

Advances in Molecular Regulation of Artemisinin Biosynthesis

Luyao Wang¹, Ying Zhang¹, Kexuan Tang¹, Shan Li², Jingya Zhao^{1*}

¹Plant Biotechnology Research Center, Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology R&D Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai

²School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou Guangdong
Email: wangluyao0501@163.com

Received: May. 11th, 2016; accepted: May. 26th, 2016; published: May. 31st, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Artemisinin, a sesquiterpene lactone compound with an endoperoxide bridge, is a new and the most potent antimalarial drug. Commercially available artemisinin is extracted from *Artemisia annua* L. plants. Therefore, the regulation of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* has become a hot spot. This paper reviews the ways of artemisinin biosynthesis, especially the key enzymes and gene regulation in the biosynthesis. The review also presents the advances in molecular regulation of artemisinin biosynthesis, it focuses on how to enhance the artemisinin content to help stabilize the supply of artemisinin.

Keywords

Artemisia annua L., Artemisinin, Biosynthesis, Key Enzymes, Molecular Regulation

青蒿素生物合成分子调控研究进展

王路尧¹, 张颖¹, 唐克轩¹, 李杉², 赵静雅^{1*}

¹上海交通大学农业与生物学院, 复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海

²华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州

Email: wangluyao0501@163.com

*通讯作者。

收稿日期：2016年5月11日；录用日期：2016年5月26日；发布日期：2016年5月31日

摘要

青蒿素是一种含有过氧基团的倍半萜内酯化合物，是目前已知的世界上最有效的疟疾治疗药物。青蒿素的主要来源是青蒿，因此青蒿中青蒿素的生物合成调控已成为研究的热点。文章综述了青蒿素生物合成的途径，重点介绍青蒿素生物合成途径中的关键酶。此外，文章还介绍了近年来青蒿素生物合成分子调控方面的研究进展，主要集中于如何有效提升青蒿素含量的方法从而有助于青蒿素的稳定供应。

关键词

青蒿，青蒿素，生物合成，关键酶，分子调控

1. 引言

疟疾是一种经按蚊叮咬而感染疟原虫所引起的虫媒传染病，据报道全世界每年有 2.2 亿人口受疟疾威胁，并且约有 66 万人死于疟疾[1]。青蒿素是我国学者在 20 世纪 70 年代初从中药青蒿(*Artemisia annua* L.)中分离得到的抗疟有效单体，是一种含有过氧基团的倍半萜内酯化合物(见图 1)，分子式为 $C_{15}H_{22}O_5$ [2]。青蒿素是一种与过去抗疟药作用方式完全不同的新结构类型药物，是所有抗疟药中起效最快、疗效最好、毒副作用最低的化合物，特别是对脑型疟疾及多抗药性疟疾的疗效更为显著。目前，联合国卫生组织推荐以青蒿素为基础的联合疗法(ACTs)为最有效的治疗疟疾的方法[3]-[5]。

目前青蒿素类药物的生产主要是从青蒿植株中提取，而青蒿植株中青蒿素的含量较低(约占干重的 0.01%~1%)，使得青蒿素的市场供应能力受到了限制，导致青蒿素的价格昂贵，并且难以满足治疗病例对青蒿素的需求[4]。随着现代分子生物技术的发展，应用细胞工程、基因工程等技术手段提高青蒿素含量，以及采用合成生物学生产青蒿素逐渐成为人们研究的热点。因此，对青蒿素进行生物合成分子调控的研究，对提高青蒿素生物产量有着极为重要的作用。

2. 青蒿素的合成途径

为了提高青蒿中青蒿素的含量，国内外不断开展青蒿素生物合成学的研究，青蒿素的生物合成途径现在已十分清楚(见图 2)。青蒿素生物合成途径属于类异戊二烯途径，有两条途径均可获得青蒿素的生物合成前体异戊烯基焦磷酸(isopentenyl phosphate, IPP)：质体中的异戊二烯途径(MEP 途径)和细胞质中的甲羟戊酸途径(MVA 途径)，然后 IPP 由法尼基焦磷酸合成酶(farnesyl diphosphate synthase, FPS)作用聚合生成法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP) [6]。

