

黄花蒿发根的生长及部分代谢成分的特征研究

邹婷, 张犇, 陈晶磊, 陈韶华, 王剑文*
(苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123)

[摘要] 目的:研究黄花蒿发根的生长形态和部分次生代谢物特征。方法:比较发根和未转化根的形态差异,测定生长调节剂如萘乙酸(NAA)和赤霉素(GA₃)对根生长的影响,分析了发根和未转化根的部分次生代谢物的含量特征。结果:低浓度NAA(0.01~0.05 mg·L⁻¹)能明显促进发根侧根和次侧根的形成,对未转化根则无显著作用,高浓度NAA(0.1 mg·L⁻¹)抑制发根的生长,而对未转化根的生长起促进作用。未转化根中不含有青蒿素,而在发根中检测到较高含量的青蒿素(0.64 mg·g⁻¹),未转化根中青蒿乙素含量较高(1.24 mg·g⁻¹)。在未转化根和发根中,青蒿黄酮 chrysopenetin 含量相当,而发根中另一种黄酮化合物 artemitin 含量(0.76 mg·g⁻¹)是未转化根的 3.5 倍。结论:黄花蒿发根具有较独特的生长和次生代谢特征。

[关键词] 黄花蒿;发根;生长;次生代谢物;未转化根

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0108-06

Characterization on Growth and Some Secondary Metabolites of *Artemisia annua* Roots

ZOU Ting, ZHANG Ben, CHEN Jing-lei, CHEN Shao-hua, WANG Jian-wen*
(School of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

[Abstract] **Objective:** The characterization on growth and some secondary metabolites of *Artemisia annua* hairy roots were investigated. **Method:** We investigated the effects of plant growth regulators such as NAA and GA₃ on the hairy roots and untransformed roots. The main components of some secondary metabolites were tested in the hairy roots. **Result:** NAA at lower concentration (0.01 - 0.05 mg·L⁻¹) could promote formation of lateral and branch roots and had no effect on untransformed roots. High concentrated NAA (0.1 mg·L⁻¹) inhibited the growth of hairy roots but stimulated the growth of untransformed roots. Artemisinin was not detected in untransformed roots, but at 0.64 mg·g⁻¹ in hairy roots. To the flavonoids in *A. annua*, chrysopenetin was found in both roots, but there was a higher content of arteannuin (0.76 mg·g⁻¹) in hairy roots, 3.5 folds of that in untransformed roots. **Conclusion:** *A. annua* hairy roots have a unique characterization on growth and secondary metabolites.

[Key words] *Artemisia annua*; hairy root; growth; secondary metabolites; untransformed roots

青蒿素(artemisinin, QHS)是一种从中药黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中提取的含过氧桥键的倍半萜内酯,对凶险型疟疾和抗氯喹株的患者疗效显著,且毒

副作用较小。青蒿素主要来源于黄花蒿植株的提取,但是其环节多,耗时费力,且产量受环境和季节的限制,难以满足市场的需求,鉴于此,人们试图通过组织培养技术来解决青蒿素生产问题,其中黄花蒿发根的培养是生物技术解决青蒿素资源的可持续发展途径^[1]。

发根培养与细胞、组织培养相比,具有许多独特的优势:无激素自主性生长、高生物量、次生代谢物高合成生产。这些特点都缘于发根农杆菌 Ri 质粒 (root inducing plasmid) 中转移 DNA (transferred

[收稿日期] 20101119(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772731);江苏省“六大人才高峰”第五批高层次人才项目(B2008048)

[第一作者] 邹婷,硕士研究生,研究方向:中药生物技术

[通讯作者] *王剑文,研究员,博士生导师, Tel: 0512-69561430, E-mail: jwwang@suda.edu.cn

DNA, T-DNA)对植物根细胞基因组的转化整合^[2-3]。在植物内源激素的调控下,植物次生代谢合成具有组织、器官专一性的特点,很多植物的发根在离体培养条件下都表现出独特的次生代谢物的合成能力^[4-5]。目前对黄花蒿发根的研究主要集中在发根液体培养条件的优化上,光照、温度、培养基碳源、pH、激素、摇瓶转速、装液量等对黄花蒿发根生长的影响已有相关报道^[6-9],但有关黄花蒿发根与未转化根的生长形态差异、生长调节物质对其影响和发根次生代谢特征的研究尚不多见。为优化黄花蒿发根培养条件,合理开发黄花蒿发根发根的药用活性成分,本实验通过对离体黄花蒿发根生长的观察,研究了不同植物生长调节物质对发根生长的作用,同时针对发根及未转化的正常根,比较分析了两者次生代谢物(青蒿黄酮及青蒿素、青蒿乙素)特征。

