

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.30418

周颖, 刘谦, 蒲高斌, 张永清. 丹参遗传转化体系建立及应用研究进展[J]. 植物科学学报, 2022, 40(3): 418-425

Zhou Y, Liu Q, Pu GB, Zhang YQ. Research progress on establishment and application of genetic transformation system of *Salvia miltiorrhiza* Bunge[J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(3): 418-425

丹参遗传转化体系建立及应用研究进展

周颖, 刘谦*, 蒲高斌, 张永清*

(山东中医药大学药学院, 济南 250355)

摘要: 丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是我国一种传统的大宗中药材, 主要活性成分丹参酮和丹酚酸被广泛用于治疗心脑血管等疾病。建立高效、稳定的遗传转化体系, 对丹参进行定向改良, 为丹参酮和丹酚酸类成分工业化生产及丹参药材产量与质量提高提供了可能。本文结合国内外的研究, 对丹参遗传转化方法进行了系统总结, 从外植体、培养基、菌液浓度等影响丹参遗传转化因素方面进行综述。对近5年丹参遗传转化研究的关键酶基因和转录因子进行归纳, 并对未来的研究重点进行了展望。

关键词: 丹参; 遗传转化; 再生; 研究进展

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)03-0418-08

Research progress on establishment and application of genetic transformation system of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Zhou Ying, Liu Qian*, Pu Gao-Bin, Zhang Yong-Qing*

(School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: *Salvia miltiorrhiza* Bunge is a traditional Chinese medicine widely used in the treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases due to its active components tanshinone and salvianolic acid. The establishment of an efficient and stable genetic transformation system and directional improvement of *S. miltiorrhiza* provide the possibility for industrial production of tanshinone and salvianolic acid and improvement in *S. miltiorrhiza* yield and quality. This paper studied both at home and abroad, and has carried on the system summary of *S. miltiorrhiza* genetic transformation method, from the explants, culture medium and the concentration of microbial factors affecting *S. miltiorrhiza* genetic transformation were summarized, for nearly five years of *S. miltiorrhiza* genetic transformation research, summarized the key enzyme genes and transcription factors. The future research focus was prospected to provide reference for improving the efficiency of genetic transformation and promoting the development of *S. miltiorrhiza* industry.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; Genetic transformation; Regeneration; Transformation method

收稿日期: 2021-10-12, 修回日期: 2022-03-02。

基金项目: 国家自然科学基金(82003892); 国家重点研发计划(2017YFC1702700); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-21)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (82003892), National Key Research and Development Program of China (2017YFC1702700) and Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs-National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-21).

作者简介: 周颖(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量控制(E-mail: 1820397112@qq.com)。

* 通讯作者(Authors for correspondence. E-mail: cleanlq@163.com; zyg622003@126.com)。

植物遗传转化是利用重组 DNA 等技术, 将外源基因导入植物细胞使其与受体染色体整合并稳定遗传或表达的过程, 是开展基因工程的核心。通过基因工程技术, 在中药领域可以提高药用植物的产量, 改善药材的品质, 增强抗逆性, 保障药材生产; 调控次生代谢产物的合成和积累, 增加药用植物中活性物质的含量; 打破育种界限, 缩短育种年限, 为中药产业发展提供新思路^[1]。目前, 通过遗传转化技术, 在黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 中过表达 *AaADS* 基因可以显著提高青蒿素的含量^[2]; 在丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 中过表达 *SmERF1* 可以提高其耐盐性^[3]。因此, 对遗传转化体系进行优化, 提高植物的遗传转化效率, 对药用植物开展基因工程研究具有重要意义。

丹参为唇形科多年生草本, 其根部药用历史悠久。丹参酮和丹酚酸类成分是丹参的主要活性成分, 治疗心脑血管疾病、阿尔兹海默症等疾病效果显著^[4]。丹参是我国传统的大宗中药材, 也是开展药用植物基因工程研究的模式植物。目前, 通过遗传转化技术开展丹参基因工程研究过程中仍存在问题。丹参中次生代谢产物仍以丹参原料提取为主, 虽然可以利用微生物发酵等一些工业化方式扩大生产, 但尚不能大量获得, 并且其遗传转化效率也不稳定。李雯瑞^[5]研究发现过表达丹参 *SmGRAS1~5* 基因的转化效率在 60%~80%; 王瑞红^[6]的研究表明过表达 *SmPsbD* 基因的转化效率仅为 15%。丹参遗传转化过程周期长, 在发根农杆菌介导的叶盘法遗传转化中, 约 14 d 才开始长出毛状根^[7], 而黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 10 d 就可以发出毛状根, 缩短了遗传转化的时间^[8]。