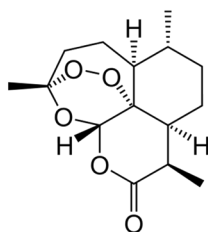


Figure 1. The chemical structure of artemisinin
图 1. 青蒿素的化学结构

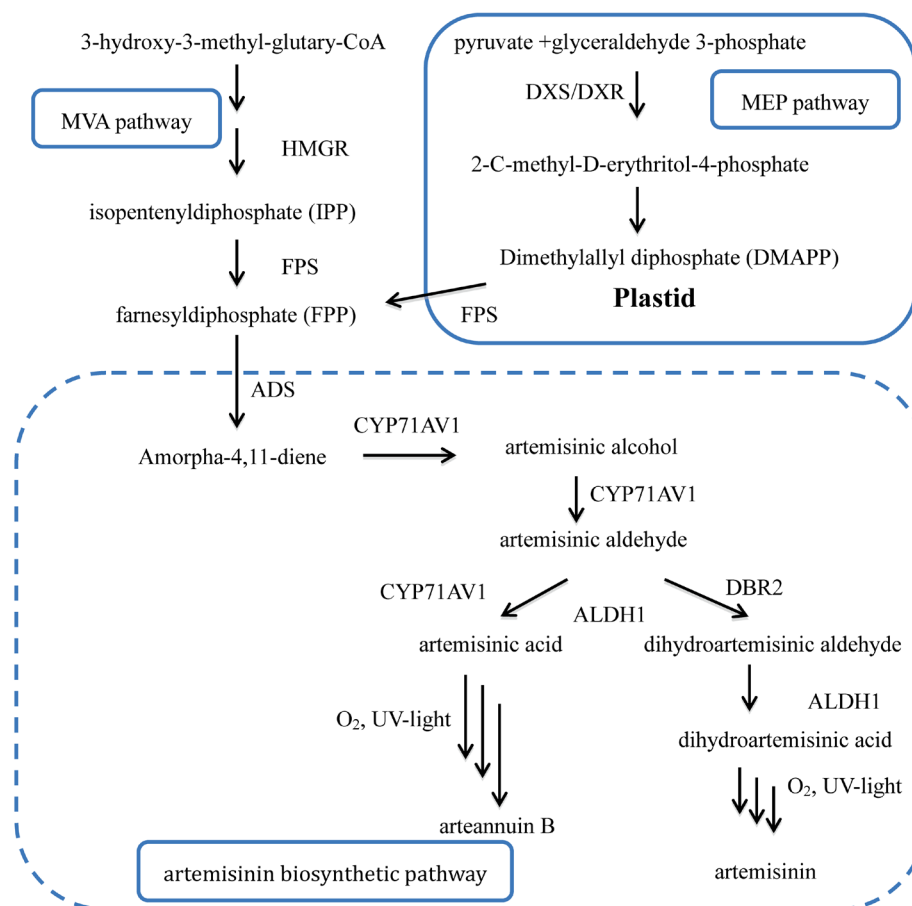


Figure 2. Biosynthetic pathway of artemisinin
图 2. 青蒿素的合成途径

青蒿素在青蒿分泌型腺毛的分泌细胞中合成, 然后积累在分泌型腺毛的蜡质囊腔中[7] [8]。由 FPP 开始进入青蒿素合成特异的代谢途径, 紫穗槐二烯合成酶(ADS)催化 FPP 生成紫穗槐二烯(amorpha-4,11-diene) [9] [10], ADS 基因在青蒿腺毛中特异表达, 是青蒿素生物合成的第一个关键酶基因 [9] [11] [12]。随后, 紫穗槐二烯经过一个细胞色素 P450 的水解酶紫穗槐二烯氧化酶(CYP71AV1)的作用水解为青蒿醇(artemisinic alcohol)并进一步氧化为青蒿醛(artemisinic aldehyde) [13]。青蒿醛双键还原酶 2 (DBR2) [14]和醛脱氢酶 1 (ALDH1) [15]两步酶反应将青蒿醛先转化成二氢青蒿醛(dihydroartemisinic aldehyde), 然后生成青蒿素的最直接前体二氢青蒿酸(dihydroartemisinic acid, DHAA)。与此同时, CYP71AV1 和 ALDH1 也会催化青蒿醛生成青蒿酸(artemisinic acid) [13] [15]。目前研究报道发现, 从 DHAA 到青蒿素(artemisinin), 以及青蒿酸到青蒿素 B (arteannuin B)的转化是不需要酶的光氧化反应[16]-[19]。

3. 青蒿素生物合成途径的关键酶

在青蒿素合成途径探索的过程中, 根据相关酶基因的克隆与功能鉴定, 判定有几个关键酶的作用非常明显。目前, 研究较多的关键酶有: HMG-CoA 还原酶(HMGR), 1-脱氧木酮糖- 5-磷酸还原异构酶(DXR), 法呢基焦磷酸合酶(FPS), 紫穗槐二烯合成酶(ADS), 紫穗槐二烯氧化酶(CYP71AV1), 细胞色素 P450 还原酶(CPR), 青蒿醛双键还原酶(DBR2)和青蒿醛脱氢酶(ALDH1)。下面对这些参与青蒿素合成的关键酶作简单介绍。

3.1. 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶(HMGR)

HMGR 催化 HMG-CoA 形成甲羟戊酸(MVA), 由于该酶促反应不可逆, 所以 HMGR 被认为是 MVA 途径中的限速酶[20]。Chappell 和 Nable 报道, 在烟草悬浮细胞培养物中加入真菌诱导子会导致培养液中倍半萜类物质 capsidiol 的积累, 同时也检测到 HMGR 瞬时峰值的出现[21]。Ram 和 Khan 报道, HMGR 酶活性将限制植物中青蒿素的合成和积累[22]。

3.2. 1-脱氧木酮糖- 5-磷酸还原异构酶(DXR)

在质体中, 合成 IPP 的第一个关键步骤是通过 DXR 酶的作用生成 MEP, 据 Graham 等人构建的青蒿基因图谱, DXR 基因与高水平青蒿素含量紧密相关[3] [23]。为了综合评价 DXR 基因在青蒿素生物合成的作用, 使用 CaMV 35S 强启动子过表达 DXR 基因得到转基因植株, 青蒿素含量比非转基因植株高 1.21~2.35 倍[24]。以上研究表明 DXR 基因对青蒿素生物合成具有调节作用。

3.3. 法呢基焦磷酸合酶(FPS)

FPS 是一种 1,4-异戊二烯基转移酶, 它催化异戊烯基二磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)和二甲烯丙基二磷酸(dimethylallyl diphosphate, DMAPP)通过缩合作用形成牛儿基焦磷酸(Geranylgeranyl pyrophosphate, GPP)以及催化 GPP 和 IPP 缩合形成 FPP。1996 年青蒿的 FPS 基因被首次克隆[21], 该基因编码 343 个氨基酸, 推测编码蛋白的分子量为 39.42 kD, 其氨基酸序列与拟南芥、白羽扁豆和玉米的同源性分别为 76%、84%和 72%; 与鼠、人类的同源性分别为 46%和 45%, 在多聚异戊二烯转移酶中普遍存在的两个保守区域同时也存在于青蒿的 FPS 基因中。在大肠杆菌中表达后, 在体外能检测到 FPS 活性[25]。2000 年 Chen 等在青蒿中过量表达 FPS 基因, 转化植株中青蒿素的含量比对照高 2~3 倍[26]。

