

促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备

The Preparation of an Elicitor from a Fungal Endophyte to Enhance Artemisinin Production in Hairy Root Cultures of *Artemisia annua* L.

王剑文^{1*}, 郑丽屏², 谭仁祥^{3*}

WANG Jian-Wen^{1*}, ZHENG Li-Ping² and TAN Ren-Xiang^{3*}

1 苏州大学药学院, 苏州 215123

2 苏州大学园艺系, 苏州 215123

3 南京大学功能生物分子研究所, 南京 210093

1 School of Pharmaceutical Science, Soochow University, Suzhou 2151231, China

2 Department of Horticulture, Soochow University, Suzhou 2151231, China

3 Institute of Functional Biomolecules, Nanjing University, Nanjing 210093, China

摘要 应用酸解法对黄花蒿(*Artemisia annua* L.)内生胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)菌丝体进行提取,在黄花蒿发根培养系统中比较了各制备提取物的青蒿素诱导活性。活性提取物经过 Sephadex G25 层析后,部分纯化的内生菌寡糖提取物(MW < 2500)可显著促进发根青蒿素的合成。培养 23d 的发根经诱导子(0.4mg/mL)处理 4d 后,青蒿素产量可达 13.51mg/L,比同期对照产量提高 51.63%,诱导作用与诱导子浓度、作用时间相关。内生菌寡糖诱导子的制备和使用,在青蒿素生物技术生产研究中为首次应用。

关键词 黄花蒿,内生真菌,胶孢炭疽菌,诱导子,青蒿素

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0829-06

Abstract The different components of crude mycelium of the predominant endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* of *Artemisia annua* have been extracted by the methods of acid hydrolysate. We compared the effect of the isolated components on artemisinin biosynthesis in hairy root cultures. Therefore, the oligosaccharide elicitor from *C. gloeosporioides* has been partially purified by column chromatography of Sephadex G25. The isolated oligosaccharide B II(elicitor, MW < 2500) has been revealed to promote the production of artemisinin in *Artemisia annua* hairy root cultures. When hairy roots of 23-day old cultures (later growth phase) were exposed to the elicitor at 0.4mg/mL for 4 days, the maximum production of artemisinin reached to 13.51mg/L, a 51.63% increase over the control. This is the first report on the stimulation of artemisinin production in hairy roots by the oligosaccharide elicitor from an endophytic fungus of *A. annua*.

Key words *Artemisia annua*, a fungal endophyte, *Colletotrichum gloeosporioides*, oligosaccharide elicitor, artemisinin

Received: April 24, 2006; Accepted: June 22, 2006.

This work was supported by the grants from NSFC (No. 30470191), NSF for Universities in Jiangsu Province (No. 05KJB360120), and MSDF from Soochow University (No. EE132514).

* Corresponding author. Tel: 86-512-61124708, 86-25-83592945; E-mail: jwwang@suda.edu.cn, rxtan@nju.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30470191),江苏省高校自然科学基金项目(No. 05KJB360120)和苏州大学医学发展基金项目(No. EE132514)资助。

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)为菊科蒿属植物,是传统的清热、抗疟中草药。我国科学工作者在1972年从黄花蒿中分离到抗疟新药——青蒿素(artemisinin),青蒿素原料药生产主要依靠我国从黄花蒿中提取,其环节多,耗时费力,且产量受环境和季节的限制。利用生物技术来生产青蒿素是目前青蒿素研究的一个热点,可能成为大规模生产青蒿素的重要手段^[1]。Weathers等(1994)^[2]和秦明波等(1994)^[3]应用发根农杆菌Ri质粒转化青蒿叶片获得发根,并检测到较高含量青蒿素的存在。