1 材料

PYX-DHS-40X50-S-II型恒温培养箱(太仓市试验设备厂);HZQ-X100型恒温振荡培养箱(上海跃进医疗器械厂);AG电子分析天平(德国Sartorius公司);高压液相色谱仪为Waters 600E HPLC系统,甲醇为色谱纯,对照品由本实验室提取分离并经波谱鉴定。

以发根农杆菌R1601诱导的黄花蒿发根HR3系为实验材料,发根保存在MS固体培养基上(添加3%蔗糖)。发根培养的基本培养基为MS培养基,培养温度25~27℃,光照时间每天16h,光照强度为2000lx左右。在基本培养基中加入0~0.5mg·L⁻¹萘乙酸(NAA)、赤霉素(GA₃)以观察生长调节物质对发根生长的影响。

2 方法

2.1 发根生长状况观察 观察主根、侧根、次侧根的生长和分化情况,记录主(侧)根长、主(侧)根数。主根为直接接种的根,侧根为直接从主根上形成的根,次侧根为直接从侧根上形成的根。离体根接种在直径9cm的培养皿中,每处理5条根,重复6次。

2.2 黄花蒿根系次生代谢物分析

2.2.1 青蒿素、青蒿乙素的提取和测定 黄花蒿正常根或发根于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,3000×g离心10min,上清液滤入10mL量瓶中,乙醇定容,用于青蒿素和青蒿乙素的测定,青蒿

素、青蒿乙素对照品由本实验室提取、分离,并经波谱鉴定^[10]。青蒿素测定参考Zhao和Zeng^[11]的方法并略修改。取提取液200μL于10mL试管中加800μL乙醇、4mL0.2%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无水乙醇、400μL0.16mol·L⁻¹醋酸,混匀,3000×g离心10min,上清液用于高压液相测定。按照同样方法制备用于高压液相分析的青蒿素对照品溶液,对照品质量浓度分别为0,4,8,12,16,20,24mg·L⁻¹。液相色谱测定条件:Hypersil BDS C₈色谱柱(4.6mm×150mm,5μm),流动相甲醇-0.01mol·L⁻¹NaAc/HAc缓冲液(pH7.0)(40:60),流速1.0mL·min⁻¹。高压液相色谱仪为Waters 600E HPLC系统,检测紫外波长260nm,进样量10μL,在上述条件下,青蒿素的出峰时间大约在10.3min。

参照Kawamoto^[12]的方法测定青蒿乙素。取样品乙醇提取液,进行液相色谱测定。流动相为水/0.1mol·L⁻¹H₃PO₄/甲醇(59:1:40)。检测波长220nm,注射体积10μL。在上述条件下,青蒿乙素的出峰时间大约在17.7min。

2.2.2 黄花蒿根系黄酮类化合物 artemetin, chrysopenetin的测定 黄花蒿正常根或发根于50℃烘干,研成细粉,称取0.50g,加50mL甲醇,60℃超声波提取4h,过滤,水浴蒸干甲醇。残渣用1mL甲醇溶解,3000×g离心10min,上清液滤入10mL量瓶中,甲醇定容。RP-HPLC法定量分析^[13],Hypersil BDS C₈色谱柱(3.9mm×150mm,5μm),流动相甲醇-2%醋酸(40:60),流速1.0mL·min⁻¹。高压液相色谱仪为Waters 600E HPLC系统,检测波长254nm,注射体积10μL。准确称取artemetin, chrysopenetin对照品各2.00mg,用甲醇定容至4mL。Artemetin, chrysopenetin对照品由本实验室提取、分离,并经波谱鉴定^[10]。

