

丹参 *SmCPS1* 基因启动子区甲基化特征分析及其与 *SmCPS1* 组织差异性表达的关系

孙莹, 陈新*, 严铸云, 王清蓉, 李晓燕, 穆帝秀

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**分析不同组织中丹参(*Salvia miltiorrhiza*)柯巴基焦磷酸合酶1基因(*SmCPS1*)启动子区甲基化分布特征及其与*SmCPS1*组织差异性表达的关系。**方法:**采用重亚硫酸盐转化法检测不同组织中*SmCPS1*启动子区-1 021 bp(转录起始位点+1)内的甲基化率;实时荧光定量聚合酶链式反应 Real-time PCR 检测不同组织中*SmCPS1*表达量。**结果:***SmCPS1*启动子区甲基化主要集中在转录起始位点上游-750~-500 bp,-450 bp以内的启动子区几乎无甲基化。300个甲基化检测位点中,组织差异性甲基化位点共72个,占总检测甲基化位点数的24%;发生甲基化的转录因子结合区域共18个,其中有10个区域的甲基化存在组织差异。与*SmCPS1*表达量显著相关($P < 0.01$)者21个,其中7个负相关者集中在-632~-450 bp,14个正相关者分布在-632 bp之外及-450 bp以内的启动子区。**结论:***SmCPS1*启动子区甲基化差异可能是影响其组织差异性表达的原因。

[关键词] 丹参;柯巴基焦磷酸合酶1基因;甲基化;启动子

[中图分类号] R281;R289;R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0028-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181231

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1332.017.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 15:01

Methylation Pattern of *SmCPS1* Promoter in Different Tissues of *Salvia miltiorrhiza* and Its Correlation with *SmCPS1* Tissue-differential Expression Pattern

SUN Ying, CHEN Xin*, YAN Zhu-yun, WANG Qing-rong, LI Xiao-yan, MU Di-xiu
(College Pharmacy, Key Laboratory of Chinese Herbal Medicine Standardization, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory of Breeding Base Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the methylation pattern of *Salvia miltiorrhiza* copalyl diphosphate synthase 1 (*SmCPS1*) promoter in different tissues of *S. miltiorrhiza* and its correlation with *SmCPS1* tissue-differential expression pattern. **Method:** Bisulfite conversion method was used to detect the methylation rate of *SmCPS1* promoter in -1 021 bp (translation start site +1). The expression of *SmCPS1* was determined by Real-time quantitative polymerase chain reaction method (Real-time PCR). **Result:** Methylation sites were mainly distributed in the promoter region between -750 bp to -500 bp, rarely in region below -450 bp. Among the 300

[收稿日期] 20180103(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573537)

[第一作者] 孙莹,在读硕士,从事药用植物基因转录调控机制的研究,E-mail:1937148502@qq.com

[通信作者] *陈新,博士,教授,从事分子生物学、中药资源开发与利用方面研究,E-mail:chenxin64@hotmail.com

examined sites, 72 sites (about 24%) showed a tissue-differential manner. 18 transcription binding regions were found to have methylated sites, and 10 of these regions showed differential methylated sites (DMS). A total of 21 DMS were found to be significantly correlated with *SmCPS1* ($P < 0.01$); 7 DMS, which were in negative correlation with *SmCPS1*, were found to be mainly distributed in the promoter region between -632 bp to -450 bp; the other 14 DMS, which were in positive correlation with *SmCPS1*, were distributed in the region beyond -632 bp and below -450 bp. **Conclusion:** Promoter methylation difference may be the cause of tissue-differential expression pattern of *SmCPS1* in *S. miltiorrhiza*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; *Salvia miltiorrhiza* copalyl diphosphate synthase 1 (*SmCPS1*); methylation; promoter

中药丹参治疗心血管类疾病的主要成分是丹参酮类成分^[1]。关于丹参酮类成分生物合成机制的研究对丹参药材良种选育具有重要指导意义。丹参柯巴基焦磷酸合酶 1 基因 (*SmCPS1*) 是丹参酮类成分合成代谢过程中的关键酶基因,通过 RNA 干扰 (RNAi) 技术干扰该基因的表达直接导致丹参中丹参酮类成分的合成障碍^[2]。当前研究已知 *SmCPS1* 的表达具有组织差异性,主要在丹参根部表达,其次为茎和叶^[3],但造成这种组织差异性的原因尚不明确。

