛和青蒿素调节因子 2 HY5-下胚
轴伸长转录因子 TGA-TGACG 基序结合因子 PIFs-光敏色素互作因子 MYC2-骨髓细胞组织增生因子 2 EIN3/EIL-乙烯不敏感因子 3/乙烯
不敏感样因子 3 MeJA-茉莉酸甲酯 ABA-脱落酸 SA-水杨酸

HDI-homeodomain protein 1 GSW2-GST-specific WRKY transcription factor TLR1/TLR2-trichomeless regulator 1/2 TAR2-trichome and
artemisinin regulator 2 HY5-elongated hypocotyl 5 TGA-TGACG motif-binding factor PIFs-phytochrome interacting factors MYC2-
myelocytomatosis 2 EIN3/EIL-ethylene-insensitive 3/EIN3-like MeJA-methyl jasmonate ABA-abscisic acid SA-salicylic acid

2 转录因子调控黄花蒿腺毛形成与发育

黄花蒿叶片、芽和花表面存在 2 种多细胞头状腺毛，即 GSTs 和 T 型非分泌性腺毛 (T-shaped non-glandular trichomes, TNGs)。GSTs 由 10 个细胞 (2 个基细胞、2 个颈细胞、4 个近顶细胞和 2 个顶细胞) 及 1 个储存青蒿素的皮下空间组成，是青蒿素生物合成的主要场所，ADS、CYP71AV1、青蒿素醛 $\Delta^{11(13)}$ 还原酶 2 (double bond reductase 2, DBR2) 和醛脱氢酶 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) 等青蒿素生物合成关键酶及大量转录因子基因在 GSTs 的顶细胞和近顶细胞中表达^[14,53]。因此，GSTs 数量越多 (或密度越高)，生物合成能力越强，意味着青蒿素含量越高。然而，GSTs 仅占植株干质量的 2%且易于脱落，以及在 GSTs 中合成的其他萜类与青蒿素合成存在代谢竞争等因素极大阻碍了青蒿素产量的提升，通过转录因子促进 GSTs 形成、改善 GSTs 生长发育状态是提升药材整体品质的有效策略^[10,54]。

研究表明，R2R3-MYB 和 HD-ZIP IV 类转录因子在 GSTs 的形成与发育中扮演重要角色 (图 2)。AaMYB1 是第 1 个从黄花蒿腺毛特异性 EST 文库中分离的腺毛形成相关转录因子，位于 R2R3-MYB 亚家族 S13 亚组，编码 330 aa，在黄花蒿叶片成熟时表达上调并持续到花蕾形成。过表达 AaMYB1 可激活腺毛形成必需基因 *GL1*、*GL2* 表达及 GA4 合成与降

解，共同促进 GSTs 形成^[17]。AaMYB2 能与拟南芥腺毛调控复合体蛋白 GL3 直接作用，过表达 AaMYB2 的植株中 *AaHD1*、*AaMYB1*、*CYP71AV1* 基因表达量下降，腺毛密度降低。主要在 GSTs 基细胞中表达的 R2R3-MYB S9 亚组转录因子 AaMIXTA1 促进黄花蒿 GSTs 和 TNGs 密度增加可能与其正调控角质层、蜡质形成有关。过表达 AaMIXTA1、RNA 干扰和双荧光素酶报告基因检测均显示 AaMIXTA1 正调控角质层形成基因 *AaCYP77A1*、*AaCYP86A1* 和蜡质形成基因 *AaKCS5*、*AaCER1*、*AaABCG12* 表达^[23]。而与 AaMIXTA1 同源的转录因子 AaMYB17，主要在芽尖等分生组织的 GSTs 特异表达，其正调控 GSTs 形成的作用机制与 AaMIXTA1 有所差异，并非通过调控角质层生物合成基因表达发挥作用^[22]。研究发现，另一 R2R3-MYB 转录因子 AaTLR1 在 AaWOX1 介导下与 LFY 转录因子 AaTLR2 结合，通过抑制 GA 合成，下调腺毛形成正调控转录因子 *AaMYB1*、*AaMIXTA1* 和 *AaHD1* 基因表达等负调控 GSTs 形成，并下调 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*、*ALDH1* 基因表达进一步抑制青蒿素生物合成^[24]。

除 R2R3-MYB 外，2 种 HD-ZIP IV 转录因子 AaHD1、AaHD8 调控腺毛形成的机制研究较为详尽，两者既可单独发挥作用，也可通过相互作用增强活性或共同调控其他转录因子活性，促进腺毛形

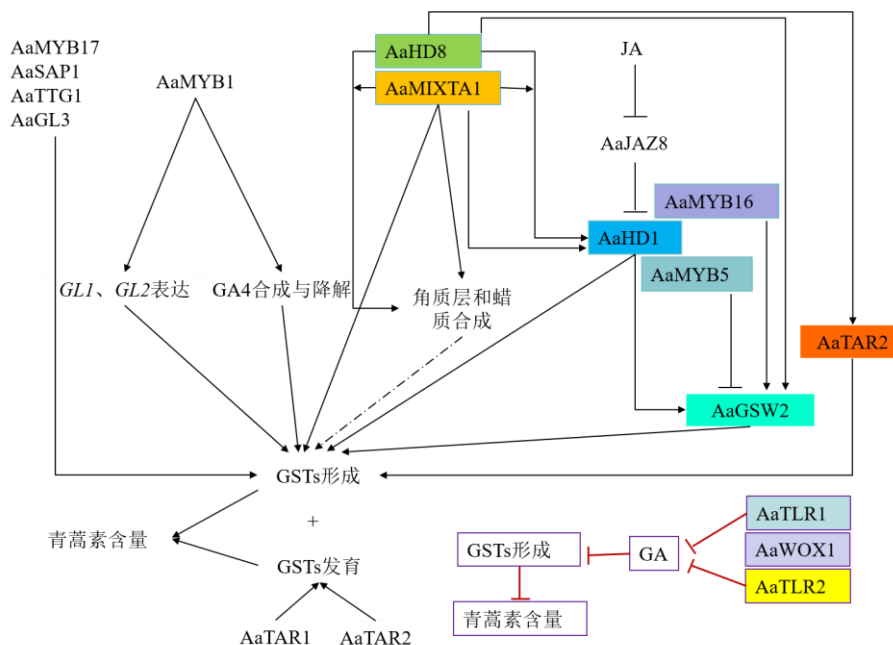


图 2 转录因子通过调控 GSTs 形成与发育对青蒿素产量的影响

Fig. 2 Effects on artemisinin yield of transcript factors via regulating GSTs initiation and development

