

青蒿素生产研究进展

杨水平 杨 宪 黄建国 丁德容

(西南农业大学资源环境学院, 重庆 400716)

摘要: 青蒿素是我国利用传统中医自主开发的抗疟特效药。对青蒿人工栽培、离体培养生产青蒿素、青蒿素生物合成与调控等的最新研究进展作了综述, 并认为青蒿规模化种植是满足青蒿素现实需求的主要途径, 同时应努力运用现代生物技术开启另一条高质高产的青蒿素生产途径。

关键词: 青蒿; 青蒿素; 栽培; 离体培养; 生物合成

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)02-0189-06

Advances in Researches on Artemisinin Production

YANG Shui-ping YANG Xian HUANG Jian-guo DING De-rong

(College of Natural Resource and Environment, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A review of research works on artemisinin production is presented under the following headings: 1. cultivation of *Artemisia annua* including cultivation practices, plant breeding, harvesting time, processing and preservation; 2. artemisinin production by plant tissue culture; 3. biosynthesis of artemisinin, and 4. perspective.

Key words: Artemisinin; *Artemisia annua*; Cultivation; Tissue culture; Biosynthesis

青蒿素类药是我国科学家利用传统中医药自主开发研制的抗疟特效药。上世纪 70 年代从青蒿 (*Artemisia annua* L.) 中分离提取出抗疟活性单体—青蒿素, 随之确认其分子结构和绝对构型, 1986、1987 年蒿甲醚油针剂、青蒿琥酯钠盐的水针剂和青蒿素栓剂作为一类新药在我国批准生产。1995 年蒿甲醚率先载入国际药典, 这是我国创制的新药首次得到国际公认^[1], 至今已有 5 个抗疟类新药 (青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢青蒿素、复方蒿甲醚) 9 种剂型, 并在世界各国销售, 每年挽救数百万重症患者的生命。除独特的抗疟作用外, 该类药还具抗血吸虫、肺吸虫、红斑狼疮、皮炎以及免疫调节、抗流感等多种疗效^[2]。目前, 国内和国际上已经掀起了青蒿素、青蒿素衍生物开发及其应用的研究热潮^[1,2]。

但是, 国际抗疟药市场上青蒿素类药物尚占不到 1% 的份额, 其原因就在于青蒿素原料缺乏。目前, 商用青蒿素基本来自植物青蒿的提取物。20 多年来, 主要依靠野生青蒿资源, 但野生资源分布

零散, 青蒿素含量相当低且产量和品质不稳定, 影响生产工艺和成本, 近缘植物中未发现含有青蒿素^[3,4]。已探明有利用价值的野生青蒿资源, 仅可提取青蒿素 10-20 t, 远远不能满足市场近 200 t 的需求量^[2,3]。同时, 由于作为原料的青蒿, 要求在花前收获, 这将导致野生青蒿种子逐年减少, 进而引发资源枯竭。因此, 寻求青蒿素高质高产的生产途径尤为重要。本文拟对青蒿人工种植和离体培养生产青蒿素的研究进展作一综述。

1 青蒿的人工种植

近年来, 青蒿的人工栽培已小有规模, 发展势头较快。估计在相当长的时期内, 人工栽培将会是解决青蒿素类药物原料短缺的主要手段。

1.1 立地条件与栽培措施

青蒿资源品质 (青蒿素含量) 具有显著的生态地域性, 一些地区青蒿的品质显著高于其它地区, 这与当地的土壤、气候等生态因子有关, 因而这些地

区就被选为青蒿规模化种植的基地。重庆酉阳的栽培种中有青蒿素含量可达 1.2%–1.5% 的单株系, 高于中国品系含量(0.01%–0.9%)。选择适宜的种植时间和条件也很必要, 青蒿适宜凉爽的季节种植, 如晚春和初夏^[4]。Elhag 等^[5]在温室条件下栽培, 发现白天 25–30℃、晚上 15–20℃, 能促进植物体内青蒿酸向青蒿素转化, 使青蒿素含量增加 43%。

