

文章编号:2095-6134(2015)04-0476-06

油菜素内酯促进药用植物青蒿中青蒿素的生物合成^{*}

池剑亭, 申亚琳, 舒位恒, 王 红[†]

(中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049)

(2014 年 8 月 15 日收稿; 2014 年 11 月 20 日收修稿稿)

Chi J T, Shen Y L, Shu W H, et al. Artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. promoted by brassinosteroid[J]. Journal of University of Chinese Academy of Sciences, 2015,32(4):476-481.

摘 要 油菜素内酯是一种植物生长调节剂,它对启动子序列中含有 E-box(CANNTG)元件的基因具有明显的调控作用.青蒿素生物合成的关键基因 *ADS*、*DBR2* 和 *CYP71AV1* 启动子中均含有此序列元件.研究油菜素内酯处理对青蒿中青蒿素生物合成的影响.结果表明,80 μmol/L 的油菜素内酯是处理的最适浓度;80 μmol/L 油菜素内酯处理 4 d 后青蒿素含量比对照增加 1 倍多,在该处理条件下青蒿素生物合成的关键基因 *ADS*、*CYP71AV1* 和 *DBR2* 的表达均被上调.本研究的结果表明,油菜素内酯通过促进青蒿素生物合成关键基因的表达而增加青蒿素的合成.这一研究结果对生产上提高青蒿素含量具有一定参考价值.

关键词 青蒿;青蒿素;基因表达;油菜素内酯

中图分类号:TQ464 文献标志码:A doi:10.7523/j.issn.2095-6134.2015.04.008

Artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. promoted by brassinosteroid

CHI Jianting, SHEN Yalin, SHU Weiheng, WANG Hong

(College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract As a plant growth regulator, brassinosteroid is able to activate the expression of the genes in their promoter sequences containing E-box (CANNTG) cis-element. Since the key enzyme genes of artemisinin biosynthesis pathway, including *ADS* (amorpha-4, 11-diene synthase), *DBR2* (artemisinic aldehyde Δ11(13) reductase), and *CYP71AV1* (cytochrome P450 monooxygenase), all contain this element, the effect of brassinosteroid on artemisinin biosynthesis is investigated. Our results show that 80 μmol/L of brassinosteroid is the optimal concentration for foliar application of *Artemisia annua* L.; the artemisinin content increases by more than 100% compared to that of the control after 80 μmol/L brassinosteroid treatment for 4 days; and the expressions of artemisinin biosynthesis-related genes *ADS*, *CYP71AV1*, and *DBR2* are all up-regulated after treatment. The above results indicate that brassinosteroid promotes the biosynthesis of artemisinin by up-regulating

^{*} 国家自然科学基金(61379081)资助
[†] 通信作者, E-mail:hwang@ucas.ac.cn

the expression of the key genes involved in artemisinin biosynthesis, which could be used as a possible way to increase artemisinin production of medicinal plant *A. annua*.

Key words *Artemisia annua* L.; artemisinin; gene expression; brassinosteroid

青蒿素 (artemisinin) 是中国学者在 20 世纪 70 年代初从药用植物青蒿 (*Artemisia annua* L.) 中分离得到的抗疟有效单体,同时也是 ACTs 疗法 (artemisinin-based combination therapys) 的基础药物. 目前世界上青蒿素类药物的生产主要是从药用植物黄花蒿中提取,而药用植物青蒿中青蒿素的含量一般较低 (约占干重的 0.01% ~ 0.8%),且提取环节多、费时费力,使青蒿素的生产成本高、产量低,难以满足市场需求,所以如何提高药用植物青蒿中青蒿素的含量成为关键^[1-2]. 青蒿素是一种含有过氧基团的倍半萜内酯化合物,其生物合成途径属于植物类异戊二烯代谢的倍半萜分支途径. 近年来,青蒿素的生物合成途径研究取得了很大的进展,其生物合成途径中的一些关键酶基因,如紫穗槐二烯合酶 (amorpho-4,11-diene synthase, *ADS*) 基因^[3],细胞色素 P450 单加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenase, *CYP71AV1*) 基因^[4],青蒿醛 $\Delta 11$ (13) 还原酶 (artemisinic aldehyde $\Delta 11$ (13) reductase, *DBR2*) 基因^[5]等已被克隆和鉴定,这为青蒿素的代谢工程及青蒿素生物合成调控的研究奠定了基础. 因青蒿素只在药用植物青蒿的花及叶片表面的腺毛中合成^[6-7],且其含量较低,故而利用代谢工程结合化学工艺最终合成青蒿素的方法受到青睐^[8-9]. 近年来,通过基因工程的方法提高药用植物青蒿中的青蒿素含量也取得一些进展. 2009 年, Zhang 等^[10]将反义鲨烯合酶基因 (*SQS*) 转入药用植物青蒿中,转基因株系中的青蒿素含量增加了 3.14 倍. 2011 年, Alam 和 Abidin^[11]将 *HMGR* 与 *ADS* 同时转入药用植物青蒿中,得到青蒿素含量提高 7.14 倍的转基因株系.