3 结果与讨论

3.1 黄花蒿发根和正常根生长及形态特征 黄花蒿正常根在离体培养条件下生长缓慢,无侧根发生。而发根离体培养生长快,并伴有分支出现。发根根系在生长形态上表现出多样性。根据发根的生长形态,发根大致分为3类。第1类,发根根尖无顶端优势,侧根形成距根尖1cm左右,侧根着生密度较大,多根毛。侧根发育的先后与位置关系不明显。发根

生长一定时间后,主根与侧根难于区别(图 1a)。第 2 类,初期发根表现出一定的顶端优势,侧根分布于主根的两侧,侧根在距根尖 1~3 cm 处形成,侧根形成的高峰期在培养的第 2 周,主根的生长在第 2 周后开始减缓,顶端优势减弱,此后发根的生长主要是

侧根的生长(图 1b)。第 3 类,发根的侧根只在主根的一侧生长,侧根生长较快,侧根与主根的连接处多根毛(图 1c)。从数量上看,这三类发根分别大约占发根的 50%,20%,30%。相应的生长形态特征在固体培养基上继代培养 3 次仍然不会丧失。



图 1 黄花蒿发根的形态特征

a. 0.01~0.05 mg·L⁻¹ NAA; b. 0.1 mg·L⁻¹ NAA; c. 0.5 mg·L⁻¹ NAA

3.2 植物生长调节剂对离体黄花蒿正常根和发根生长形态的影响 离体发根生长对 NAA 非常敏感,NAA 质量浓度变化强烈影响其生长。第一类发根离体培养 2 周的结果表明,低质量浓度的 NAA(0.01~0.05 mg·L⁻¹)对发根主根的伸长生长表现出一定的抑制作用,对侧根的伸长生长效应不明显,但促进了侧根和次侧根的产生,根系密度增加(表 1,图 2a)。0.1 mg·L⁻¹ NAA 显著抑制了发根的伸长生长、侧根和次侧根的数量,发根粗短、褐化,愈伤化(图 2b)。0.5 mg·L⁻¹ NAA 处理使发根产生大量的愈伤组织,根状组织褐化,坏死(图 2c)。黄花蒿正常根的离体生长必须依赖

NAA,有效促进侧根发生的质量浓度是 0.1 mg·L⁻¹ NAA,在此质量浓度下,其侧根的生长和数量远不如发根,而且在此浓度下生长的正常根在离体培养 2 周后逐渐停止生长,最终死亡。因此,激素自养型、多分支和快速生长可以作为发根农杆菌转化的初步依据。已有报道表明赤霉素能够促进液体培养中发根的生长和青蒿素的产量^[7]。我们用 0.01~0.5 mg·L⁻¹ 赤霉素(GA₃)处理离体黄花蒿发根,结果表明赤霉素对黄花蒿发根的伸长生长稍有促进作用,但抑制侧根和次侧根的形成,所形成的根系纤细(表 1,图 2d)。而赤霉素对黄花蒿正常根的离体生长没有明显效果。

表 1 植物生长调节剂对黄花蒿离体正常根和发根生长的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

调节剂 /mg·L ⁻¹	根类型	主根长度/cm		侧根长度/cm		侧根数量	
		NAA	GA ₃	NAA	GA ₃	NAA	GA ₃
0	发根	7.0±2.2	6.8±1.5	2.5±0.6	2.5±0.8	15.6±4.4	15.2±4.2
	正常根	1.5±1.0	2.0±0.7	0	0	0	0
0.01	发根	6.7±3.2	7.2±2.6	3.0±1.2	1.8±1.2 ¹⁾	18.6±4.8 ¹⁾	12.6±3.6
	正常根	1.5±0.8	1.5±0.8	0	0	0	0
0.05	发根	6.0±3.3	7.4±3.2	1.2±0.4 ²⁾	1.5±0.5 ²⁾	20.2±5.2 ²⁾	10.2±3.2 ²⁾
	正常根	1.4±0.5	1.8±0.5	1.2±0.5	0	1.8±0.5	0
0.10	发根	3.3±1.5 ²⁾	8.2±3.0 ¹⁾	2.2±1.0	1.6±0.8 ¹⁾	12.2±5.2 ¹⁾	10.6±2.8 ²⁾
	正常根	3.8±0.6	1.6±0.8	3.8±1.5	0	3.6±2.2	0
0.5	发根	2.1±1.2 ²⁾	6.5±2.4	2.2±0.6	1.5±0.4 ²⁾	7.8±2.6 ²⁾	10.4±2.5 ²⁾
	正常根	2.4±0.8	1.4±0.8	3.2±1.4	0	3.3±1.5	0