栽培中稍加肥料, 青蒿植株高大, 青蒿素的含量较野生的略高, 且嫩叶比老叶的含量高^[6]。1988 年 WHO 选用含 NPK 的复合肥使植物中青蒿素含量增加 5%–10%^[7]。我们在重庆酉阳所得的数据(未发表)表明: 栽培青蒿比野生的青蒿素含量平均提高 31%–84%; 适当施肥可大幅度提高收获叶的产量, 施 N、P、K、NPK 复合肥可分别增产 61%、37%、53%、168%。Liersch 等^[8]对筛选的青蒿品种 811 喷洒矮壮素阳离子(chlormequat), 结果植株中青蒿素含量比对照高 30%。韦霄等^[9]用鸡粪或复合肥作基肥, 于 3 月上旬播种青蒿种子, 播种量为 900–1 500 g hm⁻², 留苗密度为 15 cm×15 cm, 在苗期和生长盛期各追肥 1 次, 可提高青蒿产量和青蒿素产量。

1.2 良种选育

Elhag 等^[5]在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。我们发现, 圆柱红黄茎、三回栉齿密粗裂叶青蒿单株的干叶产量最高, 可达 300 g, 平均高于混合群体 125%; 菱型黄绿茎、三回栉齿稀粗裂叶青蒿的青蒿素含量最高, 可达 1.72%, 平均比混合群体高 128%。Sangwan 等^[10]研究发现, 青蒿植株之间化学物质的巨大差异根本上源于遗传性状的多态性, 即植株之间青蒿素含量差异源于遗传基础不同。Wallaart 等^[11]用秋水仙素处理得到四倍体青蒿, 发现青蒿素含量比二倍体提高 38%, 且叶片要大得多, 但四倍体矮小, 产量低 25%。尽管如此, Wallaart 认为, 四倍体仍是选育生长快、青蒿素含量高的青蒿植株的良好材料。改进青蒿遗传性状工作进展缓慢, 因为其花很小(约 1 mm), 目前尚未找到控制其授粉的理想系统。

1989 年印度采用集团选种的方法, 培育出叶片干物质产量为 2.9 t hm⁻²、青蒿素含量为 3.19 kg hm⁻² 的新品种^[34]。Delabays^[12]在瑞士用中国青蒿克隆间杂交, 试管内繁殖, 对意大利、南斯拉夫和西班牙的青蒿授粉, 获得杂交品种, 该品种的干物质产量为 2 t hm⁻², 青蒿素含量平均在 0.64%–0.95%。Debrunner^[13]

从越南两组青蒿中选择了 5 种高青蒿素核型, 同中国的一种高青蒿素核型杂交, 获得青蒿素产量为 38 kg hm⁻² 的杂交品种。Magalhaes^[14]通过从中国和越南青蒿品种选择的核型间杂交, 获得适合巴西种植的青蒿品种, 青蒿素产量最高达 21.38 kg hm⁻²。

我国青蒿品种选育研究从二十世纪八十年代末开始, 陈和荣^[15]用秋水仙碱处理青蒿种子, 选育出了青蒿素含量高、营养体重量显著增加、植株高大健壮、生长适应性强、稳定性好、抗逆性强的青蒿新品种“京厦 I 号”, 青蒿素含量为 1.0%。1991–1997 年, 重庆市药物种植所在酉阳县青蒿类型中选育出青蒿素含量在 1.0% 的青蒿良种^[16]。

但青蒿属异花授粉植物, 自花授粉少且很难结实(<5%), 使青蒿优质高产株系难于保持, 在种子繁殖中, 易受外来花粉干扰而降低种子纯度与质量, 良种品质性状难稳定。因此加强无性快繁培养技术开发, 为大田生产提供种苗是当务之急。