青蒿素作为植物体内的一种萜类次生代谢产物,在激素及胁迫环境下其合成也受影响. 2005 年, Zhang 等^[12]报道,外源赤霉素处理药用植物青蒿后及药用植物青蒿花芽形成过程中,都伴有青蒿酸向青蒿素的转变,同时内源赤霉素的含量也是在花芽完全形成后达到最高. Kapoor 等^[13]发现球囊霉菌可诱发药用植物青蒿叶表面腺毛密度

的增加,同时对青蒿素含量的增加有明显作用. Wang 等^[14]发现茉莉酸甲酯处理后青蒿素的含量增加 50%,青蒿酸的含量增加 80%,二氢青蒿酸的含量增加 28%. Pu 等^[15]用 1 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸处理青蒿幼苗后,上调了青蒿素生物合成相关基因的表达;同时也加快了二氢青蒿酸向青蒿素的转变. Liu 等^[16]报道,药用植物青蒿在机械损伤 4 h 后,青蒿素的含量增加近 50%,且青蒿素生物合成的关键基因都得到瞬时的诱导表达. Jing 等^[17]用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 处理药用植物青蒿后发现,青蒿素的含量增加了 65%, *HMGR*、*FPS*、*CYP71AV1* 等基因均被诱导表达. Lei 等^[18]发现对药用植物青蒿叶片喷施 100 mg/L 的壳聚糖后,二氢青蒿酸含量增加 72%,青蒿素含量增加 53%, *ADS* 和 *DBR2* 被诱导表达,同时叶片中过氧化氢和活性氧的含量分别增加 1.4 和 3 倍.

油菜素内酯作为第 6 大类植物激素,在植物生长发育过程中的作用,已得到越来越多的实验证实,尤其在细胞伸长,维管发育,胁迫反应,以及光形态建成等生理过程中具有重要作用^[19-22]. 不同于动物甾醇类激素直接作用于细胞核内受体因子激活目标基因的方式^[23],油菜素内酯通过细胞膜 *BRI1* 受体上膜外的亮氨酸重复区传递信号^[24-25];在细胞内有包括 *BES1*、*BZR1/2* 及 *BIM1* 等一系列的蛋白共同参与油菜素内酯信号转导^[26-27]. 当 *BRI1* 被激活后, *BES1* 与含有 bHLH 结构域的 *BIM1* 结合,并同时与启动子中含有 E-box (CANNTG) 元件的基因结合,进而激活一系列相关基因的表达^[2-31]. 青蒿素生物合成的关键酶基因 *ADS*、*DBR2* 及 *CYP71AV1* 的启动子序列中均含有 E-box 元件,而油菜素内酯对这类基因的表达有调控作用^[32],因此我们采用叶片喷施的方法,研究了油菜素内酯对青蒿素生物合成的调控.

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

油菜素内酯,青蒿素标准品购自 Inalco 公司. 甲醇、醋酸、乙醇 (分析级) 购自科创汇达公司. 植物材料为来自四川省的药用植物青蒿 001 株系的

种子. RNA 提取试剂盒 (RNA simple total RNA kit, 总 RNA 提取试剂盒) 购自天根生物公司, 反转录试剂盒 (one step g-DNA removal and cDNA synthase supermix) 购自金式金生物公司, 荧光定量 PCR 试剂盒 (GoTaq® qPCR Master Mix) 购自 Promega 生物公司.