因此, 开展丹参体内次生物质生物合成途径和调控机制研究, 是改良丹参品质, 提高次生物质含量的有效手段。而建立高效、稳定的遗传转化体系则是实现丹参次生代谢物质调控研究和品质改良的前提和基础, 也是丹参基因工程研究的重要环节。本文对丹参遗传转化方法以及影响丹参遗传转化的因素进行了系统归纳总结, 并对未来的研究重点进行了展望。

1 丹参遗传转化方法

植物遗传转化方法有农杆菌介导法、PEG 介

导法、基因枪法、电激法、超声法、显微注射法、花粉管通道法和脂质体法等。其中, 农杆菌介导法是目前丹参遗传转化中最主要、最常用的方法。

农杆菌介导法是以农杆菌为媒介, 侵染外植体后将其 T-DNA 转移并整合到植株基因组中, 具有转化率高且稳定性好的优点。整合或插入基因在植株各组织器官里能够特异性表达, T-DNA 区能插入长达 50 kb 的外源 DNA 片段, 外源基因不易发生甲基化和转基因沉默^[9]。目前发现的能够在生物之间转移 DNA 的仅有农杆菌, 其中以根癌杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*)^[10-14] 最为常用。本文对丹参遗传转化中两种介导方法在质粒类型、外植体材料、菌株类型、转化产物等方面进行了较为全面的比较分析 (表 1)。

根癌农杆菌介导的转化方法主要有整体植株接种共感染法、叶盘转化法、原生质体转化法。由于叶盘转化法操作简单、重复性高, 为丹参根癌农杆菌转化最常用的方法^[15]。发根农杆菌介导的遗传转化具有生长迅速, 培养时不需添加外源激素等优点, 大幅度缩短了遗传转化周期, 因而成为现阶段丹参次生代谢和基因工程研究的主要方法。目前, 研究人员以农杆菌介导的转化方法, 先后开展了构建和优化丹参遗传转化体系的研究, 并取得了一定的进展 (表 2)。

2 影响农杆菌介导的丹参遗传转化的因素

当前, 越来越多的研究者成功构建了农杆菌介导的丹参遗传转化体系。然而, 农杆菌介导的丹参遗传转化受多种因素制约, 包括外植体、培养基组成、菌株类型、菌液浓度、侵染时间以及抗生素等。

2.1 外植体

成功建立遗传转化体系的首要条件是正确选择外植体, 明确受体细胞的转化能力是选择外植体的依据。外植体的转化能力、所处的发育阶段以及种类在一定程度上影响着遗传转化的效率。通常要求建立遗传转化体系的外植体要幼嫩、增殖能力强且处于萌动期, 因为这时候的外植体分裂能力强, 更易于转化, 而且农杆菌介导的遗传转化只发生在很短的时期内, 一般只有处于分裂周期的 S 期才具有

表 1 根癌农杆菌与发根农杆菌介导的丹参遗传转化的比较
Table 1 Comparison of *Agrobacterium tumefaciens*- and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*

区别 Difference	根癌农杆菌介导 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	发根农杆菌介导 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>
质粒类型 Plasmid type	Ti 质粒	Ri 质粒 ^[13]
外植体材料 Explants material	多为叶片	叶片、茎、子叶、愈伤组织,下胚轴等
菌株类型 Strain type	LBA4404、EHA105、GV3101 等	C58C1、ATCC15834、K599
菌种类型 Bacteria type	根瘤菌	发根瘤菌
最终产物 Final product	植株	毛状根
转化产物表型 Phenotype of transformation product	生长旺盛,根系发达	白色绒毛、多根毛、多分支、无向地性 ^[14]
抗生素使用 Antibiotic use	卡那霉、头孢噻肟,潮霉素等	卡那霉、头孢噻肟,潮霉素等
转化过程 Transformation process	无菌叶片→根癌农杆菌侵染→共培养 2~3 d→选择培养及芽分化→生根培养→再生植株→固体培养	无菌叶片→发根农杆菌侵染→共培养 2~3 d→选择培养及毛状根形成→液体悬浮培养
优点 Advantage	技术成熟、成功率高、效果好,能产生瞬时和稳定的转化,整合效率高 ^[10]	毛状根可在无激素培养基上生长,且生长迅速,避免根癌农杆菌介导嵌合体产生 ^[11, 12]
形成最终产物的时间 Time when final product is formed	3~4 周	2 周左右
缺点 Disadvantage	易产生嵌合体,转化植株的再生需使用外源激素,费力费时	诱导产生的毛状根难以转化成形态正常的再生植株