1.3 采收加工和储藏

卫云等^[17]认为花蕾期植株中青蒿素含量最高, 为最佳采收期。钟风林等^[18]对青蒿不同生长期的青蒿素含量变化进行考察, 认为青蒿的采集期在生长盛期至花蕾期之前, 青蒿素含量最高, 营养体重量大, 而且采集的时间以晴天中午 12 时至下午 16 时为宜, 在这期间采收的植株青蒿素含量最高, 这与光强有利于青蒿素的产生和大量积累的理论相一致。在青蒿植株和枝条上的叶片中, 青蒿素含量均呈下部、中部、上部依次递增的分布规律。因此, 青蒿植物的上部和枝条上部的叶片应首选入药, 其次为中部, 最后才是下部。不同的干燥方法对青蒿素的产量也有一定的影响, 比较晒干、阴干和 60℃ 烘干 3 种方法, 以自然晒干的效果最好, 比阴干的样品含量高 23.76%。我们的研究也证实了晒干的效果最好, 测得晒干分别比烘干、阴干的高 101.7%、34.48%; 同时还研究了储藏对青蒿素含量的影响, 发现青蒿素含量随储藏时间的延长而降低, 储藏 6 个月降低 12.87%, 1 年降低 32.76%, 认为含量太低的叶片存放一年后就失去了加工的价值(未发表)。

2 离体培养生产青蒿素

目前青蒿素生产原料基本上依赖天然采集的野生植株和人工栽培青蒿。天然野生青蒿受地理环境和季节的限制以及资源的日益匮乏, 难以获得持续的发展。人工栽培占地大, 耗时耗力, 且植株易变

异,也使得产量难以保证。因此,利用现代生物技术来生产或促进青蒿素生产很有必要,实际上,这方面工作已经取得了很多成果。利用组织培养合成青蒿素是目前的研究热点,有望成为大规模生产青蒿素的重要手段。自 80 年代以来,利用植物组织培养生产青蒿素的研究已经在青蒿愈伤组织、悬浮细胞、芽和毛状根等培养体系中进行了青蒿素合成的探索。

2.1 培养系的建立与青蒿素的合成

贺锡钝等^[18]对青蒿的愈伤组织、带芽的愈伤组织和由愈伤组织分化产生的小植株中青蒿素的合成进行分析,认为青蒿愈伤组织中不含青蒿素,在愈伤组织伴随芽分化形成时,检测到青蒿素的含量约为干重的 0.008%。而由分化苗长成的植株中,青蒿素的含量达到干重的 0.92%,高于野生植株。Nair 等^[19]在进行青蒿愈伤组织悬浮培养时,在愈伤组织中未检测到青蒿素的存在,但在悬浮培养液中检测到微量的青蒿素(8 mg L⁻¹)。同样 Brown 的研究也证实了青蒿愈伤组织中不含萜类,但在分化的芽中检测到和亲本相似的萜类合成物^[2]。Tawfit 等在研究青蒿悬浮细胞培养时,在培养物中没有检测到青蒿素的合成,但在培养液的正己烷提取物中检测到抗疟的活性成分^[2]。Fulzele 等^[20]研究青蒿素在组织培养中的合成时发现,5 个不同地区来源的青蒿均可检测出青蒿素和青蒿素-B 的存在;但是,在诱导的愈伤组织和细胞培养物中没有检测出青蒿素和青蒿素-B 的存在,如由欧洲青蒿品种诱导的愈伤组织、悬浮细胞培养物、芽和根的悬浮培养中以及培养基中均未检测出青蒿素的存在,有趣的是芽培养时在萌发根的培养芽中可检测到青蒿素和青蒿素-B(培养基为 MS+NAA 1 mg L⁻¹+KT 0.1 mg L⁻¹),青蒿素和青蒿素-B 分别为 9.5 mg kg⁻¹FW、65.7 mg kg⁻¹FW。他们认为根从不定芽上启动时,青蒿素和青蒿素-B 的合成就开始,而且,培养的不定芽完全分化是青蒿素合成的先决条件。Paniego 等^[21]在新诱导的青蒿愈伤组织中检测到青蒿素的含量约为干重的 0.1%~0.08%,此培养物经 3 次继代培养后,愈伤组织内青蒿素的含量几乎难以检测到。由此可见,在未分化的青蒿植物组织中不含或含有极低水平的青蒿素,而一定的组织分化则可促进青蒿素的合成。鉴于此,更多的研究转向了毛状根和不定芽的培养;特别是毛状根培养物,其生长速度快、分枝多、生理生化及遗传特征稳定,具有稳定的次生代谢物合成能