1.2 植物材料准备与处理

药用植物青蒿种子用 70% 的酒精清洗 2 min 后, 5% 次氯酸钠处理 10 ~ 15 min, 用灭菌水洗掉多余的次氯酸钠后, 将药用植物青蒿种子播种在 MS 植物培养基中. 2 周后将培养基中萌发的幼苗转到草木灰和蛭石按 1: 1 的比例混好的花盆中, 5 周后选择生长状态均一的幼苗 (组培及温室的条件均为光照 3 000 lx, 16 h 白天/8 h 黑夜), 用不同浓度 (5、10、80、100 和 200 μmol/L) 的油素内酯分别处理药用植物青蒿, 设置一个空白对照 (蒸馏水) 和一个 CK 溶剂 (2% 乙醇) 对照, 每个处理设 6 个重复, 处理时间为 10 d. 因为油素内酯不溶于水, 先将其溶于少量乙醇中配成 100 mmol/L 的母液, 然后分别吸取不同体积的母液溶于 100 mL 蒸馏水中, 配成 5、10、80、100 和 200 μmol/L 5 个不同浓度的油素内酯溶液, 叶面喷施处理药用植物青蒿, 每天处理一次, 处理量以处理液完全覆盖植株叶片为准.

1.3 样品的提取及 HPLC 分析油素内酯处理后青蒿叶片中青蒿素的含量

参考 Zhao 等^[33]的方法测定药用植物青蒿中的青蒿素含量. 采集的药用植物青蒿叶片于 45 ℃ 烘箱中烘干至恒重后研成粉末, 准确称取 100 mg 粉末, 40 mL 石油醚 (沸点 30 ~ 60 ℃) 浸提过夜; 次日超声波处理浸提液 2 ~ 4 min, 于旋转蒸发仪蒸干石油醚后, 用 10 mL 甲醇溶解残余物, 然后 12 000 r/min 离心 5 min 除去不溶物, 收集上清液

即青蒿素提取液. 取 1 mL 青蒿素提取液加入到 4 mL 0.2% 的 NaOH 中, 混匀后 50 ℃ 水浴 30 min, 待反应液冷却至室温后再加入 5 mL 0.05 mol/L 醋酸溶液, 充分混匀, 经 0.45 μm 的 NC 膜过滤后, 上柱进行 HPLC 分析. HPLC (Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪) 检测条件: 3.9 × 150 mm C18 反相柱, 流动相为 0.01 mol/L pH 7.0 磷酸钠缓冲液: 甲醇 (50: 50), 流速 1 mL/min, UV 检测波长为 260 nm, 上柱体积为 20 μL, 青蒿素的保留时间接近 4 min. 使用 Agilent Masshunter 对色谱峰进行积分, 以青蒿素标准品绘制标准曲线, 计算不同样品中的青蒿素含量.

1.4 实时荧光定量 RT-PCR 分析青蒿素生物合成相关基因的表达

油素内酯处理后取适量的植物组织用于提取 RNA, 分析青蒿素生物合成相关基因的表达. 使用 RNA simple total RNA kit 提取中药青蒿总 RNA, 使用 one step g-DNA removal and cDNA synthase supermix (TransGen Biotech) 反转录得到 cDNA 后用于基因表达分析. 使用 beacon designer 7.0 (Premier Biosoft, India) 设计引物, 各基因引物序列如表 1.

使用 Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪 (Stratagene, USA) 进行相关基因的表达分析. 荧光定量 PCR 的反应体系为 10 μL: cDNA 1 μL, 上下游引物各 1 μL, Reference dye 0.4 μL, GoTaq® qPCR Master Mix 5 μL, ddH₂O 补足至 10 μL. 反应参数如下: 95 ℃ 4 min; 95 ℃ 15 s, 56 ~ 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 20 s; 35 个循环, 之后进行 dsDNA 溶解曲线分析以检测反应特异性. 每个基因 3 个重复. 反应结束后, 用 Stratagene 相对定量分析软件对获得的信号数据进行处理, 分析相对表达量.

表 1 基因表达分析所用引物

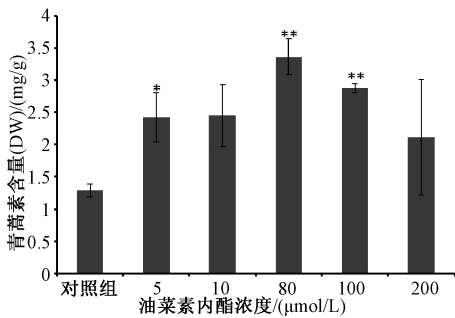
Table 1 Primers used for gene expression analysis

| gene | description | sequence(5' to 3') |
|--------|---------------------------------------|--|
| ADS | amorpha-4,11-diene synthase | F: AAGCAAGTAGACGAAGGGGTGG R: GCGTGGATTTCATCAATCAG |
| CYP | cytochrome P450 reductase or cyp71av1 | F: CACCCTCCACTACCCCTTG R: GACACATCCTTCTCCACGC |
| DBR2 | artemisinic aldehydeΔ11(13) reductase | F: CTTGGGTTACAAGCTGTGGCTCAAG R: ATATAATCAAACTAGAGGAGTGACC |
| AaWRKY | transcription factor | F: GGTAGAGGGTAGCGTTGA R: CAGCCTTGCGGTATGTGC |
| Actin | house keeper gene | F: GAGGAGCATCCCGTTCTTT R: TGTACGTCCACTGGCATACAG |