外源基因转化能力。已分化的组织细胞的转化能力与其发育程度有关,一般来说,发育晚期的组织细胞转化能力较差,甚至会丧失转化能力;发育早期的组织细胞转化能力较强。目前,应用丹参叶片作为外植体时,使用率最高的是丹参的第 2 轮叶片,分生能力强且生长最为旺盛。张换样等^[16]的研究表明,丹参叶龄在 7~14 d 时,叶片的分化效率最高,叶龄超过 14 d 的叶片分化率降低。此外,不同种类外植体的转化率也有较明显的差异,刘晓艳等^[17]通过研究外植体类型对农杆菌诱导丹参毛状根的影响发现叶片比茎和叶柄更适合做外植体;张换样等^[16]以 14 d 叶龄丹参的叶柄、茎段和叶片为外植体时发现,以丹参叶柄作为外植体的分化率高,分化速度更快。

2.2 菌株类型、菌液浓度及侵染时间

农杆菌的侵染能力随不同菌株的类型有着明显差异。在一定范围内,菌液浓度越高转化率就越高,但菌液浓度过高会伤害外植体,且造成除菌培养阶段农杆菌不易控制。不同类型的外植体对菌液侵染时间的要求也不同。周伟等^[18]以发根农杆菌 R1601、A4、C58C1 为实验菌株,以叶片、叶柄、茎段为外植体,研究了菌液浓度对丹参毛状根转化效率的影响,发现应用发根农杆菌 C58C1 侵染叶片,菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.4 时的转化效率最高。张夏楠等^[19]对丹参外植体农杆菌侵染时间进行优化研究,发现外植体侵染 10 min 时诱导效果最佳为 63.3%,时间越长诱导率越低,侵染 20 min 时仅为 13.3%。蔡媛等^[20]的研究表明,农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 1.0,侵染时间为 5 min 时毛状根的诱导率最高。

表2 农杆菌介导的丹参遗传转化研究进展
Table 2 Advances in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Salvia miltiorrhiza*

基因型 Genotype	外植体 Explant	农杆菌 <i>Agrobacterium</i>		菌液浓度 Microbial concentration	侵染时间 / min Infection time	共培养添加物 Co-culture additive	共培养 时间 / d Co-culture time	抗生素及其浓度 / mg / L Antibiotics and their concentrations
		菌种 Bacterial species	菌株 Strain					
‘商洛’丹参	叶片、茎、叶柄、根	根癌农杆菌	EHA105	OD ₅₉₀ = 0.4	30	6.6 μmol/L BAP + 0.5 μmol/L NAA	3	卡那霉素 60 ^[14]
			EHA105	OD ₆₀₀ = 0.6	15	2.0 mg/L 6-BA	2	大观霉素 50 ^[21]
白花丹参 bh2-7	叶片、叶柄	根癌农杆菌	EHA105	OD ₆₀₀ = 0.6	5	NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + AS 300 μmol/L	1	卡那霉素 30 ^[22]
紫花丹参 99-3 品系	叶片、茎	根癌农杆菌	GV3101	OD ₆₀₀ = 0.6	5	NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + AS 300 μmol/L	1	卡那霉素 30 ^[22]
丹参	叶片	根癌农杆菌	EHA105	OD ₆₀₀ = 0.5	15	MS 培养基	3	卡那霉素 30 ^[23]
丹参	叶片	根癌农杆菌	EHA105	OD ₆₀₀ = 0.4~0.6		AS 100 mmol/L	2~3	头孢噻吩 500 ^[24]
丹参	叶片	发根农杆菌	C58C1	OD ₆₀₀ = 0.5	25	AS 100 μmol/L	2~3	头孢噻吩 400 ^[25]
	叶片	发根农杆菌	C58C1	OD ₆₀₀ = 0.5	30	MS 培养基	3	头孢噻吩 500 ^[26]
白花丹参	叶片、茎	发根农杆菌	ATCC10060	OD ₆₀₀ = 0.8	10	MS 培养基	2	头孢噻吩 400 ^[27]
‘商洛’丹参	叶片	发根农杆菌	ATCC15834	OD ₆₀₀ = 0.5	30	MS 培养基	2	卡那霉素 30 ^[28]

