

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201512007

引文格式: 张林甦, 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.

丹参不同愈伤组织诱导及遗传转化体系优化

张林甦^{1*}, 邵芬娟², 秦利军³

(1. 黔南民族医学高等专科学校 药理学系, 贵州 都匀 558003; 2. 中国林业科学研究院 林业研究所林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091; 3. 贵州大学 农业生物工程研究院 山地植物资源保护与种质创新省部共建教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为了获得满足不同目的的组织培养材料和稳定高效的遗传转化体系, 该研究以丹参叶片和茎段为外植体, 采用含不同浓度的植物激素(植物生长物质)的 Murashige Skoog (MS) 培养基, 探索诱导丹参产生不同愈伤的条件; 采用正交法考察浸染时间、共培养时间、筛选压等对农杆菌介导的丹参遗传转化体系的影响, 并根据出芽率及转化阳性率优化丹参遗传转化体系。结果表明: (1) 能较快诱导丹参叶片产生愈伤的是 MS+0.5 mg · L⁻¹ 6-BA+0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D; 诱导茎较快产生愈伤的是 MS+0.1 mg · L⁻¹ NAA+0.5 mg · L⁻¹ 6-BA; 1 mg · L⁻¹ 反式玉米素 (ZR) 可能有利于诱导产生含有丹参酮的愈伤组织; 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D 较易诱导丹参愈伤组织生根。(2) 以卡那霉素为筛选剂时农杆菌 GV3101 介导的丹参遗传转化的条件为浸染 5 min、共培养 1 d、卡那霉素 30 mg · L⁻¹ 筛选, 经 PCR 鉴定转基因阳性率为 60%; 而用 10 mg · L⁻¹ 链霉素筛选阳性率达 70%。该研究结果确定了丹参不同愈伤组织诱导条件, 明确了以卡那霉素为筛选剂时农杆菌 GV3101 介导的丹参遗传转化的条件, 换用 10 mg · L⁻¹ 链霉素筛选时体系更加稳定、更易操作、更易重复。

关键词: 丹参, 愈伤, 诱导, 遗传转化

中图分类号: Q943.1, Q94-336 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)01-0102-07

Callus inducing on different phytohormone media and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system optimizing of *Salvia miltiorrhiza*

ZHANG Lin-Su^{1*}, SHAO Fen-Juan², QIN Li-Jun³

(1. Department of Pharmacy, Qiannan Medical College for Nationalities, Duyun 558003, Guizhou, China; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Ministry of Education, Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: With the decoding of its genome, *Salvia miltiorrhiza*, belonging to Labiatae (Lamiaceae) sage (*Salvia* Linn), is becoming an important model medicinal plant and is being widely studied. The earliest record of *S. miltiorrhiza* can be found in more than two thousand years ago in the Sheng Nong's Herbal Classic in which *S. miltiorrhiza* was listed as one of the top grade drugs. *S. miltiorrhiza* has a long history in treatment of many cardiovascular and cerebrovascular diseases.

收稿日期: 2016-03-20 修回日期: 2016-04-27

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20111106110033) [Supported by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China(20111106110033)].

作者简介: 张林甦(1972-), 女, 贵州贵阳人, 博士, 副教授, 从事植物分子生物学研究, (E-mail) linsuzhang009@163.com。

*通信作者

The active components of *S. miltiorrhiza* are divided into two categories: water-soluble phenolic acids and lipid-soluble tanshinones. As an important medicinal mode plant with long history, the biosynthetic pathways of *S. miltiorrhiza* active contents tanshinones and phenolic acids attract growing research interests. An appropriate tissue culture condition and a simple, stable and efficient genetic transformation system are very important in the research of the plant *S. miltiorrhiza*. Based on former studies, we investigated culture conditions to induce different *S. miltiorrhiza* calluses using different phytohormones on Murashige Skoog medium. And through a four factor-three level orthogonal design, we investigated the effects of submerging time, co-culture time, screening pressure and concentrate of acetosyringone. The results of callus induction were that: $MS+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$ induce callus faster than other explants, while $MS+0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ was suitable in inducing stems; $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ trans-zeatin could induce brawn callus maybe contain more tanshinone, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D}$ could induce more roots on callus. And the confirmed agrobacterium-mediated genetic transformation parameters for *agrobacterium tumefaciens* GV3101 harboring *nptII* gene plasmid were: submerging 5 min, co-culture 1 d and screening at $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin, the positive ratio of transgenic plant by PCR verification was 60%. When submerging 5 min, co-culture 1 d and screening at $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ streptomycin the transgenic plant positive rate was 70%. The later transgenic system seemed more stable and easier to be repeated in this trial, maybe due to the less toxic of streptomycin which indicated that streptomycin maybe another candidates for transgenic screening in *S. miltiorrhiza*. The determination of different callus inducing condition and the optimizing of genetic transformation system provide useful application in further researches of *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*, callus, induction, genetic transformation

丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 为鼠尾草属 (*Salvia* Linn.) 植物, 其药用历史悠久, 最早记载于《神农本草经》, 为和痿再吴普本草《痿再》, 现临床上广泛应用于心脑血管等多种疾病的治疗 (赵阳等, 2010; 李佑生等, 2006; 戈升荣等, 2002)。丹参的有效成分为两大类代表性次生代谢物质: 萜类 (丹参酮) 和酚酸类 (丹酚酸) (郑国墀和柿泽宽, 1989; Ma et al, 2012; Ma et al, 2015)。同时, 由于丹参基因组较小, 生长条件简单、生长周期快, 已经成为研究药用植物萜类和酚酸类的模式植物 (宋经元等, 2013)。随着模式植物如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、杨树 (*Populus*) 等在分子水平上的研究不断深入, 为人们认识和了解植物的生长发育及其调控机理提供了大量的参考 (Mukherjee et al, 2015; Del Toro-De et al, 2016; Shi et al, 2015; Ding & Nilsson, 2015)。因此, 组织快繁再生、遗传转化等技术是对植物进行研究的重要基础。

丹参的组织培养条件宽泛, 一定范围内的植物激素 (植物生长物质) 配比均能诱导出愈伤并再生植株 (王建英和刘涤, 1987; 胡月红等, 1992; 姜广奋, 1994; 赵洁等, 1999; 田宇红和王喆之等, 2003)。郭肖红等 (2007a, b) 主要从培养基的氮源、碳源及有机物等方面研究了丹参不定根的培养条件, 张荫麟等 (1997) 用发根农杆菌和根癌农杆菌转化丹参得到冠瘿瘤和毛状根再生得到丹参植株, 但是他们没

有转入目的基因, 没有涉及抗性筛选的步骤。这些研究对于丹参的组织培养具有重要意义, 但是至今还没有系统性的试验, 尤其是从不同植物激素的影响来探讨丹参不同愈伤产生的条件, 而这些不同愈伤对于丹参的进一步研究具有重要意义。对于丹参的遗传转化体系, 最早是王倩 (2005)、王丽娟 (2005) 和 Yan & Wang (2007) 报道了用农杆菌介导的遗传转化体系, 他们构建了含有目的基因的载体并经根癌农杆菌转化丹参叶片获得阳性植株。Cui et al (2015) 也用 RNAi 载体成功转化出转基因丹参。但是由于丹参品种不同、载体不同、农杆菌不同等原因, 本实验室在丹参遗传转化实验中发现采用已有方法其结果随机性较大, 很多时候转化后的丹参叶片停止生长。因此在参阅已有文献的基础上, 笔者摸索了丹参叶片和茎段为外植体诱导不同愈伤产生的条件, 用正交法系统地对比丹参遗传转化体系进行了研究, 优化得到较易重复的遗传转化体系, 为丹参植物的组织培养研究提供了更多的基础工具。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

丹参苗 (99-3 品系) 由中国医学科学院药用植物研究所卢善发实验室扩繁保存。带有 NPTII 基因激活标签载体由笔者先期构建, 并转入农杆菌

GV3101。植物激素 6-BA、NAA、2,4-D 及琼脂粉为 Sigma 公司产品,硫酸卡那霉素为 Amresco 公司产品,MS 培养基粉末购自 phytotech 公司,DNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 丹参组织培养

切下丹参 993 成熟无菌苗带腋芽的茎段接种于 1/2MS 培养基(含 30%蔗糖,0.85%的琼脂)继代,2 个月左右长成成熟植株,取较为幼嫩的丹参叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的方形,茎段 1 cm 左右,接种在附加不同浓度植物激素的 MS 培养基中培养,10 d 左右更换一次培养基,15~20 d 观察愈伤及不定芽出芽情况。切下不定芽接种于 1/2MS 培养基中进行生根培养。待 1~2 个月后丹参苗生根较多、苗较壮时移栽在土里继续培养。