决定一个基因表达模式的信息主要位于该基因的启动子区。启动子区的顺式作用元件序列是转录因子结合的基础,决定了该基因受哪些转录因子调控。转录因子结合于启动子上后,通过对其下游基因的转录过程起促进或抑制的作用,从而影响该基因的表达^[4]。

DNA 5'胞嘧啶甲基化是表观遗传调控的一种机制,在不改变核酸序列的条件下,通过对核酸碱基的修饰改变转录因子与顺势作用元件的结合能力,影响基因转录过程以达到调控基因表达的目的。如转录因子 C/EBP α 能结合于 5'-TGACGTCA,也能识别 5'-^mCGTCA^[5]。转录因子 KLF4 能识别无甲基化的 5'-TTTACGCC 序列,也能特异性的识别 5'-TCC^mCGCCC 序列;但此二序列任意甲基化状态的变化都使其失去与 KLF4 结合的能力^[6]。植物中, NOS 基因启动子 CCAAT 盒下游的 1 个 CTG 位点发生的甲基化足以使转基因烟草子代失去转基因性状^[7];导致大米转 *RTBV* 基因在维管束中特异性沉默现象的原因,与其启动子区关键区域的甲基化有关;甲基化后的该区域与一种新发现的蛋白结合,从而抑制了维管束中 *RTBV* 基因的转录^[8]。因此,推测不同组织中 *SmCPS1* 基因的表达差异可能与其启动子区的甲基化差异有关。

当前关于丹参酮类成分合成代谢途径调节机制

的研究集中于对参与调控的转录因子的鉴别^[9-12]。仅 Piotr 等^[13]从启动子区的角度入手鉴定 *SmCPS1* 启动子区并预测了丹参 *SmCPS1* 启动子调控元件。因此关于关键酶基因启动子区在丹参酮类成分合成代谢途径中的调控作用的知识甚少。另一方面,甘晓燕^[14]虽以甲基化敏感扩增多态性技术 (MSAP 法) 观察到不同产地、不同时期丹参基因组中 CCGG 位点甲基化的变化,但受其方法的限制未能检测出 *SmCPS1* 基因的甲基化变化,且其观察到的甲基化变化未能与这些位点所对应的基因的表达相结合。因此 DNA 甲基化在丹参基因组中的调控作用仍有大量未解之处。

本文拟通过以具有单碱基分辨率的重亚硫酸盐法检测不同组织中 *SmCPS1* 基因启动子区的甲基化变化,结合实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 *SmCPS1* 在不同组织中的相对表达量数据,从启动子区甲基化的角度研究 *SmCPS1* 表达调控机制,一方面为解释 *SmCPS1* 组织差异性表达的调控机制提供资料,另一方面填补了丹参关键酶基因启动子区在丹参酮类成分合成途径中作用知识的空白。

1 材料

丹参材料采自成都中医药大学药用植物园,由成都中医药大学陈新教授鉴定确认为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza*。于 2017 年 11 月份花期末时采集。取同一株丹参根、茎和叶 3 个部位,分别用于提取 RNA 和 DNA。

trizol Universal 总 RNA 提取试剂 (北京天根生化科技有限公司,批号 DP424),trizol 伴侣 (北京天恩泽公司,批号 81027),植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司,批号 DP305),EZ DNA Methylation-Gold Kit (美国 Zymo Research Corporation,批号 D5005),Taq HS EX (北京 Takara Biomedical Technology,批号 RR006A),pMDTM 19-T

Vector Cloning Kit(北京 Takara,批号 6013)。

P-360 型 NanoPhotometer 核酸测定仪(德国 Implen 公司),CFX96 Touch™ 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测系统和 T100™ Thermal Cycler(美国 Bio-Rad)。