通过对众多转化方案的比较,发现在外植体、培养基、抗生素的选用上基本一致。在已有的报道中,遗传转化体系构建过程的外植体多为叶片,相较于其他类型外植体,稳定而且出愈率和转化率都较高^[14, 15, 22-28]。常用的基础培养基主要是 MS 培养基,因其无机盐与离子的浓度较高,成为较为稳定的平衡培养液,被广泛应用于多种外植体的培养中^[23, 26-28];目前,卡那霉素和头孢噻肟是应用最多的两种抗生素,卡那霉素浓度多为 30~50 mg/L^[22, 23, 28],头孢噻肟浓度多为 300~500 mg/L,浓度太高则会抑制外植体及愈伤组织的正常生长,因此,在构建体系过程中,应进行抗生素适宜浓度的筛选,从而最大程度上提高遗传转化的效率。

2.3 培养条件

共培养、培养基的选择以及外源添加物对遗传转化的效果也具有重要影响。农杆菌介导的遗传转化关键之一在于共培养,共培养能够增加外植体与农杆菌的接触,促进 T-DNA 转移到外植体基因组中,张林魁等^[22]通过实验发现,共培养 1 d 的出芽率高于共培养 3 d 的出芽率,且转基因阳性率并未降低,大大缩短了遗传转化的周期。培养基选择对建立一个高效的遗传转化体系也是非常重要的,一般是在了解基本培养基类型和特点基础上,根据植物材料的生理特性、增殖特点、栽培条件及品种类型等,确定培养基的成分和浓度以及植物激素的类型和浓度。目前,在丹参遗传转化中,以 MS 和 1/2 MS 培养基为主要培养基^[5, 29, 30]。在基础培养基中添加适量的外源物能够促进转化效率的提高。如酚类化合物乙酰丁香酮,尤其在发根农杆菌介导的遗传转化中应用广泛,能够促进 T-DNA 上 *Vir* 基因的活化和高效表达,因此确定最优乙酰丁香酮浓度也可以提高丹参遗传转化效率,周伟等^[18]的研究表明,丹参遗传转化过程中添加乙酰丁香酮浓度为 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,转化效率最高;此外褐化也是丹参遗传转化过程中一个较为严重的问题,往往是由丹参外植体材料在受伤后分泌的多酚类物质造成,低浓度的抗氧化物如抗坏血酸(VC)和活性炭,对抑制褐化有较好的效果^[31]。

2.4 抗生素选择

抗生素敏感实试验是建立遗传转化体系的关键环节,主要是为在外植体除菌培养阶段防止农杆菌

过度生长产生污染。因此,要求在培养基中添加的抑菌性抗生素既能有效抑制农杆菌生长又不影响植物细胞正常发育。为合理使用抗生素,就需对抗生素种类及其浓度进行敏感性测定。在丹参农杆菌介导的遗传转化中,目前多用头孢噻肟(500 mg/L)和特美汀(300 mg/L),抑菌效果较好^[5, 29, 30, 32]。

2.5 植株再生

植株再生是农杆菌介导的丹参遗传转化中的一个重要环节。植物的基因型在一定程度上决定着植物离体再生的难易。兰英等^[33]的研究发现,川丹参、山东丹参以及河南丹参的再生率不同,最高的可达 64%,最低的只有 37%。刘冬青^[34]研究发现,不同品系的丹参毛状根的诱导率也不同,D21 品系最高诱导率可达 85.6%,最低的为 D7 品系,诱导率仅为 4.4%。同时以白花丹参的叶片、茎段和茎尖进行再生实验时,成活率最高的外植体材料是茎尖,在灭菌 10 min 的条件下可达 85%以上;其次是叶片,成活率为 70%以上;最低的是茎段,成活率只有 60%^[35]。因此,进一步优化再生系统对建立高效的丹参遗传转化体系具有十分重要的意义。