在我们的实验中,通过高产发根株系的筛选和液体培养基的初步优化,黄花蒿发根的青蒿素含量已达 0.78mg/g DW ^[4]。但是对于大规模生产的发根培养,仍然存在成本高、产量低的问题。利用生物诱导子,尤其是真菌诱导子促进植物组织次生代谢物合成的研究愈来愈多^[5]。但相关研究主要集中在诱导子的筛选,而关于诱导子的制备方法及其对青蒿素生物合成的诱导活性比较则甚少。而且,由于诱导粗提物的化学性质不确定,使得诱导物与代谢物之间结构与功能的关系研究不透彻,目前只能用尝试的手段筛选诱导物。当前应用较多的是真菌诱导物,而且多为与植物寄主有相关性的病原菌。近年来,植物内生菌在调节植物的抗病虫害及抗逆能力中的作用日益受到关注。在与植物亲密的内共生关系中,令人瞩目的是内生菌(endophytes)对次生代谢物合成的影响^[6]。我们已有的实验结果表明,在发根离体培养中,青蒿素的合成可以被黄花蒿内生炭疽菌诱导子所调节^[4]。本研究为了提高诱导子的诱导活性,研究通过不同制备方法所得到的内生真菌诱导物对青蒿素生物合成的影响,进一步对诱导子进行纯化,优化内生菌诱导子对青蒿素合成调控的处理方法,为青蒿素生物技术生产体系的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 发根培养

以本实验室诱导的黄花蒿发根HR3系为实验材料,发根保存在MS(MS+0.01mg/LGA₃+0.5g/L水解酪蛋白+3%蔗糖)液体培养基中,120~130r/min摇床上液体培养,培养温度为25~27℃,光照时间每天16h,光照度2000lx左右。每2周继代1次。将摇瓶培养10d的发根作为诱导处理实验的接种材料,取2cm左右的发根根尖,接种在含0.01mg/LGA₃、0.5g/L水解酪蛋白和3%蔗糖的MS培养

基中。培养瓶为250mL三角瓶,内盛有50mL液体培养基,每瓶接种量为0.1g鲜重的发根。120~130r/min摇床上液体培养,培养温度、光照条件如上述。

1.2 内生真菌的分离与培养

1.2.1 内生真菌的分离纯化 采集夏季生长旺盛的黄花蒿植株,截取茎秆剪切成小段,先用清水进行初步清洗,然后用10%次氯酸钠浸泡5min;经无菌水漂洗后,酒精消毒30s;最后再经无菌水漂洗干净,备用。用灭菌手术刀片将消毒好的茎段纵剖成两半,放到WA(琼脂15g,水1000mL)平板上,剖面向下,于26℃光照培养箱内培养,并逐日观察记录内生菌生长情况。在WA培养基上观察到菌丝生成后,立即从菌丝尖端进行分离,转接到新鲜PSA(马铃薯200g,蔗糖20g,琼脂18g,水1000mL)平板上。26℃恒温培养,观察并记录菌落生长形态。从青蒿素高产的黄花蒿植株中共分离得到84株内生菌(72株为内生真菌),内生胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)为黄花蒿内生菌优势种,菌种由南京大学生物系邹文欣老师鉴定^[7]。

1.2.2 内生菌摇瓶培养 活化菌种:将胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)接种于PSA平板上活化,26℃培养5d。摇床发酵:培养基为查氏培养基,装液量为每500mL摇瓶装液300mL,接种量为5%~10%。于26℃、140r/min下发酵7d。发酵液的获得:发酵7d后,用单层滤膜过滤,得到菌体,备用。

1.3 内生真菌诱导子的制备、纯化及诱导处理

1.3.1 内生真菌诱导子的制备:

(1)直接酸解法 称取50g湿菌体,匀浆后,加入100mL蒸馏水,用10%(V/V)三氟乙酸调pH为4,沸水浴1h,减压抽滤,取滤液,用蒸馏水定容至100mL,用NaOH调pH为5.8,得到提取液A,冷冻保存。