3.4. 紫穗槐二烯合成酶(ADS)

ADS 是青蒿素合成途径中另一个重要的酶, 为倍半萜合酶, 催化 FPP 形成青蒿素生物合成的倍半萜中间产物紫穗槐二烯[12]。1999 年, Bouwmeester 等首次从青蒿中分离到青蒿的 ADS, 随后, Mercke 和 Wallaart 的研究小组先后从青蒿中克隆到 ADS 基因, 并在大肠杆菌中表达。青蒿 ADS 基因的 cDNA 全长约 2100 bp, 编码区为 1641 bp, 推测编码 546 个氨基酸, 编码蛋白的分子量为 63.9 kD。Wallaart 等将青蒿的 ADS 转入烟草(烟草不含内源倍半萜合酶), 结果表明, 在烟草中能检测到该酶的表达活性[10]。

3.5. 紫穗槐二烯氧化酶(CYP71AV1)和细胞色素 P450 还原酶(CPR)

CYP71AV1 催化从紫穗槐二烯到青蒿酸的三步氧化反应。2006 年, Teoh 等人首先从青蒿中克隆该基因并进行功能验证。分析 CYP71AV1 基因在青蒿不同组织中的表达, 结果表明它在腺毛中的表达量最高, 其次在花蕾中有中等程度的表达, 在根里面不表达[13]。从植物基因组表达序列标签数据库中检索到 P450 植物基因组表达序列标签, 可以得到两种菊科作物——向日葵和生菜。用 BLAST 分析 P450 基因片段, 可以证明青蒿中的 CYP71AV1 与向日葵和生菜的相比在氨基酸水平有惊人的同源性(85%~88%), 与其它菊科以外的植物家族的同源性低的多。表明 CYP71AV1 在菊科植物中是一种特异的 P450 氧化酶。因此, 菊科植物中 CYP71AV1 为保守的倍半萜内酯合成酶中很好的研究对象。

CPR 是 CYP71AV1 的氧化还原伴侣。2006 年, Ro 等克隆到了 CYP71AV1 基因及其氧化还原伴侣基因 CPR, 他们发现在只转化了 CPR 的酵母中没有检测到青蒿酸, 但在 CYP71AV1 和 CPR 共表达的酵母中, 控制半乳糖诱导的启动子, 检测到的青蒿酸含量达(32 ± 13) mg/L, 青蒿醇的含量不及青蒿酸的 5%, 且完全不生成青蒿醛。证明 CYP71AV1 与它的氧化还原伴侣 CPR 共表达时, 能提高青蒿酸的产量[27]。

3.7. 青蒿醛双键还原酶(DBR2)

DBR2 是 2008 年由 Zhang 等人克隆得到。DBR2 基因长为 1245 bp, 编码 414 氨基酸的蛋白质, 分子质量为 45.6 kD。DBR2 在腺毛的表达量最高, 特异性地作用于青蒿醛。将 DBR2 和青蒿素合成途径中 ADS、CYP71AV1、CPR 四个关键酶基因转化酵母, 在酵母中检测出了二氢青蒿酸[14]。

3.8. 醛脱氢酶基因(ALDH1)

2009 年, Teoh 等从青蒿中克隆得到了一个醛脱氢酶基因, 命名为 ALDH1 [15]。该基因编码区全长为 1497 bp, 编码 498 氨基酸, 分子量为 53.8 kD。ALDH1 在青蒿中的表达方式和青蒿素在植物中的分布很相似。ALDH1 能作用于青蒿醛和二氢青蒿醛, 生成相应的青蒿酸和二氢青蒿酸。

4. 青蒿素生物合成的基因调控

由于青蒿素在植物青蒿中的含量很低, 为了保证青蒿素的稳定供应, 科研人员利用包括传统选育种、调控环境因子、利用微生物合成青蒿素, 以及通过代谢工程改造青蒿植株等方法提高青蒿素的产量。

4.1. 青蒿发根体系的建立对青蒿素生物合成的调控

1994 年, Weathers 等[28]和秦明波、叶和春等[29]几乎同时建立了青蒿的发根培养体系; 随后 1998 年刘本叶等又进一步研究了 Ri 质粒转化青蒿的各种影响因素, 最终确定了最佳的转化条件, 并利用农杆菌介导的转化体系筛选出的高产发根系, 研究不同理化因子对发根生长及青蒿素生物合成的调控[30]。陈大华等人将棉花的(+)- δ -杜松烯合酶(CAD)的 cDNA 插入到植物表达载体中, 通过发根农杆菌 15834 介导转化青蒿, 获得了转基因发根, 青蒿素含量与对照发根相比有所提高, 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 FPS 的表达[31]。