3 近 5 年来导入丹参的目的基因及其功能

近年来,随着分子生物学的不断发展,越来越多的基因被转入丹参中,通过对其进行过表达或敲除,从而达到了一定的调控目的,主要包括调控丹参活性成分及增强抗性的基因(表 3)。

4 丹参遗传转化的发展前景和展望

借助转基因等基因工程技术改良中药品质问题是科学技术为中药产业发展提供的新思路,也是培育新品种的一条重要途径。转基因技术在丹参品种选育和基因功能验证等方面的应用前景广阔,而建立高效、稳定的遗传转化体系是转基因技术顺利实现的重要基础。

目前,人们围绕丹参遗传转化开展了大量的研究工作,取得了丰硕的成果,为提高丹参体内活性物质含量、实现活性物质工业化生产、改良丹参性状和培育新品种方面奠定了坚实基础。农杆菌介导法使用频率最高,相对比较成熟,但也存在着侵染对象主要限制在双子叶植物,具有周期长、操作复杂、诱导再生植株难度大,侵染后的外植体在再生

表 3 近 5 年以来丹参遗传转化的主要基因

Table 3 Research progress on genetic transformation genes in *Salvia miltiorrhiza* in recent five years

基因类别 Gene category	基因名称 Gene name	过表达/敲除 Overexpression/ knockout	功能 Function
bHLH	<i>SmbHLH3</i>	过表达	抑制毛状根丹参酮和酚酸积累 ^[36]
	<i>SmbHLH92</i>	过表达	抑制丹参酮和酚酸积累 ^[37]
	<i>SmbHLH148</i>	过表达	提高丹参酮 I、二氢丹参酮 I、隐丹参酮和咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 含量 ^[38]
	<i>SmbHLH10</i>	过表达	提高丹参酮含量 ^[39]
	<i>SmbHLH51</i>	过表达	提高迷迭香酸和丹酚酸 B 和总黄酮含量 ^[40]
	<i>SmbHLH52</i>	敲除	降低迷迭香酸、丹酚酸 B、总黄酮和花色苷含量 ^[39]
MYB	<i>SmMYB98</i>	过表达	提高丹参酮和酚酸含量 ^[41]
	<i>SmMYB111</i>	过表达	提高迷迭香酸和丹酚酸 B 含量 ^[42]
	<i>SmMYB9b</i>	过表达	提高 15,16-二氢丹参酮 I、1,2-二氢丹参酮、丹参酮酸甲酯、隐丹参酮、丹参酮 I、1,2-二氢丹参酮 I 和丹参酮 II A 含量 ^[43]
	<i>SmMYB36</i>	过表达	提高丹参酮(二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II A)、酚酸(迷迭香酸和丹酚酸 B)、总酚和总类黄酮含量 ^[44]
	<i>SmPAP1</i>	过表达	提高迷迭香酸、丹酚酸 B、总酚和总黄酮含量 ^[45]
MYC	<i>SmMYC2</i>	过表达	提高酚酸(迷迭香酸和丹酚酸 B)、总酚和总黄酮含量 ^[46]
	<i>SmMYC2a</i> 和 <i>SmMYC2b</i>	敲除	降低丹参酮(丹参酮 I、二氢丹参酮 I、丹参酮 II A、隐丹参酮)、酚酸(丹酚酸 A 和丹酚酸 B)和中间产物(L-苯丙氨酸、高尿酸、迷迭香酸)含量 ^[47]
茉莉酸生物合成/信号基因	<i>SmJMT</i>	过表达	提高酚酸(迷迭香酸和丹酚酸 B)以及总酚和总黄酮的含量 ^[48]
	<i>SmJAZ8</i>	过表达	调节 JA 诱导丹参毛状根中丹酚酸和丹参酮生物合成的核心抑制物 ^[49]
	<i>SmJAZ9</i>	过表达	降低丹参酮含量,敲除此基因则具有相反作用 ^[50]
	<i>LePS</i>	过表达	提高丹参酮(丹参酮 I、丹参酮 II A 和隐丹参酮)和茉莉酸酯含量,增强了抗虫性 ^[51]
碳代谢基因	<i>SmSnRK2.3</i>	过表达	酚酸含量无变化 ^[52]
	<i>SmSnRK2.6</i>	过表达	提高酚酸(迷迭香酸和丹酚酸 B)含量 ^[52]
激素调节基因	<i>SmGASA4</i>	过表达	促进生长(更大的主根,更多和更长的侧根);增强了对盐、干旱和多效唑的耐受性;促进对 GA3 的反应 ^[53]
其他基因	<i>SmKSL</i>	过表达	提高丹参酮含量 ^[54]
	<i>SmGRAS3</i>	过表达	负响应 GA 信号,同时促进丹参酮生物合成 ^[55]

