

## 丹参 *SmHPPR1* 基因调控丹酚酸生物合成的研究

谈荣慧, 赵望, 张金家, 赵淑娟\*

(上海中医药大学中药研究所, 中药新资源与品质评价国家中医药管理局重点研究室, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

**摘要:** 丹参是临床上治疗心脑血管疾病的常用中药, 其主要水溶性活性成分为迷迭香酸和丹酚酸B, 由苯丙烷类代谢途径产生。4-羟基苯丙酮酸还原酶 (HPPR) 是苯丙烷代谢途径中的关键酶。本课题组前期在丹参中克隆了 *SmHPPR1* 基因并构建了植物表达载体。在此基础上, 获得了携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥阳性植株并测定 4-羟基苯乳酸的含量; 诱导了过表达 *SmHPPR1* 丹参毛状根并进行有效成分含量测定和转录组分析。结果显示: 携带 *SmHPPR1* 的 T1 代转基因拟南芥中 4-羟基苯乳酸含量为  $0.594 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; *SmHPPR1*-OE-3 毛状根中的迷迭香酸、丹酚酸B、总丹酚酸含量分别是 control-3 毛状根的 1.09、1.29、1.15 倍, 丹参素是 control-3 毛状根的 36.26%; 转录组分析显示, *SmHPPR1* 过表达引起了 *SmTAT2* 表达量上调; 蛋白-蛋白相互作用表明 CYT (TR74706\_c0\_g1)、NADP<sup>+</sup> (TR26565\_c0\_g1) 和 NADP<sup>+</sup> (TR68771\_c0\_g1) 是网络的中心节点并参与代谢过程、细胞过程等。以上研究表明, *SmHPPR1* 在携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥中能催化 4-羟基苯丙酮酸还原为 4-羟基苯乳酸; 丹参毛状根中过表达 *SmHPPR1* 可以通过协同调控其他途径基因来提高丹酚酸的含量。

**关键词:** 丹参; 4-羟基苯丙酮酸还原酶; 丹酚酸; 迷迭香酸; 生物合成

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2818-11

## *SmHPPR1* from *Salvia miltiorrhiza* regulated the biosynthesis of salvianolic acids

TAN Rong-hui, ZHAO Wang, ZHANG Jin-jia, ZHAO Shu-juan\*

(The SATCM Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicine, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge is a traditional Chinese medicinal herb widely used to treat cardiovascular and cerebrovascular diseases at clinic. Its main water-soluble components are rosmarinic acid (RA) and salvianolic acid B (SAB), which are produced by phenylpropanoid pathway. 4-Hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR) is a key enzyme in phenylpropanoid metabolism pathway. *SmHPPR1* was cloned from *S. miltiorrhiza* and was constructed into plant expression vector pJR-*SmHPPR1*. On this basis, *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis* plants were induced and the content of 4-hydroxyphenyllactic acid (pHPL) was determined. *SmHPPR1*-overexpressing (*SmHPPR1*-OE) hairy roots of *S. miltiorrhiza* were obtained and the concentration of active components and transcriptome analysis were performed. The results showed that the concentration of pHPL in *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis* T1 was  $0.594 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  dry weight. The concentration of RA, SAB and total salvianolic acid in *SmHPPR1*-OE-3 hairy roots were 1.09, 1.29, 1.15 times of that in control-3, respectively, and the content of Danshensu was 36.26% of that in control-3. Transcriptomic analysis revealed that overexpression of *SmHPPR1* caused the upregulation of other

收稿日期: 2023-01-10; 修回日期: 2023-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (30300447); 上海中医药大学预算内项目 (2019LK103).

\*通讯作者 Tel: 86-21-51322576, E-mail: zhaoshujuan@126.com; zhaoshujuan@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0030

phenylpropanoid pathway genes like *SmTAT2*. Protein-protein interaction indicated CYT (TR74706\_c0\_g1), NADP<sup>+</sup> (TR26565\_c0\_g1) and NADP<sup>+</sup> (TR68771\_c0\_g1) is the central node of the network and participated in metabolic process and cellular process. The tracking work in this study proved that *SmHPPR1* could catalyze the reduction of 4-hydroxyphenylpyruvic acid to 4-hydroxyphenyllactic acid in *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis*, and *SmHPPR1*-overexpressing in hairy roots of *S. miltiorrhiza* could increase the concentration of salvianolic acids through synergistically regulating other pathway genes.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge; 4-hydroxyphenylpyruvate reductase; salvianolic acid; rosmarinic acid; biosynthesis

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Radix et Rhizoma) 是唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的干燥根和根茎, 具有活血祛瘀, 调经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效<sup>[1]</sup>。其基原植物具有生命力强、周期短、基因组小、染色体数目少等特点, 随着组织培养和转基因技术成熟、丹参转录组和基因组信息的逐步丰富, 丹参被认为是中药研究的理想模式植物<sup>[2,3]</sup>。丹参中的有效成分主要分为两类: 脂溶性的二萜醌类化合物, 如丹参酮 I、丹参酮 IIA、隐丹参酮等; 和水溶性的酚酸类成分 (丹酚酸类化合物), 如丹酚酸 B (salvianolic acid B, SAB)、丹酚酸 A、迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 和丹参素 (danshensu, DSU) 等。研究表明, 丹参水溶性成分具有抗心肌缺血、抗血栓、抗高血脂、抗胃溃疡、调节组织修复和再生等作用<sup>[4-6]</sup>。

丹酚酸类化合物由苯丙氨酸和酪氨酸两条相互平行的分支途径产生。苯丙氨酸被苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸 4-羟化酶 (C4H) 和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL) 催化产生 4-香豆酰 CoA; 酪氨酸在酪氨酸转氨酶 (TAT) 作用下生成 4-羟苯基丙酮酸 (pHPP), pHPP 被 4-羟苯基丙酮酸还原酶 (HPPR) 催化为 4-羟基苯乳酸 (pHPL)。活化形式的 4-香豆酰 CoA 和 pHPL 在迷迭香酸合成酶 (RAS) 和细胞色素 P450 蛋白—CYP98A14 的催化下生成迷迭香酸<sup>[7-10]</sup> (图 1)。同时, 4-香豆酰 CoA 在一系列木质素合成酶作用下生成木质素<sup>[11,12]</sup>。

HPPR 广泛分布于陆生植物中, 在苔藓、蕨类植物、裸子植物和被子植物中均发现了与 HPPR 结构同源<sup>[13]</sup>。近年来, 多种植物中克隆鉴定出 HPPR 基因, 如彩叶草 (*Coleus blumei*)<sup>[14]</sup>、洋苏草 (*Salvia officinalis*)<sup>[15]</sup>、黄芩 (*Scutellaria baicalensis*)<sup>[16]</sup>、紫苏 (*Perilla frutescens*)<sup>[17]</sup>、猫须草 (*Orthosiphon aristatus*)<sup>[18]</sup>、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)<sup>[13]</sup>、小麦 (*Triticum aestivum*)<sup>[19]</sup> 等。研究发现, HPPR 属于 D-异构体特异性 2-羟基酸脱氢酶家族<sup>[20]</sup>。大肠杆菌中异源表达的 CbHPPR 可催化 NAD(P)H 依赖的 4-羟基苯丙酮酸还原为 4-羟基苯乳酸, 3,4-二羟基苯丙酮酸还原为 3,4-二羟基苯乳酸<sup>[14]</sup>。紫苏 *PfHPPR* 在根、茎、叶中均有表达, 但在叶片中表达量最高, 并受