2 结果与分析

2.1 油菜素内酯处理最适浓度的确定

为确定最适于药用植物青蒿中青蒿素累积的油菜素内酯处理的浓度,我们根据预实验的结果,分别用5、10、80、100和200 $\mu\text{mol/L}$ 5个浓度并叶面喷施植株10 d后,取其叶片,依1.3中所述方法测定不同处理组间青蒿素含量的变化.结果显示,所有处理组的青蒿素含量均比CK组高,青蒿素含量增加最多的处理浓度为80 $\mu\text{mol/L}$,青蒿素含量比对照增加近1倍,在该浓度下青蒿素的平均含量(DW)为3.26 mg/g,如图1所示.因此,80 $\mu\text{mol/L}$ 为油菜素内酯处理药用植物青蒿的最适浓度.



DW,干重; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图1 不同浓度油菜素内酯处理后青蒿素含量的变化

Fig. 1 Changes in artemisinin content after treatment with different concentrations of brassinosteroid

2.2 油菜素内酯处理后青蒿素生物合成相关基因表达的变化

在80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理后的0,2,4,6,8和10 d 6个不同时间点分别取青蒿的材料,提取RNA,反转录后实时荧光定量PCR检测青蒿素生物合成关键基因的表达情况.

实时荧光定量PCR检测结果见图2.从图2中可以看出,青蒿素生物合成的关键基因*ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*的表达量,在油菜素内酯处理后的第4 d急剧增加.其中*ADS*的增加近25倍,*CYP71AV1*增加近70倍,*DBR2*增加近10倍.而在处理第8 d后,这3个关键基因的表达量仍保持较高的水平.*WRKY*是一个调控青蒿素生物合成的重要转录因子,在药用植物青蒿中瞬时表达,能上调青蒿素生物合成关键基因*ADS*,

CYP71AV1、*DBR2*的表达^[34].为此,我们检测了油菜素内酯处理后*WRKY*表达的变化,结果表明(图2),在油菜素内酯处理第8 d时,*WRKY*的表达增加近50倍.在油菜素内酯处理后期,可能是由于*WRKY*表达的增加,进一步激活了青蒿素生物合成的关键基因*ADS*、*CYP71AV1*和*DBR2*的表达.