阶段除菌比较困难等缺点。此外，次生物质合成途径复杂，人工调控效率受诸多因素影响，致使丹参遗传转化效率仍然不高。遗传转化方法和再生体系还有待于更进一步的优化和完善，以满足我国转基因丹参新品培育和功能基因研究的深入开展。

参考文献：

[1] 张照亮, 任露露, 颜小梅, 聂昕茹, 杨天元. 茶树离体再生和遗传转化的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2021, 48 (5): 738–743.

Zhang ZL, Ren LL, Yan XM, Nie XR, Yang TY. Research progress on regeneration *in vitro* and genetic transformation system of *Camellia sinensis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2021, 48(5): 738–743.

[2] 肖楠, 张学文, 龙炎杏, 陈金军, 谢心, 等. 黄花蒿腺毛细胞中过表达 *AaADS* 基因显著提高青蒿素含量[J]. 分子植物育种, 2021, 19(16): 5389–5397.

Xiao N, Zhang XW, Long YX, Chen JJ, Xie X, *et al.* Overexpression of *AaADS* gene increase growth of glandular trichomes of *Artemisia annua* and the content of artemisinin [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (16): 5389–5397.

[3] 化文平, 李世强, 孔维维, 李翠芹. 过表达 *SmERF1* 提高了丹参耐盐性[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(4): 1786–1792.

Hua WP, Li SQ, Kong WW, Li CQ. Overexpression of *SmERF1* improves salt tolerance in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(4): 1786–1792.

[4] Su CY, Ming QL, Rahman K, Han T, Qin LP. *Salvia miltiorrhiza*; traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology[J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163–182.

[5] 李雯瑞. 丹参 5 个 *SmGRAS* 转录因子在调控丹参酮类和酚酸类物质合成中的功能[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020: 61–86.