脱落酸 (ABA)、水杨酸 (SA)、紫外线-B 辐射 (UV-B) 等多种因素诱导<sup>[17]</sup>。小麦 *TaHPPR* 在根、小穗、叶鞘中均有表达, 且在低温、干旱、ABA 和高盐胁迫处理下表达水平均有所下降<sup>[19]</sup>。

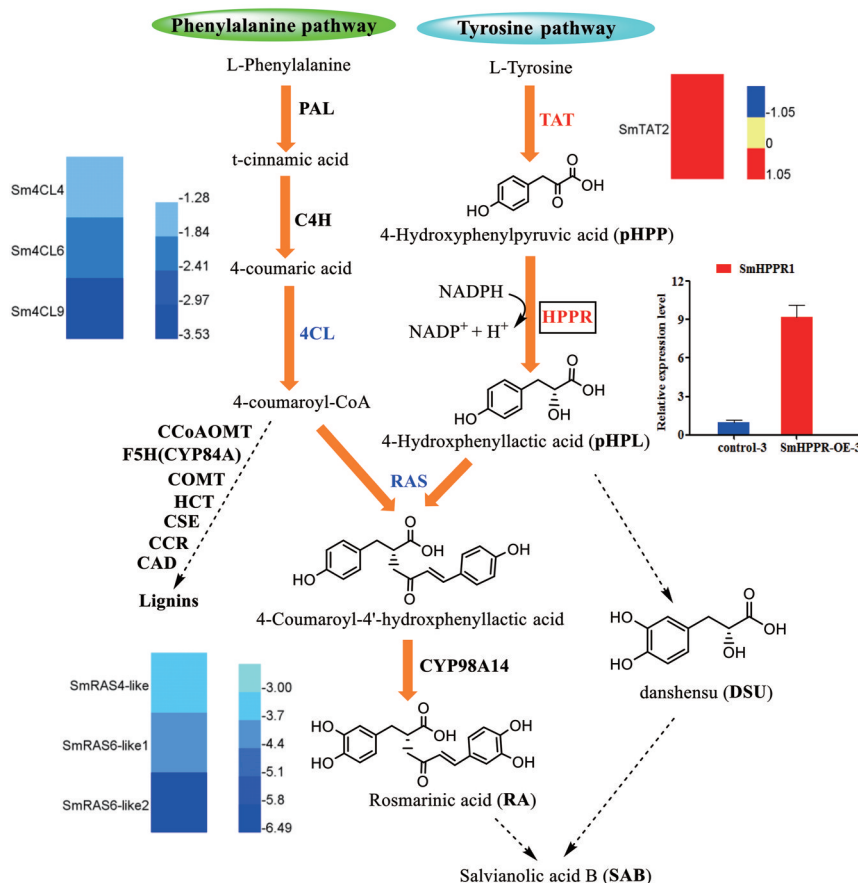
本课题组前期实验中克隆到丹参 *SmHPPR1* (GenBank: DQ266514), 编码 313aa, 并构建植物表达载体 pJR-*SmHPPR1*。本研究在此基础上, 将植物表达载体分别导入根癌农杆菌 GV3101 和发根农杆菌 LBA9402, 侵染拟南芥幼苗和丹参无菌苗幼嫩叶片诱导携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥和过表达 *SmHPPR1* 丹参毛状根; 筛选携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥并测定 pHPL 的含量; 筛选过表达 *SmHPPR1* 丹参毛状根并进行有效成分含量测定和转录组分析, 以此来探讨 *SmHPPR1* 在丹酚酸合成途径中的作用, 为利用基因工程手段合成丹酚酸有效成分奠定基础。

## 材料与方法

**材料** 丹参植株 (两年生) 采自上海中医药大学百草园, 收集盛花期丹参植株的根、叶和花组织材料, 液氮速冻、并于 -80 °C 冰箱保存备用。丹参无菌苗 (MS 固体培养基培养) 由本实验室培养。所用大肠杆菌 Top10、pJR 质粒、pJR-*SmHPPR1* 质粒、发根农杆菌 LBA9402 均为本实验室保存。拟南芥种植于 20 °C 植物培养箱, 光周期为 16 h/8 h (亮/暗)。

**试剂和仪器** PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒、SYBR Green® premix Ex Taq™ 试剂盒 (大连宝生物工程公司); PR3 聚合酶、DNA Marker (上海创英生物科技有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程公司); 木质素含量检测试剂盒、引物合成 (上海生工生物工程公司); RA 和 SAB 对照品 (上海融禾医药科技发展有限公司); 乙腈 (色谱纯, Fisher 公司), 其余试剂为分析纯。实时荧光定量 PCR 仪-StepOnePlus (ABI); Agilent 1100 和 1260 高效液相色谱仪; BioTek Synergy H1 酶标仪, Percival 培养箱。

**植物表达载体的构建** 将实验室保种的 T-*SmHPPR1* 和 pJR 质粒分别用 *Bam* H I 和 *Sal* I 核酸内切



**Figure 1** Phenylpropanoid biosynthetic pathway in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*. The heat map showed the expression level of DEGs between *SmHPPR1*-OE-3 and control-3. Red, up-regulated; blue, down-regulated. Different colors indicate different gene expression levels based on the  $\log_2FC$  values

酶双酶切, 胶回收目的片段后连接并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, PCR 扩增筛选阳性单菌落, 将单菌落摇菌提质粒酶切鉴定并送测序, 经鉴定正确的重组质粒命名为 pJR-*SmHPPR1*。

**根癌农杆菌介导的遗传转化** 利用冻融法将 pJR-*SmHPPR1* 质粒转化根癌农杆菌 GV3101, 将 PCR 验证正确的阳性单克隆命名为 GV3101-*SmHPPR1* 并转接于 20 mL 含有 50 mg·L<sup>-1</sup> 庆大霉素 (gentamycin, Gm) 和 50 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素 (kanamycin, Kan) 的 LB 液体培养基中, 28 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养过夜; 取培养物, 加入 200 mL 含有 50 mg·L<sup>-1</sup> Kan 的 LB 液体培养基中, 28 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 培养至  $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$ ; 将培养物于 5 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 15 min, 收集菌体, 用 MSOH 液体培养基重悬, 使  $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$  备用。MSOH 是在 MS 培养基的基础上由 1 g·L<sup>-1</sup> 水解酪蛋白替代 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub><sup>[21]</sup>。

**转基因拟南芥株系的获得及筛选** 转化前 4 天将已抽苔的花序剪掉, 选取生长良好的植物并使土壤吸足水。把 GV3101-*SmHPPR1* 农杆菌悬浮液倒在搪瓷盘中, 将长有植物的培养杯在其中倒置, 保证植株莲座

叶以上部分浸没于液体中, 15 s 后取出转化植株, 平放在一个铁盘中, 盖上保鲜膜, 移入温室暗培养, 第二天揭去保鲜膜, 竖直培养。转化的拟南芥生长 3 到 4 周后, 收种子并放在干燥环境中存放 2 周。将经过消毒的种子铺种于含有 50 mg·L<sup>-1</sup> Kan 的 MS 培养基上, 春化处理, 移至温室 6~8 天后, 挑出能正常生长的绿苗, 移栽到土壤中。用 CTAB 法<sup>[22]</sup> 提取植株基因组 DNA 并用引物 *SmHPPR1*-F1、*SmHPPR1*-R1 扩增 *SmHPPR1* 基因条带, 筛选携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥阳性植株。

**转基因拟南芥植株酚酸类物质含量的测定** 样品溶液的制备: 收取成熟刚收集种子的野生拟南芥 (WT)、携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥植株, 冷冻干燥后剪成 2~4 mm 的小段, 分别精密称取 100.00 mg 后转移至三角瓶中, 加入蒸馏水 15 mL, 暗处放置 18 h (期间可轻轻摇晃), 取上清液适量, 微孔滤膜滤过后, 即得样品溶液 1 和 2。标准品溶液的制备: 精密称取 pHPP 适量于容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得对照品浓度为 2.44 mg·mL<sup>-1</sup>; 精密称取 pHPL 适量于量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得标准品浓度为 2.14 mg·mL<sup>-1</sup>。

