

中药青蒿的生理生化特征及其研究进展*

耿 颀^{1,2} 叶和春^{1**} 李国凤¹ 麻 密¹

(¹中国科学院植物研究所 北京 100093)

(²河南师范大学生命科学学院 河南新乡 453002)

关键词 青蒿; 次生代谢; 青蒿素; 组织培养; 遗传性状; 基因工程 (图2 参86)

CLC Q946.8 : Q949.783.5

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ARTEMISIA ANNUA L. AND ITS RESEARCH PROGRESS*

GENG Sa^{1,2}, YE Hechun^{1**}, LI Guofeng¹ & MA Mi¹

(¹Research Center of Plant Molecular and Developmental Biology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

(²College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453002, China)

Abstract This article presents a brief review concerning the different aspects of studies on *Artemisia annua* L. Many research papers have been published regarding artificial planting, and physiological and chemical characteristics of *A. annua* in recent years. The progresses in investigations to enhance artemisinin production from *A. annua* cell, tissue culture, whole plants, and gene manipulation are discussed in this paper. Fig 2, Ref 86

Keywords *Artemisia annua* L.; secondary metabolism; artemisinin; tissue culture; genetic property; gene engineering

CLC Q946.8 : Q949.783.5

中药青蒿即黄花蒿(*Artemisia annua* L.),与分类学上的青蒿(*Artemisia apiacea*)同属菊科(Asteraceae or Compositae)蒿属(*Artemisia*),两者均为一年生草本植物且形态上非常相似,最明显的区别是黄花蒿的叶片为三回羽状全裂,而青蒿为二回羽状全裂.青蒿广泛分布于全国各地,多生于海拔400 m以下的丘陵平地^[1].现在这种植物广泛分布于世界各地^[2].青蒿在许多地区被用于编制花环,提取香料,更重要的是从青蒿中分离出的青蒿素是所有抗疟药中起效最快、疗效最好、毒性最低的药物,特别是对脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾疗效更为突出.青蒿素是我国科学工作者在深入研究抗疟中草药的基础上从中药青蒿中分离出的抗疟有效单体,是一种有过氧桥结构的新型倍半萜内酯,为无色针状晶体,熔点156~157℃,分子式为C₁₅H₂₂O₅,是与已知抗疟药完全不同的新型化合物^[3].青蒿素的发现,在国际上引起极大的轰动,被世界卫生组织称为“是世界上唯一有效的疟疾治疗药物^[4].”随后,国内外科学家在青蒿素化学结构基础上,开发了一系列衍生物,包括蒿甲醚、青蒿琥酯、蒿乙醚、双氢青蒿素等,它们已经成为世界上抗疟药市场上必不可少的治疗药物

青蒿素治疗疟疾效果好,使众多的疟疾患者有希望尽快痊愈,国内外市场上供不应求.自从确定了其化学结构以来,人们便试图用化学合成的方法来生产青蒿素.20世纪70年代末,中国科学院上海有机化学研究所及国外许多科研机构都着手研究青蒿素及其衍生物的化学合成,有许多详细的公开研究报道^[5-7].经过几年的努力,我国首先完成了青蒿素的全合成,但由于青蒿素的全合成过程包括十步以上的化学反应,且最终都要经过一步光反应步骤,具有合成过程复杂、成本高、毒性大、产率低等缺点^[5],使得用化学合成方法生产青蒿素商品未能正式投入工业化生产.另外,虽然药用青蒿素多直接从青蒿植物体主要是叶和花蕾等部位中提取,但环节较多,费时也费力,且青蒿素的含量相当低^[8,9];即使如此,田间栽培仍然是目前获得青蒿素的最可靠途径,同时许多国家正在试图通过生物技术的手段来解决青蒿素的生产问题.

1 青蒿的栽培和生理生化特征

1.1 青蒿的人工栽培

1.1.1 栽培 由于青蒿素化学合成没有太大经济价值,目前田间栽培的青蒿依然是商业化青蒿素的唯一可靠来源.过去,青蒿素的主要来源是中国的野生青蒿,即使这样,我们国家还是收获了足够的原材料用于东南亚新型抗疟药的临床研究.由于对青蒿素的兴趣和应用越来越广,许多研究着眼于把药用青蒿驯化为一种可以栽培的作物^[10,11].尝试把青蒿作为

. 收稿日期: 2000-11-27 接受日期: 2000-12-13

* 国家“九五”科技攻关项目(No:96-C02-03-02)资助 Supported by the National “Ninth Five-year Plan” S&T Key Project of China (No. 96-C02-03-02)

** 通讯作者 Corresponding author (Email:hchye@bj.col.com.cn)

栽培作物并取得良好结果的国家有澳大利亚^[10]、比利时^[12]、印度^[13]、瑞士^[14]、美国^[15]和越南^[16]。因为青蒿是一种短日照植物,在热带不等生长到足够的生物量就会开花,所以不适于生长在热带。

青蒿的无性繁殖方法很简单,但作为繁殖种质的青蒿植株必须生长在长日照条件下,以免开花。目前,在青蒿素原料的商品化过程中,用种子播种是最实用和经济的方法。青蒿种子在低温条件下至少可以保存3年。陈和荣等^[17]就我国不同地区的青蒿种子,不同播种期,不同生态型,植株不同部位的样品做过较为详细的比较。其中有一个地方的青蒿种质中的青蒿素含量最高,达到0.714% (DW),2月14日和3月14日播种,植株的青蒿素含量分别为0.46%和0.681% (DW),比其他时间播种青蒿素的含量高,可得到较高的青蒿素产量;还发现光照对青蒿素含量的影响较大,没有遮阳的植株,青蒿素的含量达到0.947%,同一植株叶片中青蒿素的含量(0.787%)高于花(0.347%)和花序(0.122%)中的青蒿素含量。在北温带的种植研究表明^[18],在晚春或早夏播种可以获得生物量的高产,使青蒿素含量达到最高的关键时期是开花前期,这时的光周期约13.5 h。若种植较晚,整个植株会在很矮时就会开花,这样产量就会降低。也可能试行秋播越冬种植,但关于这方面的资料不多。在印度,寒冷的12月中旬种植获得成功,而在坦桑尼亚,十月份种植的青蒿比十一月份种植的青蒿叶片产量多一倍^[10]。在美国印地安那州,从四月份到七月份,按月连续移栽幼苗,以后每2 wk取样检测生长速度和芳香油的含量,发现在盛花期芳香油含量最高,并且五月和六月份移栽的苗芳香油含量最高^[15]。

施用氮肥可以促进青蒿的生长,但很少有关于施肥对青蒿素积累的报道。Srivastava等^[19]报道微量元素如硼能提高青蒿素的含量,但是使用的土壤是否缺硼,青蒿植株对硼是否利用和怎么利用不得而知。温室实验表明,土壤的pH值从5.5到7.4之间,叶片产量基本没有变化,并且pH值对青蒿素的含量也没有大的影响^[11]。收获前水胁迫2 wk会使叶片青蒿素的含量大大降低^[20]。Shukla等^[21]报道外施生长调节物质不仅能促进青蒿长高,而且能提高青蒿素的含量,但是生长调节物质是否能有效的应用还需进一步的研究。