力。刘春朝等^[22]对影响青蒿毛状根生长及青蒿素合成的温度和光照等培养条件进行了研究,在最适光温等条件下获得青蒿素的产量为 223.3 mg L⁻¹。

一些添加物可提高培养系的合成能力。Woerdenbag 等^[23]在诱导的青蒿芽培养物中检测到青蒿素的存在,并发现赤霉素和水解酪蛋白等对芽中青蒿素的合成具有强的刺激作用。Ferreira 等^[24]在青蒿芽的培养过程中,同样检测到青蒿素的存在,并在诱导生根的青蒿芽中获得了高含量的青蒿素,约为干重的 0.02%;改进培养基中的各种金属离子和复合维生素对芽中青蒿素的合成影响不明显,但添加赤霉素使得芽中青蒿素的含量提高了 3~4 倍。李弘剑等^[25]在青蒿细胞悬浮组培合成青蒿素过程中添加微生物刺激剂和微生物胸外酶刺激剂,结果发现:酵母 K 提取物(20%)处理培养细胞 3 d,合成青蒿素达 320 mg g⁻¹DW,比对照高 38%;0.2%果酸酶处理 2 d 以上,达 740 mg g⁻¹DW,比对照高 3.08 倍。王红等^[26]用 3 种真菌诱导子处理青蒿发根,都能促进发根中青蒿素的积累,诱导效果与诱导子浓度、诱导时间及发根的生长状态有关,但对细胞生长无明显效果;其中以大丽花轮枝孢的诱导效果最好,青蒿素含量较对照高 45%。

利用发根农杆菌和根癌农杆菌感染青蒿,建立青蒿离体培养系统,提供了以 Ri 质粒和 Ti 质粒作为基因载体进行青蒿的遗传改造的可能性。秦明波等^[27]首先用发根农杆菌 1601 成功转化青蒿幼茎获得毛状根培养物。Weathers 等^[28]利用发根农杆菌 15834 感染青蒿的芽尖和叶片,获得青蒿毛状根培养物,并且检测到青蒿素的含量均为干重的 0.43%,其含量远高于其它青蒿组织培养物中青蒿素的含量。蔡国琴等^[29]利用发根农杆菌 1601 感染青蒿叶片建立了毛状根培养系,并在培养物中检测到青蒿素,在添加赤霉素的条件下青蒿素的含量约为干重的 0.2%。Paniego 等^[30]用根癌农杆菌感染青蒿叶片,使青蒿产生了芽状畸形瘤。Vergauwe 等^[31]利用根癌农杆菌感染青蒿叶片,获得转基因植株中青蒿素含量约为干重的 0.17%,青蒿素合成前体青蒿素-B 的含量约为 0.22%。刘本叶等^[32]研究了影响发根农杆菌转化青蒿的因素,认为发根农杆菌种类、基本培养基和青蒿株系对转化率有明显影响,嫩叶比成熟叶转化率高,最适条件转化率可达 100%。从 747 条发根农杆菌转化的青蒿发根中,筛选出 7 个发根系生长快的发根系,这 7 个发根系在生长速度和青蒿

素含量上也差异显著,最高青蒿素产量达每月 33.25 mg L⁻¹^[33]。

2.2 生物反应器培养

Fulzele 等^[29]利用 1 L 生物反应器进行青蒿芽的悬浮培养,经过 30 d 的分批培养可获得再生的植株,生物量提高了 4–5 倍。Park 等利用 2 L 的长方形气提式生物反应器培养青蒿芽,经过 4 周的培养,培养物增殖 8 倍,获得的青蒿芽可长出不定根^[2]。刘春朝等^[35,36]研究了适用于青蒿发根及芽培养的生物反应器及控制技术,利用超声雾化生物反应器、自制的流化床生物反应器、自制的气升式内环流生物反应器进行青蒿毛状根多层培养生产青蒿素,在一定条件和工艺下,经 20 d 分别获得生物量(干重) 10.3 g L⁻¹、21.3 g L⁻¹、22.57 g L⁻¹ 和青蒿素 179.3 mg L⁻¹、349.8 mg L⁻¹、374.4 mg L⁻¹; 利用新型的超声雾化内环流生物反应器对不定芽多层培养,25 d 获得青蒿素 46.9 mg L⁻¹。