注:与无 NAA 或者 GA₃ 培养基相比¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01,发根培养转接 2 周后测定。

3.3 黄花蒿发根和正常根离体培养时的次生代谢特征 Zhao 和 Zeng^[11]报道了以 0.01 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 缓冲溶液-甲醇(55:45)为流动相,HPLC 测定青蒿素的含量,其方法灵敏、准确,具

有实际价值。我们在实验中发现,用磷酸盐作流动相,易析出结晶堵塞,对层析柱损伤大。Na₂HPO₄·12H₂O 可溶于水(7.7 g/100 mL H₂O),不溶于醇。而 NaAc·3H₂O 在水中的溶解度较大(46.5 g/100

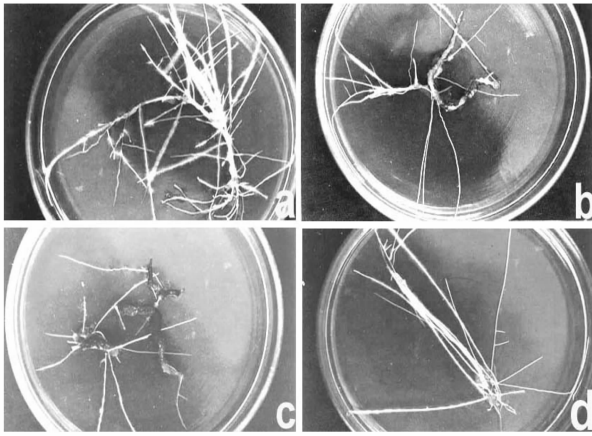


图2 NAA 和 GA₃ 对黄花蒿发根生长的影响

a. 0.05 mg·L⁻¹ NAA; b. 0.10 mg·L⁻¹ NAA;
c. 0.50 mg·L⁻¹ NAA; d. 0.10 mg·L⁻¹ GA₃

mL H₂O), 因此我们把流动相改为甲醇/0.01 mol·L⁻¹ NaAc/HAc 缓冲液 (pH 7.0) (40:60)。通过比较研究, 改换 NaAc/HAc 缓冲液为流动相后, 可解决磷酸盐堵泵和损伤层析柱的问题, 而且得到良好的分离效果(图3)。

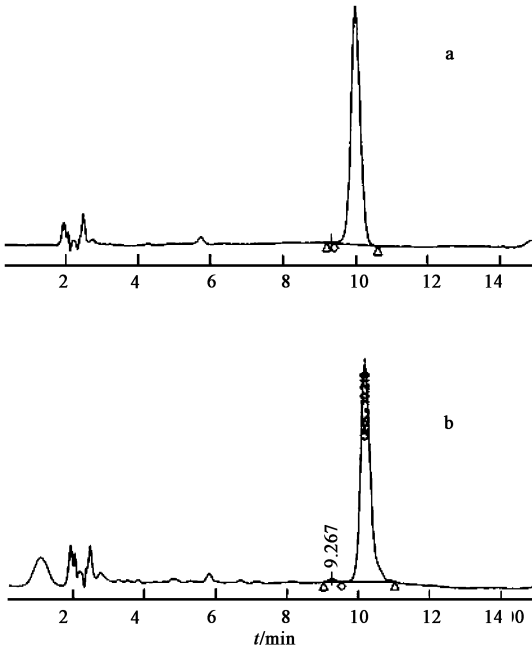


图3 青蒿素对照品和青蒿发根提取物 HPLC

a. 青蒿素对照品; b. 发根提取物

青蒿素在所观察的浓度范围内 (4 ~ 24 mg·L⁻¹), 以峰面积对进样量回归得回归方程 $C = 1.446 \times 10^6 X + 8.115 \times 10^2$, $R^2 = 0.9992 (n = 4)$, 青蒿素浓度与峰面积呈良好的线性关系。经精密密度实验, 测得相对标准偏差 RSD 1.24% ($n = 6$)。在称