田间种植的条件下,种植密度从每 m^2 1株到20株,收获原材料的干重从2 t/hm^2 增加到6.8 t/hm^2 ,而种植密度不影响青蒿素和青蒿酸的含量^[10]。在印地安那州,施用0、67、134 kg/hm^2 氮肥的条件下,生物量从每 m^2 种植2.7株到11.1株逐渐增加,在67 kg/hm^2 氮肥的条件下生物量最大^[15]。从瑞士获得的杂种青蒿在堪培拉和巴西种植,间距为0.3 m $\times$ 0.5 m,在九月到十一月间干叶产量达2.15 t/hm^2 ,可提取出6 kg青蒿素和14.6 kg青蒿酸^[12]。

1.1.2 收获 为了降低提取过程中的成本,再加上青蒿素含量相对较低,最好在整块种植面积内青蒿中青蒿素含量最高时收获。因此生物量和最高青蒿素产量必须综合考虑来确

定最佳收获时期。最近,有人利用青蒿酸来生产青蒿素,因为青蒿植株中青蒿酸的含量是青蒿素的8~10倍^[10,22,23]。如果这种技术可行的话,确定最佳的收获时期必须同时考虑这两种化合物的含量。

1.1.3 收获后处理 提取青蒿素以前,大量的植物材料需要干燥。Ferreira等^[24]用HPLC-EC的方法比较了冷冻干燥、烘干(40 $^{\circ}\text{C}$)和室内晾干等3种干燥方法,发现室内晾干这种方法最好,青蒿素含量达到0.13%,而冷冻干燥和烘干(40 $^{\circ}\text{C}$)的材料青蒿素含量分别是0.02%和0.10%。室内晾干的时候,时间2~8 d对青蒿素的含量没有影响。而2 min微波炉处理(使用最大功率)5 g新鲜的叶片样品,发现青蒿素被全部破坏,5 min微波处理(50%功率),发现50%的青蒿素被微波破坏^[24]。然而,同样用HPLC-EC检测发现,用微波(50%功率)处理青蒿素标准品溶液5 min,却没发现青蒿素损失^[18]。

1.2 青蒿的生理生化特征

1.2.1 青蒿生殖生理学 青蒿的头状花呈黄绿色,d 2~3 mm,萼片覆瓦状(图1A-C)。这些头状花松散地排列在由许多两性花组成的圆锥花序中,边缘是雌性小花,其柱头伸向位于中心的花。两性花和雌花的花冠都是筒状合瓣花,前者的花冠顶端成5裂,后者2~3裂。花托光滑,非膜质,三角形。柱头二裂,其表皮细胞变成长尖形,有助于俘获花粉,可作为花粉的接受体(图1F)。菊科植物的花粉受体是活跃的类型,它可以在生长的过程中伸向花药,以便于接受随风传播的花粉^[25]。5个雄蕊都具二室花药,朝向中央的小花并且与花冠的底部相连(图1F)。每个雄蕊的顶部都长有披针形附属物,与花冠的裂瓣相间排列。子房基生,单室,结一枚长1 mm的瘦果。三沟花粉粒相对光滑,是典型的风媒花粉(图1G,H)。花粉粒的外壁具柱状复合体,这个特征在Anthemideae中是常见的特点,但在*A. annua*中有2~3层^[26]。这种花粉和蒿属其它种的花粉一样,具有极强的表面识别能力^[27-29],已有证据表明青蒿花粉外壁的表面含有表面识别蛋白^[30]。从图1C~E可以看出,青蒿整个花的花器官表面都分布着腺毛。

虽然Ferreira等^[31]的实验结果发现青蒿花的头状结构非常适合自花授粉,但是,实验数据显示自花授粉稀少且很难结实^[32],说明青蒿象其它菊科植物一样,存在自交不亲和性^[33]。这一特征使得通过有性繁殖将高产株系的性状保存下来很困难,这也许是青蒿植株个体间青蒿素含量差异较大的原因所在。

Ferreira等^[31]研究表明,青蒿是一种严格的短日照植物。未成年的植株对光周期信号很敏感,光处理2 wk后就会开花。温室条件下,处于营养生长期的青蒿分别用光周期8、10和12 h处理两周后都会开花,而分别用16、20和24 h处理的青蒿则没有开花,当光周期为13.5 h,2 wk之内就会开花。田间实验表明,在北温带的西亚图,观察到青蒿第一次出现花蕾的时间是9月4号,光周期为12 h 57 min。

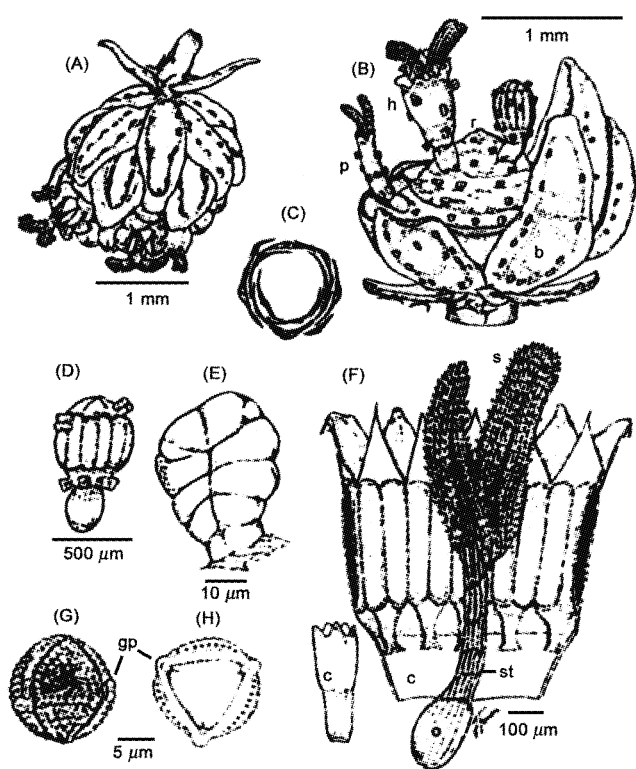


图1 青蒿花的形态结构

Fig 1 Flower morphology of *A. annua*

(A) 头状花; (B) 开放的头状花, 其中的花托(r)带有覆瓦状萼片(b), 边缘的雄花(p)和中间的两性花(h), 在花托、萼片、雌雄花上发现有很多突起的腺毛; (C) 覆瓦状萼片(囊苞横切); (D) 未开放的小花, 表面生有很多腺毛; (E) 扫描电镜下观察的成熟膨胀的腺毛; (F) 两性花的详细解剖图, 浅裂的花药基部(与花冠(c)相连, p 为二裂的雄蕊, st 为花柱, o 为子房, 此解剖图在花药刚开裂的两性花); (G) 带残翅的三浅沟花粉粒, 是典型的风媒植物的特点, 萌发孔(gp)从凹陷的地方突起; (H) 光学显微镜观察花粉粒横切面看到的萌发孔。(From Ferreira 等, 1995)^[71]