(2)脱脂脱蛋白酸解法 称取100g湿菌体,60~80℃下烘干,研磨破碎,按1:3(W/V)的比例加入80%乙醇(300mL),在室温下浸泡过夜。减压抽滤,分别收集滤液和滤渣。滤渣按1:3(W/V)加入氯仿和正丁醇的混合液(氯仿:正丁醇=4:1,V/V),60℃下回流6h,减压抽滤,收集滤液。合并乙醇和混合液的滤液(含脂质和蛋白),标为LP。滤渣用丙酮和水冲洗,自然风干,干物质按1:6(W/V)加入10%三氟乙酸,沸水浴酸解1h。水解物过滤,取滤液,用NaOH中和至pH为5.8。在4℃下静置一夜,上清液浓缩,得提取液B。硫酸-蒽酮法测总糖含量,冷冻保存。

(3)有机溶剂脱脂脱蛋白法:称取100g湿菌

体,研磨破碎后,加入 100mL 乙酸乙酯浸泡过夜,以除去表面脂质,减压抽滤。滤渣用丙酮、水洗净晾干。然后室温浸泡于 200mL 0.9% NaCl 溶液中,并用磁力搅拌机搅拌 24h,过滤,得残渣。滤液离心分离(4000r/min)后,浓缩至 25mL,Sevage 方法(氯仿:正丁醇 = 4:1,混和振荡萃取)除蛋白质 5 次以上,直至紫外光谱检测无蛋白质(280nm)和核酸(260nm)等杂质峰为止。浓缩至小体积,加入 3 倍 95% (V/V)的乙醇沉淀多糖,置冰箱中醇析 24h,离心,沉淀溶于适量水,得到提取液,测总糖含量。残渣应用上述方法重复提取 3~5 次,去蛋白质,再次浓缩,合并,得提取液 C,测总糖含量。合并 Sevage 方法得到的蛋白质,标为 P。

(4) 脱脂酸解法:称取 50g 湿菌体,在研钵中匀浆,加入 120mL 乙酸乙酯,室温搅拌 24h。减压抽滤,得到乙酸乙酯抽提液及残渣。抽提液 60℃ 水浴下减压蒸馏,去掉乙酸乙酯,得到油脂,加适量 0.2mol/L NaOH 溶液,沸水浴条件下反应约 0.5h,使其充分皂化。离心(4000r/min),上层即为脂质,标为 G。残渣加入 100mL 蒸馏水。干物质按 1:6 (W/V)加入 10% 三氟乙酸,沸水浴酸解 1h。减压抽滤,取滤液,去沉淀,得提取液 D,测总糖含量。

1.3.2 内生真菌诱导子的部分纯化 实验采用凝胶过滤层析法进行诱导物的纯化。Sephadex G25 柱(2.6cm × 50cm)用蒸馏水平衡后,沿柱内壁滴加诱导物,用蒸馏水洗脱,流速控制在 0.25 ~ 0.35 mL·min⁻¹ 部分收集器收集。硫酸蒽酮法检测糖。绘制洗脱曲线。分别合并洗脱曲线中各峰对应的部分。

1.4 诱导处理

对不同诱导子的作用、诱导子浓度、诱导处理时间和发根培养时间对诱导影响进行了研究。在比较不同诱导子的作用时,各提取物先通过滤膜(孔径为 0.22μm)灭菌,A、B、C、D 粗提物以 0.5mg/mL(总糖含量/培养基)的浓度加入到继代培养 20d 的黄花蒿发根中,含蛋白粗提物 LP、P 的浓度为 50mg/L,含脂质粗提物 G 加入量为 5mg/L。对照处理加入同等体积的重蒸水,处理 3d 后测定发根的生物量和青蒿素含量;在诱导子浓度比较实验中,不同浓度(0 ~ 0.8 mg/mL)的诱导子加入继代培养 20d 的黄花蒿发根中;在诱导子的时间动态中,一定浓度的诱导子加入继代培养 20d 的黄花蒿发根中后,6d 内每隔 1 天分别测定发根的生物量和青蒿素含量;为测定诱导子对不同生长阶段的黄花蒿发根的影响,诱导子在发