1.3 丹参遗传转化

1.3.1 杀死浓度范围的确定 本实验激活标签载体以 PBI121 为基本载体改造得到,含有 NPTII 基因,可编码编码新霉素磷酸转移酶,产生卡那霉素抗性,因此选用不同浓度的卡那霉素来确定杀死浓度范围(killing scale),同 1.2 的操作,将丹参无菌叶片切成块后接种在附加不同浓度卡那霉素的 MS 培养基中(含 NAA 0.1 mg · L⁻¹+BA 1.0 mg · L⁻¹),20 d 时观察出芽及生长情况。

1.3.2 遗传转化体系确定 以正交法设计实验,4 因素(浸染时间、共培养时间、抗生素浓度及乙酰丁香酮浓度)3 水平(低、中、高),采用正交表 L₉(3⁴),工作表如表 2。浸染时间低、中、高分别为 3、5、10 min,共培养时间低、中、高分别为 1、2 和 3 d,抗生素卡那霉素浓度低、中、高分别为 20、30、40 mg · L⁻¹,乙酰丁香酮浓度低、中、高分别为 100、200、300 μmol · L⁻¹。分为 9 组,每组 4 皿(约 60 个外植体)。30 d 内统计外植体出芽率。

1.3.3 丹参遗传转化 按照最终选定的遗传转化条件:浸染 5 min、共培养 1 d、卡那霉素 30 mg · L⁻¹筛选,按照 1.2 的操作方法浸染一批丹参叶片,待不定芽长出后切下不定芽接种于 1/2MS 培养基中进行生根培养。1~2 个月后待转基因丹参苗生根较多、苗较壮时移栽在土里继续培养待 PCR 鉴定。

1.4 转基因植株的 PCR 鉴定

每棵丹参苗取 1 片叶片(带叶柄)液氮研磨,按北京艾德莱公司 CTAB 植物基因组 DNA 提取试剂盒 DN14 说明书步骤提取 DNA,电泳检查 DNA 提取

质量。提取的 DNA 2 μL 为模板,用 NPTII 正向引物(GTATCCATCATGGCTGATGCA AT)、反向引物(GAAGAACTCGTCAAGAAGGCCGA)各 1 μL,2 × premix rTaq 10 μL,水 6 μL,总共 20 μL 体系进行 PCR 扩增,PCR 扩增程序为 94 °C 2 min,94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min 30 个循环,72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。取 PCR 产物 10 μL 上样,2%琼脂糖凝胶电泳检测是否有目的条带。同时以野生型丹参作对照(CK)。

2 结果与分析

2.1 各种激素配比情况下丹参愈伤诱导情况

从表 1 可以看出,丹参的愈伤较容易诱导,除了 Y4 培养基诱导出的愈伤是深褐色,其余均为绿色或浅绿色,具有较好的再生能力,D1 诱导的愈伤易生根。Y2 培养基诱导愈伤最快,10 d 左右可观察到愈伤,Y1 培养基诱导茎产生愈伤快于诱导叶。根据这些结果,对于不同的实验目的可以选择不同的诱导条件:Y1 适合于以茎作为外植体,Y4 可能适合于考查愈伤组织产丹参酮的研究(丹参酮呈红色,会令愈伤的颜色较深),D1 适合用于对丹参根的研究,而探索丹参遗传转化体系,需要较多可再生的芽,因此在后续实验中选择出芽较多的 Y3 培养基。

2.2 杀死浓度范围

通过观察丹参叶片在含不同浓度的卡那霉素培养基上的生长状况考察丹参对卡那霉素敏感的敏感性。发现高浓度卡那霉素抑制外植体生长,70 mg · L⁻¹卡那霉素 10 d 内使叶片褐化,不加卡那霉素的叶片一直可保持鲜活绿色。叶片生长状况及出芽率(表 2)随卡那浓度降低而好转。未经农杆菌浸染的丹参叶片可耐受 50 mg · L⁻¹的卡那霉素。

2.3 丹参遗传转化体系确定

农杆菌的浸染对丹参叶片的生长会有影响,因此将浸染后的卡那霉素筛选浓度梯度设为 40、30、20 mg · L⁻¹。将浸染时间、共培养时间、卡那霉素浓度和乙酰丁香酮浓度按正交表 L₉(3⁴)设计实验,考察丹参叶片出芽率,统计结果见表 3。