3 青蒿素生物合成及合成过程的基因调控

3.1 青蒿素生物合成的细胞定位研究

Ferreira 等研究青蒿叶形态时,在头状花序小花的花冠、花托、苞片中发现了很多透明的与青蒿素合成有关的腺状细胞列,在头状花序的苞片和花梗中发现了无腺的丝状 T 细胞列。浸在氯仿中 5 s 而不损坏表皮的情况下从腺状同系叶中提取得到青蒿素 B 及青蒿烯,而在无腺的同系细胞中却没有青蒿素及青蒿烯,从而初步确定青蒿素及其相关化合物合成及汇集的场所就是腺状细胞列^[37]。我们认为这项发现在某种程度上可以解释青蒿素含量在组培过程中分化、在植株不同生育期不同器官差异很大,这是因为并不是所有的细胞都具有合成青蒿素的能力。

3.2 青蒿素生物合成的关键酶及其基因调控

青蒿素的生化合成途径属于植物类异戊二烯两种代谢途径中的甲羟戊酸途径,该途径在细胞质中进行,由乙酰辅酶 A 大约经 9 步酶促反应形成法呢基焦磷酸,这些过程已经比较清楚。从法呢基焦磷酸到合成青蒿素,则是近年的最新进展,这得益于 4,11-二烯倍半萜等重要中间产物及其催化酶的分离、纯化,这些重要的中间产物对阐明青蒿素生化合成途径至关重要。Wallaart 等^[38]将合成途径

概括为:法呢基焦磷酸→4,11-二烯倍半萜→青蒿酸→二氢青蒿酸→二氢青蒿酸过氧化物→青蒿素。在青蒿素的生物合成途径中,有 3 种关键酶被发现、分离,它们分别是:3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶、法呢基焦磷酸合酶(FDPS)和倍半萜合酶(环化酶)。这几种酶的功能分析和作用机理的研究尚在进行之中,但它们的基因已被克隆,基因转化工作也在开展^[38-40]。FDPS 的基因在大肠杆菌中表达后,在体外能检测到 FDPS 活性^[39]。Wallaart 等^[38]将青蒿的 amorpho-4,11-diene 合酶(一种倍半萜合酶)基因转入不含内源倍半萜合酶的烟草,在烟草中能检测到该酶的活性,转基因烟草叶片中 amorpho-4,11-diene 含量为 0.2–1.7 ng g⁻¹FW。

关键酶被克隆和用发根农杆菌、根癌农杆菌建立的青蒿离体培养系统,为青蒿素生物合成的基因调控奠定了基础。陈大华等^[40-43]将来源于棉花的杜松烯合成酶(Cad)的 cDNA 和法呢基焦磷酸合酶(FDPS)基因的 cDNA 分别插入到植物表达载体中,构建了两个含 Cad 和 FDPS 基因的植物表达载体,通过发根农杆菌 15834 和根癌农杆菌 LBA4404 介导,利用已建立的青蒿发根和丛生芽转化体系,转化青蒿叶片,分别获得了转基因发根和转基因植株。青蒿素含量检测结果:转 FDPS 发根系中的青蒿素含量最高达到 3.01 mg g⁻¹DW,比对照提高 3–4 倍;转 FDPS 基因的再生植株中,青蒿素含量最高可达 10.08 mg g⁻¹DW,比对照提高 2–3 倍;转 Cad 基因的发根中青蒿素含量增幅不明显,但发根提取物中青蒿酸、青蒿甲素、青蒿乙素等青蒿素前体或衍生物在含量上与对照存在差异。研究还发现,外源 Cad 基因的导入和表达可能相应地促进青蒿转基因发根自身的法呢基焦磷酸合酶基因的表达。上述结果表明,外源基因的导入,对青蒿转基因材料倍半萜类物质的生物合成具有明显的调控作用。