成。在外源 JA 刺激下, AaHD1 与抑制蛋白 AaJAZ8 分离, 释放出的 AaHD1 促进 GSTs 和 TNGs 形成, 敲除 *AaHD1* 基因, JA 促进腺毛形成的作用下降^[26], 而 AaHD8 可通过激活角质层生物合成关键酶基因表达间接促进腺毛形成^[25]。同时, 位于上游的 AaHD8 可与 AaHD1 启动子 L1-box(TAAATGC/TA) 结合, 增强 AaHD1 的调控活性或与 AaMIXTA1 形成复合体, 协同增强对角质层形成及 AaHD1 的调控效果^[27], 此外, AaHD1、AaHD8 还可分别调控 AaGSW2、AaTAR2 转录因子的活性, 促进 GSTs 形成^[25,33]。而 2 个调控作用相反且相互竞争的转录因子 AaMYB5、AaMYB16 则很大程度依赖与 AaHD1 的 START-SAD 结构域结合, 才能发挥对 AaGSW2 转录因子的调控作用^[20]。由于 HD-ZIP 转录因子通常以二聚体形式发挥调控作用, 深入研究 AaHD1/AaHD8 的相互作用机制有助于揭示调控腺毛形成的特异性调节因子。

与前述转录因子调控功能不同, AP2/ERF 转录因子 AaTAR1 和 S15 亚组的 MYB 转录因子 AaTAR2 调控的是腺毛发育过程而不是腺毛形成。在 TAR1-RNAi 植株中, GSTs 顶部细胞膨胀、GSTs 细胞数量减少、表皮蜡质异常沉积和角质层渗透性发生改变^[34]。抑制 *AaTAR2* 基因表达, GSTs 和 TNGs 2 种腺毛形态发生剧烈变化, 腺毛细胞皱缩, 缺乏支持, 但过表达 *AaTAR2* 基因对腺毛形态和密度无明显影响^[25]。此外, 也有报道锌指蛋白 AaSAP1 和 WRKY 转录因子 AaTTG1、AaGL3 能响应 JA 诱导, 正调控腺毛的发育, 提高腺毛密度, 但具体机制还有待进一步解析^[55-56]。

通常认为, TNGs 与 GSTs 的主要区别是其不具有分泌和贮存各种次生代谢物的能力, 但随着 TNGs 青蒿素合成能力的证明^[10], 以及多种转录因子(如 AaHD1、AaHD8、AaMIXTA1、AaTAR2 等)同时调控 GSTs 和 TNGs 的形成, 表明 2 种腺毛的形成至少在早期阶段可能具有相同或相似的分子机制, 为进一步开发非 GSTs 资源合成青蒿素的研究提供了有力的理论依据。

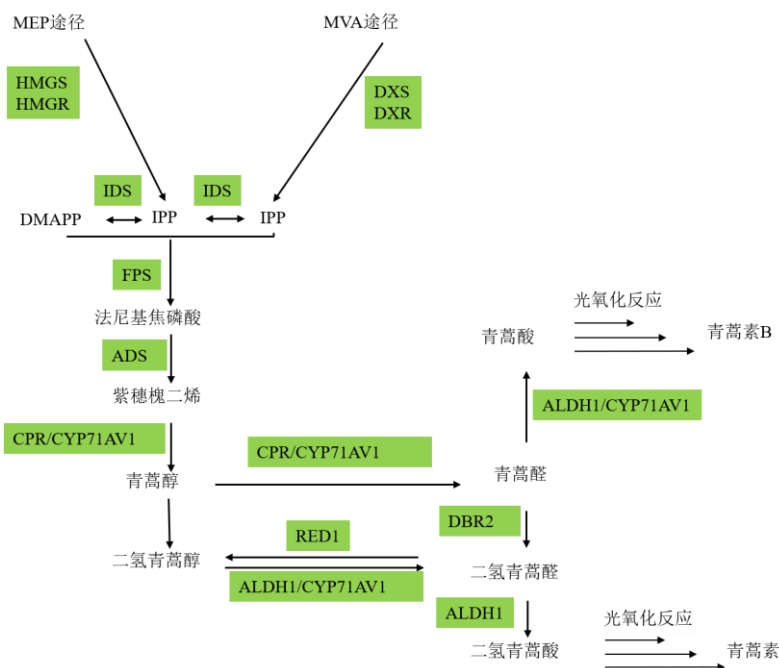
3 转录因子调控青蒿素生物合成

3.1 调控青蒿素生物合成关键酶基因表达

以法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)合成为分界点, 青蒿素生物合成可分为上游步骤和下游步骤 2 个阶段(图 3)。青蒿素生物合成上游步骤已比较清楚, 有较为公认的限速酶和酶促反应。

其中, 甲羟戊酸(mevalonate acid, MVA)途径是 FPP 合成的主要贡献者, 阻断 MVA 途径青蒿素含量降低 80.4%, 而阻断 2-甲基赤藓醇磷酸(methylerythritol phosphate, MEP)途径青蒿素含量仅降低 14.2%^[57]。进一步研究表明, MEP 途径关键酶基因 *DXR* 仅在含有叶绿体的 GSTs 近顶细胞中表达^[58]。FPP 合成时, 由 MEP 途径提供 1 分子异戊烯基焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)先与 MVA 途径生成的 1 分子二甲烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP)合成牻牛儿基二磷酸(geranyl diphosphate, GPP), 然后转运至顶细胞与胞质中 MVA 途径提供的 1 分子 IPP 形成通用前体 FPP^[59]。在下游步骤, FPP 先被 ADS 催化生成紫穗槐二烯(amorpha-4,11-diene, AD), 再经 CYP71AV1 催化依次生成青蒿醇、青蒿醛和青蒿酸^[60-62]。值得注意的是, 青蒿醛既可在 DBR2、ALDH1 催化下形成二氢青蒿醛、二氢青蒿酸, 并最终生成青蒿素^[63-64], 也可被 ALDH1、CYP71AV1 催化生成青蒿酸而最终形成青蒿素 B^[62,65]。可见, DBR2 酶的活性对于青蒿醛是否被 DBR2 有效催化形成二氢青蒿醛至关重要, 是能否得到高含量青蒿素的关键。另外, 青蒿醇也可形成其他中间产物参与青蒿素合成, 如青蒿醇可被催化形成二氢青蒿醇^[63], 再被 CYP71AV1 和 ALDH1 催化形成二氢青蒿醛[二氢青蒿醛也可被二氢青蒿醛还原酶 1(dihydroartemisinic aldehyde reductase 1, RED1)还原成二氢青蒿醇], 参与青蒿素合成^[66-67]。但下游步骤仍存在一些争议之处: 如有研究认为青蒿酸可经青蒿素 B 和青蒿烯进而形成青蒿素^[68], 而前体饲喂研究表明二氢青蒿酸才是青蒿素的直接前体, 青蒿酸并不能转化为二氢青蒿酸和青蒿素, 其主要代谢产物是青蒿素 B^[60,65]。再如, 尽管有研究证明二氢青蒿酸转化成青蒿素及青蒿酸转化成青蒿素 B 的过程是一种自发的光氧化反应, 而非酶促反应^[69], 但也有研究认为, 青蒿素含有过氧桥键, 可能存在一种过氧化物酶或其他一系列氧化酶催化二氢青蒿酸转化成青蒿素^[70]。现已证明, 过氧化物酶在黄花蒿无细胞系统中间接参与向青蒿素的生物转化^[71], 并发现 3 种与青蒿素含量相关的过氧化物酶^[72-74], 如果能分离出相应的酶, 将极大促进青蒿素的合成生物学研究。