由表 3 可知,影响丹参遗传转化出芽率的主要因素是浸染时间、共培养时间和选择压。乙酰丁香酮的浓度对双子叶植物的转化影响不明显(因后续重复实验中去除了乙酰丁香酮对出芽率无大的影响)。浸染时间短(3 min)外源基因整合到丹参基

表 1 各种激素配比情况下丹参愈伤诱导情况

Table 1 Different hormone proportions for *Salvia miltiorrhiza* callus induction

培养基 Medium	植物激素 Hytohormone ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			外植体数 (个) Explant number		愈伤数量 (块) Callus number		愈伤性状 Callus status
	NAA	6-BA	2,4-D	叶片 Leaf	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎段 Stem	
Y1	0.1	0.5	0	30	20	24	18	浅黄色 Light yellow
Y2	0	0.5	0.5	30	20	25	12	浅黄绿色 Light yellowgreen
Y3	0.1	1.0	0	30	20	25	15	绿色, 出芽多 Green, many sprouts
Y4	仅含玉米素 0.5 ZR only 0.5			30	23	13	3	深褐色 Puce
D1	0	0	1.0	43	29	29	22	浅色, 根较多 Tint, more roots

表 2 卡那霉素对丹参外植体的杀死浓度范围

Table 2 killing scale of kanamycin to *Salvia miltiorrhiza* explant

项目 Item	卡那霉素浓度 Kanamycin ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)					
	70	50	40	30	20	0
出芽数/外植体数 Bud number/Explant number	0/27	4/27	12/45	20/45	25/45	很多 Many/45
出芽率 Sprouting ratio (%)	0	15	27	44	56	>100

表 3 正交法 [$L_9(3^4)$] 考查丹参遗传转化体系Table 3 Orthogonal method $L_9(3^4)$ to investigate genetic transformation system in *Salvia miltiorrhiza*

组别 Group	因素 Factor				出芽数/ 外植体数 Buds number / Explant number	出芽率 Buds number / explant (%)
	浸染时间 Dimming time (min)	共培养时间 Co-culture time (d)	卡那霉素 Kanamycin ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	乙酰丁香酮 Acetosyringone ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
1	3	1	20	100	22/60	37±2.2bc
2	3	2	30	200	20/60	33±2.2b
3	3	3	40	300	19/58	32±2.7b
4	5	1	30	300	26/56	46±2.4d
5	5	2	40	100	18/60	30±3.3b
6	5	3	20	200	23/52	45±2.0d
7	10	1	40	200	8/45	17±2.2a
8	10	2	20	300	11/52	21±2.2a
9	10	3	30	100	9/43	21±4.4a

注: 采用 SPSS18 Duncan's multiple range test 方法分析, 同一列不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05, n = 3$)。

Note: SPSS18 Duncan's multiple range test method was used, and different letters mean significant differences in the same column ($P < 0.05, n = 3$).