(A) Nodding capitulum. (B) Expanded capitulum showing calyx with imbricated bracts (b), receptacle (r), marginal pistillate floret (p), and internal hermaphroditic (h) florets. Glandular trichomes are found abundantly on the receptacle, bracts, and florets of the capitulum. (C) Cross section of the involucre showing imbrication of bracts. (D) Unexpanded floret showing orientation of glandular trichomes. (E) Fully developed, turgid, glandular trichome, based on SEM. (F) Details of hermaphroditic floret, the stigma reaches this state of development only after pollen shed. (G) Tricoplate pollen grain with vestigial spines, characteristic of wind-pollinated species, and germination pores (gp) bulging from the furrows. (H) Pollen crosssection based on light microscopy shows details of bulging germination pores. (Source: Ferreira and Janick, 1995)^[71]

1.2.2 青蒿的生理生化特征 青蒿最显著的生化特征是它含有青蒿素及其衍生物(图2)^[34]。蒿属植物种类繁多, 在其它种中是否含有青蒿素呢? 胡世林等^[35]选择全国各地使用的青蒿药材涉及菊科蒿属 5 种植物进行分析, 它们都有相当长的药用历史和地区习性, 因而是寻找青蒿素的首选植物。一般认为, 具抗疟作用的药物多能清热、抗菌, 而能清热抗菌者未必有抗疟效果。因此, 他们把是否具有抗疟作用作为判断青蒿真伪的重要标志, 且能提供寻找其它抗疟成份的线索。他们的结果表明: 5 种来源的青蒿药材及已筛选的近 20 种蒿属植物,

只有青蒿(*A. annua*)一种植物含有青蒿素。Klayman^[36]分析研究了 *A. ludoviciana*, *A. vulgaris*, *A. schmidtiana*, *A. pontica*, *A. arbuscula* 和 *A. dracunculus* 等几种蒿属植物, 均未检测到青蒿素存在。到目前为止, 至少已有 40 种挥发的油类物质从青蒿中分离出来^[18], 青蒿中还含有许多不挥发性的有使用价值的倍半萜类物质, 其中包括青蒿素、青蒿酸和青蒿素 B(图2)。青蒿植株中含有青蒿素的部位有叶片、幼茎、花蕾、花和种子^[31,36]。

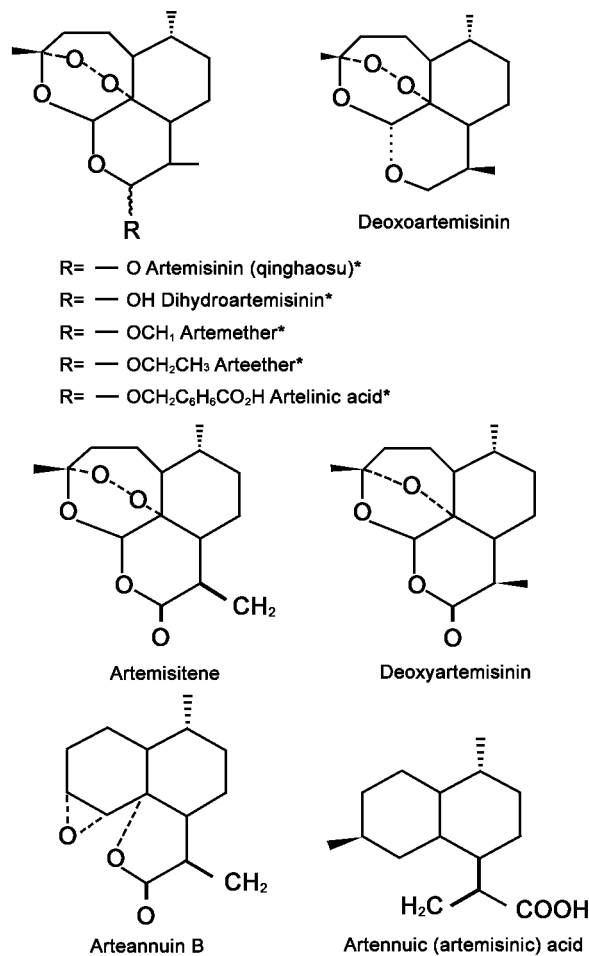


图2 青蒿素及其衍生物

Fig 2 Artemisinin and derivatives

* 表示具有抗疟效果的化合物 Showing antimalarial compounds.

我国科学工作者^[1]研究青蒿发现, 青蒿开花期是青蒿叶中青蒿素含量达到最高的转折点, 而开花期受地形、气温、土质和施肥等的影响很大, 所以在开花前叶盛期采收青蒿为宜, 人工稍加施肥的青蒿, 一般植株高大, 青蒿素含量较野生略高, 嫩叶比老叶的青蒿素含量高。在人工控制的环境中只要青蒿基本生长营养条件得到满足, 生长环境中营养物质含量和生长基质对青蒿素含量没有多大的影响, 而高温(30℃)和强光照却使青蒿素的含量成百倍地增长^[37]。Ferreira 等^[31]则在严格地研究了叶片和花序中的青蒿素含量后, 发现花序中青蒿素含量最高, 接近盛花期花蕾中的青蒿素含量。这一研究结果进一步证实了许多温室或田间的实验结果, 即盛花期的青蒿中青蒿素含量最高^[38-40]。还有些结果说明青蒿植株中青蒿

素最高含量出现在开花前期^[11,36,41]。Woerdenbag 等^[42]的研究发现,在青蒿的生长周期中,5 个月生长时间的青蒿的叶产量和青蒿素含量可以达到最高,青蒿素含量可达 0.86% (干重),然后开始下降。Singh 等^[9]也发现不同地区栽培的青蒿,当植株生长至花开一半到完全开放时,青蒿素的含量和产量可达到最高。Elhag 等^[43]筛选高产的青蒿植株时,发现青蒿素含量高的植株具有长的节间、茁壮的茎秆、伸展的枝条和茂密的叶。Liersch 等^[44]把两种植物激素 daminozide 和矮壮素喷在筛选的青蒿品种 811 上,矮壮素喷过的植株中青蒿素含量比对照高 30%。从不同的科学工作者的研究结果中可见,青蒿的收获应该在青蒿营养生长末期到生殖生长期时为宜。青蒿的另一个生化特征是不产地青蒿可能具有独特次生代谢物,如产于中国的青蒿所含主要次生代谢物为蒿酮 (artemisia katon) ^[45],而产于越南的青蒿则没有这种代谢物^[16];最近,Wallart^[46]等研究青蒿素及其前体在一个生长季节的含量变化发现,不同地理区域生长的青蒿素具有不同的化学型。其中一种化学型的青蒿素含量较高,并且双氢青蒿酸含量也较高,但青蒿酸的含量较低,青蒿酸一直被人们普遍认为是青蒿素生物合成过程中双氢青蒿酸合成的前体;在另一种化学型的青蒿中发现青蒿素和双氢青蒿酸含量低,而青蒿酸含量较高。这也许告诉人们,青蒿素生物合成途径中的限速步骤是青蒿酸被还原成双氢青蒿酸。他们还发现,当青蒿素含量较低的青蒿经过一次霜冻以后,青蒿素含量会升高,而双氢青蒿酸含量会降低,这可能是胁迫条件会加速双氢青蒿酸向青蒿素的生物转化,青蒿植株中高含量的双氢青蒿酸可能是青蒿对胁迫条件的适应,在紧急的情况下,这些双氢青蒿酸能够和活性氧反应释放青蒿素作为稳定的保护物质。