图 3 显示多种限速酶控制着青蒿素的合成进程, 这些酶的基因表达水平受转录因子严格调控, 迄今已报道 AP2/ERF、bHLH、MYB、NAC、WRKY、



G3P-甘油醛-3-磷酸酯 HMGS-3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 合酶 HMGR-3-羟基-3-甲基-戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 DXS-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 DXR-1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶 IDS-异戊烯基焦磷酸异构酶 FPS-法尼基焦磷酸合酶 DBR2-双键还原酶 2 CPR-细胞色素 P450 还原酶

G3P-glyceraldehyde 3-phosphate HMGS-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A synthase HMGR-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase; DXS-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase DXR-1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase IDS-isopentenyl diphosphate isomerase FPS-farnesyl diphosphate synthase DBR2-double bond reductase 2 CPR-cytochrome P450 oxidoreductase

图 3 青蒿素的生物合成途径

Fig. 3 Biosynthesis pathway of artemisinin

bZIP、HD-ZIP IV、TCP、SPL、YABBY 等家族的众多转录因子具有调控青蒿素生物合成关键酶基因 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*、*ALDH1* 表达的作用。由于这些基因的启动子区域含有多种转录因子结合位点，如 AP2/ERF 结合位点 RAA 基序、WRKY 结合位点 W-Box、bZIP 结合位点 ABRE 基序、MYB 结合位点 E-Box、bHLH 结合位点 G-box^[75]，因此，在已有研究中，大部分转录因子能与相应位点特异性结合，激活基因表达，直接正调控青蒿素生物合成。如最近发现 AaWRKY17 和 AabZIP9 能与 *ADS* 启动子 W-box 基序、“ACGT” 顺式作用元件结合，上调基因表达，*AabZIP9* 过表达植株中青蒿素、双氢青蒿素和青蒿酸含量分别提高 23.2%~67.1%、34.5%~92.8%、40.4%~121.2%^[30,38]。AaSPL2 能与 *DBR2* 启动子的 GTAC-bow 基序结合，调控基因转录，*AaSPL2* 过表达植株中青蒿素含量提高 33%~86%^[49]。AaYABBY5 能直接与 *CYP71AV1*、*DBR2* 启动子结合，或以其他方式间接上调 *ADS*、*ALDH1* 基因表达，*AaYABBY5* 过表达植株中双氢青蒿素和青

蒿素含量显著提高^[50]。同时也有部分转录因子通过与其他转录因子相互作用而间接正调控青蒿素生物合成，如 AaMYB2 和 bHLH 类转录因子 AaPIF3 对 *CYP71AV1*、*ADS*、*DBR2*、*ALDH1* 基因表达均有促进作用，过表达 AaPIF3，青蒿素含量提高 55.97%~65.21%^[12,42]，但 AaPIF3 只能通过 AaERF1 起间接调控作用^[76]；乙烯信号关键因子 AaEIN3 通过促进叶片衰老基因 *AaNAC2*、*AaSAG12* 表达，加速黄花蒿叶片衰老，进而减弱 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2* 和 *AaAOR* 基因表达，降低青蒿素积累^[51]。还有一些转录因子（如 AaMYB15）作为负调控因子参与青蒿素生物合成^[21]。此外，AaWRKY40、AaPWA73483、AaPWA66309 等多个转录因子的调控机制也在继续研究之中^[31]。

3.2 调控青蒿素生物合成相关的激素信号传导

外源 JA/MeJA、SA、ABA 和 GA 等多种激素促进青蒿素生物合成离不开转录因子的参与，如 ABA 可激活 AabZIP1 转录因子上调 *ADS* 和 *CYP71AV1* 表达^[37]。JA 能激活多种转录因子，促进

GSTs 发育及激活青蒿素生物合成基因转录^[13,77]。目前, 转录因子参与激素信号传导调控青蒿素生物合成的研究已获得较大进展, 部分重要调控机制逐步得到揭示。

3.2.1 调控 JAs 信号传导 JAs 是研究最多也是促进青蒿素生物合成最有效的植物激素, 能上调青蒿素合成酶基因 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2* 和转录因子表达、促进 GSTs 形成与发育, 提高青蒿素及其衍生物含量^[47,77]。JA 信号介导的转录调控核心模型是 SCF^{CO11}-JAZs-MYC2 复合体, 在 JA 作用下, 转录抑制因子 JAZ 蛋白降解, 释放出 MYC2 等转录因子激活下游 JAs 应答基因表达。研究表明, 转录因子参与 JA 调控青蒿素生物合成的作用包括 2 个方面, 一是激活 JA 生物合成关键基因, 如 AaTCP14 上调丙二烯氧化环化酶基因 (allene oxide cyclase, *AaAOC*) 和 12-羧-植物二烯酸还原酶 3 基因 (12-oxo-phytodienoic acid reductase 3, *AaOPR3*) 表达, 促进内源性 JA 生物合成, 进而提高青蒿素产量^[47]。二是激活 JAs 应答因子, 促进 JA 信号传导, 上调青蒿素生物合成基因表达。早期发现, 在 MeJA 作用下, AP2/ERF 转录因子 (AaTAR1、AaERF1、AaERF2)、AaWRKY1、AabHLH1 表达增加, 分别与 *ADS*、*CYP71AV1* 启动子 GCC-box/RAA/CBF2、W-box、E-box 结合, 上调基因表达^[28,34-35,43]。随着 AaORA^[36]、AaGSW1^[32]、AaMYC2^[45]、AaTCP14^[47]、AaTCP15^[48]等转录因子功能的相继确定, JA 促进青蒿素生物合成的转录调控网络逐渐被揭示。bHLH 转录因子 AaMYC2 受 AaJAZs 负调控, 既是响应 JA 信号通路的核心调节因子, 也是 GA 信号抑制子 AaDELLAs 调控节点^[78], 过表达 AaMYC2 或 AaMYC2-like, 可激活 *CYP71AV1*、*DBR2* 启动子 G-box 基序, 提高基因表达水平, 显著提高青蒿素生物合成能力^[45-46]。黄花蒿转录因子除单独调控青蒿素生物合成基因表达外, 还与其他转录因子形成复合体, 以级联方式提高转录调控效率。如 GST 特异性 WRKY 转录因子 AaGSW1 除直接上调 *CYP71AV1* 表达外, AaMYC2、AabZIP1 (响应 ABA 信号) 可分别与 AaGSW1 启动子 G-box、ABRE 基序结合, 并通过 AaORA 间接上调 *ADS*、*DBR2* 表达, 从而在 JA 信号传导上游形成 AaMYC2-AaGSW1-AaORA 转录级联调控模式^[32]。AaORA 是另一个在 GST 特异性表达的 AP2/ERF 转录因子, 上调 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2* 及转录因子 *AaERF1*