根培养的第 11、14、17、20、23、26、29 天加入,经过 4d 处理,测定发根的生物量和青蒿素含量。每处理 10 瓶发根,培养瓶为 250mL 三角瓶,内盛有 50mL 液体培养基,每瓶接种量为 0.1 g 鲜重的发根。120 ~ 130r/min 摇床上液体培养,培养温度、光照条件如本节 1.1 所述,每实验重复 3 次。

1.5 青蒿素的测定

取发根,用吸水纸将发根表面的多余水分吸干,称鲜重。然后将其置于烘箱中 50℃ 烘干 24h,称量干重。黄花蒿发根于 50℃ 烘干,研成细粉,称取 0.500g,加石油醚(30 ~ 60℃)30mL,在超声波浴中提取 30min,过滤,水浴蒸干石油醚。残渣用 2mL 乙醇溶解,3000g 离心 10min,上清液滤入 10mL 容量瓶中,乙醇定容,用于青蒿素的测定。取提取液 200μL 于 10mL 试管中加 800μL 乙醇、4mL 0.2% NaOH 溶液,摇匀。于 50℃ 水浴中反应 30min。流水中冷却至室温后,取出 0.5mL 反应液于 1.5mL 离心管中,加入 100μL 乙醇、400μL 0.16mol/L 醋酸,混匀,3000g 离心 10min,上清液用于测定。按照同样方法制备青蒿素对照品溶液,对照品浓度分别为 0、4、8、12、16、20、24μg/mL,青蒿素对照品由本实验室提取、分离,并经波谱鉴定^[8]。青蒿素测定参照 Zhao S S 和 Zeng M Y(1985)的 HPLC 法^[9]。液相色谱测定条件:色谱柱为 Hypersil BDS C8 柱,150 × 4.6mm,流动相为甲醇/0.01mol/L NaAc/HAc 缓冲液(pH = 7.0)(40:60, V/V),流速为 1.0mL/min。高压液相色谱仪为 Waters 600E HPLC 系统。紫外检测器波长设在 260nm。注射体积 10μL。在上述条件下,青蒿素的出峰时间大约在 10.3min。

2 结果

2.1 内生菌细胞壁粗提物对青蒿素产量的作用

应用直接酸解法、脱脂脱蛋白酸解法、有机溶剂脱脂脱蛋白法和脱脂酸解法对内生菌细胞壁物质进行提取,4 种制备方法所得到的提取物诱导黄花蒿发根中青蒿素积累的作用是各不相同的(图 1)。粗提诱导物 A、B、C 和 D 在 0.5mg/mL 处理浓度下都具有青蒿素诱导活性。在脱脂脱蛋白酸解中,经过 2 次有机溶剂提取,除去油脂、蛋白后再酸解的糖类诱导物 B 可以最大程度地促进青蒿素的合成,青蒿素含量达 0.72mg/g DW,较对照提高了 38.5%。诱导物 B 对青蒿素的诱导增量(0.22mg/g DW)是粗提物(有机溶剂脱脂脱蛋白法提取)诱导增量(0.10mg/g DW)的 2.2 倍。诱导物 B 的成分与有机溶剂脱脂脱

蛋白法得到的 C 相比,不同点在于前者经过酸解。诱导物 B 诱导合成的青蒿素增值分别为诱导物 A (直接酸解法提取)和 D (脱脂酸解法提取)的 1.8 和 1.5 倍。诱导物 B 与脱脂酸解法得到的粗提物 D 相比,蛋白成分被去除,与直接酸解法所得到的粗提物 A 相比,脂质和蛋白成分被去除,说明蛋白和脂质可能干扰多糖提取物对青蒿素生物合成的诱导。图 1 同时显示出:蛋白和脂质粗提物 LP、蛋白 P、脂质 G 不具有诱导活性。