1.2.3 青蒿腺毛的结构及其生理生化功能 作为单萜和倍半萜的储存位点,毛状腺体在菊科植物中广泛存在^[47]。Duke 等^[48]用扫描电镜和透射电镜观察了青蒿 (*A. annua*) 叶片表面由 2 列共 10 个细胞组成的腺毛形成过程。在叶发育的早期即叶原基时期,已经有叶细胞向腺细胞分化。发育的早期只有 1 个细胞,即表皮细胞向外扩大突出叶表面。细胞扩大到足够大时,细胞进行垂周分裂形成 2 个细胞,接着 2 个细胞平周分裂,形成 4 个细胞,即 2 个基细胞和 2 个顶细胞。2 个顶细胞再经过一次平周分裂形成共 6 个细胞。顶端细胞再经过一次平周分裂,最后形成共 10 个细胞的腺毛结构,即由 2 个柄细胞 (stalk cells), 2 个基细胞和 6 个即 3 对顶细胞 (分泌细胞) 组成,从 1 个细胞到 4 个细胞时期,细胞液泡化很少,而且,质体仅是一些没有重叠类囊体的原质体。6 细胞时期,所有 6 个细胞均含有具有少许折叠类囊体的叶绿体,但是缺乏淀粉粒,正是这种特征,使腺毛细胞和叶肉细胞组织区分开来。10 个细胞时期,6 个分泌细胞液泡化比较强,6 个分泌细胞壁开始同表皮分离形成两裂片的囊,用以存放细胞内容物。10 个细胞具有不同的细胞特征。分泌细胞具有发达的内质网。2 个顶细胞中的质体为变形虫状而不含有类囊体,接着顶端细胞的 4 个分泌细胞,质体也为变形虫状,但是含有类囊体。2 个基细胞有时含有类囊体。2 个柄细胞的叶绿体含有类囊体和淀粉粒。10 个细胞继续发育和分化,分泌细胞壁与表皮的分离一直向柄细胞延伸,直到 2 个基细胞,形成了以 6 个分泌细胞壁和表皮构成的表皮下腔。此时,2 个基细胞含有叶绿体和较大的液泡。

腺毛继续分化,2 个细胞一般不含有叶绿体,而质体聚合

成较大的原质体。2 个顶细胞象转移细胞一样,细胞壁向内生长,从而扩大了表面积,这样便有利于代谢产物的分泌,这种细胞中叶绿体的基质和类囊体比率比叶肉细胞中基质和类囊体比率高。分泌细胞中靠近与表皮形成表皮下腔的细胞壁处的细胞质,其中富含光滑型内质网。Duke 等^[49]的研究证实,含腺体结构的心形腺体与青蒿素的储存密切相关。因为存在于腺体中的青蒿素和青蒿酸能够被极快地利用有机溶剂进行完全提取而不损伤叶片和花的表皮细胞,而在无腺体的组织中却未发现有青蒿素及其前体存在。对于天然青蒿中不同部位、不同生长阶段以及环境因子对组织中青蒿素含量变化的影响,可由上述研究结果得到初步解释。青蒿素在青蒿植株中的合成是否与含有腺体结构有关,有待免疫化学组织定位等新技术的应用,才能有比较确凿的证据。就目前的研究结果看,腺体结构可能不是唯一的储存或合成青蒿素的位点,因为 Weathers 等^[50]和 Liu 等^[51]在根本就不含心形腺毛结构的发根中检测到了高含量的青蒿素存在,这也许可以为青蒿素在含有腺体结构以外组织中合成提供一些有利的证据。因此,腺体结构存在于青蒿植株表面,可能是经生物合成途径聚集于此的青蒿素等萜类化合物可以作为一种植保素来抵抗病虫害的侵染。

1.2.4 遗传性状的改进 长期以来,改进青蒿遗传性状的工作进展缓慢,原因可能在于青蒿素的代谢复杂,还有许多未知的遗传机制。许多国家的科学家针对青蒿素的含量做了许多关于青蒿遗传性状的研究。Delabays 等^[14]培育了一株产于中国的青蒿高产系 (青蒿素含量 > 1%),在温室中诱导其开花,用产于意大利、南斯拉夫和西班牙的青蒿授粉。发现杂交后代的青蒿素含量分别是 0.64%、0.73% 和 0.95%。青蒿素这种梯度变化说明青蒿素含量是受很多附加的遗传因子控制的。Ferreira 等^[52]在温室和田间两种条件下对青蒿素生产的广义遗传性状进行了分析,发现青蒿素含量高低是由遗传性状决定的,并且在这两种培养条件下,未开花的青蒿在长日照条件下青蒿素含量差异很小。因此,长日照的温室培养条件是筛选青蒿高产系的较理想系统。挑选的优良品系可以在短日照条件下诱导开花,进行育种实验,然后对后代性状分析可能获得青蒿素的高产系。Wallart 等^[53]利用秋水仙素诱导出四倍体青蒿,发现四倍体青蒿植株中青蒿素含量要比二倍体青蒿高 38%,且其叶片比二倍体青蒿大得多,但是四倍体青蒿比野生型青蒿矮小,因此,四倍体青蒿的生物量较小,青蒿素产量比二倍体青蒿低 25%。尽管如此,四倍体青蒿仍然是选育生长快,青蒿素含量高的青蒿株系的很好的材料。

对不同种青蒿研究表明,青蒿素的含量很不稳定,有时含量只有 0.01%^[54]。在美国种植的青蒿中青蒿素的含量在 0.05% ~ 0.21% 之间,个别植株在盛花期能达到 0.42%^[52]。而瑞士的研究者报道原产于中国的青蒿中青蒿素含量可达 1.1%^[14]。印度研究者^[55]针对青蒿这种特有的生化表型上的差异,利用分子标记技术对产于印度的青蒿进行分析,发现不同基因型的青蒿之间存在很高的多态性,他们用 UPGMA 分析系统分析 RAPD 结果和不同基因型青蒿植化特点的资料,发现青蒿植株之间化学物质的巨大差异根本上是源于遗传性状的多态性。这说明用遗传学手段选育青蒿得到青蒿素高产系是可能的。

2 利用组织培养与细胞工程技术生产青蒿素

2.1 青蒿的组织培养

由于利用传统化学合成西药的方式来合成青蒿素具有很多缺点,现在人们正试图利用组织培养技术获得青蒿素,以便使疟疾流行地区的贫困人民能够受益.利用细胞培养技术生产青蒿素有不破坏自然资源,不受自然条件限制的优点,还可能通过各种细胞及基因工程的手段获得高产青蒿素的新品系,且天然青蒿素对人体无毒副作用^[56],具有其它方法无法替代的优越性.