2 方法

2.1 SmCPS1 表达量分析 总 RNA 用 trizol Universal 总 RNA 提取试剂配合 trizol 伴侣试剂盒提取。Real-time PCR 的方法与文献报道相同^[15]。

2.2 不同部位丹参 DNA 提取及重亚硫酸盐转化 用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。DNA 浓度由 NanoPhotometer 核酸测定仪检测。重亚硫酸盐转化使用试剂盒 EZ DNA Methylation-Gold Kit,按其说明书标准方案进行,每次转化用 DNA 量不超过 500 ng。转化后以试剂盒内 Elution Buffer 11 μL 洗脱。

2.3 重亚硫酸盐转化后的 PCR 扩增及测序 以丹参基因组框架图及 Genbank 数据库中的 SmCPS1 基因启动子区序列(Genbank:KF718290.2)为参考序列,Kismeth(<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>)设计用于重亚硫酸盐转化后扩增用的简并引物。引物均由北京擎科新业生物技术有限公司(成都分公司)合成。每 50 μL 扩增体系含重亚硫酸盐转化后的 DNA 2.5 μL,10 × PCR buffer 5.0 μL,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹) 4.0 μL,dNTP mixture (2.5 mmol·L⁻¹) 4.0 μL,引物(10 μmol·L⁻¹) 2 μL,Taq HS EX 1 U。PCR 扩增程序为 94 °C 3 min;94 °C 30 s,退火(温度见表 1) 30 s,72 °C 30 s,47 个循环;72 °C 15 min。

表 1 重亚硫酸盐转化后 PCR 扩增用引物序列

Table 1 Primers used in bisulfite sequencing

引物	序列(5'-3')	退火温度 /°C	扩增片段 /bp
P1	上游 AYGGTTATTAAGGAGAATATTATTAGTG 下游 TACAATATTCCATTCAACTRCCAAATA	52	367
P2	上游 AGGYAGAAAAAGAAAAAYATGATT 下游 CACCTTTCATCTCCTACTTTATCAA	52	373
P3	上游 AYGAAGGGAGTAGAAAGAAATTGAT 下游 RARRCCATTCAAATTTCCCTTT	52	522
P4	上游 GTGGAAAGAAATTAAGTATGAGAAAAT 下游 AACRAATTARTTAATTAATTAACATTTTC	52~46	422
P5	上游 YAAATAGGYAGGAAATGTTAATTA 下游 CCACATRCATTAACCTCAAAACAA	52~46	546

产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测后切胶回收。回收产物经 pMD™ 19-T Vector Cloning Kit 做成单克隆后,挑选至少 10 个阳性克隆送往北京擎科新业生物技术有限公司(成都分公司)测序。见表 1。

2.4 数据分析 使用相对定量法(2^{-ΔΔC_t})分析不同组织中 SmCPS1 相对表达量。鉴于 DNA 甲基化属于动态特征,在同一组织中的不同类型细胞中尚可存在差异,因此本次研究的是丹参不同组织中的各类型细胞整体甲基化率。测序结果经人工拼接后,使用 Kismeth(<http://katahdin.mssm.edu/kismeth/revpage.pl>)分析甲基化位点和甲基化率。使用 PlantTFDB 数据库(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/prediction.php>)预测检测范围内的转录因子结合位点。对于具有重叠区域的同种类型的转录因子,以其最大重叠区域作为该类型转录因子的结合区域看待。Pearson 相关性分析由 SPSS 21.0 软件计算。

3 结果与分析

3.1 不同组织中 SmCPS1 表达量分析 SmCPS1 在根-茎-叶中的相对表达量为 1:1.16:12.28。SmCPS1 在根中表达量最低,其次为茎,在叶中表达量最高。

3.2 丹参 SmCPS1 启动子区转录因子结合位点的预测 于 SmCPS1 启动子区 -1 021 bp 内预测出 19 个不同转录因子家族,97 个结合位点,整理后获得 35 个调控区。