4.2. 青蒿素生物合成途径相关基因对青蒿素生物合成的调控

随着植物基因工程的发展, 转基因技术被广泛地用于作物改良。人们也尝试了用转基因的方法提高青蒿中青蒿素的含量。

1996 年, Vergauwe 等通过 Agrobacterium 感染青蒿叶片, 建立了 Ti 质粒介导的青蒿转化体系[32]; 随后他们又详细研究了各种参数如外植体苗龄、种类、根癌农杆菌菌株类型及二元载体类型等对于青蒿转化的影响, 进一步优化了 Ti 质粒介导的青蒿转化体系[33]。1999 年陈等人将青蒿 FPS 基因转化青蒿, 得到转基因青蒿毛状根和转基因植株发根系中的青蒿素含量提高, 达到 3.01 mg/g(DW), 与对照相比, 青蒿素含量提高 3~4 倍[34]。转 FPS 的再生植株中, 青蒿素含量最高可达 10.08 mg/g(DW), 与野生型相比, 青蒿素含量提高 2~3 倍[26]。因此, 外源基因的导入, 对青蒿转基因材料中倍半萜类物质的生物合成具有明显的调控作用。

研究表明, 使用 CaMV 35S 强启动子过表达长春花(Catharanthus roseus. L) HMGR 基因得到的转基因青蒿, 植株中青蒿素的含量比野生型青蒿中高 22.5%~38.9% [35] [36]。此外, 通过酿酒酵母(S. cerevisia)合成青蒿素的前体青蒿酸的过程中, 青蒿的 HMGR 基因也被证实发挥了重要作用, HMGR 的三拷贝工程酵母明显比单拷贝工程酵母青蒿酸产量多[37]。

Chen 等在在青蒿中导入外源棉花(Gossypium arboretum) FPS 基因, 和非转基因的对照组相比, 青蒿素的含量提高到 2~3 倍[26]。Banyai 和 Han [38] [39]在青蒿中过表达青蒿的 FPS 基因, 青蒿素的含量为野生型的 2~2.5 倍, 并且青蒿素的含量和 FPS 基因的表达量有密切的相关性($R^2 = 0.78, P \leq 0.01$)。Ma 等[40]通过过表达青蒿的 ADS 基因, 得到转基因青蒿中青蒿素、青蒿酸、二氢青蒿酸的含量和对照组相比

分别提高了 82%、65% 和 59%。

为了提高青蒿素的含量，除了过量表达单个青蒿素生物合成途径的关键酶基因，也可以同时过表达两个或者更多的基因。Alam 和 Abdin 在青蒿中过表达长春花的 *HMGR* 基因和青蒿的 *ADS* 基因，得到的转基因植株中，青蒿素含量最高的株系和野生型相比提高了 7.65 倍[41]。Wang 等在青蒿中过表达 *HMGR* 和 *FPS* 基因，和对照组相比，转基因植株青蒿中青蒿素含量为对照组的 2.8 倍[42]。Tang 等人过量表达 *CYP71AV1* 和 *CPR* 基因，得到的转基因青蒿中青蒿素含量最高约为对照的 2.4 倍[43]。Chen 等将 *FPS*、*CYP71AV1* 和 *CPR* 基因同时构建在 pCAMBIA2300 载体上，并使用 CaMV35 启动子，和对照组相比，转基因青蒿的青蒿素含量提高了 3.6 倍[44]。Lu 等通过过表达 *ADS*、*CYP71AV1* 和 *CPR* 基因使青蒿素的含量和对照组相比提高了 2.4 倍(15.1 mg/g DW) [45]。

上述结果表明，过量表达单个或多个青蒿素代谢途径中的关键酶基因可以有效地增加青蒿素的合成。

4.3. 竞争支路的抑制对青蒿素生物合成的调控

在青蒿素合成途径中，FPP 作为紫穗槐二烯的前体，同时也能被其他倍半萜烯合酶通过竞争支路合成倍半萜烯。在与青蒿素生物合成途径的竞争中，角鲨烯合酶(SQS)是催化甾醇生物合成途径的第一个关键酶[46]。Zhang 等将青蒿素合成途径中 *SQS* 基因沉默，抑制萜类合成途径中甾醇的合成，将青蒿素含量提高了 3.14 倍[47]。 β -石竹烯合酶(CPS)是将 FPP 转化成 β -石竹烯的关键酶，也是青蒿素生物合成途径重要的竞争支路[48]。Chen 等通过在青蒿中导入 cDNA 反义链(*asCPS*)来下调 *CPS* 基因。结果和对照组相比，所有转基因青蒿的 β -石竹烯均明显下降 40%~60%，而青蒿素含量在一些转基因株系中提高了 54.9% [49]。

上述结果表明，抑制萜类生物合成途径中影响青蒿素生物合成的竞争支路的生物合成，可以有效地增加青蒿素的合成。

4.4. 诱导子对青蒿素生物合成的调控

最近几年对于诱导子对青蒿素生物合成的调控研究较多，诱导子引起了植物代谢过程的一系列变化，最终使植物产生防卫反应，如关键酶基因的表达量的变化，次生代谢产物的变化以及植物体内活性氧的变化等。2007 年，Waraporn 等用壳聚糖诱导青蒿毛状根，使得毛状根中青蒿素的含量比野生型的高出 6 倍[50]；2009 年 Gao 等人使用水杨酸诱导青蒿植株，青蒿素的含量比对照组高出 54%，并且确定了水杨酸诱导青蒿植株的最优条件[51]。2010 年，Wang 等人利用甲基茉莉酸(MeJA)诱导青蒿植株，检测青蒿素、青蒿酸及二氢青蒿酸的含量分别提高了 49%、80%、28% [52]。Caretto 等人用外源 MeJA 诱导青蒿悬浮细胞，在 30 分钟内产生响应，青蒿素量增加 3 倍[53]。