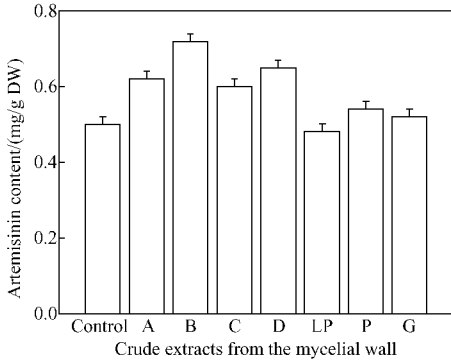


图 1 内生菌粗提物对黄花蒿发根中青蒿素合成的诱导作用

Fig.1 Effects of different elicitors from mycelial wall of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides*

on artemisinin content in hairy roots of *Artemisia annua*

The elicitors at 0.5mg/mL were added to 20-day-old hairy root cultures for 3 d treatment. Control received the same volume of water only. Values are means of triplicate results and error bars show standard deviations.

2.2 诱导物的部分纯化

我们对高活性的粗提物 B 进一步分离诱导子组分,粗提物 B 经过 Sephadex G25 层析柱分离,色谱图明显分为 3 个洗脱部分,第一部分 B I 出现在外水体积内,其余部分 B II、B III 出现在内水体积内(图 2),因此, B I 的分子量大于 2500D, B II、B III 的分子量小于 2500 D。图 3 显示,不同分子量的分离组分诱导青蒿素生物合成的活性是不相同的。与粗提物 B 相比,组分 B I 具有较弱的诱导子活性。组分 B II 在 0.5mg/mL 的浓度下显著地促进青蒿素的生物合成(0.82mg/g DW),说明粗提物 B 的主要有效诱导活性成分是 B II。

2.3 诱导子浓度对黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

在诱导子浓度比较实验中,不同浓度(0 ~ 0.8mg/mL)的 B II 诱导物加入继代培养 20d 的黄花蒿发根中,结果表明,黄花蒿发根中青蒿素的生物合成与诱导子的处理浓度密切相关(图 4)。对照处

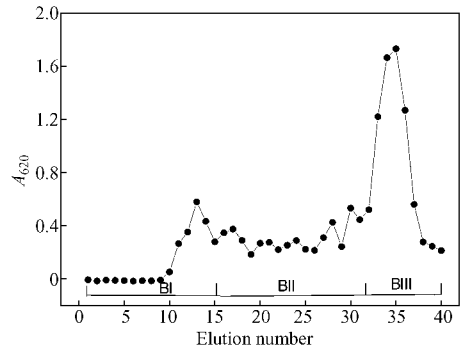


图 2 内生菌胞壁酸解物 B 在 Sephadex G25 柱层析洗脱曲线

Fig.2 Chromatogram of crude elicitor B from *Colletotrichum gloeosporioides* by acid hydrolysate in the column of Sephadex G25

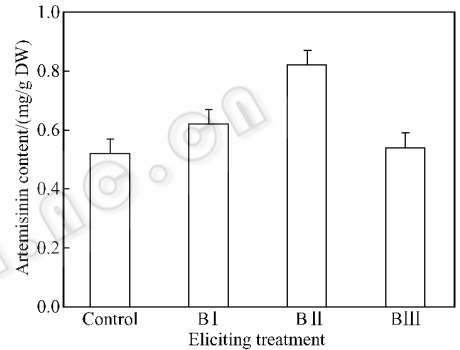


图 3 内生菌胞壁酸解物 B 各组分对黄花蒿发根青蒿素合成的影响

Fig.3 Effects of partially purified components of crude B elicitors (0.5mg/mL) from mycelial wall of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* on artemisinin content in hairy roots of *Artemisia annua* (same procedure as specified in Fig. 1)