4 展望

随着中国入世,中医药面临一个前所未有的发展机遇,如何让具有传统优势和特点的中药大步走向世界,已引起我国医药界的高度重视。青蒿素及其衍生物作为目前世界上最好的抗疟药物,将其推向世界,带动其他中药的出口,是当前我国中医药走向世界的有效途径。

人工栽培是目前青蒿素获取的主要手段,其意义不仅在于有效地获得青蒿素类药物的原料,使我

国资源优势变为经济优势,也有利于保护野生青蒿资源、及可持续利用,也有利于保护和改善生态环境。但青蒿栽培历史短,对种质资源和优良性状的调查、收集、整理与积累等工作进行得非常有限,加之优良性状易退化,难以支持大规模持续种植。因此,青蒿的人工种植必须把青蒿种质资源的调查研究和品种资源建设放在首位,其次必须进行规范化栽培,包括建立青蒿生产管理规范,以保障青蒿品质质量,为青蒿素质量标准研制奠定基础,以适应国际市场的要求。该领域今后的重点应当围绕:(1)青蒿种质资源调查与收集、(2)选育高产优质的品系、(3)高产优质的栽培技术、(4)有效的提取加工技术等方面进行。

青蒿的组织培养研究虽尚不能提供青蒿素的实用生产,但这方面所取得的进展是很令人鼓舞的,人们试图通过组培筛选高产培养系,利用生物反应器培养生产青蒿素,为我们提供了一条富有吸引力的青蒿素生产的希望之路。今后的工作目标应当是:(1)筛选高产的培养系;(2)开发合适的青蒿组培生物反应系统和成熟可操作的生产技术;(3)开发无性快繁技术,为大田栽培提供优良种苗。

青蒿素生物化学合成基础工作近年的进展也是可喜的,包括青蒿素生物合成与汇积的细胞定位,弄清了合成途径及控制合成的关键酶,并对关键酶的基因进行克隆和转化。今后在对合成途径及关键酶的进一步了解基础上深入研究:(1)青蒿素生化合成的代谢调控,目标是大幅度增加青蒿素含量,手段可以是添加生化合成的前体,或是控制关键酶,或是激活对关键酶控制的基因,或是关键酶基因转化等;(2)关键酶基因克隆,并在合适的青蒿离体培养体系和微生物中高效表达;(3)利用基因工程手段改变关键酶基因,以增强它们所控制酶的效率。

综上所述,提高青蒿素产量,既要以大田栽培等技术手段充分开发青蒿植物资源,以满足社会对青蒿素类药物的现实需求,又要利用现代生物技术手段,努力开启另一条高产高质的青蒿素来源新途径。