内参样品制备: 精密吸取 pHPL 标准品 50  $\mu\text{L}$  于两个 5 mL 量瓶中, 分别用样品溶液 1 和 2 稀释定容, 得样品溶液 3 和 4。色谱条件: Agilent 1100 高效液相色谱仪, 色谱柱为 C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 检测波长 280 nm, 流动相为乙腈 (A) 和 0.4% 甲酸 (B) 梯度洗脱: 0~40 min, A 的比例由 0 到 30%, B 的比例由 100% 到 70%。

**发根农杆菌介导的遗传转化** 利用三亲杂交法将 pJR-*SmHPPRI* 质粒和 pJR 质粒转入发根农杆菌 LBA9402, PCR 验证正确的阳性单克隆命名为 LBA9402-*SmHPPRI* 和 LBA9402-control, 并转接于 3 mL 含有 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的利福平 (rifampicin, Rif) 和 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kan 的 YMB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  震荡培养至 YMB 液体培养基变为浑浊的淡黄色, 按 1% 比例接种至 20 mL YMB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  震荡培养至  $A_{600}$  为 0.5 备用。

**丹参毛状根的诱导及筛选** 参照文献<sup>[21]</sup>的实验方法诱导丹参毛状根。将活化的 LBA9402-*SmHPPRI* 和 LBA9402-control 的菌液稀释 2 倍, 侵染丹参无菌苗幼嫩叶片, 5 min 后放在 MSOH 固体培养基上 25  $^{\circ}\text{C}$  暗培养; 2 天后用无菌水洗去叶片表面的菌液并放在含有 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  头孢噻肟 (cefotaxime sodium, Cef) 的 MSOH 固体培养基上 25  $^{\circ}\text{C}$  暗培养; 2 周左右在叶片周围长出毛状根, 待毛状根生长到 2 cm 左右时剪下并转移到含有 500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cef 和 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Kan 的 MSOH 固体培养基中培养; 3 周后将毛状根转移到含有 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cef 的 MSOH 固体培养基中培养; 2~3 周后转移到 MSOH 液体培养基中培养。脱菌完全的丹参毛状根在 MSOH 液体培养基上继代培养, 每 21 天转接一次。采用 CTAB 法<sup>[22]</sup>提取毛状根基因组 DNA 并分别用引物 *SmHPPRI*-F2、*SmHPPRI*-R2 和 *Kan*-F、*Kan*-R (表 1) 扩增 *SmHPPRI* 和 *Kan* 基因条带, 筛选过表达 *SmHPPRI* 和载体对照毛状根株系并命名为: *SmHPPRI*-OE 和 control。

**丹参毛状根丹酚酸的提取测定** 以“1 g 鲜重/100 mL MSOH 液体培养基”接种丹参毛状根, 21 天后收取丹参毛状根材料并于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻, 冷冻干燥机冻干并研磨成粉, 储存于电子干燥器中备用。

**RA 和 SAB 的提取** 参照文献<sup>[23]</sup>的实验方法, 精密称取粉末 50 mg, 加入 70% 甲醇和 1% 甲酸 10 mL, 常温浸泡 30 min, 超声 40 min。

**DSU 的提取** 精密称取粉末 100 mg, 加入 70% 甲醇和 1% 甲酸 5 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床振荡 30 min, 60  $^{\circ}\text{C}$  超声 60 min, 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清。沉淀加入 70% 甲醇和 1% 甲酸 5 mL 并重复上述操作, 将两者上清合并并用  $\text{N}_2$  挥干, 加入 70% 甲醇和 1% 甲酸 1 mL 超

声 30 min。

**标准品溶液的制备** 分别精密称取 DSU、RA 和 SAB 对照品, 加入 70% 甲醇和 1% 甲酸制成 DSU、RA 和 SAB 标准品溶液。

**色谱条件** 测定 RA 和 SAB 的色谱条件 (2008 年、2010 年) 同测定转 *SmHPPRI* 拟南芥植株中酚酸类物质含量的方法; 测定 RA 和 SAB 的色谱条件 (2022 年): 与上述不同的是采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪, 检测波长 286 和 330 nm, 流动相 A (25%) 和 B (75%) 在 0~30 min 等比例洗脱。测定 DSU 的色谱条件: 与测定 RA 和 SAB 色谱条件 (2022 年) 不同的是, 检测波长 300 nm, 乙腈 (A) 和 0.4% 甲酸 (B) 梯度洗脱: 0~10 min, A 5%, B 95%; 11~20 min, A 25%, B 75%; 21~40 min, A 90%, B 10%; 41~45 min, A 5%, B 95%。

**木质素含量测定** 精密称取 5 mg 丹参毛状根粉末于 1.5 mL 离心管中, 按照木质素含量检测试剂盒说明书操作, 酶标仪分别测定 280 nm 下样品管和空白管的吸光值 ( $A$ )。

**实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR)** 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 qPCR 引物 (表 1), 对引物的扩增效率进行了评估, *qSmHPPRI* 和 *qActin* 的引物扩增效率范围为 95%~105%。提取 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根的总 RNA, 根据反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链, -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。将反转录得到的 cDNA 稀释 5 倍, 按照 SYBR Green<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒说明书加样并进行 qPCR 反应, 以丹参 *Actin* 基因为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算相对表达水平<sup>[24]</sup>。

**Table 1** Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Fragment length /bp
Screening primers of overexpression hairy roots		
<i>SmHPPRI</i> -F1	ttggatccaccactcaaacaccatct	1 019
<i>SmHPPRI</i> -R1	tgaagcttcaagattcaaac	
<i>SmHPPRI</i> -F2	tcaggatccatggaggcgcggtgttc	933
<i>SmHPPRI</i> -R2	cagtctagaaggtgtaacagaggct	
<i>Kan</i> -F	cacaacagacaatcggc	660
<i>Kan</i> -R	cgtaaagcagaggaag	
qPCR primes		
<i>qActin</i> -F	aggaaccaccgatccagaca	278
<i>qActin</i> -R	ggtgccctgaggtcctgtt	
<i>qSmHPPRI</i> -F	cgccgacgccgatcatcgactca	190
<i>qSmHPPRI</i> -R	aatccgcctcagaaccgccagcat	

**转录组测序及生物信息学分析** 将过表达丹参毛状根 *SmHPPRI*-OE-3 和载体对照丹参毛状根 control-3 送到上海中科新生命公司进行 cDNA 文库构建和转录组测序。去除接头序列和低质量的 reads, 获得可用于后续分析的 clean reads 并由 Trinity 软件进行转录本拼

接。应用 DESeq2 软件进行样品组间的差异表达分析, 对原有假设检验得到的  $P$ -value 进行校正, 以差异表达倍数 (fold change, FC) 和错误发现率 (false discovery rate, FDR) 作为差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选条件, 筛选标准为  $|\log_2FC| > 1$  且  $FDR < 0.05$ 。利用 KEGG 数据库预测 DEGs 主要参与的代谢途径和信号通路。利用 HemI 1.0 软件绘制各样本中基因表达量的热图。利用 STRING 数据库 (<https://www.string-db.org/>) 预测 *SmHPPR1*-OE-3 毛状根的 DEGs 对应的蛋白之间可能存在的相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 并用 Cytoscape 3.9.1 软件构建预测的 PPI 网络。