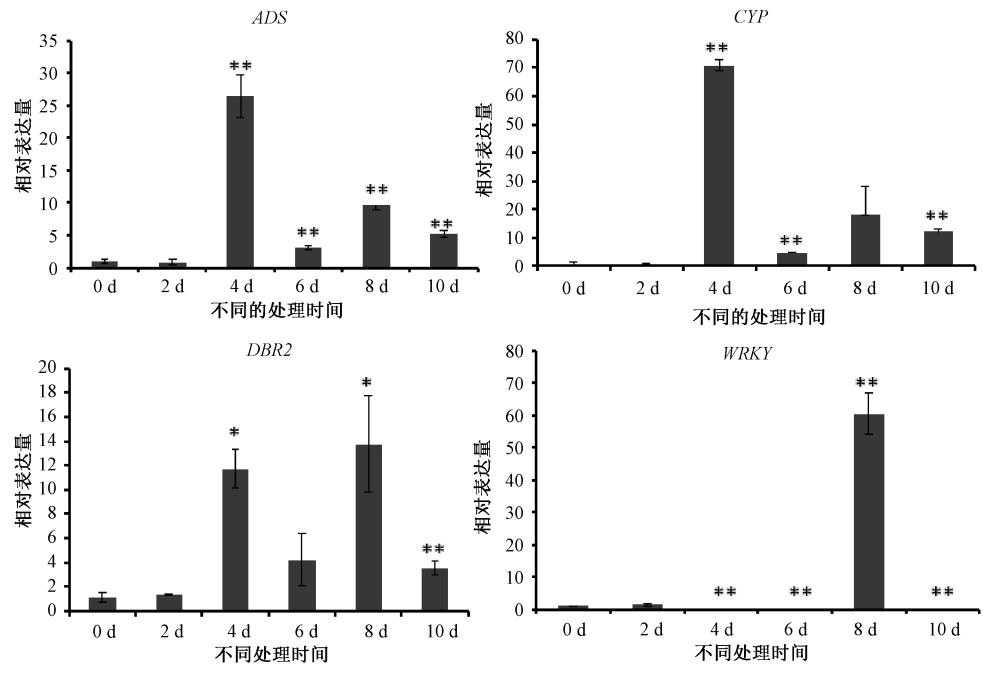
2.3 油菜素内酯处理后青蒿素含量的变化

不同油菜素内酯处理后青蒿素含量的检测结果表明(图1),在80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理后,药用植物青蒿中青蒿素的含量达最高.实时荧光定量PCR的结果表明(图2),在80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理后的第4 d,青蒿素生物合成途径中的关键基因*ADS*、*CYP71AV1*、*DBR2*的表达量增加10~70倍.为此,我们测定了80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理4 d后青蒿素含量的变化,结果表明(图3),处理后的植株中青蒿素含量(DW)为3.82 mg/g,比未处理的植株提高1倍多,且差异显著.

3 结论

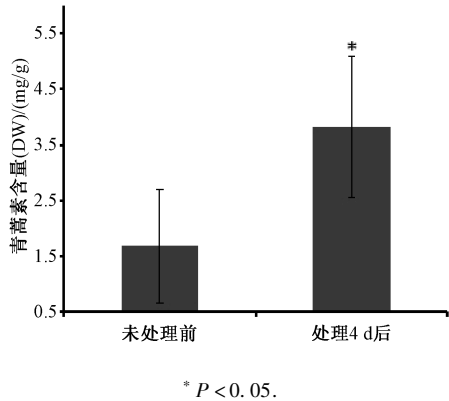
油菜素内酯作为一种植物生长调节剂,在植物生长发育过程中的作用显著.本研究结果表明,油菜素内酯对药用植物青蒿中的倍半萜类次生代谢产物——青蒿素的生物合成具有重要的调控作用.*BES1* (*bri-EMS-suppressor 1*)是位于油菜素内酯信号途径下游的一个转录激活因子,油菜素内酯与其受体结合后,通过一系列的信号级联反应,使*BES1*被激活,激活的*BES1*可以与启动子序列中含有E-box (CANNTG)的基因结合,从而激活相关基因的表达.青蒿素生物合成的关键基因如*ADS*、*DBR2*及*CYP71AV1*基因的启动子序列中,均含有多个E-box元件.本研究的结果也表明(图2),油菜素内酯处理后,*ADS*、*DBR2*及*CYP71AV1*的转录水平明显上调.因此,油菜素内酯处理,可能是通过促进青蒿素生物合成关键基因的表达而促进青蒿素的生物合成.

在80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理4 d后青蒿素的含量增加了1倍多,而且在处理后的第4天青蒿素生物合成途径的几个关键基因(*ADS*、*DBR2*、*CYP71AV1*)的表达明显上调,与未处理的植株相比,油菜素内酯处理4 d后药用植物青蒿中青蒿



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图 2 80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理后青蒿素生物合成相关基因 *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2*, *WRKY* 的表达随时间的变化
Fig. 2 Dynamic changes in the expression of artemisinin biosynthesis-related genes *ADS*, *CYP71AV1*, *DBR2* and *WRKY* after treatment with 80 $\mu\text{mol/L}$ brassinosteroid



* $P < 0.05$.

图 3 80 $\mu\text{mol/L}$ 油菜素内酯处理 4 d 后青蒿中青蒿素的含量的变化
Fig. 3 Artemisinin content changes in *Artemisia annua* treated with 80 $\mu\text{mol/L}$ brassinosteroid for 4 days

素的累积量 (DW) 达到 3.82 mg/g。青蒿素是一种具有重要药用价值的抗疟药物,本研究的结果表明,叶面喷施油菜素内酯,可以明显增加青蒿素的含量。因此在田间生产过程中,可以适时适量叶面喷施油菜素内酯,以提高药用植物青蒿中青蒿素的累积量,从而达到增产的目的。

参考文献

[1] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin) : an antimalarial drug from China [J]. Science, 1985, 228 (4703) : 1 049-1 055.

[2] Mutabingwa T K. Artemisinin-based combination therapies (ACTs) : best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy [J]. Acta Tropica, 2005, 95 (3) : 305-315.

[3] Bouwmeester H J, Wallaart T E, Janssen M H, et al. Amorpho-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis [J]. Phytochemistry, 1999, 52 (5) : 843-854.