基因表达^[36]。基于 AaORA 与长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中调控萜类吲哚生物碱生物合成的关键转录因子 CrORCA^s^[79]、烟草 *Nicotiana rustica* L. 中调控尼古丁生物合成的 NIC2-基因座关键转录因子 ERFs 高度同源^[80]及 JA 信号下游转录因子 CrORCA2/CrORCA3 受 CrMYC2 调控^[81]等研究结果, 推测 AaORA 是 JA 信号传导的重要调控因子, 在青蒿素生物合成调控中起关键作用 (或核心作用)。在 JA 信号传导下游, AaORA 转录因子对青蒿素生物合成基因的调控既部分依赖于 AaTCP14 (AaTCP14 与 AaORA 的 C 端结合, 形成 AaTCP14-AaORA 转录激活复合体, 协同增强 *DBR2*、*ALDH1* 转录活性, 该复合体的形成受 AaJAZ8 负调控, 且 AaJAZ8 减弱 AaTCP14-AaORA 对 *DBR2* 的激活作用), 又能独立行使调控作用 (AaTCP14 只能调控 *DBR2*、*ALDH1* 转录活性, AaORA 还能调控 *ADS* 转录活性)^[47]。与 AaTCP14 相似, 其同源转录因子 AaTCP15 也能与 AaORA 的 C 端、N 端结合, 形成 AaTCP15-AaORA 复合体协同调控 *DBR2* 活性 (与 AaTCP14-AaORA 不同的是 AaTCP15-AaORA 不能激活 *ALDH1* 基因转录) 或直接激活 *DBR2*、*ALDH1* 转录, 推动代谢流从青蒿醛向二氢青蒿醛方向转化, 提高青蒿素含量^[48]。AaMYC2-AaGSW1-AaORA/AaTCP14 (AaTCP15) 转录级联调控模式的阐明为 JAs 调控青蒿素生物合成的动态调控机制研究提供了更好的研究平台 (图 4)。

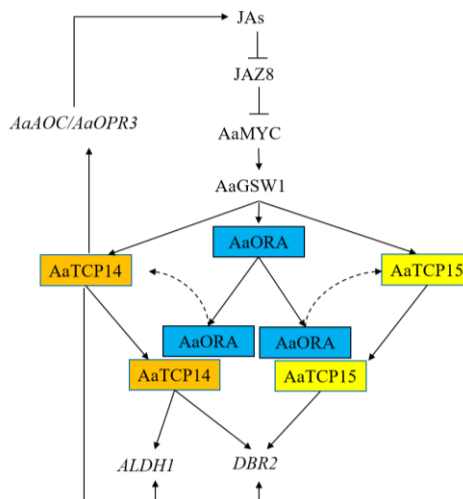


图 4 JA 信号调控青蒿素生物合成的 AaMYC2-AaGSW1-AaORA/AaTCP14 (AaTCP15) 转录级联模式

Fig. 4 AaMYC2-AaGSW1-AaTCP14/AaTCP14 (AaTCP15) regulatory cascade module of artemisinin biosynthesis in response to JA signaling

3.2.2 调控 ABA 信号传导 ABA 除调节干旱、寒冷和渗透胁迫等应激反应外,也是植物次生代谢的关键调节因子。在青蒿素生物合成中,外源 ABA 激活合成酶基因表达,提高青蒿素含量^[82-83]。目前已发现多种转录因子参与 ABA 信号通路调控,其中 bZIP 家族 A 组能与 ABA 响应元件(ABA-responsive elements, ABRE)结合,该组中 ABF1、ABF2、ABF3、ABI5 等是调控 ABA 信号的重要转录因子,被称为 ABI5-ABF-AREB 亚家族。研究发现黄花蒿中有 145 个 bZIP 转录因子,其中 64 个在 GSTs 表达,ABI5-ABF-AREB 亚家族的 AaABF3 能激活 *ALDH1* 启动子 G-box,上调基因表达^[39]。AabZIP1 的 N 末端 C1 结构域含有保守的丝氨酸和苏氨酸残基,是响应 ABA 信号的关键,该结构域变异后 AabZIP1 无法响应 ABA 信号^[37]。当黄花蒿体内 ABA 增加时,ABA 先与 AaPYL9 受体结合启动 ABA 信号传导,随后该复合体与 2C 型蛋白磷酸酶 AaPP2C1 结合(AaPYL9 的 P89S、H116A 被替换以及 AaPP2C1 第 3 磷酸化位点基序的 G199D 被替换或缺失,则两者相互作用即消除),从而释放在静息状态下被 AaPP2C1 抑制的 SnRK2 类激酶 AaAPK1^[84-86]。随着 AaAPK1 的激活,下游 AabZIP1 的 Ser³⁷ 位点被 AaAPK1 磷酸化,继而激活 AaGSW1、AaORA、AaTCP14/AaTCP15 等转录因子活性,以 AabZIP1-AaGSW1-AaTCP14 (AaTCP15)/AaORA 级联方式或直接与 *CYP71AV1*、*ADS* 启动子 ABRE 基序结合,上调青蒿素合成酶基因表达,提高青蒿素及其衍生物含量^[32,47-48,86]。

3.2.3 调控 GAs 信号传导 GAs 是一种二萜类植物激素,参与种子萌发、植物开花、环境胁迫等过程。在植物体内,GAs 与青蒿素共用萜类生物合成上游途径,FPP 是两者生物合成分支点。目前,GAs 中活性最强的 GA3 对青蒿素的调控作用仍存在一定争议,有研究认为外源 GA3 可能通过刺激 SA 合成,触发活性氧生成,从而促进青蒿素生物合成基因表达和/或提高青蒿素合成代谢流以增加青蒿素积累^[87-89],也有研究认为 GA3 并未显著促进青蒿素生物合成或增加 GSTs 数量(密度),仅促进 GSTs 个体增大^[56]。Chen 等^[90]研究也指出,真正有效促进青蒿素生物合成的是 GA4 和 GA1,而不是 GA3。另外,过表达 GA4/GA1 前体 GA20/GA9 生物合成关键酶基因 *GA20ox*,促进转基因植物枝条数量增加,株高增长,GSTs 个体增大、密度提高,青蒿素

含量增长 2 倍^[91],该研究进一步表明 GA4/GA1 可能是青蒿素生物合成的主要活性 GAs。在 GAs 信号通路中,转录因子同样发挥重要作用,当植物感受到 GA (GA4/GA1) 信号时,R2R3-MYB、HD-ZIP IV、C2H2 锌指蛋白和 bHLH 转录因子家族随即参与 GA 信号调节,AaMYB1 促进 *GA3ox1* 和 *GA3ox2* 表达,提高 GA9 向 GA4 的转化效率^[17],尤其是 MYB 转录因子 AaMIXTA1 表达显著上调,并通过 AaHD8 正调控 GSTs 形成^[27,90],或与 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2* 和 *ALDH1* 启动子的 GA 响应元件 GARE 基序结合,上调青蒿素生物合成基因表达^[17]。