许多研究者已经成功地进行了青蒿愈伤和芽的离体培养繁殖^[8,57-59].首先进行这一尝试的是 80 年代初贺锡纯等^[8]进行的青蒿愈伤组织的诱导分化及青蒿素含量变化的研究,他们成功地进行了愈伤组织的诱导与植株的再生,并且测定了青蒿素的含量,结果表明愈伤组织中未测出青蒿素,再分化的芽及苗中均含青蒿素,且苗中青蒿素含量大,占干重的 0.92%,比天然植物含量(0.52%)有明显的增加.他们对青蒿素在植物体内的合成部位作了初步探讨,他们认为青蒿素主要存在于花、叶部分,其合成只有在组织分化后才能表现出来. Butcher^[60]的研究与此相符,即通常由愈伤组织形成萜类化合物较为困难,只有当愈伤组织再分化形成有组织的结构以后才开始形成这类物质.然而, Woerdenbag 等^[58]通过对 MS 培养基微量元素的调整,使再生芽在含 0.5 mg/L NAA 和 0.2 mg/L BA 液体培养基上旋转培养,发现芽在完全无根的状态下也能合成青蒿素;但丛生芽生根却能促进青蒿素的生物合成^[59],并且研究也发现,通过组织培养获得的青蒿苗对土壤有很强的适应性,然而许多移植的组培植株表现出细胞分裂素特征异常现象,植株失去顶端优势,侧枝生长旺盛,并且这种植株方式获得的青蒿植株在营养生长过程中若不能恢复正常,就不会开花^[61];但我国科学工作者却发现青蒿的异地引种也能引起某些植株发生变态,如把四川西阳种子种于厦门时,某些植株的枝条形成藤状,而山东种子在厦门种植则生理特征变异得更明显,有的植株 5 月底开花,有的 10 月底仍未开花,有的株高 30 cm 左右,有的 10 月底仍处于匍匐状态,所有引种的植株叶片肥厚、节间短、花序大^[17],所以很难区分青蒿植株变态是组织培养引起还是由不同的生态环境引起的.

在培养基中附加不同浓度组合的细胞分裂素和生长素,会很容易获得愈伤组织^[59,62],但通常都是比较致密的愈伤^[57].使用 1 mg/L 的 BA 和 1 mg/L 的 2,4-D 可以获得最大产量的松散愈伤,但即使这样也只有 10% 的外植体能够产生愈伤^[59].很多研究证实,在未分化的愈伤组织和细胞培养物中,只有微量的青蒿素存在^[57,59]或根本不含青蒿素^[8,63].这些研究结果显示,一定程度分化的青蒿组织是青蒿素生物合成的先决条件^[62-64].细胞培养所用的培养液中大多未检测到青蒿素的存在^[59,64],但 Nair 等^[57]报道在愈伤组织的培养液中检测到了低水平的青蒿素含量.

在离体生长的不同青蒿组织中是否存在青蒿素,有许多不同的结果.其中一个研究结果认为具有一定分化程度的组织培养的芽上生根对青蒿素的合成起到很重要的作用,而在不含根的芽中则只有微量的青蒿素存在^[62,64,65].多数实验结果说明根中不含青蒿素^[59,62,64],而 Nair 等^[57]和 Jha 等^[66]报道

根中有微量青蒿素存在.最近几年,青蒿发根培养系统相继建立^[50,67-69]; Weathers 等^[50]报道发根中有相对较高的青蒿素含量(0.4%),但极不稳定^[18],而 Jaziri 等^[69]不能确定发根中有青蒿素的存在.因为青蒿素对植物体有较强的毒性^[70],可能只聚集于青蒿表面的头状腺体内^[49,71].由此推论,发根中有较高青蒿素含量的报道在理论上无法解释,但是,如果在发根中确实有青蒿素的存在,会对搞清楚青蒿素的生物合成途径有深远影响.

许多研究发现,生长物质对芽培养过程中青蒿素的合成有很大的影响.用 100 $\mu\text{g/mL}$ 的霉抗唑(miconazole)处理培养的丛生芽中青蒿素含量提高了 7 倍^[72]. Woerdenbag 等^[58]发现在 MS 培养基中附加 0.2 mg/L BA 和 0.05 mg/L NAA 及 1% 的蔗糖,获得丛生芽中青蒿素含量为 0.16%.添加 10 mg/L GA_3 (54%) 0.5 g/L 水解酪蛋白,10 或 20 mg/L naftine (40%) 都能不同程度地促进青蒿素的合成,而其他生长调节物质,如霉抗唑;诱导子,如纤维素酶;前体如甲瓦龙酸;基因表达调节物质如秋水仙素等对丛生芽中的青蒿素合成有负面影响或不起作用. Whipkey 等^[65]报道 0.1 mg/L 的 BA 和 10 mg/L 的 KT 可以使丛生芽培养的青蒿素产量增加 30%,这种增长是通过增加生物量来实现的,而不是通过提高青蒿素的含量(mg/g)来实现的.而我们通过诱导试管苗开花,利用花蕾和花器官为外植体诱导丛生芽,发现用此法得到的丛生芽青蒿素含量比直接利用叶片诱导的丛生芽青蒿素含量高近 1 倍^[73],说明利用丛生芽培养系统生产青蒿素有很大潜力.

组织培养曾被作为一种种质保存和筛选青蒿素高产系的系统,但发现温室中生长的青蒿比组织培养条件下生长的青蒿中青蒿素的含量高出 40%,推测同一种青蒿在两种培养条件下青蒿素含量的差异可能是衰变的结果,2 年后再检测组织培养条件下生长的青蒿中青蒿素的含量变化,发现青蒿素含量又降低 20%^[40].以上结果显示,在组织培养条件下青蒿中青蒿素的含量不稳定,这可能是无性系变异或是获得性遗传的原因所致,但如前面所述,青蒿中青蒿素含量受环境因子的影响,组培的条件是否适合青蒿素的合成也值得探讨.

2.2 利用生物反应器生产青蒿素

利用反应器生产青蒿素最成功的研究,就是中国科学院的科学工作者利用新型雾化生物反应器培养青蒿发根和不定芽.他们为了充分利用反应器空间,减少营养液损失,降低染菌的机率,对原有的超声雾化反应器进行了改进,利用一种新型的内环流超声雾化生物反应器进行青蒿不定芽培养^[74]和发根培养^[75,76,77]生产青蒿素的初步研究,获得较好结果.不定芽在生物反应器中生长速率明显高于三角瓶培养,分别为固体培养和摇瓶培养的 2.4 倍和 2.1 倍,青蒿素的含量分别为固体培养和摇瓶培养的 1.5 倍和 1.8 倍,青蒿素产量分别为固体培养和摇瓶培养的 2.9 倍和 3.2 倍^[75].由此可见,雾化反应器为青蒿不定芽生长提供了适宜的环境条件,从而促进了青蒿不定芽的快速生长和青蒿素的大量合成.另外,刘春朝等利用雾化生物反应器^[76]和流化床生物反应器^[77]分别培养青蒿发根生产青蒿素,并取得较理想的结果.如利用雾化生物反应器,在合适的工艺条件下,经 20 d 分批培养获得生物量 10.3 g/L,青蒿素产量 179.1 mg/L^[76];如利用雾化生物反应器,在合适的工艺条件下,经 20 d 分批培养获得生物量干重 21.3 g/L,青蒿素产量 349.8 mg/L^[77],这些记录为利用生物反应器