## 结果与分析

### 1 丹参 *SmHPPR1* 的聚类分析

为了研究丹参 *SmHPPRs* 家族成员的亲缘关系, 基于 *SmHPPR1*、*SmHPPR2* (GenBank: KF220565)、*SmHPPR3* (GenBank: KF220566) 和 *SmHPPR4* (GenBank: KF220566) 蛋白的氨基酸, 同时选择拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和彩叶草 (*Coleus blumei*) 的 HPPR 蛋白序列为参照, 利用 MEGA 7.0 软件、使用邻接法 (neighbor-joining) 中重复 1 000 次抽样的方法构建系统进化树。聚类结果 (图 2) 显示, *SmHPPR1* 与彩叶草 (*CbHPPR*) 亲缘关系最近, 其次是拟南芥 (*AtHPPR2*、*AtHPPR3*)。

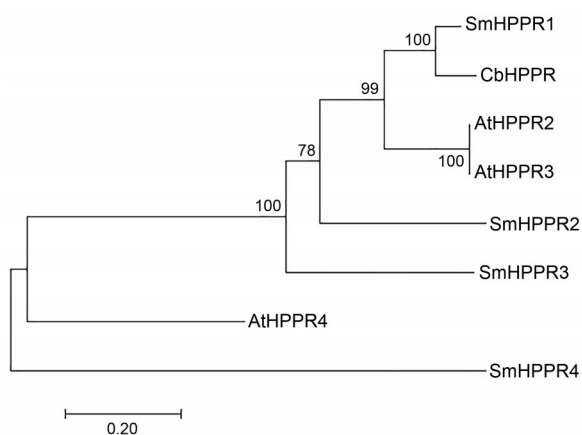


Figure 2 Phylogenetic analysis of HPPR homologous proteins

### 2 转基因拟南芥植株的获得和筛选

冻融法将 pJR-*SmHPPR1* 质粒转入根癌农杆菌 GV3101, 再以浸泡法转化拟南芥。T0 代拟南芥种子经表面消毒后, 平铺于含  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kan 的 MS 培养基上 (每个培养皿约 300 粒种子)。从大约 600 粒种子中得到 10 棵能正常发芽生长的植株 (图 3A)。结果表明:

不含 Kan 抗性的植株子叶变黄, 不能继续生长, 而含 Kan 抗性的植株长势良好。

将抗性筛选后的小苗移栽到土壤中, 待长出较大的真叶后, 提取叶片的基因组 DNA, 以 WT 拟南芥植株为对照, 用 *SmHPPR1*-F1/*SmHPPR1*-R1 为引物 PCR 扩增, 发现绝大部分 Kan 抗性植株的 PCR 结果都是阳性的 (图 3B)。可以确定这些拟南芥植株已转入丹参 *SmHPPR1* 基因。

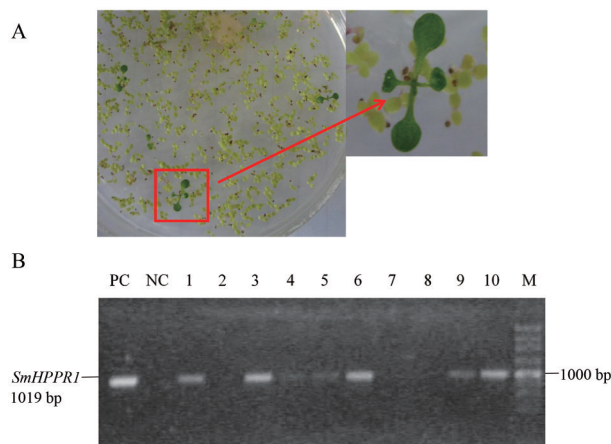


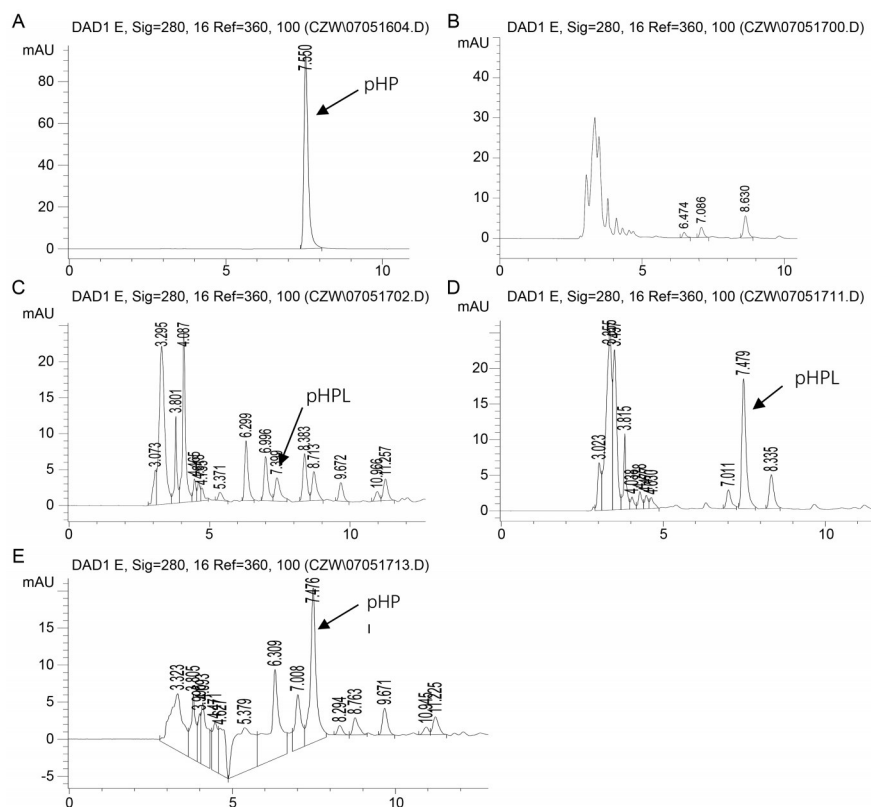
Figure 3 Induction and screening of *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis*. A: *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis*; B: Molecular identification of *SmHPPR1* transgenic *Arabidopsis*. M: DNA marker; PC: Positive control; NC: Negative control

### 3 转基因拟南芥酚酸类物质含量测定

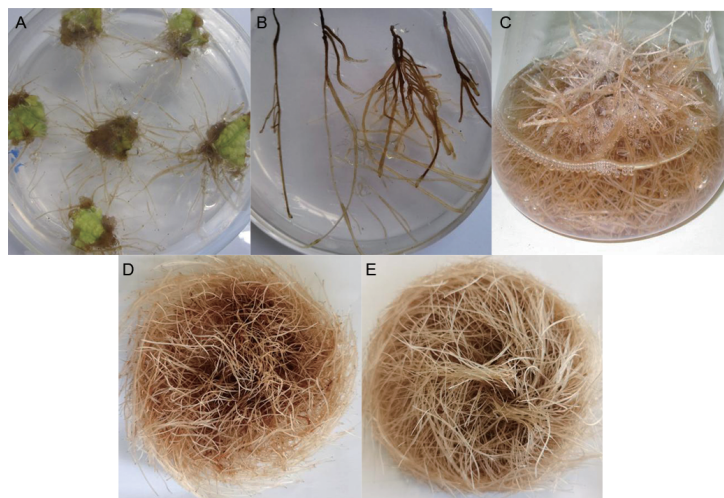
HPLC 法检测 WT 拟南芥和携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥中 HPPR 催化的产物—4-羟基苯乳酸的含量。如图所示, 野生型拟南芥中未检测到 4-羟基苯乳酸, 转 *SmHPPR1* T1 代拟南芥中 4-羟基苯乳酸含量为  $0.594 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  干重 (dry weight, DW) (图 4)。推测 *SmHPPR1* 基因在拟南芥中的表达产物可能参与了 4-羟基苯乳酸的生物合成反应。