取的发根样品中混入 1.00 mg 青蒿素对照品, 按样品测定方法操作, 黄花蒿发根中的青蒿素回收率为 97.64%。用此方法测定了黄花蒿未转化根和发根中的青蒿素含量, 结果表明: 在未转化根中, 没有检测到青蒿素。而在发根中却检测到较高含量的青蒿素 (0.68 mg·g⁻¹ DW) (表 2)。按照 Kawamoto^[12] 的方法对黄花蒿根系中的青蒿乙素进行分析(图 4), 在未转化根中, 青蒿乙素含量较高, 达 1.24 mg·g⁻¹ DW, 而在发根中只检测到较低含量的青蒿乙素 (0.48 mg·g⁻¹ DW)。

表 2 黄花蒿未转化根和发根中青蒿素、青蒿乙素及 artemitin, chrysopenetin 的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

部位	mg·g ⁻¹ DW			
	青蒿素	青蒿乙素	artemitin	chrysopenetin
未转化根	0	1.24 ± 0.38	0.22 ± 0.12	0.81 ± 0.48
毛根	0.64 ± 0.15	0.48 ± 0.14	0.76 ± 0.25	0.78 ± 0.34

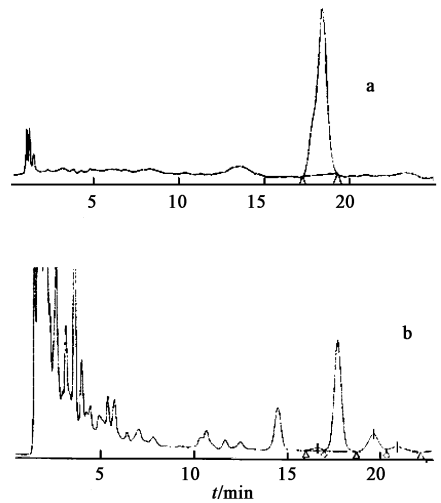


图4 青蒿乙素对照品和青蒿发根提取物 HPLC

a. 青蒿乙素对照品; b. 发根提取物

同时分析了黄花蒿发根和正常根中黄酮化合物 artemitin 和 chrysopenetin 的含量变化, 结果表明(图 5, 表 2): 在未转化根和发根中, chrysopenetin 含量接近, 而发根中 artemitin 含量明显高于未转化根。从高效液相色谱图中还可看出, 黄花蒿发根和正常根中其他化合物的色谱峰也不完全相同。

4 结论

黄花蒿发根生长和形态的差异与发根农杆菌 Ri 质粒 T-DNA 插入片段的位点、长短、拷贝数等有关。Vilaine 等^[14] 曾报道 Ri T-DNA 不同形式的转化, 使得烟草、胡萝卜等植物的发根生长形态多样