大规模培养发根的研究工作提供了有益的借鉴。

Nair 等^[57]利用愈伤组织和细胞作为悬浮培养材料,发现愈伤组织悬浮培养无青蒿素的产生,但细胞悬浮培养则有青蒿素的产生。Tawfiq 等^[78]利用青蒿细胞和组织悬浮培养则未检测到青蒿素的存在。

以上这些生物技术的研发与应用为工业化生产青蒿素提供了有力的理论依据,但这些技术中存在一个重要问题就是所用的青蒿材料以及生物技术培养后的材料青蒿素的含量仍然维持在一个相当低的水平上,这是降低生产成本的一个最大障碍。

3 中药青蒿次生代谢的基因工程

除了直接利用组织和器官培养,科研人员也在探索其它更有效的生产青蒿素的方法。秦明波等^[67]、蔡国琴等^[68]首先利用发根农杆菌(*A. rhizogenes*)成功地转化了青蒿,并且建立了发根的离体培养系统;刘本叶等^[79]对发根诱导生长特性,理化因子对发根的生长及青蒿酸含量的影响作了系统分析。如前所述,许多人也先后建立了青蒿的发根培养系统。离体发根培养技术系统的建立,有可能成为青蒿素工业化生产的新途径。

现在人们的注意力多集中在根癌农杆菌对青蒿的转化及次生代谢关键酶的克隆上。有人曾成功地利用胭脂碱型根癌农杆菌感染野生青蒿,获得芽状畸形瘤,试图利用这一系统来研究次生代谢^[80,81],但后续的工作未见报道。对于青蒿的遗传转化及青蒿素生物合成代谢调控的基因工程,近年来,我们实验室做了大量的工作,以下结合本实验室的工作谈谈国内这方面的研究进展。

根据类异戊二烯次生代谢途径研究结果表明,青蒿素生物合成可能的关键是环状杜松烯类的形成及其前体 FPP(法呢基焦磷酸)的供应^[82]。因此,为了提高发根和青蒿植株中青蒿素的含量,我们将起源于棉花基因组的(+) - δ - 杜松烯合成酶(Cad)基因和 FPP 合成酶基因分别插入到植物表达载体中,从而构建了两个含 CaMV35S 启动子的 Cad 基因和 FPP 合成酶基因的植物表达载体,通过根癌农杆菌 LBA4404 和发根农杆菌 15834 介导,利用我们建立的遗传转化系统^[83],转化青蒿叶片^[82,84]。HPLC 检测表明,转法呢基合成酶基因发根系 F-26 系的青蒿素含量约为对照的 5 倍,达(3.01 $\pm$ 0.09) mg/g。与对照相比,转杜松烯合成酶基因发根青蒿素含量增幅不明显,但 TLC 分析结果表明,转杜松烯合成酶基因发根的提取物中青蒿酸、青蒿甲素、青蒿已素等青蒿素前体或衍生物在含量上与对照存在差异。转基因植株的青蒿素 HPLC 检测结果表明:转 FPP 基因的再生植株 F-61 系中,青蒿素含量为对照的 2~3 倍,达到 10.08 mg/g。可见上述外源基因的导入,对青蒿转基因材料中倍半萜成份的生物合成有明显的控制作用。尤其是法呢基焦磷酸合成酶的导入不仅能够提高转基因植株的青蒿素含量,同时也能提高转基因植株的生物量。我们还将细胞分裂素合成关键酶基因 *ipt* 导入青蒿,发现转基因植株中细胞分裂素含量的提高,能促进青蒿中叶绿素和青蒿素含量的提高,青蒿植株中细胞分裂素、叶绿素和青蒿素三者含量上存在正相关性^[85];另外,为了从生殖生理上控制青蒿素的生物合成,我们正利用基因的正义和反义表达技术把与开花有关的基因(如 *leafy* 等)导入青蒿,试图达到控制青蒿生殖生长的目的,从而控制青蒿素的生物合成,并从分子机理上研究青

蒿素生物合成与青蒿生殖生长的关系(未发表资料)。因此,通过各种基因工程手段获得适合工业化生产所需的青蒿高新品系,即将成为现实。

除了利用遗传转化手段来提高青蒿中青蒿素含量以外,我们实验室还从根本上入手,根据植物类异戊二烯代谢途径的研究进展^[86],从青蒿中克隆了与青蒿素生物合成相关酶的基因,其中包括 HMGR 还原酶(HMGR)基因 HMGR II 亚基因家族的一个新的成员 HMGR - c2 (GenBank Accession number AF096838),两个法呢基焦磷酸合成酶的基因 *artfps1* 和 *artfps2* (GenBank Accession number, *artfps1* AF112881; *artfps2* AF136602)、一个倍半萜合成酶的基因 *artses1* (GenBank Accession number AF304444) 和一个倍半萜合成酶基因片段 (GenBank Accession number AF156854) 以及一个鲨烯合成酶基因 *artsqs* (GenBank Accession number AF302464),这些基因功能正在检测之中。这将使我们能够更为有效地控制青蒿自身与青蒿素合成有关酶的表达,从而达到调控青蒿素生物合成的目的;尤其是青蒿倍半萜合成酶基因的克隆是目前国际上本研究领域最受关注的焦点和难点之一,有关基因的克隆和功能检测更倍受人们关注。相信,随着更多未知重要基因序列和功能的确定,人工控制青蒿素的生物合成终会实现。

References

- 1 陈定如,林伙,郭贵仲,范征广. 黄花蒿的栽培. 中草药, 1980, **11** (5): 227 ~ 228
- 2 Klayman DL. *Artemisia annua*: from weed to respectable antimalarial plant. In: Kinghorn AD, Balandrin MF eds. Human medicinal agents from plants. Washington DC: Am Chem Soc Symp Ser, 1933. 242 ~ 255
- 3 Coordinating group for research on the structure of qinghaosu (青蒿素结构研究协作组). A novel kind of sesquiterpene lactone—artemisinin. *Sci Bull* (科学通报), 1977, **22**: 142
- 4 WHO. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (1994 ~ 1995): the role of artemisinin and derivatives in the current treatment of malaria. Report of an Informal Consultation convened by WHO in Geneva, 1993-09-27 ~ 29
- 5 Xu XX(许杏详), Zhu J(朱杰), Zhou WS(周维善). Studies on the structure and synthesis of arteannuin and its related compound. *Organic Chem* (有机化学), 1982, **6**: 447 ~ 448
- 6 Xu XX, Zhu J, Hung DZ, Zhou WS. Total synthesis of artemisinin and deoxyarteannuin. *Tetrahedron*, 1986, **42**: 819 ~ 828
- 7 Avery MA, Chong WW, Jennings KM, White C. Stereoselective total synthesis of (+) - artemisinin, the antimalarial constituent of *Artemisia annua* L. *J Am Chem Soc*, 1992, **114**: 974 ~ 979
- 8 He XC(贺锡纯), Zeng MY(曾美怡), Li GF(李国风), Liang Z(梁峥). Callus induction and regeneration of plantlets from *Artemisia annua* and changes of qinghaosu contents. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1983, **25**(1): 87 ~ 90
- 9 Singh A, Vishwakarma RA, Husain A. Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. *Planta Med*, 1988, **54**: 475 ~ 476
- 10 Laughlin JC. Agricultural production of artemisinin: a review. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**(suppl1): 21 ~ 22
- 11 Laughlin JC. Effect of agronomic practices on plant yield and antimalarial constituents of *Artemisia annua* L. *Acta Hort*, 1993, **331**: 53 ~ 61
- 12 Magalhaes PM. A experimentacao agricola com plantas medicinais e aromaticas. *Atualidades Cientificas*, 1994, **3**: 31 ~ 56 (CPQBA/UNICAMP, Campinas, Brazil)