### 4 *SmHPPR1* 过表达丹参毛状根的获得和筛选

LBA9402-*SmHPPR1* 菌液侵染丹参无菌苗叶片, 3 周后叶片周围长出 2 cm 左右的丹参毛状根 (图 5A), 将毛状根剪下转移到含有  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef 和  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kan 的 M5OH 固体培养基中培养 (图 5B), 经过多次转接直至脱菌完成, 将毛状根转接到 M5OH 液体培养基中暗培养 (图 5C)。LBA9402-control 诱导丹参毛状根的过程与上述过程类似。提取丹参毛状根基因组 DNA, PCR 扩增 *SmHPPR1* 和 Kan 目的条带 (图 6A、B), PCR 条带与目的条带大小一致, 说明诱导的丹参毛状根过表达 4 个株系和载体对照 4 个株系均为阳性。根据毛状根生长状态和丹酚酸含量选取 *SmHPPR1*-OE-3



**Figure 4** HPLC chromatograms of sample solution. A: 4-Hydroxyphenyllactic acid (pHP) reference standards; B: WT *Arabidopsis* extraction solution (Sample solution 1); C: WT *Arabidopsis* extraction solution containing pHP reference standards (Sample solution 3); D: *SmHPPRI* transgenic *Arabidopsis* extraction solution (Sample solution 2); E: *SmHPPRI* transgenic *Arabidopsis* extraction solution containing pHP reference standards (Sample solution 4)



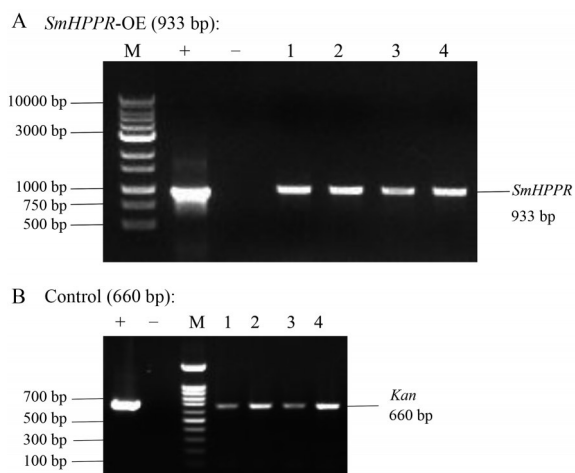
**Figure 5** Danshen hairy roots induced by LBA9402-*SmHPPRI*. A: Hairy roots grow around leaves; B: Obtainment of kanamycin-resistant hairy roots through selecting on medium with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kanamycin; C: The degerminated hairy roots were transferred to MSOH liquid medium for culture; D: Hairy roots of *SmHPPRI*-OE-3 cultured for 21 days; E: Hairy roots of control-3 cultured for 21 days

和 control-3 作为后期研究对象, 其中 *SmHPPRI*-OE-3 毛状根中的 RA、SAB 和总丹酚酸 (total salvianolic acids, TSA, RA 和 SAB 之和) 含量分别是  $60.28$ 、 $22.64$  和  $82.92 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; control-3 毛状根中的 RA、SAB 和 TSA 含量分别是  $45.45$ 、 $34.51$  和  $79.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; *SmHPPRI*-

OE-3 和 control-3 毛状根的干重分别是  $0.61$  和  $0.56 \text{ g}$  (表 2)。

### 5 培养丹参毛状根中丹酚酸含量的测定

继代培养后, 再次考察 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根的丹酚酸含量。收取以“ $1 \text{ g}$  鲜重/ $100 \text{ mL}$  MSOH



**Figure 6** Molecular identification of target hairy roots. A: Detection of *SmHPPRI* gene by PCR; B: Detection of *Kan* gene by PCR. M: Marker; +: The corresponding plasmid (positive control); -: Non-transgenic hairy root

液体培养基”中培养21天的 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 丹参毛状根材料 (图 5D、E) 并冷冻干燥研磨成粉, 高效液相测定 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根中 DSU、RA 和 SAB 含量, *SmHPPRI*-OE-3 毛状根中的 DSU、RA、SAB 和 TSA 含量分别是  $0.62 \pm 0.07$ 、 $73.65 \pm 4.85$ 、 $30.51 \pm 2.78$  和  $104.16 \pm 4.28 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; control-3 毛状根中的 DSU、RA、SAB 和 TSA 含量分别是  $1.71 \pm 0.37$ 、 $67.42 \pm 3.70$ 、 $23.46 \pm 4.20$  和  $90.88 \pm 7.45 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; *SmHPPRI*-OE-3

和 control-3 毛状根的干重分别是  $0.73 \pm 0.01$  和  $0.96 \pm 0.11 \text{ g}$  (表 2)。 *SmHPPRI*-OE-3 毛状根中的 RA、SAB、TSA 含量分别是 control-3 毛状根的 1.09、1.29、1.15 倍, DSU 是 control-3 毛状根的 36.26%。 SPSS 软件分析表明 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根中 RA、SAB 和 TSA 含量无显著差异, DSU 和干重有显著差异。

### 6 丹参毛状根木质素含量的测定

*SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根木质素含量分别是  $(11.38 \pm 0.37)\%$ 、 $(12.70 \pm 1.36)\%$  (表 2)。 SPSS 软件分析表明 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根中木质素含量无显著差异。

### 7 测序数据分析和 KEGG 富集分析

为了研究 *SmHPPRI* 基因对丹参毛状根中丹酚酸含量的影响, 将 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 送转录组测序, 分别获得 74 582 409 和 75 754 693 个 clean reads (表 3)。 差异表达基因共有 4 081 个, 其中 1 738 个基因表达上调, 2 343 个基因表达下调 (图 7A)。 KEGG 富集分析表明差异表达基因显著富集在次生代谢物的生物合成 (ko01110)、苯丙烷类生物合成 (ko00940)、代谢途径 (ko01100) 和植物激素信号转导 (ko04075) 等 (图 7B)。 丹参毛状根中过表达 *SmHPPRI* 后, 引起了丹酚酸生物合成途径基因表达量变化, 如 *SmTAT2* 表达量上调; *Sm4CL4*、*Sm4CL6*、*Sm4CL9*、*SmRAS4-like*、*SmRAS6-like1* 和 *SmRAS6-like2* 表达量下调 (图 1, 表 4)。

qPCR 分析 *SmHPPRI*-OE-3 和 control-3 毛状根中

**Table 2** The concentration of salvianolic acids in danshen hairy roots. "/" means lignin has not been measured. DSU: Danshensu; RA: Rosmarinic acid; SAB: Salvianolic acid B; TSA: Total salvianolic acids; DW: Dry weight

Sample	Sampling time	Dry weight/g	Salvianolic acid/mg·g <sup>-1</sup> DW				Lignin/%
			DSU	RA	SAB	TSA	
Control-3	2010	0.56	/	45.45	34.51	79.96	/
	2022	$0.96 \pm 0.11$	$1.71 \pm 0.37$	$67.42 \pm 3.70$	$23.46 \pm 4.20$	$90.88 \pm 7.45$	$11.38 \pm 0.37$
<i>SmHPPRI</i> -OE-3	2008	0.61	/	60.28	22.64	82.92	/
	2022	$0.73 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.07$	$73.65 \pm 4.85$	$30.51 \pm 2.78$	$104.16 \pm 4.28$	$12.70 \pm 1.36$