3.2.4 调控 SA 信号传导 SA 是一种调节植物生长发育、光合作用、蒸腾作用以及诱导致病基因表达、促进次生代谢产物合成的重要酚类激素。施用外源 SA,可激活 *HMGR*、*ADS* 等青蒿素生物合成前期基因转录表达,刺激细胞产生活性氧,促进二氢青蒿酸转化为青蒿素,而对生物合成后期基因 *CPR*、*CYP71AV1* 的表达影响不大^[92-93]。在 SA 信号通路中,病程相关基因非表达子(non-expressor of pathogenesis-related genes, NPR) 基因家族及 bZIP 类转录因子 TGA 起着关键作用。NPR 包含 ANK 和 BTB/POZ 2 个结构域,通过 ANK 结构域介导,NPR 的 BTB/POZ 结构域与 TGA 转录因子结合,发挥调控作用^[94]。黄花蒿中检测到 6 个 TGA 转录因子和 5 个 NPR 基因,其中 AaNPR1 作为转录共激活因子与 AaTGA6 相互作用,增强 AaTGA6 与 *AaERF1* 启动子 TGACG 基序的结合能力,进而增加下游 *ADS*、*CYP71AV1* 基因表达,而 AaTGA3 则与 AaTGA6 相互作用形成异二聚体,负调控 AaTGA6 与 *AaERF1* 的结合。AaTGA6 是青蒿素生物合成的重要调控因子,在 *AaTGA6* 过表达植株中,*AaTGA6* mRNA 水平增加 11~15 倍,*AaERF1* mRNA 水平增加 2~3 倍,*ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*、*ALDH1* 基因表达水平提高 1~7 倍,青蒿素含量提高 90%~120%^[40]。

上述研究表明,转录因子调控激素信号的传导是一个相当复杂的过程,加之部分转录因子,如 AaGSW1^[32]、AaHLH1^[43,95]、AaTCP15^[48]等同时参与调控 2 种及 2 种以上激素信号应答,相互形成多种交叉调控,大大增加了转录因子调控网络的研究难度。

3.3 调控青蒿素生物合成相关的光信号传导

光是调节青蒿素生物合成的另一重要因子。研究显示,过表达蓝光受体 AtCRY1 促进 *AaADS* 和

AaCYP71A1 转录,过表达光敏色素互作因子 PIF3 上调 *ADS*、*CYP71A1*、*DBR2*、*ALDH1* 基因表达,红光、蓝光显著提高青蒿素及其衍生物含量,冷白光促进黄花蒿毛状根形成及青蒿素生物合成,UVB 辐照激活 *HMGR*、*DXR*、*IPPi*、*FPS*、*ADS*、*CYP71A1* 和 *RED1* 基因表达^[96],而暗处理使 *ADS*、*CYP71A1*、*DBR2*、*ALDH1* 基因的 mRNA 水平下调 10 倍以上^[13]。植物具有极其精细的光接收(如感受红光和远红光的光敏色素、感受蓝光/UVA 的隐花色素和趋光色素、感受 UVB 的紫外光受体 UVR8)和信号系统将光传递到光调控因子(如 bZIP 转录因子 HY5、光形态建成调控因子 COP1)调控相关基因表达。*AaHY5* 有 3 个结构域,分别是与 DNA 结合的 bZIP 结构域、COP1 位点及酪蛋白激酶 II 磷酸化位点。*AaHY5* 和 *AaCOP1* 是作用相反的 2 个因子,在黑暗条件下,细胞核内 *AaCOP1* 聚集,负调控 *AaHY5* 生成;在光照条件下,细胞核内 *AaCOP1* 降低,*AaHY5* 的积累启动光形态建成,并激活 *AaGSW1* 表达,直接或进而激活 *AaORA* 间接正调控青蒿素生物合成(图 5)^[41]。此外 *WRKY11*、*WRKY41*、*ERF9*、*ERF13*、*RAP2-2*、*HSF*、*AaMYB4* 等转录因子基因在响应光信号时表达上调,*WRKY53* 表达下调,这些转录因子可能也参与光信号调控^[15,19]。

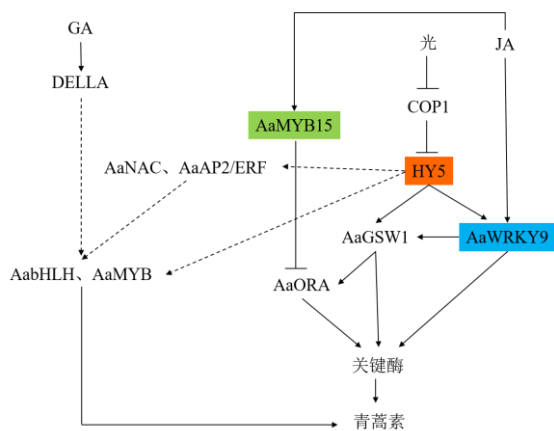


图 5 光与 GA/JA 对青蒿素生物合成的协同调控模式
Fig. 5 A model of light and GA/JA signal nodes coordinately regulated key genes in artemisinin biosynthesis

JA、GA 等激素调控青蒿素生物合成需要光的介导,两者具有协同增效作用,当激素和光组合处理时,青蒿素生物合成关键基因 *ADS*、*CYP71A1*、*DBR2*、*CPR* 的表达水平显著高于光或激素单独处理^[13,16]。研究表明,激素和光对青蒿素生物合成的协同增效作用与转录因子的调控作用密不可分,现

已发现多种转录因子参与介导光与激素的协同增效过程,涉及 bHLH、MYB、NAC、WRKY、ERF、LSD、HD-ZIP 和 E2F/DP 等多个转录因子家族,推测的调控机制如图 5 所示^[13,16]。其中 *AaWRKY9*、*AaMYB15* 2 个转录因子的研究较为深入,*AaWRKY9* 是一个由光或 JA 双重诱导的腺毛特异性转录因子,*AaWRKY9* 的表达受 *AaHY5* 正调控,*AaJAZ9* 负调控。在光下,*AaHY5* 积累增加,*AaHY5* 与 *AaWRKY9* 启动子的 G-box 结合后上调 *AaWRKY9* 表达;缺乏 JA 时,*AaJAZ9* 抑制 *AaWRKY9* 表达。因此,在仅有光或 JA 时,*AaWRKY9* 促进下游基因表达的能力有限,只有在光和 JA 同时存在时,*AaWRKY9* 表达增加且 *AaJAZ9* 被降解,大量的 *AaWRKY9* 与 *DBR2*、*AaGSW1* 启动子 W-box 基序结合,协同提升青蒿素生物合成能力^[29]。而 *AaMYB15* 是一个负调控因子,暗处理和 JA 处理可诱导 *AaMYB15* 表达,光照抑制其表达。*AaMYB15* 能直接下调 *ADS*、*CYP71A1*、*DBR2*、*ALDH1* 等基因表达,或与 *AaORA* 启动子结合并抑制其活性,间接下调青蒿素合成途径关键酶基因表达(图 5)^[21]。

在自然界,光作为一种不可或缺的环境因素与其他环境因素协同(或拮抗)调节植物次生代谢物的生物合成,其含量和产量与光质、光强、光周期密切相关^[96]。尽管已对光质与青蒿素生物合成的调控关系有所了解,并对部分光响应转录因子进行了表征,但光强和光周期的调节机制尚少有涉及,完整的光信号通路仍不清楚,很有必要系统开展光对黄花蒿生长与发育及对青蒿素含量和产量的调控机制研究。