4.5. 转录因子对青蒿素生物合成的调控

通常植物的转录因子可以调节代谢途径中的一系列基因，过表达植物转录因子也就成为一种很有前景的调控植物次生代谢产物的方法[54]。茉莉酮酸酯转录响应因子 *ORCA3* 已被证实可以调节长春花中超过 5 种萜类吲哚生物碱生物合成途径相关的基因，过表达 *ORCA3* 基因可使长春花中一些萜类吲哚生物碱含量的增加[55]-[57]。

第一个在青蒿中克隆和验证的转录因子 *AaWRKY1* 可以同时结合到 *ADS* 和 *CYP71AV1* 启动子的 W box 上，从而激活青蒿素生物合成途径关键酶基因的表达[58]。Tang 等通过过表达 *AaWRKY1* 使青蒿素含量提高了 3.4 倍，从而达到 24.5 mg/g (DW) [59]。

AaORA 为青蒿中 AP2/ERF 家族中的腺毛特异的转录因子，也被证实可以上调青蒿素生物合成途径的

多个基因。在青蒿中过表达 *AaORA* 可以使青蒿素合成途径关键基因 *ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2* 和转录因子 *AaERF1* 的表达水平均显著升高, 所得转基因植株中青蒿素含量比对照组最多提高了 53% (11.9 mg/g DW)。 *AaERF1* 和 *AaERF2* 为 AP2 类茉莉酸应答的转录因子, 正调控青蒿素的生物合成。在青蒿中过表达 *AaERF1* 或 *AaERF2*, 青蒿素和青蒿酸的含量相应增加; 在青蒿中抑制 *AaERF1* 或者 *AaERF2*, 次生代谢产物的含量则降低[60]。

ADS 基因和 *CYP71AV1* 基因作为青蒿素生物合成的关键基因, 启动子含有 E-box 顺式元件, 是 *bHLH* 转录因子的结合位点。 Ji 等人从青蒿腺毛 cDNA 文库中分离到 *AabHLH1*, 其表达受脱落酸和真菌诱导子壳聚糖的诱导。 *AabHLH1* 能结合 E-box 顺式元件, 将其瞬时转化青蒿叶片能够调控青蒿素合成途径中的关键酶基因。表明 *AabHLH1* 能调控青蒿素的生物合成[61]。

在拟南芥的研究中发现, *MYC2* 转录因子是 JA 信号通路的主要调节器[62]。在青蒿中, JA 诱导青蒿素的生物合成, *AaMYC2* 基因表达快速响应 JA 诱导。 *AaMYC2* 的表达激活 *CYP71AV1* 和 *DBR2* 的转录, 导致青蒿素含量增加。与此相反, *AaMYC2* 的 RNAi 转基因植株中 *AaMYC2* 的表达被抑制, 青蒿素含量降低。同时, 所述 RNAi 转基因青蒿对 MeJA 处理的灵敏度比野生型植物低。 *AaMYC2* 是青蒿素生物合成的正调节因子, 对增加青蒿素的生产遗传工程具有很大的价值[63]。

青蒿素储存在青蒿的腺毛中, 这些腺毛主要分布在青蒿叶、芽和萼片的表面[64] [65], 所以普遍认为在腺毛中特异表达的基因在青蒿素的生物合成中有重要的作用。克隆到的 *AaWRKY1*、*AaORA* 和 *AabHLH* 转录因子都能结合腺毛特异的启动子, 如 *ADS* 和 *CYP71AV1* 基因的启动子[58] [66]。近来, *DBR2* 的启动子也被证实具有腺毛特异性, 一些 *ADS* 和 *CYP71AV1* 启动子上的顺式作用元件同样能在 *DBR2* 的启动子区域找到[67]。至于转录因子能否和 *DBR2* 的启动子结合, 还需要进一步地验证。

总的说来, 过表达青蒿素生物合成途径的关键酶基因, 阻碍竞争合成途径的关键酶基因, 以及过表达转录因子等都是有效提高青蒿中青蒿素含量的方法。

5. 总结与展望

青蒿素是目前最有效的治疗疟疾药物, 作为广谱性天然药物它具有极大的应用和市场潜力。由于无法满足青蒿素的长期稳定和大量的供应, 科学家们通过各种方式试图提高其产量。青蒿素的生物合成是提高青蒿素产量的一个重点研究方向。青蒿作为青蒿素唯一的商业来源, 人们试图通过基因工程途径来提高青蒿中青蒿素的含量, 也取得了一定的成果。

近年来, 青蒿素生物合成代谢途径已被解析, 青蒿素生物合成的限速步骤和关键酶也被阐明。通过导入过量表达的限速酶基因或者抑制青蒿素合成途径中的分支途径, 以及通过基因启动子上的作用元件调控基因的表达可以有效地提高青蒿素的合成。因此, 基因工程手段将成为青蒿素代谢调控的新途径。同时还应加强生物反应器培养设备的研制, 使青蒿素生物合成路线能适应工业化生产, 提高青蒿素生产的能力来增加青蒿素的供给, 为实现工业化生产的应用打下基础。

致 谢

国家高科技研究发展计划(863 项目)“植物代谢生物反应器产品研发(2011AA100605)”项目。

参考文献 (References)

- [1] WHO (2012) World Malaria Report. http://www.who.int/malaria/publications/world_malariareport_2012/en/index.html
- [2] Qinghaosu Coordinating Research Group (1977) A New Sesquiterpene Lactone-Qinghaosu. *Chinese Science Bulletin*, 3, 142.