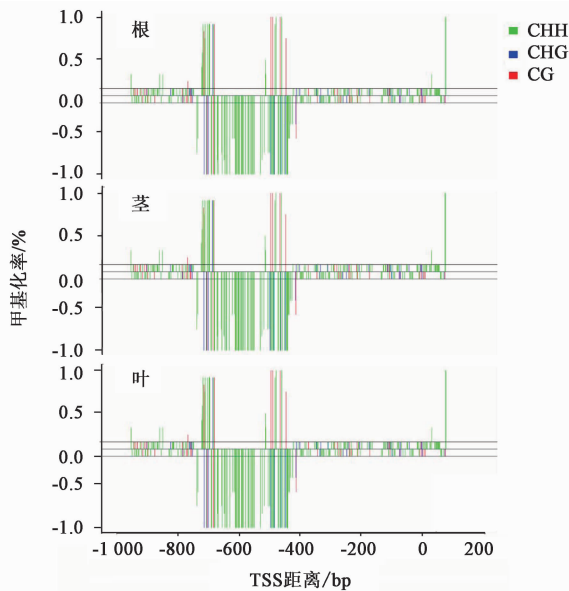
3.3 丹参不同组织 SmCPS1 启动子区甲基化分布分析 检测范围覆盖 SmCPS1 启动子区上游正义链 -1 021 bp 至 7 bp(TSS + 1),反义链 -922 bp 至 -22 bp。SmCPS1 启动子区上游正义链上 CG 位点 23 个,CHG 位点 21 个,CHH 位点 109 个,反义链 CG 位点 21 个,CHG 位点 17 个,CHH 位点 109 个。不同组织间各类型甲基化率见表 2。正义链 CG 甲基化率普遍高于反义链 CG 甲基化率,而正义链 CHG,CHH 类型甲基化率和整体甲基化率则分别低于其对应的反义链甲基化率。

表 2 丹参不同部位 SmCPS1 启动子区整体甲基化率

Table 2 Methylation levels of SmCPS1 promoter in different tissues of Salvia miltiorrhiza %

部位	正义链			反义链		
	根	茎	叶	根	茎	叶
CG	23.04	23.91	26.52	9.52	11.90	10.95
CHG	4.76	4.28	5.71	39.41	42.94	39.41
CHH	14.03	12.93	14.67	52.66	51.37	49.90
总甲基化率	14.12	13.40	15.23	44.96	44.76	43.13

丹参 *SmCPS1* 启动子区甲基化位点集中在转录起始位点 (TSS) 上游 -750 ~ -500 bp。-500 bp 内的启动子区少有甲基化位点。丹参根、茎和叶中正、反链各胞嘧啶位点的甲基化率见图 1。



绿色代表 CHH 类型位点,蓝色代表 CHG 类型位点,红色代表 CG 类型位点。横轴代表序列上的定位。TSS. 转录起始位点。纵轴 0 线内的线段代表本文所检测的胞嘧啶位点,0 线外的线段代表该胞嘧啶位点的甲基化率

图 1 丹参根、茎、叶中 *SmCPS1* 启动子区 DNA 甲基化分布
Fig. 1 Methylcytosine distribution of *SmCPS1* promoter in root, stem and leaf of *Salvia miltiorrhiza*

结合 *SmCPS1* 启动子区转录因子结合位点预测结果来看,发生甲基化的转录因子结合区域共 18 个,且集中在 -700 bp 至 -450 bp。-450 bp 以内的启动子区及 -700 bp 以上的启动子区偶有检测出甲基化位点,且甲基化位点较少发生在转录因子结合位点上(表 3)。本次共检测出组织差异性甲基化位点 72 个,占总检测甲基化位点数的 24%。其中有 38 个分布在预测出的 18 个转录因子结合区上。与表达量显著相关的差异性位点有 21 个(表 3),其中 10 个位于转录因子结合区上;7 个与表达量呈显著负相关的差异性位点集中在 -632 bp 至 -450 bp。

4 讨论

丹参 *SmCPS1* 基因的组织差异性表达可能是影响丹参酮类成分在丹参根部特异性积累的原因之一。但造成这种组织差异性表达的原因尚未可知。本文通过重亚硫酸盐转化法,以单碱基差异的分辨率检测了不同组织中 *SmCPS1* 启动子区的甲基化模式,并检测了 *SmCPS1* 在不同组织中的相对表达量,

以探究 *SmCPS1* 启动子区的甲基化与该基因组织差异性表达的关系。结果发现不同组织间 *SmCPS1* 启动子区的确存在甲基化差异位点,且其中 21 个甲基化位点与 *SmCPS1* 表达量显著相关。因此 *SmCPS1* 启动子区甲基化差异可能是影响丹参 *SmCPS1* 基因组织差异性表达的原因。