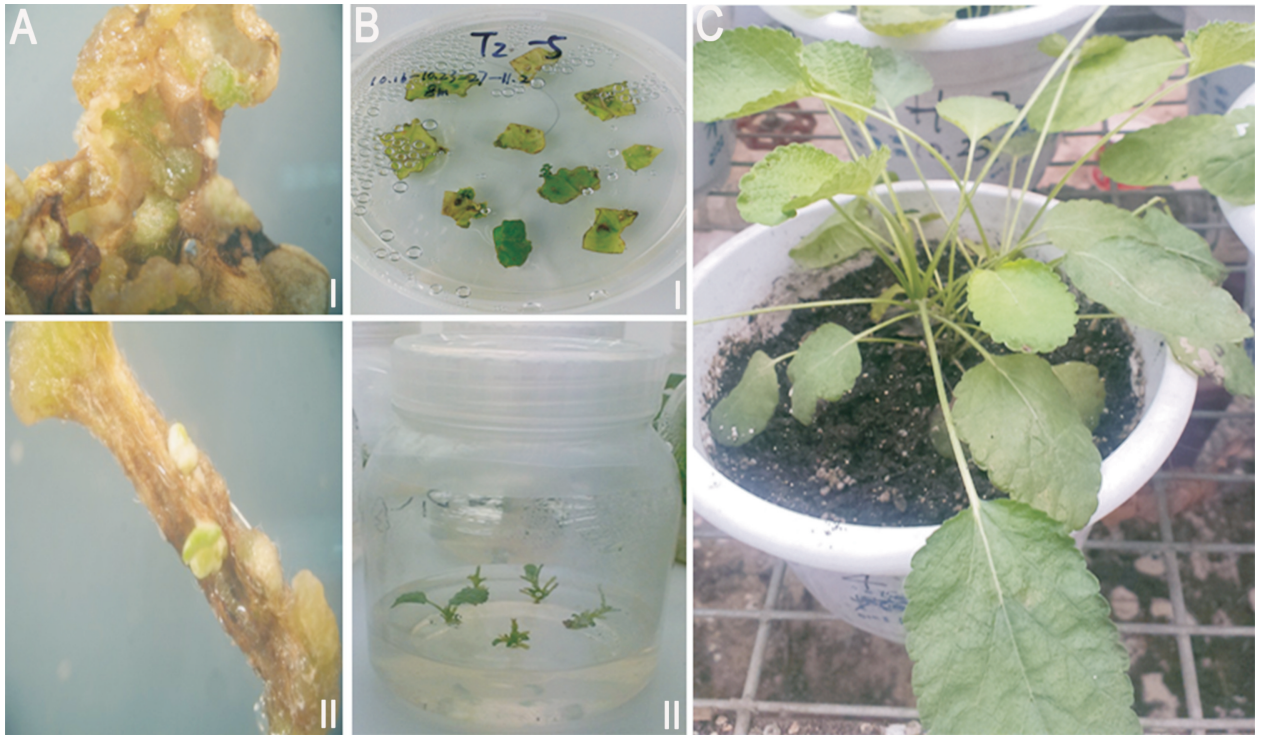


图 1 丹参转基因植株生长过程 A. I. 丹参叶诱导产生愈伤, II. 丹参茎段诱导产生愈伤; B. I. 转基因芽从筛选培养基长出, II. 转基因小芽在生根培养基中生长; C. 转基因苗移栽到土壤中培养。

Fig. 1 Growing process of transgenic *S. miltiorrhiza* plant A. I. Callus inducing from *S. miltiorrhiza* leaf, II. Callus inducing from *S. miltiorrhiza* stem; B. I. Transgenic sprout screening at selective medium, II. Transgenic shoot growing at rooting medium; C. Transgenic seedling transplanted in soil.

因组的几率理论上会下降,但是 1~3 d 的共培养可以减轻这个问题。浸染时间长(10 min)对丹参叶片的损伤较大,有些叶片浸染后呈现褐色,后面的生长状态受影响,出芽不多。浸染 5 min 左右较为适宜,第 4 组和第 6 组均能达到 45% 左右的出芽率,但是第 6 组共培养时间较长,农杆菌的生长旺盛,染菌的几率加大。因此综合考虑,确定遗传转化条件为浸染 5 min,共培养 1 d,卡那霉素 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。转基因过程及植株生长状况见图 1。

2.4 转基因植物的鉴定

提取两组转基因苗的 DNA,第 1 组:浸染 5 min,共培养 1 d,用 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素筛选,第 2 组:浸染 5 min,共培养 1 d,用 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素筛选,每组 10 株, DNA 经电泳检测质量(图 2:A, C),然后分别用 NPTII 基因的正反向引物做 PCR 扩增做转基因鉴定,电泳结果见图 2。第 1 组 10 棵植株中有 6 棵呈阳性(第 3,第 4,第 5,第 7,第 8,第 9 号植株),野生型 CK 没有条带(图 2:B),转基因阳性率达 60%。第 2 组阳性率达到 70%(图 2:D)。

这说明本研究丹参遗传转化方法可行,用链霉素筛选阳性率高于用卡那霉素筛选。

3 讨论与结论

丹参作为重要的药用植物在心脑血管及神经退行性疾病等方面具有治疗作用(赵阳等, 2010; Zhang et al, 2015),其中的有效成分丹参酮主要存在于根。因此丹参的组织培养中对于丹参根及丹参酮的关注较多。本研究通过系统考察不同的激素配比得到不同的愈伤组织,发现在 MS 培养基中仅用反式玉米素 ZR 可诱导出褐色愈伤,此色素见光易分解,这与丹参酮的特点一致,因此可考虑将反式玉米素用于诱导丹参酮的研究。丹参的毛状根可以用来研究丹参的次生代谢物(Zhang et al, 2015; Shi et al, 2016),但是这个过程需要发根农杆菌、或携带相关基因的发根农杆菌的刺激或基因整合,与植物正常条件下的生长状态不同,不定根可以作为研究丹参根生长发育的工具,我们发现 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-