- [3] Graham, I.A., Besser, K., Blumer, S., *et al.* (2010) The Genetic Map of *Artemisia annua* L. Identifies Loci Affecting Yield of the Antimalarial Drug Artemisinin. *Science*, **327**, 328-331. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1182612>
- [4] Mutabingwa, T.K. (2005) Artemisinin-Based Combination Therapies (ACTS): Best Hope for Malaria Treatment but Inaccessible to the Needy. *Acta Tropica*, **95**, 305-315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.06.009>
- [5] Nguyen, K.T., Arsenault, P.R. and Weathers, P.J. (2011) Trichomes + Roots + ROS = Artemisinin: Regulating Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, **47**, 329-338. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-011-9343-x>
- [6] Schramek, N., Wang, H., Römisch-Margl, W., *et al.* (2010) Artemisinin Biosynthesis in Growing Plants of *Artemisia annua*. A $^{13}\text{CO}_2$ Study. *Phytochemistry*, **71**, 179-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.015>
- [7] Olsson, M.E., Olofsson, L.M., Lindahl, A.-L., *et al.* (2009) Localization of Enzymes of Artemisinin Biosynthesis to the Apical Cells of Glandular Secretory Trichomes of *Artemisia annua* L. *Phytochemistry*, **70**, 1123-1128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.009>
- [8] Duke, M., Paul, R., Elshohly, H., *et al.* (1994) Localization of Artemisinin and Artemisitene in Foliar Tissues of Glanded and Glandless Biotypes of *Artemisia annua* L. *International Journal of Plant Sciences*, **155**, 365-372. <http://dx.doi.org/10.1086/297173>
- [9] Mercke, P., Bengtsson, M., Bouwmeester, H.J., *et al.* (2000) Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Amorpha-4,11-diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **381**, 173-180. <http://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.1962>
- [10] Wallaart, T.E., Bouwmeester, H.J., Hille, J., *et al.* (2001) Amorpha-4,11-diene Synthase: Cloning and Functional Expression of a Key Enzyme in the Biosynthetic Pathway of the Novel Antimalarial Drug Artemisinin. *Planta*, **212**, 460-465. <http://dx.doi.org/10.1007/s004250000428>
- [11] Kim, S.H., Chang, Y.J. and Kim, S.U. (2008) Tissue Specificity and Developmental Pattern of Amorpha-4,11-diene Synthase (ADS) Proved by ADS Promoter-Driven GUS Expression in the Heterologous Plant, *Arabidopsis thaliana*. *Planta Medica*, **74**, 188-193. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1034276>
- [12] Wang, H.Z., Olofsson, L., Lundgren, A., *et al.* (2011) Trichome-Specific Expression of Amorpha-4,11-diene Synthase, a Key Enzyme of Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L., as Reported by a Promoter-GUS Fusion. *American Journal of Plant Sciences*, **2**, 619-628. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2011.24073>
- [13] Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W., *et al.* (2006) *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. *FEBS Letters*, **580**, 1411-1416. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.065>
- [14] Zhang, Y., Teoh, K.H., Reed, D.W., *et al.* (2008) The Molecular Cloning of artemisinic Aldehyde Delta11(13) Reductase and Its Role in Glandular Trichome-Dependent Biosynthesis of Artemisinin in *Artemisia annua*. *The Journal of Biological Chemistry*, **283**, 21501-21508. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M803090200>
- [15] Teoh, K.H., Polichuk, D.R., Reed, D.W. and Covello, P.S. (2009) Molecular Cloning of an Aldehyde Dehydrogenase Implicated in Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua*. *Botany*, **87**, 635-642. <http://dx.doi.org/10.1139/B09-032>
- [16] Lommen, W.J.M., Elzinga, S., Verstappen, F.W.A. and Bouwmeester, H.J. (2007) Artemisinin and Sesquiterpene Precursors in Dead and Green Leaves of *Artemisia annua* L. *Crops. Planta Medica*, **73**, 1133-1139. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-981567>
- [17] Lommen, W.J.M., Schenk, E., Bouwmeester, H.J. and Verstappen, F.W.A. (2006) Trichome Dynamics and Artemisinin Accumulation during Development and Senescence of *Artemisia annua* Leaves. *Planta Medica*, **72**, 336-345. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2005-916202>
- [18] Brown, G.D. and Sy, L.-K. (2004) *In Vivo* Transformations of Dihydroartemisinic Acid in *Artemisia annua* Plants. *Tetrahedron*, **60**, 1139-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2003.11.070>
- [19] Brown, G.D. and Sy, L.-K. (2007) *In Vivo* Transformations of Artemisinic Acid in *Artemisia annua* Plants. *Tetrahedron*, **63**, 9548-9566. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2007.06.062>
- [20] Chappell, J., Wolf, F., Proulx, J., Cuellar, R. and Saunders, C. (1995) Is the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxyl-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase a Rate-Limiting Step for Isoprenoid Biosynthesis in Plants? *Plant Physiology*, **109**, 1337-1343.
- [21] Matsushita, Y., Kang, W.Y. and Charlwood, B.V. (1996) Cloning and Analysis of a cDNA Encoding Farnesyl Diphosphate Synthase from *Artemisia annua*. *Gene*, **172**, 207-209. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00054-6](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(96)00054-6)
- [22] Ram, M., Khan, M.A., Jha, P., *et al.* (2010) HMG-CoA Reductase Limits Artemisinin Biosynthesis and Accumulation in *Artemisia annua* L. *Plants. Acta Physiologiae Plantarum*, **32**, 859-866. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-010-0470-5>
- [23] Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., *et al.* (2002) Expression and Molecular Analysis of the Arabidopsis *DXR* Gene Encoding 1-Deoxy-D-xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase, the First Committed Enzyme of the 2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate Pathway. *Plant Physiology*, **129**, 1581-1591. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.003798>