**Table 3** Transcriptome sequencing data and transcriptome assembly

Sample	Raw_read	Clean_read	Error/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
Control-3-①	82 142 460	80 974 024	0.02	98.18	94.45	48.10
Control-3-②	71 304 730	70 535 362	0.02	98.20	94.50	48.22
<i>SmHPPRI</i> -OE-3-①	75 248 990	74 743 574	0.02	98.24	94.58	47.39
<i>SmHPPRI</i> -OE-3-②	74 884 956	74 421 244	0.02	98.43	95.1	47.37

**Table 4** Gene expression levels of DEGs in the synthesis pathway of salvianolic acid between *SmHPPRI*-OE-3 and control-3 hairy roots

Gene	Gene_id	log <sub>2</sub> FC	NR_annotation
<i>SmTAT2</i>	TR739_c4_g1	1.05	Tyrosine aminotransferase 2 [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>Sm4CL4</i>	TR174_c0_g1	-1.28	4-Coumarate:coenzyme A ligase 4 [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>Sm4CL6</i>	TR4603_c0_g1	-2.17	4-Coumarate:coenzyme A ligase 6, partial [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>SmRAS4-like</i>	TR5466_c0_g1	-3.00	Rosmarinic acid synthase 4, partial [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>Sm4CL9</i>	TR8805_c0_g1	-3.53	4-Coumarate--CoA ligase 9[ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>SmRAS6-like1</i>	TR2028_c4_g1	-4.08	Rosmarinic acid synthase 6 [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]
<i>SmRAS6-like2</i>	TR35281_c0_g1	-6.49	Rosmarinic acid synthase 6 [ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ]

*SmHPPR1* 的表达水平, 结果表明 *SmHPPR1* 在 *SmHPPR1*-OE-3 中的表达水平是 control-3 的 9.21 倍 (图 1)。

## 8 PPI 分析

将 *SmHPPR1*-OE-3 和 control-3 的 DEGs 导入 STRING 数据库构建 PPI 网络 (score > 0.80), 共包含 55 个节点和 198 条边, 其中 CYT (TR74706\_c0\_g1)、NADP<sup>+</sup> (TR26565\_c0\_g1) 和 NADP<sup>+</sup> (TR68771\_c0\_g1) 占据网络中心位置, degree 值分别是 13、11 和 11 (图 8)。CYT (TR74706\_c0\_g1) 注释为细胞色素 b6-f 复合铁硫亚基, NADP<sup>+</sup> (TR26565\_c0\_g1) 和 NADP<sup>+</sup> (TR68771\_c0\_g1) 注释为甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (表 5)。进一步分析表明它们主要参与了代谢过程 (Ko01100, Ko01120, Ko01200 等)、遗传信息处理 (Ko04141, Ko03040)、环境信息处理 (Ko04010)、细胞过程 (Ko04144) 等。

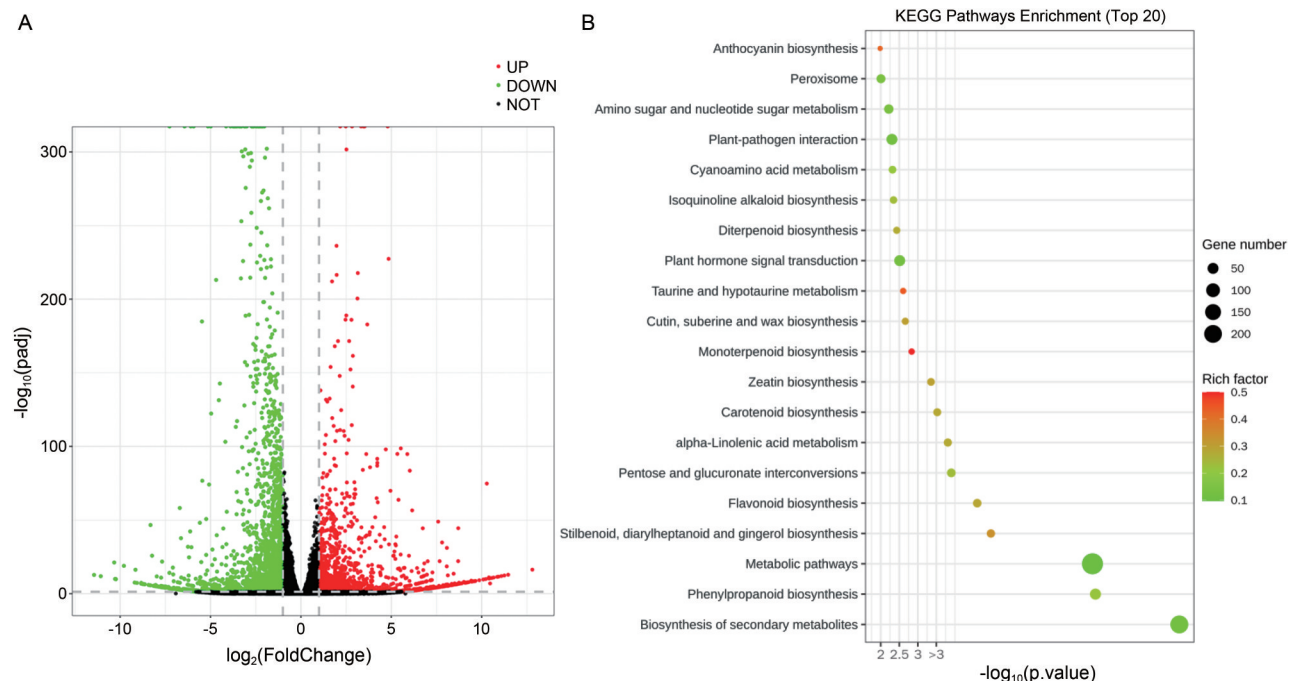
**Table 5** Core proteins in predicted protein-protein interaction based on DEGs of *SmHPPR1*-OE-3 transcriptome

Gene	Gene_id	log <sub>2</sub> FC	NR_annotation
CYT	TR74706_c0_g1	-1.59	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit [ <i>Salvia splendens</i> ]
NADP+	TR26565_c0_g1	-1.92	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) (phosphorylating) [ <i>Salvia splendens</i> ]
NADP+	TR68771_c0_g1	-2.91	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) [ <i>Salvia splendens</i> ]