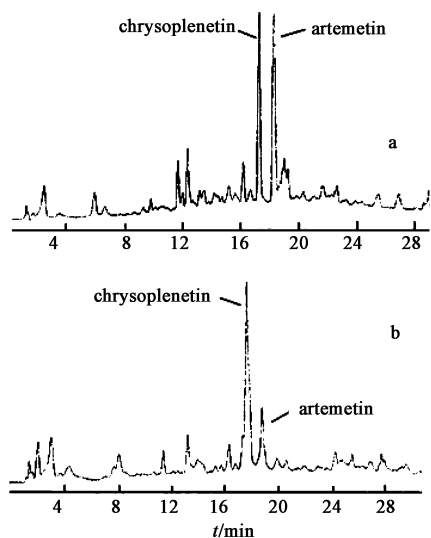


图 5 黄花蒿未转化根及发根中黄酮 HPLC
a. 未转化根; b. 发根

化。发根能产生大量侧根,其顶端优势比相应的正常根要弱,这可能与发根中整合的 T_L-DNA 上的 rolB 基因有关,该基因编码生长素糖苷水解酶,使发根中的游离态生长素含量提高^[15]。在我们的实验中发现,低质量浓度 NAA(0.01 ~ 0.05 mg·L⁻¹)能明显促进黄花蒿发根侧根和次侧根的形成,对正常根则无显著作用。高质量浓度 NAA(0.1 ~ 0.5 mg·L⁻¹)抑制发根的生长,而对正常根的生长起促进作用,但即使如此,未转化根的主根生长和侧根数量仍不及发根。在高浓度的生长素作用下,未转化根培养时间稍长就褐化死亡。因而,生长素含量和敏感性是导致发根和正常根差异的原因之一^[16]。另一方面,赤霉素对离体黄花蒿发根的生长、形态影响与其在 *Datura innoxia*、百脉根 *Lotus corniculatus* 离体发根上的作用相似,均使发根纤细、侧根减少^[17-18]。

很多植物次生代谢合成具有组织、器官的专一性。细胞悬浮系是一个细胞旺盛分裂的系统,与分化相关的次生代谢物含量往往很低,甚至没有。黄花蒿愈伤组织培养和细胞培养都曾有过研究报道,但由于细胞处于未分化状态,青蒿素含量为无或痕量,表明青蒿素的合成先决条件是组织分化^[19-21]。很多植物的发根在离体培养条件下都表现出原植株次生代谢的合成能力。长春花发根的长春花碱含量是细胞悬浮系的 1 000 多倍^[22]。柴胡 *Bupleurum falcutum* 发根中能大量合成皂苷,而愈伤组织不能合成^[4]。在本试验中发现黄花蒿未转化根中不含有青蒿素,而在发根中检测到较高含量的青蒿素;在未

转化根中青蒿乙素含量较高,而在发根中却检测到较低含量的青蒿乙素(0.48 mg·g⁻¹ DW)。这说明发根与正常的未转化根在次生代谢物合成上是有差异的。Nair 和 Basile^[23]在黄花蒿叶匀浆中加入不同缓冲溶剂,比较了不同地区、不同生长期的黄花蒿叶材料,成功地以青蒿乙素合成了青蒿素,并且提出了这一前体物质的生物转化途径,解释了转化中青蒿素过氧基团及特征七圆环的形成过程,并证明了黄花蒿原栽培地气候、土壤环境都影响叶片匀浆的转化效率。我们的实验结果表明:发根培养体系可用于阐明青蒿乙素向青蒿素的转化。我们的实验中,黄酮化合物 artemitin 和 chrysoplenetin 在黄花蒿发根和正常根中都存在, chrysoplenetin 含量接近,而发根中 artemitin 含量明显高于未转化根。Liu 等^[24]报道黄花蒿野生植株与细胞培养提取物中的黄酮化合物从成分和含量上都不相同。从高效液相色谱图中还可看出,黄花蒿发根和正常根中其他化合物的色谱峰不完全相同。发根中 Ri-质粒 T-DNA 对植物基因组的随机插入有可能引起宿主基因组发生突变,从而导致新化合物的产生。近年来,不断有从发根中分离出新型化合物的报道,如人参发根中的多炔类化合物^[25]、紫草发根中的苯醌^[26]和 *Glycyrrhiza glabra* 发根中的新黄酮化合物^[27]。Ri 质粒转化的植物发根培养可以为合成多类型的药用先导化合物提供有效的生物资源。

[参考文献]

- [1] Shanks J V, Morgan J. Plant 'Hairy root' culture[J]. Curr Opin Biotech, 1999, 10: 151.
- [2] Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, et al. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype [J]. Mol Gen Genet, 1987, 209: 475.
- [3] Capone I, Cardarelli M, Mariotti D, et al. Different promoter regions control level and tissue specificity of expression of *Agrobacterium rhizogenes* rolB gene in plants[J]. Plant Mol Biol, 1991, 16: 427.
- [4] Ahn J C, Pacek Y M, Sung C K, et al. Production of saponin by hairy root culture of *Bupleurum falcutum* L: I. Comparison of saponin content and pattern in callus, adventitious root, hairy root and cultivated root[J]. Kor J Bot, 1993, 36: 43.
- [5] Bhadra R, Vanis S, Shanks J V. Production of indole alkaloids by selected hairy root line of *Catharanthus*