[6] 王瑞红. 过表达 *SmPsbD* 对丹参光合作用和酚类化合物生

- 物合成的影响作用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020: 28–35.
- [7] 谈荣慧, 张金家, 赵淑娟. 丹参毛状根的诱导及培养条件的优化[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3048–3053.
Tan RH, Zhang JJ, Zhao SJ. Optimazation of induction and culture conditions for hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China Journal of Chinese Material Medica*, 2014, 39(16): 3048–3053.
- [8] 郭双双. 发根农杆菌诱导黄芩毛状根的形成与质量研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016: 14–21.
- [9] Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, *et al.* Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment[J]. *Mol Breed*, 2001, 7: 25–33.
- [10] 熊换英, 钟伟光, 张寿文. 农杆菌介导的植物遗传转化影响因素研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(17): 9214–9217.
Xiong HY, Zhong WG, Zhang SW. Research progress in the influencing factors of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(17): 9214–9217.
- [11] 周达锋, 卜学贤. 发根农杆菌 Ri 质粒的分子生物学及其应用前景[J]. 植物学通报, 1993, 10(2): 24–34.
Zhou DF, Bu XX. The characters of Ri plasmid and its application prospect[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1993, 10(2): 24–34.
- [12] Sharma P, Padh H, Shrivastava N. Hairy root cultures: a suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants[J]. *End Life Sci*, 2013, 13(1): 62–75.
- [13] Chandra S. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*; role of T-DNA in plant secondary metabolism[J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(3): 407–415.
- [14] 朱智慧, 晁二昆, 钱广涛, 孙伟, 薛建平, 等. 药用植物毛状根研究体系及应用方向[J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1475–1481.
Zhu ZH, Chao EK, Qian GT, Sun W, Xue JP, *et al.* Hairy root system and its application in madicinal plants[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2019, 21(11): 1475–1481.
- [15] 庞永奇, 王梅珍, 卢善发. 根癌农杆菌注射法介导的丹参遗传转化体系的建立[EB/OL]. (2015–11–25) [2022–04–27]. <http://www.paper.edu.cn/>.
- [16] 张换祥, 李静, 朱永红, 秦丽霞, 竹梦婕, 等. 丹参叶柄遗传转化体系的建立及 *EDT1* 基因的导入[J]. 甘肃农业大学学报, 2021, 56(1): 66–71.
Zhang HY, Li J, Zhu YH, Qin LX, Zhu MJ, *et al.* Establishment of genetic transformation system of *Salvia miltiorrhiza* with oetiole as explants and introduction of *EDT1* gene[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2021, 56(1): 66–71.
- [17] 刘晓艳, 王渭玲, 李学俊. 农杆菌 Ri 诱导丹参毛状根培养体系的优化[J]. 西北农业学报, 2009, 18(6): 183–186.
Liu XY, Wang WL, Li XJ. Establishment of hairy roots culture system of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(6): 183–186.
- [18] 周伟, 姚倩雯, 钱忠英. 丹参毛状根诱导条件的优化[J]. 上海师范大学学报, 2007, 36(2): 93–98.
- [19] 张夏楠, 崔光红, 蒋喜红, 黄璐琦. 丹参转基因毛状根离体培养体系的建立及分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2257–2261.
- [20] 蔡媛, 钟灿, 谢芳一, 沈冰冰, 张水寒. 基于响应面法对丹参毛状根诱导条件的优化研究[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11): 144–147.
Cai Y, Zhong C, Xie FY, Shen BB, Zhang SH. Optimization of induction conditions of *Salvia miltiorrhiza* hairy root based on the response surface method[J]. *Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 34(11): 144–147.
- [21] Cui GH, Duan LX, Jin BL, Qian J, Xue JY, *et al.* Functional divergence of diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(3): 1607–1618.
- [22] 张林魁, 邵芬娟, 秦利军. 丹参不同愈伤组织诱导及遗传转化体系优化[J]. 广西植物, 2017, 37(1): 102–108.
Zhang LS, Shao FJ, Qin LJ. Callus inducing on different phytohormone media and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system optimizing of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Guihaia*, 2017, 37(1): 102–108.
- [23] 尹艳, 张宏晨, 徐妍妍, 高伟, 张夏楠. 丹参 *SmIPI* 基因 RNA 干扰表达载体构建及遗传转化[J]. 生物技术, 2017, 27(4): 324–329.
Yin Y, Zhang HC, Xu YY, Gao W, Zhang XN. Study on construction and transformation of *SmIPI*-RNAi vector[J]. *Biotechnology*, 2017, 27(4): 324–329.
- [24] Liu Y, Yang SM, Cheng Y, Liu DQ, Zhang Y, *et al.* Production of herbicide-resistant medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* transformed with the bar gene[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(7): 1456–1465.
- [25] Wei T, Gao YH, Deng KJ, Zhang LP, Yang ML, *et al.* Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures by metabolic engineering [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 53.
- [26] Kai GY, Xu H, Zhou CC, Liao P, Xiao JB, *et al.* Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures[J]. *Metab Eng*, 2011, 13(3): 319–327.
- [27] Hao GP, Shi RJ, Tao R, Fang Q, Jiang XY, *et al.* Cloning, molecular characterization and functional analysis of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate reductase(*HDR*) gene for diterpenoid tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 70: 21–32.
- [28] Li WR, Xing BC, Mao RJ, Bai ZQ, Yang DF, *et al.* SmGRAS3 negatively responds to GA signaling while promotes tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 144: 112004.