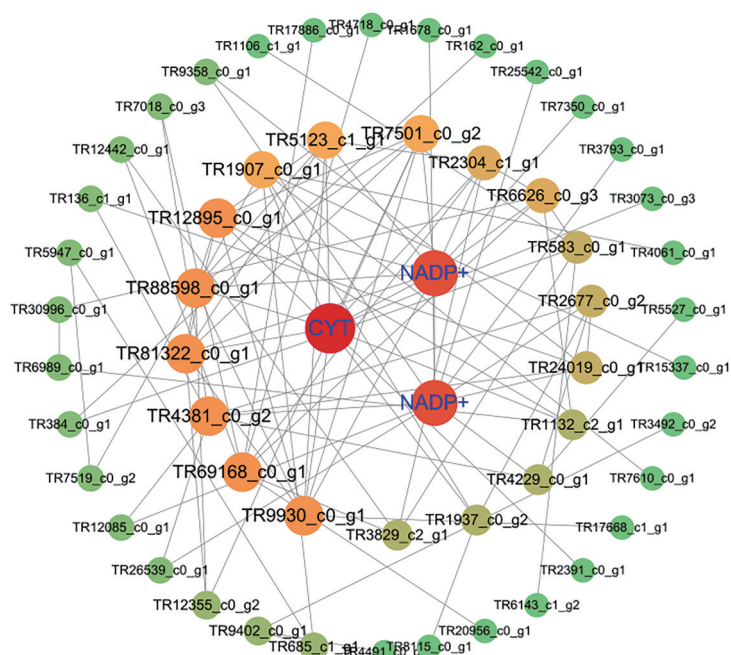
## 讨论

前期本课题组从丹参中克隆了 *SmHPPR1*, 系统进化树分析表明 *SmHPPR1* 与彩叶草 *CbHPPR* 亲缘关系最近, 其次是拟南芥 *AtHPPR2* 和 *AtHPPR3* (图 2)。在此基础上, 获得了携带 *SmHPPR1* 的转基因拟南芥植株, 在转基因拟南芥中的表达产物表明 *SmHPPR1* 可能参与了 pHPL 的生物合成反应 (图 4D、E)。拟南芥的两个基因 *AtHPPR2* 和 *AtHPPR3* 编码具有明显 HPPR 活性的蛋白, 催化 pHPP 还原为 pHPL<sup>[13]</sup>。为进一步阐明 *SmHPPR1* 在丹参丹酚酸途径中的作用, 诱导了过表达 *SmHPPR1* 丹参毛状根, 选取 *SmHPPR1*-OE-3 和 control-3 毛状根继代培养并进行研究, 结果表明: 与 control-3 毛状根相比, 过表达 *SmHPPR1*-OE-3 毛状根中 RA、SAB 及总丹酚酸含量提高, 但差异不显著。彩叶草中过表达 *CbHPPR* 提高了 RA 含量, RNAi 降低了 RA 含量<sup>[25]</sup>; Ag<sup>+</sup> 对 RA、咖啡酸和阿魏酸的积累显著增加, 而 SAB、DSU 和肉桂酸的积累明显减少并推测 SAB 可能来源于 DSU 生物合成的分支途径<sup>[26]</sup>。

转录组学分析显示过表达 *SmHPPR1* 丹参毛状根中不仅 *SmHPPR1* 的表达量上调, 酪氨酸途径中 *SmTAT2* 基因表达量也上调 (图 1), 推测酪氨酸途径中 *SmHPPR1* 和 *SmTAT2* 能协同调控 RA 的生物合成, 提高丹参毛状根中丹酚酸的含量。在拟南芥中, HPPR2 和 HPPR3 与 TAT1 一起构成了一个可能从酪氨酸到 pHPL 的保守生



**Figure 7** The volcano plot and the top enriched KEGG pathways of the DEGs between *SmHPPR1*-OE-3 and control-3 danshen hairy root. A: The volcano plot of the DEGs; B: KEGG pathways. The size of the bubble represents the number of genes. The size of the Rich factor is represented by the color of the dots, the larger the value, the closer the color is to green



**Figure 8** Predicted protein-protein interaction network of proteins corresponding to DEGs between *SmHPPRI*-OE-3 and control-3 hairy roots

物合成途径,可以在特定的植物群体中产生一些特定的代谢物,如RA<sup>[10]</sup>。夏枯草毛状根中反义表达*PvTAT*致使*PvTAT*表达水平降低,*PvTAT*酶活性降低,RA的积累显著减少<sup>[27]</sup>。同时,过表达*SmHPPRI*毛状根中*SmRAS4-like*、*SmRAS6-like1*和*SmRAS6-like2*表达量下调(图1)。敲除丹参*SmRAS*降低丹参毛状根中RA和SAB的含量<sup>[28]</sup>。RAS是BAHD酰基转移酶超家族的一员,可以酰化多种底物,如薰衣草的LaAT1具有广泛的底物耐受性,可以催化酯和酰胺的形成<sup>[29-31]</sup>。由于RAS催化底物的范围广泛,推测*SmRAS4-like*、*SmRAS6-like1*和*SmRAS6-like2*可能不参与丹酚酸的生物合成。丹参毛状根中过表达*Sm4CL2*丹酚酸含量提高,*SmRAS4-like*和*SmRAS6-like1*表达量下调;反义表达*Sm4CL2*丹酚酸含量降低,*SmRAS4-like*和*SmRAS6-like2*表达量下调<sup>[32]</sup>。

*SmHPPRI*-OE-3毛状根中*Sm4CL4*、*Sm4CL6*、*Sm4CL9*表达量下调(图1),但木质素含量与control-3无显著差异(表2),推测*Sm4CL4*、*Sm4CL6*和*Sm4CL9*可能不参与木质素生物合成。过表达*Ptc4CL1*杨树中木质素含量与*Ptc4CL1*基因表达量和*Ptc4CL1*酶活性正相关<sup>[33]</sup>;反义表达*Pt4CL1*杨树中木质素含量下降,并与*Pt4CL1*基因表达量相关<sup>[34]</sup>;拟南芥中4CL4有助于木质素的沉积<sup>[35]</sup>;水曲柳中过表达*Fm4CL-like1*提高了木质素含量<sup>[36]</sup>。

丹参毛状根中过表达*SmHPPRI*如何影响丹酚酸

途径其他基因的表达?据报道,丹参植株中RNAi-*PAL*会影响*C4H*、*ACL2*和*TAT*的表达,并降低RA和SAB的含量<sup>[37]</sup>。将*SmHPPRI*-OE-3毛状根的差异表达基因构建PPI网络,结果表明CYT(TR74706\_c0\_g1)、NADP<sup>+</sup>(TR26565\_c0\_g1)和NADP<sup>+</sup>(TR68771\_c0\_g1)是网络的中心节点并参与代谢过程、细胞过程等(图8)。NADPH是酶催化反应中的重要辅助因子,用来实现电子传递,丹参*SmHPPRI*包含一个假定的催化结构域和一个NAD(P)H结合基序,定位于细胞质,与胞质NADPH依赖的羟基丙酮酸还原酶(HPR)在光呼吸过程中的作用类似,可以在NADPH的存在下将pHPP还原为pHPL<sup>[38]</sup>,这一结果与本课题组的蛋白互作结果相类似。认为植物次生代谢产物的不同生物合成途径之间可能存在一个复杂的蛋白-蛋白相互作用网络,*SmHPPRI*-OE-3毛状根中其他通路基因的协同转录调控可能是来自合成途径基因相应酶的蛋白-蛋白相互作用的结果。

Xiao等<sup>[39]</sup>报道丹参毛状根中过表达单个*C4H*、*TAT*和*HPPRI*;共表达*TAT/HPPRI*和抑制表达4-羟基苯基丙酮酸双加氧酶(*HPPD*)均能提高RA和丹酚酸B含量。本文在丹参毛状根中过表达单个*SmHPPRI*,其序列与Xiao等<sup>[39]</sup>报道的*HPPRI*(GenBank: DQ099741)序列98.4%同源。经过长达10年的跟踪研究,结果表明过表达*SmHPPRI*能提高RA和丹酚酸B含量但差异不显著,且毛状根性状能较稳定遗传,与Xiao等<sup>[39]</sup>

报道的结果一致。进一步从转录组水平上分析发现: 丹参毛状根中过表达 *SmHPPR1* 引起了丹酚酸含量提高可能与协同调控了其他苯丙烷类途径基因如 *SmTAT2* 的表达水平有关。同时, 本实验室在丹参毛状根中过表达和反义表达 *Sm4CL2*, 结果表明过表达毛状根 (*Sm4CL2-OE-4*) 的丹酚酸含量是对照毛状根 (control-3) 的 1.35 倍, 反义表达毛状根 (*anti-Sm4CL2-1*) 的丹酚酸含量是对照毛状根 (control-3) 的 37.32%<sup>[32]</sup>, 而 *Sm4CL2* 和 *SmHPPR1* 分别是苯丙氨酸和酪氨酸分支途径中的最后一个关键酶, 推测与 *Sm4CL2* 相比, 丹参毛状根中 *SmHPPR1* 对丹酚酸含量贡献相对较小。