- roseus[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41: 581.
- [6] Weathers P J, Cheetham R D, Follansbee E, et al. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*[J]. *Biotechnol Lett*, 1994, 16: 1281.
- [7] 蔡国琴,李国珍,叶和春,等. Ri 质粒转化的青蒿发根培养及青蒿素的生物合成[J]. *生物工程学报*, 1995, 11: 315.
- [8] 刘春朝,王玉春,欧阳藩,等. 青蒿毛状根合成青蒿素的培养条件研究[J]. *植物学报*, 1998, 40 (9): 831.
- [9] Wyslouzil B E, Waterbury R G, Weathers P J. The growth of single roots of *Artemisia annua* in nutrient mist reactors[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70 (2): 143.
- [10] Tang H Q, Hu J, Yang L, et al. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species [J]. *Planta Med*, 2000, 66: 391.
- [11] Zhao S S, Zeng M Y. Spkectrometrische hochdruck-flüssigkeits-chromatographische (HPLC) unter suchungen zur analytik von Quinghaosu [J]. *Planta Med*, 1985, 51: 233.
- [12] Kawamoto H, Sekine H, Furuya T. Production of artemisinin and related sesquiterpenes in Japanese *Artemisia annua* during a vegetation period [J]. *Planta Med*, 1999, 65: 88.
- [13] 赵德修,汪沂,赵敬芳. 不同理化因子对雪莲培养细胞中黄酮类形成的影响[J]. *生物工程学报*, 1998, 14: 259.
- [14] Vilaine F, Casse-Delbart F. Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri plasmid fo agropine type *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 206: 17.
- [15] Di Cola A, Costamini P, Spano L. Cell commitment and rolB gene expression in the induction of root differentiation[J]. *Plant Cell Tiss and Org Cult*, 1996, 46: 203.
- [16] Arroo R R J, Develi A, Meijers H. Effects of exogenous auxin on root morphology and secondary metabolism in *Tagetes patula* hairy root cultures [J]. *Physiol Plant*, 1995, 93: 233.
- [17] Ohkawa H, Kamada H, Suodo H, et al. Effects of GA₃ on hairy root growth in *Datura innoxia* [J]. *J Plant Physiol*, 1989, 134: 633.
- [18] Robbins M P, Hartnoll J, Morris P. Phenylpropanoid defense response in transgenic root cultures of *Lotus corniculatus*. 1. Glutathione elicitation of isoflavan phytoalexins in transformed root cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 59.
- [19] Kudakasseril G J, Lam L, Staba E. Effect of sterol inhibitors on the incorporation of ¹⁴C-isopentenyl pyrophosphate into artemisinin by a cell-free system from *Artemisia annua* tissue cultures and plants [J]. *Plant Med*, 1987, 53: 280.
- [20] Fulzele D P, Sipahimalani A T, Heble M R. Tissue cultures of *Artemisia annua*: organogenesis and artemisinin production [J]. *Phytother Res*, 1991, 5: 149.
- [21] Woerdenbag H J, Pras N, VanUden W, et al. High peroxidase activity in cell cultures of *Artemisia annua* with minute artemisnin contents [J]. *Nat Prod Lett*, 1992, 1: 121.
- [22] Bhadra R, Vanis S, Shanks J V. Production of indole alkaloids by selected hairy root line of *Catharanthus roseus*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41: 581.
- [23] Nair M S R, Basile D V. Bioconversion of artemisinin B to artemisinin[J]. *J Nat Prod*, 1993, 56: 1559.
- [24] Liu KC-SC, Yang S L, Roberts M F, et al. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 1992, 11: 637.
- [25] Kwon B M, Ro S H, Kim M K, et al. Polyacetylene analogs isolated from hairy roots of *Panax ginseng*, inhibit acyl-CoA-cholesterol [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 552.
- [26] Fukui H, Hasan A F M F, Ueoka T, et al. Formation and secretion of a new brown benzoquinone by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47: 1037.
- [27] Asada Y, Li W, Yoshikawa T. Isoprenylated flavonoids from hairy root cultures of *Glychrrhia glabra* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47: 389.

[责任编辑 邹晓翠]