- [24] Xiang, L.E., Zeng, L.X., Yuan, Y., *et al.* (2012) Enhancement of Artemisinin Biosynthesis by Overexpressing *dxr*, *cyp71av1* and *cpr* in the Plants of *Artemisia annua* L. *Plant Omics Journal*, **5**, 503-507.
- [25] Ashby, M.N. and Edwards, P.A. (1990) Elucidation of the Deficiency in Two Yeast Coenzyme Q Mutants. Characterization of the Structural Gene Encoding Hexaprenyl Pyrophosphate Synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 13157-13164.
- [26] Chen, D.H., Ye, H.C. and Li, G.F. (2000) Expression of a Chimeric Farnesyl Diphosphate Synthase Gene in *Artemisia annua* L. Transgenic Plants via *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. *Plant Science*, **155**, 179-185. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00217-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00217-X)
- [27] Ro, D.K., Paradise, E.M., Ouellet, M., *et al.* (2006) Production of the Antimalarial Drug Precursor Artemisinic Acid in Engineered Yeast. *Nature*, **440**, 940-943. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04640>
- [28] Weathers, P.J., Cheetham, R.D., Follansbee, E. and Teoh, K. (1994) Artemisinin Production by Transformed Roots of *Artemisia annua*. *Biotechnology Letters*, **16**, 1281-1286.
- [29] Qin, M.-B., Li, G.-Z., Yun, Y., Ye, H.-C. and Li, G.-F. (1994) Induction of Hairy Root from *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes* and Its Culture *in Vitro*. *Acta Botanica Sinica*, **36**, 165-170.
- [30] Liu, B.Y., Ye, H.C., Li, G.F., *et al.* (1998) Studies on Dynamics of Growth and Biosynthesis of Artemisinin in Hairy Roots of *Artemisia annua* L. *Chinese Journal of Biotechnology*, **14**, 401-404.
- [31] Chen, D.H., Meng, Y.L., Ye, H.C., Li, G.-F. and Chen, X.-Y. (1998) Culture of Transgenic *Artemisia annua* Hairy Root with Cotton Cadinene Synthase Gene. *Acta Botanica Sinica*, **40**, 711-714.
- [32] Vergauwe, A., Cammaert, R., Vandenberghe, D., *et al.* (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Artemisia annua* L. and Regeneration of Transgenic Plants. *Plant Cell Reports*, **15**, 929-933. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00231590>
- [33] Vergauwe, A., Van Geldre, E., Inzé, D., Van Montagu, M. and Van den Eeckhout, E. (1998) Factors Influencing *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*, **18**, 105-110. <http://dx.doi.org/10.1007/s002990050540>
- [34] Chen, D.H., Liu, C.J., Ye, H.C., *et al.* (1999) Ri-Mediated Transformation of *Artemisia annua* with a Recombinant Farnesyl Diphosphate Synthase Gene for Artemisinin Production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **57**, 157-162. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1006326818509>
- [35] Aquil, S., Husaini, A.M., Abdin, M.Z. and Rather, G.M. (2009) Overexpression of the HMG-CoA Reductase Gene Leads to Enhanced Artemisinin Biosynthesis in Transgenic *Artemisia annua* Plants. *Planta Medica*, **75**, 1453-1458. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1185775>
- [36] Nafis, T., Akmal, M., Ram, M., *et al.* (2011) Enhancement of Artemisinin Content by Constitutive Expression of the HMG-CoA Reductase Gene in High-Yielding Strain of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnology Reports*, **5**, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-010-0156-x>
- [37] Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., *et al.* (2013) High-Level Semi-Synthetic Production of the Potent Antimalarial Artemisinin. *Nature*, **496**, 528-532. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12051>
- [38] Banyai, W., Kirdmanee, C., Mii, M. and Supaibulwatana, K. (2010) Overexpression of Farnesyl Pyrophosphate Synthase (FPS) Gene Affected Artemisinin Content and Growth of *Artemisia annua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **103**, 255-265. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9775-8>
- [39] Han, J.L., Liu, B.Y., Ye, H.C., Wang, H., Li, Z.-Q. and Li, G.-F. (2006) Effects of Overexpression of the Endogenous Farnesyl Diphosphate Synthase on the Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**, 482-487. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00208.x>
- [40] Ma, C., Wang, H., Lu, X., Wang, H., Xu, G. and Liu, B. (2009) Terpenoid Metabolic Profiling Analysis of Transgenic *Artemisia annua* L. by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Metabolomics*, **5**, 497-506. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-009-0170-6>
- [41] Alam, P. and Abdin, M.Z. (2011) Over-Expression of HMG-CoA Reductase and Amorpha-4,11-Diene Synthase Genes in *Artemisia annua* L. and Its Influence on Artemisinin Content. *Plant Cell Reports*, **30**, 1919-1928. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-011-1099-6>
- [42] Wang, Y.Y., Jing, F.Y., Yu, S.Y., *et al.* (2011) Co-Overexpression of the HMGR and FPS Genes Enhances Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**, 3396-3403.
- [43] Jing, F.Y., Zhang, L., Li, M.X. and Tang, K.X. (2008) Overexpressing *cyp71av1* and *cpr* Genes Enhances Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **103**, 64-70.
- [44] Chen, Y., Shen, Q., Wang, Y., *et al.* (2012) The Stacked Over-Expression of FPS, CYP71AV1 and CPR Genes Leads to the Increase of Artemisinin Level in *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnology Reports*, **7**, 287-295. <http://dx.doi.org/10.1007/s11816-012-0262-z>