综上所述, *SmHPPR1* 在携带 *SmHPPR1* 转基因的拟南芥中参与了 4-羟基苯乳酸的生物合成反应, 丹参毛状根中过表达 *SmHPPR1* 引起了其他苯丙烷类途径基因表达水平的改变, 从而增加了丹酚酸含量。生物合成途径基因相对应的酶之间的蛋白-蛋白相互作用可能参与了部分代谢通路基因之间的协同转录调控。

**致谢:** 本论文转基因拟南芥工作得到中国科学院分子植物科学卓越创新中心/植物生理生态研究所何玉科研究员的支持, 在此表示感谢。

**作者贡献:** 赵淑娟设计了本实验及论文的修改; 谈荣慧诱导了丹参毛状根、qPCR 实验、木质素含量测定、数据分析和论文初稿的写作; 赵望构建了植物表达载体、诱导转 *SmHPPR1* 拟南芥及其酚酸类物质含量测定; 张金家完成了丹参毛状根中丹酚酸的含量测定。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 77.
- [2] Song JY, Luo HM, Chen SL, et al. *Salvia miltiorrhiza* as medicinal model plant [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1099-1106.
- [3] Zhan ZG. Advances in biosynthesis and regulation of the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza* based on multi-omics approach [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2892-2903.
- [4] Shan XX, Hong BZ, Zhang CY, et al. Review of chemical composition, pharmacological effects, and clinical application of *Salvia miltiorrhiza* radix et rhizoma and prediction of its Q-markers [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 5496-5511.
- [5] Zhao SJ, Zhang JJ, Hu ZB, et al. Determination and biosynthesis of multiple salvianolic acids in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 1352-1356.
- [6] Gao B. Pharmacological action and clinical application of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin J Mod Drug Appl (中国现代药物应用), 2018, 12: 196-197.
- [7] Petersen M, Hausler E, Meinhard BK. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth [J]. Planta, 1993, 189: 10-14.
- [8] Ma PD, Liu JL, Liang ZS, et al. Regulation of water-soluble phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 170: 1253 - 1262.
- [9] Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 121-125.
- [10] Petersen M, Abdullah Y, Benner J, et al. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis [J]. Phytochemistry, 2009, 70: 1663-1679.
- [11] Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, et al. Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis* [J]. Science, 2013, 341: 1103-1106.
- [12] Shekhar H, Kant G, Tripathi R, et al. Structural insight of two 4-coumarate CoA ligase (4CL) isoforms in *Leucaena* suggests targeted genetic manipulations could lead to better lignin extractability from the pulp [J]. 3 Biotech, 2020, 10: 383.
- [13] Xu JJ, Fang X, Li CY, et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* hydroxyphenylpyruvate reductases in the tyrosine conversion pathway [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1305-1317.
- [14] Kim KH, Janiak V, Petersen M. Purification, cloning and functional expression of hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis in cell cultures of *Coleus blumei* [J]. Plant Mol Biol, 2004, 54: 311-323.
- [15] Barberini S, Savona M, Raffifi D, et al. Molecular cloning of *SoHPPR* encoding a hydroxyphenylpyruvate reductase, and its expression in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2013, 114: 131-138.
- [16] Kim YB, Uddin MR, Kim YJ, et al. Molecular cloning and characterization of tyrosine aminotransferase and hydroxyphenylpyruvate reductase, and rosmarinic acid accumulation in *Scutellaria baicalensis* [J]. Nat Prod Commun, 2014, 9: 1311-1314.
- [17] Lu XL, Hao L, Wang F, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a gene encoding hydroxyphenylpyruvate reductase involved in rosmarinic acid biosynthesis pathway from *Perilla frutescens* [J]. Springer Berlin Heidelberg, 2014: 1807-1820.
- [18] Ahmad Z, Husaini A, Roslan HA. Characterisation and expression analysis of hydroxyphenylpyruvate reductase derived from *Orthosiphon aristatus* [J]. Borneo J Resour Sci Technol, 2015, 5: 34-42.
- [19] Hao XC, Wang WW, Tang YM, et al. *TaHPPR* gene in wheat: cloning and expression analysis [J]. Chin Agric Sci Bull (中国农学通报), 2021, 37: 129-138.
- [20] Grant GA. A new family of 2-hydroxyacid dehydrogenases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 165: 1371-1374.
- [21] Hu ZB, Alfermann A. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1993, 32:

- 699-703.
- [22] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Long Island: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [23] Zhao SJ, Zhang JJ, Tan RH, et al. Enhancing diterpenoid concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots through pathway engineering with maize C1 transcription factor [J]. J Exp Bot, 2015, 66: 7211-7226.
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [25] Hücherig S, Petersen M. RNAi suppression and overexpression studies of hydroxyphenylpyruvate reductase (*HPPR*) and rosmarinic acid synthase (*RAS*) genes related to rosmarinic acid biosynthesis in hairy root cultures of *Coleus blumei* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2013, 113: 375-385.
- [26] Xing BC, Yang DF, Liang ZS, et al. Ag<sup>+</sup> as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Molecules, 2014, 20: 309.
- [27] Ru M, Wang KR, Liang ZS. A tyrosine aminotransferase involved in rosmarinic acid biosynthesis in *Prunella vulgaris* L [J]. Sci Rep, 2017, 7: 4892-4903.
- [28] Zhou Z, Tan HX, Chen WS, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 2018, 148: 63-70.
- [29] Berger A, Meinhard J, Petersen M. Rosmarinic acid synthase is a new member of the superfamily of BAHD acyltransferases [J]. Planta, 2006, 224: 1503 - 1510.
- [30] Landmann C, Hücherig S, Fink B, et al. Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.) [J]. Planta, 2011, 234: 305-320.
- [31] Di P, Zhang L, Chen JF, et al. <sup>13</sup>C tracer reveals phenolic acids biosynthesis in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. ACS Chem Biol, 2013, 8: 1537-1548.
- [32] Tan RH, Chen M, Wang L, et al. A tracking work on how Sm4CL2 re-directed the biosynthesis of salvianolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. Plant Cell Rep, 2022, 42:297-308.
- [33] Tian XM, Xie J, Zhao YL, et al. Sense-, antisense- and RNAi-4CL1 regulate soluble phenolic acids, cell wall components and growth in transgenic *Populus tomentosa* Carr [J]. Plant Physiol Biochem, 2013, 65: 111-119.
- [34] Voelker SL, Lachenbruch B, Meinzer FC, et al. Antisense down-regulation of 4CL expression alters lignification, tree growth, and saccharification potential of field-grown poplar [J]. Plant Physiol, 2010, 154: 874-886.
- [35] Li Y, Kim JI, Pysh L, et al. Four isoforms of *Arabidopsis* 4-coumarate: CoA ligase have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism [J]. Plant Physiol, 2015, 169: 2409-2421.
- [36] Chen XH, Wang HT, Li XY, et al. Molecular cloning and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase 4 (*4CL-like 1*) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19: 231-246.
- [37] Song J, Wang ZZ. RNAi-mediated suppression of the phenylalanine ammonia-lyase gene in *Salvia miltiorrhiza* causes abnormal phenotypes and a reduction in rosmarinic acid biosynthesis [J]. J Plant Res, 2011, 124: 183-192.
- [38] Wang GQ, Chen JF, Chen WS, et al. HPPR encodes the hydroxyphenylpyruvate reductase required for the biosynthesis of hydrophilic phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin J Nat Med, 2017, 15: 917-927.
- [39] Xiao Y, Zhang L, Chen WS, et al. The c4h, tat, hppr and hppd genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures [J]. PLoS One, 2011, 6: e29713-e29722.