理黄花蒿发根中青蒿素含量为 0.54mg/g,在 0.4mg/mL 内生菌诱导子作用下,青蒿素合成达最高值(0.88mg/g),青蒿素含量(9.26mg/L)也明显高于对照(6.25mg/L)。随着诱导子浓度增加,发根干重和青蒿素含量都下降。当诱导子浓度高于 0.7 mg/mL 时黄花蒿发根开始出现褐化。另一方面,内生菌诱导子处理下,黄花蒿发根的生物量都有不同程度的降低,这可能是诱导子促使黄花蒿发根的初级代谢向次生代谢方向转移而造成的结果。0.4mg/mL 内生菌诱导子被作为较适合的诱导浓度。

2.4 诱导子作用时间对黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

在诱导子的作用时间动态研究中,0.4mg/mL 内生菌诱导子 B II 加入继代培养 20d 的黄花蒿发根中后,测定 6d 内发根的生物量和青蒿素含量变化(图

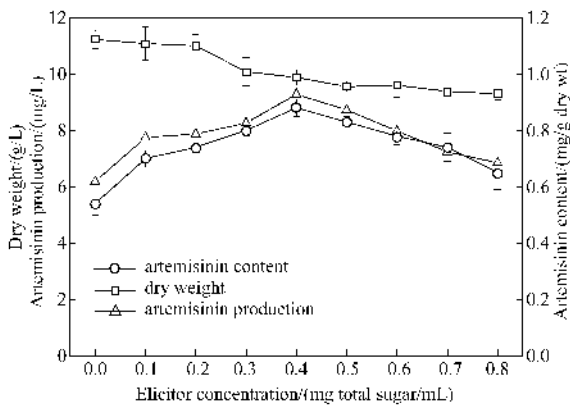


图4 不同浓度诱导子 B II 对黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of the elicitor B II on growth and on artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua* (same procedure as specified in Fig. 1)

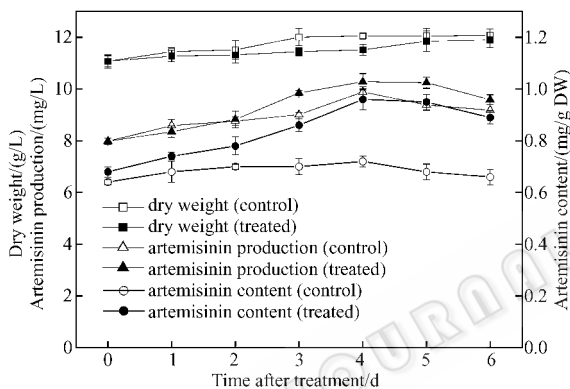


图5 诱导子 B II 作用时间对黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

Fig.5 Time course of growth and artemisinin accumulation in *Artemisia annua* hairy root cultures treated with the elicitor B II

The elicitor was added into 20-day-old hairy root cultures to 0.4mg/L (error bars = SD, $n = 3$).

5)。结果表明,青蒿素积累和诱导子处理时间有一定关系。开始阶段(第1、2天)诱导子处理的黄花蒿发根青蒿素含量分别为0.64mg/g、0.68mg/g,与对照无显著差异。第4天诱导处理的发根青蒿素含量增至最高达0.96mg/g,而同期的对照处理中青蒿素含量为0.72mg/g。随着培养时间的延长,青蒿素含量逐渐下降。液体培养中青蒿素产量的动态和青蒿素含量变化相似。在诱导处理第4天,青蒿素产量达峰值10.28mg/L。

2.5 诱导子对不同生长阶段的黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

在整个黄花蒿发根培养周期内,黄花蒿发根生

长的对数生长期为接种后第5~13天。黄花蒿发根在第1周生长较慢,发根离体后有一定的适应期,主要进行细胞分裂生长。随后发根进入伸长生长为主、生物量急剧增加的对数增长期,然后发根进入分化生长期(第3~4周),第4周后,发根生长缓慢、停止、褐化,进入停滞期。处于不同生长阶段的黄花蒿发根对内生菌诱导子的反应是有差异的。为测定诱导子对不同生长阶段的黄花蒿发根的影响,诱导子在发根培养的第11、14、17、20、23、26、29天加入,经过4天诱导处理,发根的生物量和青蒿素含量测定表明(图6):在不同生长阶段加入诱导子均能刺激青蒿素的合成。处于稳定的分化生长期末期的黄花蒿发根对诱导子 B II 较敏感,在培养第23天后加入