3.4 调控青蒿素生物合成相关的逆境胁迫因子信号传导

除植物激素和光外,一些逆境因子,如盐胁迫、浸水胁迫、低温胁迫、干旱胁迫等也对青蒿素的生物合成产生显著影响,一定程度的盐胁迫、浸水胁迫、低温胁迫能促进青蒿素及其衍生物的积累,而干旱胁迫则减少积累^[97]。逆境胁迫对青蒿素生物合成的调节作用与其促进相关酶基因表达及特定转录因子的参与有关,ABF1、APX、CCC1、CPK6、JAZ1、MYC2 和 JAZ5 是潜在的响应因子^[98]。研究表明,盐胁迫促进 *CYP71A1* 和 *WRKY* 基因表达^[99],24 h 浸水处理后 *DBR2* 和 *CPR* 基因表达上调^[100],低温促进青蒿素生物合成基因(*FPS*、*ADS*、*CYP71A1*、*CPR* 和 *DBR2*)转录水平显著提高、产生高浓度 ROS

促进青蒿素合成前体转化、抑制竞争途径 β -石竹烯合酶基因表达,并通过诱导JA合成及提高JA信号相关转录因子AaERF1、AaERF2、AaORA的调控能力进一步上调青蒿素生物合成基因表达^[101-102]。最近发现,AabHLH112是调控冷胁迫信号的重要转录因子,能通过转录因子AaERF1间接上调青蒿素生物合成基因表达^[44]。而干旱胁迫下,DXS、DXR、HMGR、FDS、CYP71AV1等生物合成基因和AaWRKY转录因子基因表达下调^[103],过表达干旱胁迫相关转录因子AaNAC1,ADS、ALDH1、DBR2基因表达水平上调,青蒿素含量增加^[52]。另据转录组分析也表明,转录因子在盐、浸水、低温、干旱等胁迫应激信号传导中起着不可或缺的作用,有29个转录因子家族参与其中一种或多种胁迫,尤其是NAC和MYB/MYB相关家族的转录因子在上述4种胁迫中均发挥重要作用,是研究转录因子调控逆境胁迫信号传导需要重点关注的家族^[97]。

总体来说,目前对转录因子响应黄花蒿逆境胁迫的作用机制研究还不够深入,而且青蒿素含量与胁迫程度、光照强度、黄花蒿生长状态、收获时间等多种因素有关,即使胁迫类型相同,因胁迫程度等因素差异也往往得出不一致的研究结果,如Lv等^[52]、Marchese等^[104]认为短期缺水有利于青蒿素积累,ADS、CYP71AV1、DBR2、ALDH1基因表达提高3~7倍,而Vashisth等^[97]、Yadav等^[103]认为长期缺水抑制青蒿素的生物合成。

4 结语与展望

青蒿素作为治疗疟疾的特效药,过去5年间需求量增长25%。近年来,化学合成、代谢工程、合成生物学、高产品种选育等研究为提高青蒿素产量提供了多种方案,但仍有不少难题尚未解决^[105]。如化学合成的纯青蒿素产品在药效及耐药性方面不及植物来源的青蒿素^[106-107],半合成方法生产青蒿素的成本较高、效率较低,影响了工业化进程^[108],代谢工程或选育的新品种优良性状还不能稳定遗传^[3,11]。因此,迄今仍未建立一种高效、快速、经济和大量生产青蒿素的有效方法,从植物提取依然是青蒿素生产的主要来源,高含量青蒿素品种的研发仍是解决当前困境的关键。

转录因子作为青蒿素生物合成的高效调控因子,具有调控CYP71AV1、ADS、DBR2、ALDH1等基因表达、腺毛形成与发育和激素等信号传导的作用,在提高青蒿素含量或产量方面拥有巨大的潜力,

然而利用转录因子提高青蒿素含量或产量的研究还未达到可商业化的目标。基于青蒿素生物合成相关转录因子主要在GSTs中表达,并与CYP71AV1、ADS等基因表达模式高度一致,目前已利用激光捕获显微切割(laser capture microdissection, LCM)、RNA-seq及染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术对近40个转录因子进行克隆、表达及基本功能研究。最近,单细胞测序技术应用于构建基因网络以鉴定在植物发育分化过程中起着关键作用的核心转录因子,以及解析转录因子对植物组织成分、细胞特性及分化的影响等方面显示出广阔的发展前景^[109-110],相信随着该技术的应用及相关数据的增多,将大大加快候选转录因子的筛选和功能表征速度,有效提高转录因子的研究精度,增加对青蒿素生物合成转录因子调控网络的认识。同时,先前青蒿素生物合成相关转录因子的研究大多注重靶基因结合位点分析,较少涉及表观遗传学研究,而Pandey等^[111]研究表明UVB介导了DBR2基因启动子中包括WRKY在内的7个转录因子结合位点的去甲基化,甲基化程度的降低显著促进了DBR2基因上调表达和青蒿素合成。因此,注重转录因子/结构基因甲基化/去甲基化等表观遗传研究,可能开启转录因子调控青蒿素生物合成途径研究的新领域。此外,植物基因组中常有一些特定的具有相似表达模式的基因簇参与次生代谢调控,而黄花蒿基因组高度复杂,是典型的大基因组(1.74 Gb)、高杂合度(1.0%~1.5%)、高重复序列(61.57%)、低GC含量(仅31.5%)基因组,其中萜类合酶基因家族显著扩张,是目前已测序植物物种中萜类合酶基因最多的物种之一^[12]。从复杂的基因组中鉴定关键转录因子,特别是基因簇调控转录因子及其功能,将为寻找更有效的青蒿素生物合成相关转录因子提供更多机会。总之,通过多种方法构建青蒿素生物合成调控网络,将丰富青蒿素代谢调控理论,助力青蒿素含量或产量进一步提高。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ekiert H, Świątkowska J, Klin P, et al. Artemisia annua-importance in traditional medicine and current state of knowledge on the chemistry, biological activity and possible applications [J]. *Planta Med*, 2021, 87(8): 584-599.
- [2] Liu C X. Discovery and development of artemisinin and related compounds [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(2): 101-