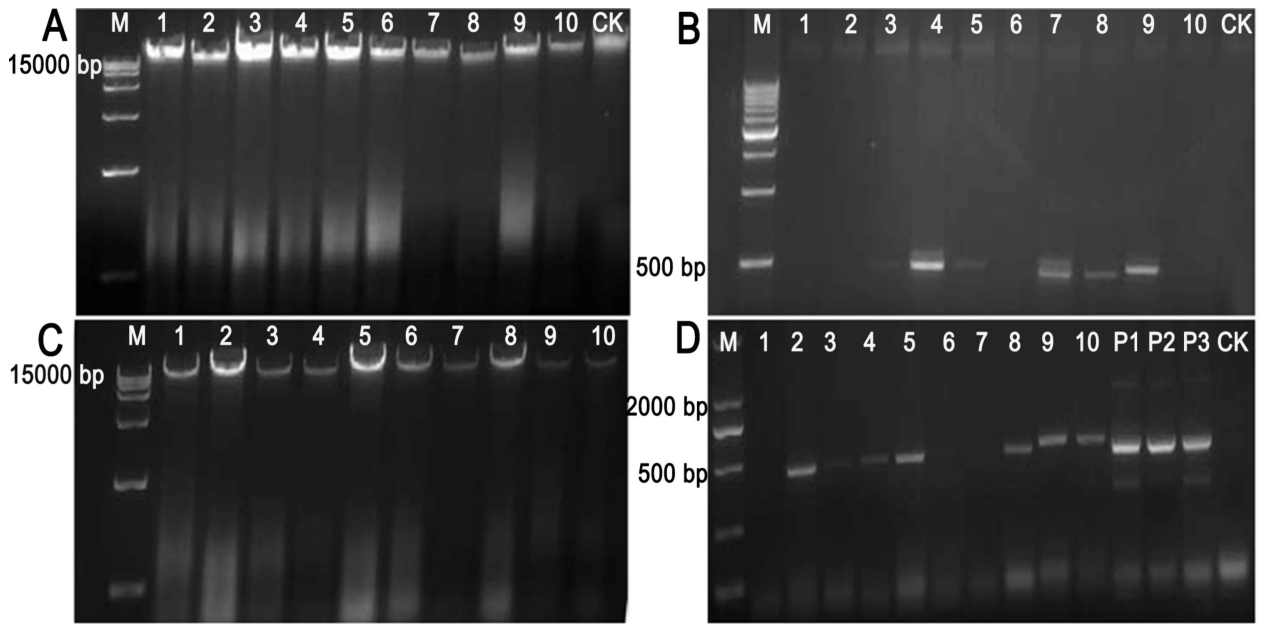


图 2 丹参转基因植株鉴定 A. 第一组植株 DNA 电泳图; 浸染 5 min、共培养 1 d、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素筛选, 泳道依次为 marker (15 000 bp), 1-10 号植株, 野生型植株 (CK); B. 第一组植株 *NPTII* 基因 PCR 验证, 泳道依次为: marker (500 bp ladder), 植株 1-10, 野生型 (CK); C. 第二组植株 DNA 电泳图; 浸染 5 min、共培养 1 d、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素筛选, 泳道依次为 marker (15 000 bp), 植株 1-10; D. *NPTII* 基因 PCR 产物电泳图 泳道依次为 marker (2 000 bp), 植株 1-10, 阳性菌 P1-P3, 野生型植株 (CK)。

Fig. 2 PCR verification of *S. miltirrhiza* transgenic plants A. DNAs extract from Group I; impregnation 5 min and co-culture 1 d, screening at $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin. Lines in order are: marker (15 000 bp), DNA of plant 1-10, DNA of wild type (CK); B. Group I PCR products amplified with primers of *NPTII* gene. Lines in order are: marker (500 bp ladder), plant 1-10, wild type (CK); C. DNAs extract from Group II; impregnation 5 min and co-culture 1 d, screening at $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ streptomycin. Lines in order are: marker (15 000 bp), DNA of plant 1-10; D. Group II PCR products amplified with primers of *NPTII* gene. Lines in order are: marker (2 000 bp), plant 1-10, positive bacterial P1-P3, wild type (CK).