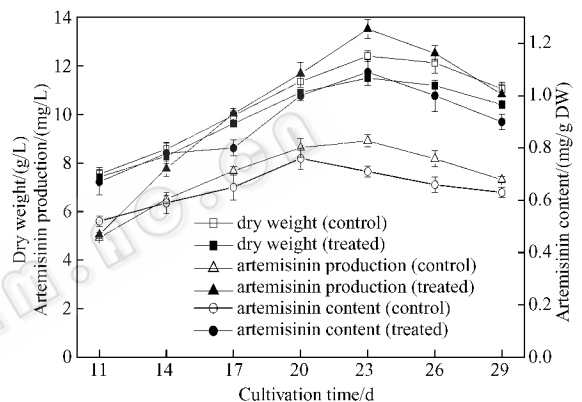


图6 诱导子 B II 对不同生长阶段的黄花蒿发根生长及青蒿素合成的影响

Fig.6 Effects of the age of *Artemisia annua* hairy roots in response to the elicitation

The elicitor B II (0.4mg/mL) was added to hairy root cultures at different growth stages (11th, 14th, 17th, 20th, 23rd, 26th and 29th day after sub-culture) Control received the same volume of water only. Hairy roots were harvested after 4 days of the treatment (error bars = SD, $n = 3$).

0.4mg/mL 诱导子,诱导处理4天后,青蒿素含量可达最高值1.09mg/g,比同期对照提高49.32%。青蒿素产量相应也达峰值13.51mg/L,比同期对照产量高出51.63%。在对数增长期早期或生长停滞期,黄花蒿发根对诱导子较不敏感,青蒿素含量和产量增幅较小。

3 讨论

近年来,具有诱导活性的寡糖类化合物,越来越受到人们的关注^[10]。从宿主植物和微生物两者细胞壁界面上释放的寡糖化合物作为非质体信号,具有激发植物发生防御反应的活性,在植物细胞培养中可作为促进次生代谢物合成的诱导物^[11,12]。青

蒿素不仅对人类健康有重要意义,同时也是具有植物它感(allelopathy)和抗菌作用的植保素类化合物^[13]其合成可被生物诱导子调节^[4,14]。近年来,植物内生菌在调节植物的抗逆能力中的作用日益受到关注,令人瞩目的是内生菌可产生丰富多样的具生物活性的次生代谢产物^[15],但内生菌是否参与宿主植物的次生代谢调控,尚未见相关报道。我们的实验结果表明,在发根离体培养中青蒿素的合成可以被内生菌寡糖诱导子所调节。在植物与病原菌相互作用的过程中,被侵染的植物细胞可产生一些水解酶,如 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶等,使病原菌细胞壁降解,生成寡聚葡萄糖和几丁寡糖等产物,激发植物的抗性反应^[10]。内生菌细胞壁寡糖是否诱发类似的反应,值得进一步探讨。结合本实验室在黄花蒿内生菌次生代谢物上的另一发现,黄花蒿内生菌可以合成植物激素吲哚乙酸和抗菌化合物^[7],我们认为黄花蒿内生菌和宿主植物较强的生态竞争能力与青蒿素的合成有着紧密联系。