- 114.
- [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] Cockram J, Hill C, Burns C, *et al.* Screening a diverse collection of *Artemisia annua* germplasm accessions for the antimalarial compound, artemisinin [J]. *PGenetic Resources*, 2012, 10(2): 152-154.
- [5] 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.
- [6] Zhang L, Jing F Y, Li F P, *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 Biochem*, 2009, 52(Pt 3): 199-207.
- [7] Chen Y F, Shen Q, Wang Y Y, *et al.* The stacked over-expression of FPS, CYP71AV1 and CPR genes leads to the increase of artemisinin level in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(3): 287-295.
- [8] Shen Q, Yan T X, Fu X Q, *et al.* Transcriptional regulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Sci Bull*, 2016, 61(1): 18-25.
- [9] Malhotra K, Subramaniyan M, Rawat K, *et al.* Compartmentalized metabolic engineering for artemisinin biosynthesis and effective malaria treatment by oral delivery of plant cells [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(11): 1464-1477.
- [10] Judd R, Bagley M C, Li M Z, *et al.* Artemisinin biosynthesis in non-glandular trichome cells of *Artemisia annua* [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(5): 704-714.
- [11] Xie D Y, Ma D M, Judd R, *et al.* Artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* and metabolic engineering: Questions, challenges, and perspectives [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(6): 1093-1114.
- [12] Shen Q, Zhang L D, Liao Z H, *et al.* The genome of *Artemisia annua* provides insight into the evolution of Asteraceae family and artemisinin biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(6): 776-788.
- [13] Hao X L, Zhong Y J, Fu X Q, *et al.* Transcriptome analysis of genes associated with the artemisinin biosynthesis by jasmonic acid treatment under the light in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 971.
- [14] 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: 9-13.
- [15] Pan W S, Zheng L P, Tian H, *et al.* Transcriptome responses involved in artemisinin production in *Artemisia annua* L. under UV-B radiation [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2014, 140: 292-300.
- [16] Ma T Y, Gao H, Zhang D, *et al.* Transcriptome analyses revealed the ultraviolet B irradiation and phytohormone gibberellins coordinately promoted the accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. [J]. *Chin Med*, 2020, 15: 67.
- [17] 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.
- [18] 苏航. 青蒿 MYB 类转录因子 MYB2 调控腺毛发育的功能研究 [D]. 泉州: 华侨大学, 2018.
- [19] Li Y P, Qin W, Fu X Q, *et al.* Transcriptomic analysis reveals the parallel transcriptional regulation of UV-B-induced artemisinin and flavonoid accumulation in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 163: 189-200.
- [20] Xie L H, Yan T X, Li L, *et al.* An HD-ZIP-MYB complex regulates glandular secretory trichome initiation in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2021, 231(5): 2050-2064.
- [21] Wu Z, Li L, Liu H, *et al.* AaMYB15, an R2R3-MYB TF in *Artemisia annua*, acts as a negative regulator of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Sci*, 2021, 308: 110920.
- [22] Qin W, Xie L H, Li Y P, *et al.* An R2R3-MYB transcription factor positively regulates the glandular secretory trichome initiation in *Artemisia annua* L. [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 657156.
- [23] 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.
- [24] Lv Z Y, Li J X, Qiu S, *et al.* The transcription factors TLR1 and TLR2 negatively regulate trichome density and artemisinin levels in *Artemisia annua* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64(6): 1212-1228.
- [25] Zhou Z, Tan H X, Li Q, *et al.* Trichome and artemisinin regulator 2 positively regulates trichome development and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2020, 228(3): 932-945.
- [26] 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.
- [27] Yan T X, Li L, Xie L H, *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.
- [28] Ma D M, Pu G B, Lei C Y, *et al.* Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [29] Fu X Q, Peng B W, Hassani D, *et al.* AaWRKY9 contributes to light- and jasmonate-mediated to regulate the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2021, 231(5): 1858-1874.
- [30] Chen T T, Li Y P, Xie L H, *et al.* AaWRKY17, a positive regulator of artemisinin biosynthesis, is involved in resistance to *Pseudomonas syringae* in *Artemisia annua* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 217.
- [31] de Paolis A, Caretto S, Quarta A, *et al.* Genome-wide identification of WRKY genes in *Artemisia annua*: Characterization of a putative ortholog of *AtWRKY40* [J]. *Plants*, 2020, 9(12): E1669.
- [32] Chen M H, Yan T X, Shen Q, *et al.* GLANDULAR TRICHOME-SPECIFIC WRKY1 promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2017, 214(1): 304-316.
- [33] Xie L H, Yan T X, Li L, *et al.* The WRKY transcription factor AaGSW2 promotes glandular trichome initiation in *Artemisia annua* [J]. *J Exp Bot*, 2021, 72(5): 1691-1701.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] Zhang F Y, Fu X Q, Lv Z Y, *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.
- [38] Shen Q, Huang H Y, Zhao Y, *et al.* The transcription factor Aabzip9 positively regulates the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1294.
- [39] Zhong Y J, Li L, Hao X L, *et al.* AaABF3, an abscisic acid-responsive transcription factor, positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1777.
- [40] Lv Z Y, Guo Z Y, Zhang L D, *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.
- [41] Hao X L, Zhong Y J, Ni Tzmann H W, *et al.* Light-induced artemisinin biosynthesis is regulated by the bZIP transcription factor AaHY5 in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2019, 60(8): 1747-1760.
- [42] Zhang Q Z, Wu N Y, Jian D Q, *et al.* Overexpression of AaPIF3 promotes artemisinin production in *Artemisia annua* [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 138: 111476.
- [43] Li L, Hao X L, Liu H, *et al.* Jasmonic acid-responsive AabHLH1 positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2019, 66(3): 369-375.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Majid I, Kumar A, Abbas N. A basic helix loop helix transcription factor, AaMYC2-Like positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 128: 115-125.
- [47] Ma Y N, Xu D B, Li L, *et al.* Jasmonate promotes artemisinin biosynthesis by activating the TCP14-ORA complex in *Artemisia annua* [J]. *Sci Adv*, 2018, 4(11): eaas9357.
- [48] Ma Y N, Xu D B, Yan X, *et al.* Jasmonate- and abscisic acid-activated AaGSW1-AaTCP15/AaORA transcriptional cascade promotes artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(7): 1412-1428.
- [49] Lv Z Y, 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.
- [50] 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.
- [51] Tang Y L, Li L, Yan T X, *et al.* AaEIN3 mediates the downregulation of artemisinin biosynthesis by ethylene signaling through promoting leaf senescence in *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 413.
- [52] Lv Z Y, 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.
- [53] Soetaert S S, van Neste C M, Vandewoestyne M L, *et al.* Differential transcriptome analysis of glandular and filamentous trichomes in *Artemisia annua* [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 220.
- [54] Pulice G, Pelaz S, Matias-Hernández L. Molecular farming in *Artemisia annua*, a promising approach to improve anti-malarial drug production [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 329.
- [55] Wang Y T, Fu X Q, Xie L H, *et al.* Stress associated protein 1 regulates the development of glandular trichomes in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2019, 139(2): 249-259.
- [56] Liu S Q, 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] Ram M, Khan M A, Jha P, *et al.* HMG-CoA reductase limits artemisinin biosynthesis and accumulation in *Artemisia annua* L. plants [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32(5): 859-866.
- [58] 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.
- [59] Schramek N, Wang H 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.
- [60] 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.
- [61] Wang Y Y, Yang K, Jing F Y, *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.
- [62] 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.
- [63] Wu T, Wang Y J, Guo D J. Investigation of glandular trichome proteins in *Artemisia annua* L. using comparative proteomics [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41822.
- [64] 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.
- [65] Brown G D, Sy L K. *In vivo* transformations of artemisinic acid in *Artemisia annua* plants [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63(38): 9548-9566.
- [66] Rydén A M, Ruyter-Spira C, Quax W J, *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.
- [67] Suberu J, Gromski P S, Nordon A, *et al.* 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.
- [68] Alejos-Gonzalez F, Qu G S, Zhou L L, *et al.* Characterization of development and artemisinin biosynthesis in self-pollinated *Artemisia annua* plants [J]. *Planta*, 2011, 234(4): 685-697.
- [69] Czechowski T, Larson T R, Catania T M, *et al.* *Artemisia annua* mutant impaired in artemisinin synthesis demonstrates importance of nonenzymatic conversion in terpenoid metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(52): 15150-15155.
- [70] Bryant L, Flatley B, Patole C, *et al.* Proteomic analysis of *Artemisia annua*: Towards elucidating the biosynthetic pathways of the antimalarial pro-drug artemisinin [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 175.
- [71] Zhang Y S, Liu B Y, Li Z Q, *et al.* Molecular cloning of a classical plant peroxidase from *Artemisia annua* and its effect on the biosynthesis of artemisinin *in vitro* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2004, 46: 1338-1346.
- [72] Nair P, Misra A, Singh A, *et al.* Differentially expressed genes during contrasting growth stages of *Artemisia annua* for artemisinin content [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60375.
- [73] Nair P, Shasany A K, Khan F, *et al.* Differentially expressed peroxidases from *Artemisia annua* and their responses to