参考文献

- [1] Li Y (李英). Experiences from developing the new antimalarial drugs artemisinins [J]. *Medicine Abroad • Plant Section (国外医药•植物药分册)*, 1999, 14(3):102-107. (in Chinese)
- [2] Liu C Z (刘春朝), Wang Y C (王玉春), Ouyang P (欧阳藩), et al. Advance in artemisinin research [J]. *Progress in Chem (化学进展)*, 1999, 11(1):41-48. (in Chinese)
- [3] Zhong G Y (钟国跃), Zhou H R (周华蓉), Ling Y (凌云), et al. Investigation on ecological environment and quantitative analysis of artemisinin from sweet wormwood (*Artemisia annua*) [J]. *Chin Herb Med (中草药)*, 1998, 29(4):264-267. (in Chinese)
- [4] Zhong F L (钟凤林), Chen H R (陈和荣), Chen M (陈敏). Effects of harvest time, component parts of plant and drying methods on artemisinin content [J]. *Chin J Chin Med (中国中药杂志)*, 1997, 22(7):405-407. (in Chinese)
- [5] Elhag H M, El-Domiaty M M, El-Ferally F S, et al. Selection and micropropagation of high producing clones of *Artemisia annua* [J]. *Phytotherapy Res*, 1992, 6:20-24.
- [6] Xie D Y (谢德玉), Ye H C (叶和春), Li G F (李国凤), et al. The progress of *Artemisia annua* research—the application of biotechnology and prospects [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 1995, 12(4):28-31. (in Chinese)
- [7] Li GD (李国栋), Zhou Q (周全), Zhao C W (赵长文), et al. Advance in medicines of artemisinin and its derivative [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 1998, 33(7):385-388. (in Chinese)
- [8] Liersch R. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period [J]. *Planta Med*, 1986, 5:387-390.
- [9] Wei X (韦霄), Li F (李锋), Xu C F (许成琼), et al. The effect of different cultivation measures on the yield of *Artemisia annua* and artemisinin content [J]. *J Guangxi Acad Sci (广西科学院学报)*, 1999, 15(3):132-136. (in Chinese)
- [10] Swangwan R S, Swangwan N S, Jain D C, et al. RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants *Artemisia annua* [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1999, 47:935-944.
- [11] Wallwaert T E, Pras N, Quax W J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type [J]. *Planta Med*, 1999, 65:723-728.
- [12] Delabays N, Benakis A, Collet G. Selection and breeding for high artemisinin (qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua*. First World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP) [J]. *Acta Hort*, 1993, (330):203-207.
- [13] Debrunner N. Selection of genotypes of *Artemisia annua* L. for the agricultural production of artemisinin [A]. In: *Proceedings of International Symposium on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants [C]*. Quedlinburg (Germany): Syringer verlag, 1996. 321-327.
- [14] Magalhaes P M. New hybrid lines of the antimalarial species *Artemisia annua* L. [J]. *Acta Hort*, 1999, (502):377-381.
- [15] Chen H R (陈和荣). Selection of a new cultivar "Jingxia No.1" of *Artemisia annua* L. [A]. In: *Zhongguo Jishu Chengguo Daquan*, 1992, No.1 (medicine) [C]. Beijing: Scientific and Technological Document Press, 1992.186-187. (in Chinese)
- [16] Huang Z F (黄正方), Zheng G H (郑贵华), Li C D (李成东). A study of factors influencing artemisinin contents of *Artemisia annua* [J]. *J Southwest Agri Univ (西南农业大学学报)*, 1997, 19(1):93-94. (in Chinese)
- [17] Wei H (卫云), Cong W H (丛伟红). Study on harvest time of