[4] Teoh K H, Polichuk D R, Reed D W, et al. *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 [J]. FEBS Letters, 2006, 580 (5) : 1 411-1 416.

[5] Zhang Y, Teoh K H, Reed D W, et al. The molecular cloning of artemisinic aldehyde Δ 11 (13) reductase and its role in glandular trichome-dependent biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283 (31) : 21 501-21 508.

[6] Duke M V, Paul R N, Elsohly H N, et al. Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. [J]. International Journal of Plant Sciences, 1994, 155 (3) : 365-372.

[7] Ferreira J F, Simon J E, Janick J. Relationship of artemisinin content of tissue-cultured, greenhouse-grown, and field-grown plants of *Artemisia annua* L. [J]. Planta Medica, 1995, 61 (4) : 351-355.

- [8] Paddon C J, Westfall P J, Pitera D J, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 528-532.
- [9] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440(7086): 940-943.
- [10] Zhang L, Jing F, Li F, et al. Development of transgenic *Artemisia annua* L (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 52(3): 199-207.
- [11] Alam P, Abdin M Z. Overexpression of *HMG-CoA* reductase and amorpha-4,11-diene synthase genes in *Artemisia annua* L. and its influence on artemisinin content [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(10): 1919-1928.
- [12] Zhang Y S, Ye H C, Liu B Y, et al. Exogenous GA3 and flowering induce the conversion of artemisinic acid to artemisinin in *Artemisia annua* plants [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2005, 52(1): 58-62.
- [13] Kapoor R, Chaudhary V, Bhatnagar A K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. [J]. *Mycorrhiza*, 2007, 17(7): 581-587.
- [14] Wang H H, Ma C F, Li Z Q, et al. Effects of exogenous methyl jasmonate on artemisinin biosynthesis and secondary metabolites in *Artemisia annua* L. [J]. *Industrial Crops and Products*, 2010, 31(2): 214-218.
- [15] Pu G B, Ma D M, Chen J L, et al. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(7): 1127-1135.
- [16] Liu D H, Zhang L D, Li C X, et al. Effect of wounding on gene expression involved in artemisinin biosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua* L. [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, 57(6): 882-886.
- [17] Jing F Y, Zhang L, Li M Y, et al. Absciscic acid (ABA) treatment increases artemisinin content in *Artemisia annua* L. by enhancing the expression of genes in artemisinin biosynthetic pathway [J]. *Biologia*, 2009, 64(2): 319-323.
- [18] Lei C Y, Ma D M, Pu G B, et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. *Industrial Crops and Products*, 2011, 33(1): 176-182.
- [19] Clouse S D. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development [J]. *Plant Journal*, 1996, 10(1): 1-8.
- [20] Li J, Chory J. Brassinosteroid actions in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1999, 50(332): 275-282.
- [21] Feldmann K A, Marks M D, Christianson M L, et al. A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis [J]. *Science*, 1989, 243(4896): 1351-1354.
- [22] Chory J, Nagpal P, Peto C A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(5): 445-459.
- [23] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade [J]. *Cell*, 1995, 83(6): 835-839.
- [24] Friedrichsen D M, Joazeiro C A, Li J, et al. Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase [J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(4): 1247-1256.
- [25] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. *Cell*, 1997, 90(5): 929-938.
- [26] Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, et al. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroids biosynthesis [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(4): 505-513.
- [27] Yin Y, Wang Z Y, Mora-Garcia S, et al. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation [J]. *Cell*, 2002, 109(2): 181-191.
- [28] He J X, Gendron J M, Sun Y, et al. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses [J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1634-1638.
- [29] Yin Y, Vafeados D, Tao Y, et al. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2005, 120(2): 249-259.
- [30] Sun Y, Fan X Y, Cao D M, et al. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2010, 19(5): 765-777.
- [31] Yu X, Li L, Zola J, et al. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2011, 65(4): 634-646.
- [32] Yin Y H, Vafeados D, Tao Y, et al. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2005, 120(2): 249-259.
- [33] Zhao S S, Zeng M Y. Application of precolumn reaction to high-performance liquid chromatography of qinghaosu in animal plasma [J]. *Analytical Chemistry*, 1986, 58(2): 289-292.
- [34] Ma D M, Pu G B, Lei C Y, et al. Isolation and characterization of *AaWRKY1*, an *Artemisia annua* L. transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiology*, 2009, 50(12): 2146-2161.