- various abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2018, 36(2): 295-309.
- [74] Nair P, Mall M, Sharma P, *et al.* Characterization of a class III peroxidase from *Artemisia annua*: Relevance to artemisinin metabolism and beyond [J]. *Plant Mol Biol*, 2019, 100(4/5): 527-541.
- [75] Hassani D, Fu X Q, Shen Q, *et al.* Parallel transcriptional regulation of artemisinin and flavonoid biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(5): 466-476.
- [76] 扎西次仁, 张巧卓, 杨春贤, 等. AaPIF3 对青蒿素生物合成基因及 AaERF1 的转录调控研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2020, 42(10): 65-73.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] Shoji T, Kajikawa M, Hashimoto T. Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(10): 3390-3409.
- [81] Zhang H T, Hedhili S, Montiel G, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant J*, 2011, 67(1): 61-71.
- [82] Jing F Y, Zhang L, Li M Y, *et al.* Abscisic 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.
- [83] Zebarjadi A, Dianatkah S, Pour Mohammadi P, *et al.* Influence of abiotic elicitors on improvement production of artemisinin in cell culture of *Artemisia annua* L. [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(9): 1-5.
- [84] Zhang F Y, Lu X, Lv Z Y, *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*, 2013, 8(2): e56697.
- [85] Zhang F Y, Fu X Q, Lv Z Y, *et al.* Type 2C phosphatase 1 of *Artemisia annua* L. is a negative regulator of ABA signaling [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 521794.
- [86] Zhang F Y, Xiang L E, Yu Q, *et al.* Artemisinin biosynthesis promoting kinase 1 positively regulates artemisinin biosynthesis through phosphorylating aabzip1 [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(5): 1109-1123.
- [87] 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.
- [88] Banyai W, Mii M, Supaibulwatana K. Enhancement of artemisinin content and biomass in *Artemisia annua* by exogenous GA3 treatment [J]. *Plant Growth Regul*, 2011, 63(1): 45-54.
- [89] 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.
- [90] Chen R B, Bu Y J, Ren J Z, *et al.* Discovery and modulation of diterpenoid metabolism improves glandular trichome formation, artemisinin production and stress resilience in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2021, 230(6): 2387-2403.
- [91] Inthima P, Nakano M, Otani M, *et al.* Overexpression of the gibberellin 20-oxidase gene from *Torenia fournieri* resulted in modified trichome formation and terpenoid metabolites of *Artemisia annua* L [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult Pctoc* 2017, 129(2): 223-236.
- [92] 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.
- [93] Yin H, Kjaer A, Fretté X C, *et al.* Chitosan oligosaccharide and salicylic acid up-regulate gene expression differently in relation to the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L [J]. *Process Biochem*, 2012, 47(11): 1559-1562.
- [94] Wang W, Withers J, Li H, *et al.* Structural basis of salicylic acid perception by *Arabidopsis* NPR proteins [J]. *Nature*, 2020, 586(7828): 311-316.
- [95] Ji Y P, Xiao J W, Shen Y L, *et al.* Cloning and characterization of AabHLH1, abHLH transcription factor that positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(9): 1592-1604.
- [96] Zhang S C, Zhang L, Zou H Y, *et al.* Effects of light on secondary metabolite biosynthesis in medicinal plants [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 781236.
- [97] Vashisth D, Kumar R, Rastogi S, *et al.* Transcriptome changes induced by abiotic stresses in *Artemisia annua* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3423.
- [98] Alam P, Balawi T A. *In silico* identification of cis-regulatory elements and their functional annotations from assembled ESTs of *Artemisia annua* L. involved in abiotic stress signaling [J]. *Rom Biotechnol Lett*, 2021, 26(2):

- 2384-2395.
- [99] Yadav R K, Sangwan R S, Srivastava A K, *et al.* Prolonged exposure to salt stress affects specialized metabolites-artemisinin and essential oil accumulation in *Artemisia annua* L.: Metabolic acclimation in preferential favour of enhanced terpenoid accumulation accompanying vegetative to reproductive phase transition [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(1): 505-522.
- [100] Yang R Y, Zeng X M, Lu Y Y, *et al.* Senescent leaves of *Artemisia annua* are one of the most active organs for overexpression of artemisinin biosynthesis responsible genes upon burst of singlet oxygen [J]. *Planta Med*, 2010, 76(7): 734-742.
- [101] 杨瑞仪, 卢元媛, 杨雪芹, 等. 低温诱导黄花蒿中青蒿素的生物合成及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 350-354.
- [102] Liu W H, Wang H Y, Chen Y P, *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.
- [103] Yadav R K, Sangwan R S, Sabir F, *et al.* Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, 74: 70-83.
- [104] Marchese J A, Ferreira J F S, Rehder V L G, *et al.* Water deficit effect on the accumulation of biomass and artemisinin in annual wormwood (*Artemisia annua* L., Asteraceae) [J]. *Braz J Plant Physiol*, 2010, 22(1): 1-9.
- [105] Wani K I, Choudhary S, Zehra A, *et al.* Enhancing artemisinin content in and delivery from *Artemisia annua*: A review of alternative, classical, and transgenic approaches [J]. *Planta*, 2021, 254(2): 29.
- [106] Elfawal M A, Towler M J, Reich N G, *et al.* Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(3): 821-826.
- [107] Desrosiers M R, Mittelman A, Weathers P J. Dried leaf *Artemisia annua* improves bioavailability of artemisinin via cytochrome P450 inhibition and enhances artemisinin efficacy downstream [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 254.
- [108] Turconi J, Grioret F, Guevel R, *et al.* Semisynthetic artemisinin, the chemical path to industrial production [J]. *Org Process Res Dev*, 2014, 18(3): 417-422.
- [109] Liu Z X, Zhou Y P, Guo J G, *et al.* Global dynamic molecular profiling of stomatal lineage cell development by single-cell RNA sequencing [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1178-1193.
- [110] Shahan R, Hsu C W, Nolan T M, *et al.* A single-cell *Arabidopsis* root atlas reveals developmental trajectories in wild-type and cell identity mutants [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(4): 543-560.
- [111] Pandey N, Pandey-Rai S. Deciphering UV-B-induced variation in DNA methylation pattern and its influence on regulation of DBR2 expression in *Artemisia annua* L. [J]. *Planta*, 2015, 242(4): 869-879.

[责任编辑 崔艳丽]