- [29] 王宁. *SmHY5* 对丹参有效成分生源合成及侧根发育的调控作用研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2020: 11–31.
- [30] 王斌. 丹参 *SABATH* 基因家族分子系统进化分析及丹参茉莉酸羧甲基转移酶基因的功能研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2018: 87–102.
- [31] 何金莲. 丹参组织培养综述[J]. 乡村科技, 2020, 11(28): 91–92.
- [32] 刘彩玲. 丹参 *SmCYP94B50* 基因克隆与功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020: 29–49.
- [33] 兰英, 柳敏, 严铸云, 谢惠庆, 沈晓凤, 等. 不同地理种源丹参组培快繁及再生苗性状差异比较[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 103–107.
- [34] 刘冬青. 不同品系丹参毛状根诱导发生及生产效率的比较研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2016: 17–22.
- [35] 亓振翠, 许明, 李玉梅, 高玉民, 吕雪峰, 等. 白花丹参组培快繁技术试验研究[J]. 农业科技通讯, 2020(4): 106–108.
- [36] Zhang CL, Xing BC, Yang DF, Ren M, Guo H, *et al.* *SmbHLH3* acts as a transcription repressor for both phenolic acids and tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Phytochemistry*, 2020, 169: 112183.
- [37] Zhang JH, Lv HZ, Liu WJ, Ji AJ, Zhang X, *et al.* *bHLH* transcription factor *SmbHLH92* negatively regulates biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2020, 12(3): 237–246.
- [38] Xing BC, Liang LJ, Liu L, Hou Z, Yang DF, *et al.* Overexpression of *SmbHLH148* induced biosynthesis of tanshinones as well as phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(12): 1681–1692.
- [39] Xing BC, Yang DF, Yu Hz, Zhang Bx, Yan KJ, *et al.* Overexpression of *SmbHLH10* enhances tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Sci*, 2018, 276: 229–238.
- [40] Wu YC, Zhang Y, Li L, Guo XR, Wang B, *et al.* *AtPAP1* interacts with and activates *SmbHLH51*, a positive regulator to phenolic acids biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1687.
- [41] Hao XL, Pu ZQ, Cao G, You DW, Zhou Y, *et al.* Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by *SmMYB98* in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Adv Res*, 2020, 23: 1–12.
- [42] Li SS, Wu YC, Kuang J, Wang HQ, Du TZ, *et al.* *SmMYB111* is a key factor to phenolic acid biosynthesis and interacts with both *SmTTG1* and *SmbHLH51* in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(30): 8069–8078.
- [43] Zhang JX, Zhou LB, Zheng XY, Zhang JJ, Yang L, *et al.* Overexpression of *SmMYB9b* enhances tanshinone concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2017, 36(8): 1297–1309.
- [44] Ding K, Pei TL, Bai ZQ, Jia YY, Ma PD, *et al.* *SmMYB36*, a novel R2R3-MYB transcription factor, enhances tanshinone accumulation and decreases phenolic acid content in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5104.
- [45] Hao GP, Jiang XY, Feng L, Tao R, Li YL, *et al.* Cloning, molecular characterization and functional analysis of a putative R2R3-MYB transcription factor of the phenolic acid biosynthetic pathway in *S. miltiorrhiza* Bge. f. *alba* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2016, 124(1): 151–168.
- [46] Yang N, Zhou WP, Su J, Wang XF, Li L, *et al.* Overexpression of *SmMYC2* increases the production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1804.
- [47] Zhou YY, Sun W, Chen JF, Tan HX, Xiao Y, *et al.* *SmMYC2a* and *SmMYC2b* played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22852.
- [48] Wang B, Niu JF, Li B, Huang YY, Han LM, *et al.* Molecular characterization and overexpression of *SmJMT* increases the production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3788.
- [49] Pei TL, Ma PD, Ding K, Liu SJ, Jia YY, *et al.* *SmJAZ8* acts as a core repressor regulating JA-induced biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(7): 1663–1678.
- [50] Shi M, Zhou W, Zhang JL, Huang SX, Wang HZ, *et al.* Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by jasmonate zim-domain repressor proteins [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20919.
- [51] Chen C, Zhang Y, Qiakefu K, Zhang X, Han LM, *et al.* Overexpression of tomato *Prosystemin* (*LePS*) enhances pest resistance and the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(41): 7760–7769.
- [52] Jia YY, Bai ZQ, Pei TL, Ding K, Liang ZS, *et al.* The protein kinase *SmSnRK2.6* positively regulates phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* by interacting with *SmAREB1* [J]. *Front Plant Sci*, 2107, 8: 1384.
- [53] Wang HB, Wei T, Wang X, Zhang LP, Yang ML, *et al.* Transcriptome analyses from mutant *Salvia miltiorrhiza* reveals important roles for *SmGASA4* during plant development [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 2088.
- [54] Deng CP, Wang Y, Huang FF, Lu SJ, Zhao LM, *et al.* *SmMYB2* promotes salvianolic acid biosynthesis in the medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(11): 1688–1702.
- [55] Li WR, Xing BC, Mao RJ, Bai ZQ, Yang DF, *et al.* *SmGRAS3* negatively responds to GA signaling while promotes tanshinones biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 144: 112004.

(责任编辑: 周媛)