D 可以促进丹参愈伤生根。因此对于不同的研究目的, 我们可以采用不同的愈伤诱导条件。

丹参作为药用模式植物 (Tian, 2011), 在分子层面的研究离不开快捷稳定的遗传转化体系。王喆之课题组在利用陕西本地的丹参叶片作外植体, 在遗传转化方面做了大量工作 (王倩, 2005; 王丽娟, 2005; Yan & Wang, 2007), Cui et al (2015) 用山东白花丹参叶片作外植体也取得成功。但是由于丹参品种繁多且种间差异大、外植体培养条件及状态不同等原因, 我们用已经完成基因组测序的紫花丹参 99-3 品系无菌苗按照已报道的方法在本研究室只有最开始的一批转化成功, 成为制约进一步实验的瓶颈。卡那霉素作为筛选抗性基因 *NPTII* 的常用抗生素, 主要是通过 30S 核糖体结合, 影响 mRNA 密码的读取, 从而导致蛋白翻译受阻。虽然我们的实验表明了丹参叶片对卡那霉素敏感, 但是用它做筛选剂重现性差, 常常发现叶片停止生长。链霉素同属于氨基糖苷类, 具有相同的作用机制, 但是在这

类抗生素中毒性较小。在本实验中也证实工作浓度 ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的链霉素筛选可以获得较高的转基因阳性率, 同时实验重现性较好。因此认为, 链霉素似可以作为卡那霉素筛选剂的替代品, 当然这还需要在其他物种中尝试验证。茎也是丹参遗传转化的好材料, 但是在实际操作中, 浸染农杆菌后农杆菌进入到其内部, 在后期农杆菌较难除净, 因此我们选择叶片作为遗传转化外植体。另外, 我们摸索出的浸染时间和共培养时间大大缩短 (浸染 5 min, 共培养 1 d 与报道的浸染 20 min、共培养 3 d 相比) (Yan & Wang, 2007), 这也简化了实验操作, 减少了后期因农杆菌污染的风险。这些方法的优化改进为深入研究丹参植物提供了很好的技术保障。

致谢 感谢中国医学科学院药用植物研究所卢善发老师的指导及提供场地和经费支持。

参考文献:

CUI G, DUAN L, JIN B, et al, 2015. Functional divergence of

- diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Physiol*, 169: 1607–1618.
- DEL TORO-DE LEON G, LEPE-SOLTERO D, GILLMOR CS, 2016. Zygotic genome activation in isogenic and hybrid plant embryos [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 29: 148–153.
- DING J, NILSSON O, 2015. Molecular regulation of phenology in trees-because the seasons they are a-changing [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 29: 73–79.
- GE SR, YU YX, XIE GX, 2002. Research progress of Danshinolic acids in pharmacological effects [J]. *J Chin Med Mat*, 25(9): 684–686. [戈升荣, 俞一心, 谢更新, 2002. 丹酚酸的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 25(9): 684–686.]
- GUO XH, GAO WY, LI KF, 2007a. Adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza* (I)-effects of various media, salts intensity, and organic components on adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 38(3): 429–432. [郭肖红, 高文远, 李克峰, 2007a. 丹参不定根组织培养的研究 (I) [J]. *中草药*, 38(3): 429–432.]
- GUO XH, GAO WY, LI KF, 2007b. Tissue culture of *Salvia miltiorrhiza* adventitious roots (II) -Effects of carbon, nitrogen, and phosphate sources on culture of *Salvia miltiorrhiza* adventitious root [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 38(6): 907–911. [郭肖红, 高文远, 李克峰, 2007b. 丹参不定根组织培养的研究 (II) [J]. *中草药*, 38(6): 907–911.]
- HU YH, ZHANG R, HU ZB, et al, 1992. Cultivation of the *Salvia miltiorrhiza* callus and its effective components [J]. *Plant Physiol Comm*, 28(6): 424–425. [胡月红, 张瑞, 胡之壁, 等, 1992. 丹参愈伤组织的培养及其有效成分 [J]. *植物生理学通讯*, 28(6): 424–425.]
- JIANG GF, 1994. Research on *Salvia miltiorrhiza* tissue and cell culture [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 25(3): 156–157. [姜广奋, 1994. 丹参组织和细胞培养研究概况 [J]. *中草药*, 25(3): 156–157.]
- LI YS, MA YY, WANG WJ, 2006. Research progress of Danshinolic acids in cardiovascular system pharmacology [J]. *Chin J Integr Med Card-/Cerebrov Dis*, 4(9): 791–793. [李佑生, 马宇滢, 王文健, 2006. 丹酚酸的心血管系统药理作用研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 4(9): 791–793.]
- MA XH, MA Y, TNAG JF, et al, 2015. The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Molecules*, 20: 16235–16254.
- MA YM, YUAN LC, WU B, et al, 2012. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 63(7): 2809–2823.
- MUKHERJEE D, MUKHERJEE A, TAPASH CG, 2015. Evolutionary rate heterogeneity of primary and secondary metabolic pathway genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gen Biol Evol*, 8(1): 17–28.
- SHI J, CUI M, YANG L, et al, 2015. Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development [J]. *Trends Plant Sci*, 20(11): 741–53.
- SHI M, LUO X, JU G, et al, 2016. Enhanced diterpene tanshinone accumulation and bioactivity of transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by pathway engineering [J]. *J Agric Food Chem*, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04697.
- SONG JY, LUO HM, LI CF, et al, 2013. *Salvia miltiorrhiza* as medicinal model plant [J]. *Acta Pharm Sin*, 48(7): 1099–1106. [宋经元, 罗红梅, 李春芳, 等, 2013. 丹参药用模式植物研究探讨 [J]. *药学报*, 48(7): 1099–1106.]
- TIAN P, 2011. Convergence: Where west meets east [J]. *Nature*, 480(7378): S84–86.
- TIAN YH, WANG ZZ, 2003. Tissue culture and plantlet regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. *J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 31(1): 99–102. [田宇红, 王喆之, 2003. 丹参组织培养及植株再生研究 [J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 31(1): 99–102.]
- WANG JY, LIU D, 1987. Organs developing of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Physiol Comm*, (6): 46–48. [王建英, 刘涤, 1987. 丹参的器官发生 [J]. *植物生理学通讯*, (6): 46–48.]
- WANG LJ, 2005. Studies on construction of *Talea 3* gene plant expression vector and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Savia miltiorrhiza* Bunge [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University: 25–30. [王丽娟, 2005. *TaLea 3* 基因植物表达载体构建及其对丹参遗传转化的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学: 25–30.]
- WANG Q, 2005. Studies on construction of HMGR gene plant expression vector and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Savia miltiorrhiza* Bunge [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University: 22–26. [王倩, 2005. HMGR 基因表达载体构建及其对丹参遗传转化的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学: 22–26.]
- YAN YP, WANG ZZ, 2007. Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 88(2): 175–184.
- ZHANG X, GUAN H, DAI Z, et al, 2015. Functional analysis of the ssopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza* via color complementation and RNA interference [J]. *Molecules*, 20: 20206–20218.
- ZHANG XZ, QIAN SS, ZHANG YJ, et al, 2015. *Salvia miltiorrhiza*: a source for anti-Alzheimer's disease drugs [J]. *Pharm Biol*, DOI: 10.3109/13880209.2015.1027408.
- ZHANG YL, SONG JY, QI JJ, et al, 1997. The plant regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bge. transformed by *Agrobacterium* [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 22(5): 274–275. [张荫麟, 宋经元, 祁建军, 等, 1997. 农杆菌转化后丹参植株再生 [J]. *中国中药杂志*, 22(5): 274–275.]
- ZHAO J, CHEN ZS, WAN J, 1999. Clonic reproduction and plant regeneration from blade of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Huazhong Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 33(1): 108–111. [赵洁, 陈志胜, 万钧, 1999. 丹参叶片无性系快速繁殖及植株再生研究 [J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 33(1): 108–111.]
- ZHAO Y, LU Y, ZHENG SZ, et al, 2010. Research progress on pharmacological activities of cryptotanshinone [J]. *Chin J Trad Chin Med Pharm*, 25(11): 1839–1841. [赵杨, 陆茵, 郑仕中, 等, 2010. 隐丹参酮的药理作用研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 25(11): 1839–1841.]
- ZHENG GX, HIROSHI K, 1989. Review on the chemical constituents of the roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chin Pharm J*, 24(1): 6–10. [郑国墀, 柿泽宽, 1989. 丹参化学成分的研究概况 [J]. *中国药学杂志*, 24(1): 6–10.]