酸解法是目前制备真菌诱导子采用的常规方法^[16],我们的结果也证明该方法制备的真菌粗提物具有诱导青蒿素生物合成的活性。但该方法制备的诱导物含有多糖、糖蛋白、蛋白和脂质等多种成分,有可能是造成刺激水平低下、实验重复性差的一个原因。一般认为,提高植物次生代谢物的诱导子的有效诱导成分为多糖和寡糖,糖蛋白、蛋白不具有诱导活性^[10]。兰文智等(2002)报道,酸解法制备的小分子多糖对紫杉醇生物合成具有较好的诱导活性^[17]。寡聚糖可以诱导南方红豆杉(*Taxus chinensis* var. *mairei*)细胞出现凋亡,次生代谢活性增强^[18]。在青蒿素的生物技术研究中,Liu等(1997)^[14]、王红等(2000)^[9]曾应用病原真菌菌丝粗提物诱导黄花蒿发根中青蒿素的积累。为了充分发挥诱导子的诱导活性,我们认为选择合适的诱导子制备方法是必要的。进一步对寡糖诱导子进行纯化和结构鉴定,还可能人工合成寡糖诱导物,这将为利用生物反应器进行黄花蒿发根大规模生产提供更有效的调控方法。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Woerdenbag HJ, Liers JFJ, van Uden W *et al.* Production of the new antimalarial drug artemisinin in shoot cultures of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1993, **32**: 247 - 257
- [2] Weathers PJ, Cheatham RD, Follansbee E *et al.* Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnol Lett*, 1994, **16**: 1281 - 1286
- [3] Qin MB(秦明波), Li GZ(李国珍), Yun Y(云月) *et al.* Induction and *in vitro* cultures of hairy roots of *Artemisia annua* with *Agrobacterium rhizogenes*. *Acta Bot Sinica* (植物学报), 1994, **36** (S): 165 - 170
- [4] Wang JW, Zhang Z, Tan RX. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by the elicitor from the endophytic *Colletotrichum* sp. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**: 857 - 860
- [5] Zhong JJ. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2001, **72**: 1 - 26
- [6] Cheplick GP, Clay K. Acquired chemical defense of grasses: the role of fungal endophytes. *Oikos*, 1988, **52**: 309 - 318
- [7] Lu H, Zou WX, Meng JC *et al.* New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungi in *Artemisia annua*. *Plant Sci*, 2000, **151**: 67 - 73
- [8] Tang HQ, Hu J, Yang L, Tan RX. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med*, 2000, **66**: 391 - 393
- [9] Zhao SS, Zeng MY. Spkctrometrische hochdruck-flüssigkeitschromatographische (HPLC) untersuchungen zur analytik von Quinghaosu. *Planta Med*, 1985, **51**: 233 - 237
- [10] Ryan CA, Farmer EE. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1991, **42**: 651 - 674
- [11] Yamada A, Shibuya N, Kodama O *et al.* Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchito oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**: 405 - 409
- [12] Linden JC, Phisalaphong M. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Sci*, 2000, **158**: 41 - 51
- [13] DiTomaso JM, Duke SO. Is polyamine biosynthesis a possible site of action of cinnemethylin and artemisinin? *Pesticide Biochem Physiol*, 1991, **39**: 158 - 167
- [14] Liu CZ, Wang YC, Ouyang F *et al.* Production of artemisinin by hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnol Lett*, 1997, **19**: 927 - 929
- [15] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001, **18**: 448 - 459
- [16] Xiao CQ(肖春桥), Gao H(高洪), Chi RA(池汝安). Advance in elicitors to stimulate the production of plant secondary metabolites. *R&D Nat Prod* (天然产物的研究与开发), 2004, **16**: 473 - 476
- [17] Lan WZ(兰文智), Yu LJ(余龙江), Li W(李为) *et al.* Selecting preparation methods and isolating components of fungal elicitor to enhance Taxol biosynthesis. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 2002, **20**: 66 - 70
- [18] Li C, Yuan YJ, MA ZH *et al.* Cell apoptosis induced by oligosaccharide in suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Acta Bot Sinica*, 2002, **44**: 598 - 602
- [19] Wang H(王红), Ye HC(叶和春), Li GF(李国凤) *et al.* Effect of fungal elicitors on cell growth and artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua*. *Acata Bot Sin* (植物学报), 2000, **42**: 905 - 909