- Artemisia annua* in Shandong [J]. J Shandong Univ TCM, 2000, 24(2):139-140. (in Chinese)
- [18] He X C(贺锡纯), Zeng M Y(曾美怡), Li G F(李国风). Callus induction and regeneration of plantlets from *Artemisia annua* and change of artemisinin content [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1983, 25:87-90. (in Chinese)
- [19] Nair M S R, Acton N, Klayman D L, et al. Production of artemisinin in tissue cultures of *Artemisia annua* [J]. J Nat Prod, 1986, 49:504-507.
- [20] Fulzele D P, Sipahimalani A T, Heble M R. Tissue cultures of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production [J]. Phytotherapy Res, 1991, 5(5):149-153.
- [21] Paniego N B, Giulietti A M. *Artemisia annua* L.: Dedifferentiated and differentiated cultures [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 36: 163-168.
- [22] Liu C Z(刘春朝), Wang Y C(王玉春), Ouyang F(欧阳藩), et al. Technical factors of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* hairy root culture [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1998, 40(9):831-835. (in Chinese)
- [23] Woerdenbag H J, Luers J F J, Uden W, et al. Production of new antimalarial drug in shoot cultures of *Artemisia annua* L. [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1993, 32:247-257.
- [24] Ferreira J F S, Janick J. Roots as an enhancing factor for the production of artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1996, 44:211-217.
- [25] Li H J(李弘剑), Zhang Y(张毅), Guo Y(郭勇), et al. Stimulus of artemisinin biosynthesis in cultural cell of *Artemisia annua* by stress *in vitro* [J]. Pharm Biotech(药物生物技术), 2001, 8(1):12-16. (in Chinese)
- [26] Wang H(王红), Ye H C(叶和春), Li G F(李国风). Effect of fungal elicitors on cell growth and artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 2000, 42(9):905-909. (in Chinese)
- [27] Qin M B(秦明波), Li G Z(李国珍), Yun Y(云月), et al. Induction of hairy roots from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and its culture *in vitro* [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1994, (A11):165-170. (in Chinese)
- [28] Weathers P J, Cheetham R D, Follasbee E, et al. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. Biotechn Lett, 1994, 16:1281-1286.
- [29] Cai G Q(蔡国琴), Li G Z(李国珍), Ye H C(叶和春), et al. Hairy root culture of *Artemisia annua* by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 1995, 11(4):315-320. (in Chinese)
- [30] Paniego N B, Giulietti A M. *Artemisia annua*: *in vitro* culture and the production of artemisinin [J]. Enzyme Micr Techn, 1996, 18: 526-530.
- [31] Vergawe A. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep, 1996, 15:929-933
- [32] Liu B Y(刘本叶), Ye H C(叶和春), Li G F(李国风), et al. Factors affecting the transformation of *Artemisia annua* L. with *Agrobacterium rhizogenes* [J]. Chin J Appl Envir Biol(应用与环境生物学报), 1998, 4(4):349-353. (in Chinese)
- [33] Liu B Y(刘本叶), Ye H C(叶和春), Li G F(李国风), et al. Studies on dynamic of growth and artemisinin biosynthesis of hairy root of *Artemisia annua* [J]. Chin J Biotechn(生物工程学报), 1998, 14(4):401-404. (in Chinese)
- [34] Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, India. Artemisinin-rich variety of *Artemisia annua* developed [J]. CIMAP-Newsletter, 1989, 16:1.
- [35] Liu C Z(刘春朝), Wang Y C(王玉春), Guo C(郭晨), et al. Production of artemisinin by *Artemisia annua* hairy root culture in a fluidized bioreactor [J]. Chin J Appl Envir Biol(应用与环境生物学报), 1998, 4(4):345-348. (in Chinese)
- [36] Liu C Z(刘春朝), Wang Y C(王玉春), Kang X Z(康学真), et al. Artemisinin production by adventitious shoots of *Artemisia annua* in a novel mist bioreactor [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1999, 41(5):524-527. (in Chinese)
- [37] Zhao B(赵兵), Wang Y C(王玉春), Ouyang P(欧阳藩), et al. Advances in research of mechanism of artemisinin biosynthesis [J]. Guihaia(广西植物), 1999, 19(2):154-158. (in Chinese)
- [38] Wallwaart T E, Bouwmeester H J, Hille J. Amorpho-4, 11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalaria drug artemisinin [J]. Planta, 2001, 21:460-465.
- [39] Matsuchita Y, Kang W Y, Charlwood B V. Cloning and analysis of cDNA encoding farnesyl diphosphate synthase from *Artemisia annua* [J]. Gene, 1996, 172:207-209.
- [40] Chen D H(陈大华), Ye H C(叶和春), Li G F(李国风). Advances in molecular biology of plant isoprenoid metabolic pathway [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 2000, 42:551-558. (in Chinese)
- [41] Chen D H, Li C J. Ri-mediated transformation of *Artemisia annua* with a recombinant farnesyl diphosphate synthase gene for artemisinin production [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1999, 57:157-162.
- [42] Chen D H, Ye H C, Li G F. Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. Plant Sci, 2000, 155:179-185.
- [43] Chen D H(陈大华), Meng Y L(孟玉玲), Ye H C(叶和春), et al. Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinene synthase gene [J]. Acta Bot Sin(植物学报), 1998, 40(8): 711-714. (in Chinese)