- 13 Singh A, Kaul CK, Mahajan VP, Singh A, Misra LN, Thakur RS, Husain A. Introduction of *Artemisia annua* in India and isolation of artemisinin, a promising antimalarial drug. *Indian J Pharmac Sci*, 1986,**48**:137 ~ 138
- 14 Delabays N, Benakis A, Collet G. Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*. *Acta Hort*, 1993,**330**:203 ~ 207
- 15 Simon JE, Charles D, Cebert E, Grant L, Janick J, Whipkey A. *Artemisia annua* L.: a promising aromatic and medicinal. In: Janick J, Simon JE eds. *Advances in New Crops*. 1990. 522 ~ 526
- 16 Timber Press, West Lafayette, Woerdenbag HJ, Pras N, Chan NG, Bang BT, Bos R, Uden WV, Van YP, Boi NV, Batterman S, Lugt CB. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Med*, 1994,**60**: 272 ~ 275
- 17 陈和荣,陈敏,钟凤林,陈福本,黄锦水,张美仙,黄静茹. 影响中药青蒿有效成分的几个因子. *中药通报*, 1986,**11**(7):9 ~ 11
- 18 Ferreira JFS, Simon JE, Janick J. *Artemisia annua*: botany, horticulture, pharmacology. *Hort Rev*, 1997,**19**:319 ~ 371
- 19 Srivastava NK, Sharma S. Influence of micronutrient imbalance on growth and artemisinin content in *Artemisia annua*. *Indian J Pharm Sci*, 1990,**52**: 225 ~ 227
- 20 Charles DJ, Simon JE, Shock CC, Feibert EBG, Smith RM. Effect of water stress and post-harvest handling on artemisinin content in the leaves of *Artemisia annua* L. In: Janick J, Simon JE eds. *New crops*. New York: Wiley, 1993. 640 ~ 624
- 21 Shukla A, Farooqi-Abad AH, Shukla YN, Sharma S. Effect of triacontanol and chlormequat on growth, plant hormones and artemisinin yield in *Artemisia annua* L. *Plant Grow Regul*. 1992,**11**:165 ~ 171
- 22 Roth RJ, Acton N. Isolation of arteannuic acid from *Artemisia annua*. *Planta Med*, 1987,**53**:501 ~ 502
- 23 Vonwiller SC, Haynes RK, King G, Wang HJ. An improved method for the isolation of qinghao (artemisinic) acid from *Artemisia annua*. *Planta Med*, 1993,**59**:562 ~ 563
- 24 Ferreira JFS, Charles D., Simon JE, Janick J. Effect of drying methods on the recovery and yield of artemisinin from *Artemisia annua* L. *HortScience*, 1992,**27**:650 (Abstr. 565)
- 25 Ladd PG. Pollen presenters in the flowering plants: form and function. *Bot J Linn Soc*, 1994,**115**:165 ~ 195
- 26 Skvarla JJ, Larson DA. An electron microscopy study of pollen morphology in the Compositae with special reference to the Ambrosiinae. *Grana Palinol*, 1965,**6**:210 ~ 269
- 27 Mitchell JC. Contact allergy from plants. In: Runeckles VC ed. *Recent Adv Phytochem*. Vol 9. New York:Plenum, 1975. 119 ~ 139
- 28 Arora N, Gangal SV. Liposomes are vehicle for allergen presentation in the immunotherapy of allergic diseases. *Allergy*, 1991,**46**:386 ~ 392
- 29 Rantio-Lehtimäki A, Helander ML, Kaihu K. Does cutting of mugwort stands affect airborne pollen concentrations. *Allergy*, 1992,**47**:388 ~ 390
- 30 Park JM, Kim JW, Hong CS. Immunoelectron-microscopic localization of IgE binding site of mugwort pollen. *J Korean Med Sci*, 1993,**8**: 30 ~ 33
- 31 Ferreira JFS, Janick J. Production and detection of artemisinin from *Artemisia annua*. *Acta Hort*, 1995,**390**:41 ~ 49
- 32 Peter-Blanc C. Développement et biologie de la reproduction de l'*Artemisia annua* L. Travail de diplôme. Univ. De Lausanne, Suisse, 1992. 1 ~ 52
- 33 North C. Plant breeding and genetics in horticulture. London:Macmillan, 1979
- 34 胡世林,徐起初,刘菊福,古云霞. 青蒿素的植物资源研究. *中药通报*, 1984,**9**(1):13 ~ 16
- 35 Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 1985,**228**:1049 ~ 1055
- 36 Acton N, Klayman DL. Artemisitene, a new sesquiterpene lactone endoperoxide from *Artemisia annua*. *Planta Med*, 1985,**51**:445 ~ 446
- 37 Chen FT(陈福泰), Zhang GH(张桂华). Studies of several physiological factors on artemisinin synthesis in *Artemisia annua*. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), 1987,**5**:26 ~ 30
- 38 Morales MR, Charles DJ, Simon JE. Seasonal accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L. *Acta Hort*, 1993,**334**:416 ~ 420
- 39 Pras N, Visser JF, Batterman S, Woerdenbag HJ, Maingre TM, Lugt CB. Laboratory selection of *Artemisia annua* L. For high artemisinin yielding types. *Phytochem Anal*, 1991,**2**:80 ~ 83
- 40 Ferreira JFS, Janick J. Relationship of artemisinin content of tissue-cultured, greenhouse-grown, and field-grown plants of *Artemisia annua*. *Planta Med*, 1995,**61**:351 ~ 355
- 41 El-Sohly HN. A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J Nat Prod*, 1990,**53**:1560 ~ 1564
- 42 Woerdenbag HJ, Pras N, Bos R, Visser JF, Hendriks H, Malingre ThM. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 1991,**2**:215 ~ 219
- 43 Elhag HM, El-Domiaty MM, El-Ferally FS, Mossam JS, El-Oleimi MM. Selection and micropropagation of high artemisinin producing clones of *Artemisia annua* L. *Phytother Res*, 1992,**6**:20 ~ 24
- 44 Liersch R, Soicke H, Stehr C, Tullner H-U. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Med*, 1986,**52**:387 ~ 390
- 45 Charles DJ, Cebert E, Simon JE. Characterization of the essential oil of *Artemisia annua* L. *J Ess Oil Res*, 1991. 33 ~ 39
- 46 Wallaart TE, Pras N, Quax WJ. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Med*, 2000,**66**(1):57 ~ 62
- 47 Mehrotra S, Mehrotra BN, Aswal BS, Sharma HP. Leaf surface studies of some medicinal artemisias. *Int J Crude Drug Res*, 1990,**28**:103 ~ 119
- 48 Duke SO, Paul RN. Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci*, 1993,**154**:107 ~ 118
- 49 Duke MV, Paul RN, Elsohly HN, Sturtz G, Duke SO. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. *Int J Plant Sci*, 1994,**155**:365 ~ 372
- 50 Weathers PJ, Cheetham RD, Follansbee E, Tesh K. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotech Lett*, 1994,**16**:1281 ~ 1286
- 51 Liu BY, Ye HC, Li GF, Chen DH, Geng S, Zhang YP, Chen JL. Studies on dynamics of growth and biosynthesis of artemisinin in hairy roots of *Artemisia annua* L. *Chin J Biotech*, 1999,**14**(4):249 ~ 254
- 52 Ferreira JFS, Simon JE, Janick J. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Med*, 1995,**61**:167 ~ 170
- 53 Wallaart TE, Pras N, Quax WJ. Seasonal variations of Artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants

- compared with the diploid wild - type. *Planta Med*, 1999, **65**(8): 723 ~ 728
- 54 Trigg PI. Qinghaosu (artemisinin) as an antimalarial drug. *Econ Med Plant Res*, 1990, **3**:20 ~ 25
 - 55 Sangwan RS, Swangwan NS, Jain DC, Kumar S, Ranade SA. RAPD profile based genitic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, **47**(6):935 ~ 944
 - 56 Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK, Theorides AD. Isolation of artemisinin(qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J Nat Prod*, 1984, **47**:715 ~ 717
 - 57 Nair MSR, Acton N, Klayman DL, Kendrick K, Basile DV, Mante S. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua*. *J Nat Prod*, 1986, **49**:504 ~ 507
 - 58 Woerdenbag HJ, Luers JFJ, Uden W, van Pras N, Malingre TM, Alfermann AW. Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1993, **32**:247 ~ 257
 - 59 Ferreira JFS, Janick J. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1996, **44**:211 ~ 217
 - 60 Butcher DN. Plant cell Tissue and Organ Culture. Berlin:Syringer - Verlag, 1977.688 ~ 693
 - 61 Ferreira JFS. Production and detection of artemisinin in *Artemisia annua* L. :[Ph. D. Thesis]. West Lafayette: Purdue University, 1994
 - 62 Martinez BC, Staba J. The production of artemisinin in *Artemisia annua* L. tissue cultures. *Adv Cell Cult*, 1988, **6**:69 ~ 87
 - 63 Brown GD. Production of anti - malarial and anti - migraine drugs in tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Acta Hort*, 1993, **330**:269 ~ 276
 - 64 Fulzele DP, Sipahimalani AT, Heble MR. Tissue cultures of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production. *Phytother Res*, 1991, **5**:149 ~ 153
 - 65 Whipkey A, Cheetham RD, Follansbee E, Tesh K. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotech Lett*, 1994, **16**:1281 ~ 1286
 - 66 Jha S, Jha TB, Mahato SB. Tissue culture of *Artemisia annua* L. : a potential source of an antimalarial drug. *Curr Sci*, 1988, **57**:344 ~ 346
 - 67 Qin MB(秦明波), Li GZ(李国珍), Yun Y(云月), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤). Induction of hairy root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture in vitro. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1994, **36**(Suppl.):165 ~ 170
 - 68 Cai GQ, Li GZ, Ye HC, Li GF. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. *Chin J Biotech*, 1996, **11**(4):227 ~ 235
 - 69 Jaziri M, Shimomura K, Yoshimatsu K, Fauconnier ML, Marlier M, Homes J. Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *J Plant Physiol*, 1995, **145**:175 ~ 177
 - 70 Duke Som Vaughn KC, Croom EM, ElSohly HN. Artemisinin, a constituent of annual wormwood (*Artemisia annua*), is a selective phytotoxin. *Weed Sci*, 1987, **35**:499 ~ 505
 - 71 Ferreira JFS, Janick J. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *Int J Plant Sci*, 1995, **156**:807 ~ 815
 - 72 Kudakasseril, Lam GJL, Staba EJ. Effect of sterol inhibitors on the incorporation of ^{14}C - isopentenyl pyrophosphate into artemisinin by a cell - free system from *Artemisia annua* tissue cultures and plants. *Planta Med*, 1987, **28**:180 ~ 284
 - 73 Geng S(耿颢), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤), Ma M(麻密), Chong K(种康). Flowering of *Artemisia annua* L. test - tube plantlets and artemisinin production with shoot clusters induced from flower organ explants. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, **7**(3):201 ~ 206
 - 74 Liu CZ, Wang YC, Guo C, Ouyang F, Ye HC, Li GF. Production of artemisinin by shoot cultures of *Artemisia annua* L. in a modified inner - loop mist bioreactor. *Plant Sci*, 1998, **135**:211 ~ 217
 - 75 Liu CZ, Wang YC, Ye HC, Li GF. Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol Lett*, 1997, **19**:927 ~ 929
 - 76 Liu CZ(刘春朝), Wang YC(王玉春), Guo C(郭晨), Ouyang F(欧阳藩), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤). Production of artemisinin by *Artemisia annua* L. hairy root cultures in mist bioreactor. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1998, **4**(3):216 ~ 219
 - 77 Liu CZ(刘春朝), Wang YC(王玉春), Guo C(郭晨), Ouyang F(欧阳藩), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤). Production of artemisinin by *Artemisia annua* L. hairy root cultures in a fluidized bioreactor. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1998, **4**(4):345 ~ 348
 - 78 Tawfiq NK, Anderson LA, Roberts MF, Phillipson JD, Bray DH, Warhurst DC. Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. *Plant Cell Rep*, 1989, **8**:425 ~ 428
 - 79 Liu BY(刘本叶), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤), Jia YT(贾燕涛), Ma M(麻密), Chen JL(陈建林), Zhang YP(张艳萍). Factors affecting the transformation of *Artemisia annua* L. with *Agrobacterium rhizogenes*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 1998, **4**(4):349 ~ 353
 - 80 Paniego NB, Maligne AE, Giuletta AM. *Artemisia annua*: in vitro culture and the production of artemisinin. In: Bajaj YPS ed. Medicinal and Aromatic Plants. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 5. Springer - Verlag, 1993.70 ~ 78
 - 81 Paniego NB, Giuletta AM. Artemisinin production by *Artemisia annua* L. transformed organ cultures. *Enzyme Microb Tech*, 1996, **18**:526 ~ 530
 - 82 Chen DH, Ye HC, Li GF. Expression of chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. *Plant Sci*, 2000, **155**:179 ~ 185
 - 83 Chen DH(陈大华), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤), Liu BY(刘本叶). Expression of green fluorescent protein gene in transgenic shoots of *Artemisia annua*. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, **41**:490 ~ 493
 - 84 Chen DH, Liu CJ, Ye HC, Li GF, Liu BY, Meng YL, Chen XY. Ri - mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, **57**:157 ~ 162
 - 85 Geng S, Ma M, Ye CH, Li GF, Chong K. Effects of ipt gene expression on the physiological and biochemical characteristics of *Artemisia annua* L. *Plant Science*, 2001, **160**:691 ~ 698
 - 86 Chen DH(陈大华), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤), Liu Y(刘彦). Advances in molecular biology of plant isoprenoid metabolic pathway. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, **42**(6):551 ~ 558