- [45] Lu, X., Shen, Q., Zhang, L., *et al.* (2013) Promotion of Artemisinin Biosynthesis in Transgenic *Artemisia annua* by Overexpressing *ADS*, *CYP71AV1* and *CPR* Genes. *Industrial Crops and Products*, **49**, 380-385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.045>
- [46] Liu, Y., Ye, H.C., Wang, H. and Li, G.F. (2003) Molecular Cloning, *Escherichia coli* Expression and Genomic Organization of Squalene Synthase Gene from *Artemisia annua*. *Acta Botanica Sinica*, **45**, 608-613.
- [47] Zhang, L., Jing, F.Y., Li, F.P., *et al.* (2009) 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. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **52**, 199-207. <http://dx.doi.org/10.1042/BA20080068>
- [48] Cai, Y., Jia, J.W., Crock, J., Lin, Z.-X., Chen, X.-Y. and Croteau, R. (2002) A cDNA Clone for β -Caryophyllene Synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, **61**, 523-529. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00265-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00265-0)
- [49] Chen, J.L., Fang, H.M., Ji, Y.P., *et al.* (2011) Artemisinin Biosynthesis Enhancement in Transgenic *Artemisia annua* Plants by Downregulation of the β -Caryophyllene Synthase Gene. *Planta Medica*, **77**, 1759-1765. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1271038>
- [50] Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H. and Shoyama, Y. (2007) Improvement of Artemisinin Production by Chitosan in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology Letters*, **29**, 1143-1146. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-007-9368-8>
- [51] Pu, G.-B., Ma, D.-M., Chen, J.-L., *et al.* (2009) Salicylic Acid Activates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Plant Cell Reports*, **28**, 1127-1135. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-009-0713-3>
- [52] Wang, H., Ma, C., Li, Z., *et al.* (2010) Effects of Exogenous Methyl Jasmonate on Artemisinin Biosynthesis and Secondary Metabolites in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, **31**, 214-218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.10.008>
- [53] Caretto, S., Quarta, A., Durante, M., *et al.* (2010) Methyl Jasmonate and Miconazole Differently Affect Artemisinin Production and Gene Expression in *Artemisia annua* Suspension Cultures. *Plant Biology*, **13**, 51-58. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00306.x>
- [54] Verpoorte, R. and Memelink, J. (2002) Engineering Secondary Metabolite Production in Plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 181-187. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00308-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00308-7)
- [55] Van der Fits, L. and Memelink, J. (2000) ORCA3, a Jasmonate-Responsive Transcriptional Regulator of Plant Primary and Secondary Metabolism. *Science*, **289**, 295-297. <http://dx.doi.org/10.1126/science.289.5477.295>
- [56] Van der Fits, L. and Memelink, J. (2001) The Jasmonate-Inducible AP2/ERF-Domain Transcription Factor ORCA3 Activates Gene Expression via Interaction with a Jasmonate-Responsive Promoter Element. *The Plant Journal*, **25**, 43-53.
- [57] Pan, Q.F., Wang, Q., Yuan, F., *et al.* (2012) Overexpression of ORCA3 and G10H in *Catharanthus roseus* Plants Regulated Alkaloid Biosynthesis and Metabolism Revealed by NMR-Metabolomics. *PLoS ONE*, **7**, e43038. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043038>
- [58] Ma, D.M., Pu, G.B., Lei, C.Y., *et al.* (2009) 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. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 2146-2161. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcp149>
- [59] Tang, K.X., Chen, Y.F., Shen, Q., *et al.* (2012) Overexpression *ALDH1* Gene Increased Artemisinin Content in *Artemisia annua* L. Patent CN201210014242.7.
- [60] Lu, X., Zhang, L., Zhang, F., *et al.* (2013) 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*. *New Phytologist*, **198**, 1191-1202. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.12207>
- [61] Ji, Y.P., Xiao, J.W., Shen, Y.L., *et al.* (2014) Cloning and Characterization of AabHLH1, a bHLH Transcription Factor That Positively Regulates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua*. *Plant and Cell Physiology*, **55**, 1592-1604. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcu090>
- [62] Kazan, K. and Manners, J.M. (2013) MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, **6**, 686-703. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sss128>
- [63] Shen, Q., Lu, X., Yan, T.X., *et al.* (2016) The Jasmonate-Responsive AaMYC2 Transcription Factor Positively Regulates Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua*. *New Phytologist*, **210**, 1269-1281. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13874>
- [64] Olofsson, L., Engstrom, A., Lundgren, A. and Brodelius, P.E. (2011) Relative Expression of Genes of Terpene Metabolism in Different Tissues of *Artemisia annua* L. *BMC Plant Biology*, **11**, 45. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-45>
- [65] Olofsson, L., Lundgren, A. and Brodelius, P.E. (2012) Trichome Isolation with and without Fixation Using Laser Mi-

crodissection and Pressure Catapulting Followed by RNA Amplification: Expression of Genes of Terpene Metabolism in Apical and Sub-Apical Trichome Cells of *Artemisia annua* L. *Plant Science*, **183**, 9-13.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.019>

- [66] Yu, Z.-X., Li, J.-X., Yang, C.-Q., Hu, W.-L., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y. (2012) The Jasmonate-Responsive AP2/ERF Transcription Factors AaERF1 and AaERF2 Positively Regulate Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Molecular Plant*, **5**, 353-365. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssr087>
- [67] Jiang, W., Lu, X., Qiu, B., *et al.* (2013) Molecular Cloning and Characterization of a Trichome-Specific Promoter of Artemisinic Aldehyde $\Delta^{11}(13)$ Reductase (DBR2) in *Artemisia annua*. *Plant Molecular Biology Reporter*, **32**, 82-91.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11105-013-0603-2>