本次检测发现 *SmCPS1* 在不同组织中的相对表达量与之前的研究发现不同。MA 等^[3]采集 6 月份的丹参材料,检测发现 *SmCPS1* 在根部相对表达量最高,其次是茎,在叶中表达量最低;而本次以 11 月份花期末的丹参为材料,检测出 *SmCPS1* 在叶中表达量最高,在根和茎中的表达量相对较低。由于其他遗传背景的丹参材料的检测结果表现出与文献中结果不同的规律(数据未公布),因此这种相对表达量的差异可能与丹参材料的遗传背景有关。另外,不同时期的丹参酮类成分的积累存在动态变化^[16]。5 月至 6 月时总丹参酮含量呈急速增高趋势,而 11 月至 12 月时总丹参酮含量下降,因此本次检测出不同组织中 *SmCPS1* 表达量与前人 6 月时检测的结果有差异也可能是采样时期的不同。这也提示丹参不同时期不同组织中 *SmCPS1* 表达量存在动态变化。

启动子区可分为核心启动子区、近端启动子区和远端启动子区^[17]。核心启动子区是基因转录装置集结的位点,一般为转录起始位点 100 bp 范围附近。核心启动子外为近端启动子,位于核心启动子区上游约 -250 bp 至 -1 000 bp;再远端为远端启动子。位于启动子区的顺式作用元件可通过与相应的反式作用因子结合,再通过反式作用因子对转录装置的影响而间接起到增强子或抑制子的作用^[4]。笔者的结果说明 *SmCPS1* 启动子区甲基化主要集中在近端启动子区(转录起始位点上游 -750 bp 至 -500 bp),-450 bp 以内的核心启动子区则少有甲基化位点。结合转录因子结合位点的预测结果看来,核心启动子区的顺式作用元件主要处于非甲基化状态;而 -750 bp 至 -500 bp 的顺式作用元件常处于甲基化状态。

当前研究普遍认为高等植物启动子区高甲基化抑制基因表达^[18]。例如低温诱导下,启动子区 -1 149 bp 至 -826 bp 发生的 CHH 超甲基化抑制玫瑰 *RhAG* 的表达,从而产生花瓣数增多的表象^[19]。从这一观点上看,甲基化率与 *SmCPS1* 的表达呈显著负相关的 -632 bp 至 -450 bp 的近端启动子区可能是调节 *SmCPS1* 表达的一个重要区域。然而,本次研究也检测出了一些与表达量呈显著正相关的位

表 3 丹参根、茎、叶位于转录因子结合位点上的组织差异性甲基化位点

Table 3 Tissue-differential methylcytosines on translationfactor binding sites in root, stem and leaf of *Salvia miltiorrhiza*

位置/bp	类型	根/%	茎/%	叶/%	链	转录因子	P(双侧)	R
-924	CHH	0	0	20	+	AP2	0.008 ¹⁾	1.000
-706	CHG	90	100	100	-	NAC	0.659	0.511
-704	CHH	100	90	100	+	NAC	0.675	0.489
-699	CHH	100	90	100	+	NAC	0.675	0.489
-698	CHH	90	90	100	+	NAC	0.008 ¹⁾	1.000
-697	CHH	90	90	100	+	NAC	0.008 ¹⁾	1.000
-687	CHG	100	90	100	+	NAC, MYB	0.675	0.489
-684	CHH	100	90	100	+	MYB, Trihelix	0.675	0.489
-682	CG	100	90	100	+	MYB, Trihelix	0.675	0.489
-671	CHH	100	80	100	-	G2-like	0.675	0.489
-658	CHH	100	70	100	-	G2-like	0.675	0.489
-622	CHH	90	50	100	-	BBR-BPC	0.554	0.645
-616	CHH	90	50	100	-	BBR-BPC	0.554	0.645
-613	CHH	100	100	70	-	BBR-BPC	0.008 ¹⁾	-1.000
-612	CHH	90	100	70	-	BBR-BPC	0.220	-0.941
-610	CHH	90	100	70	-	BBR-BPC	0.220	-0.941
-607	CHH	100	100	70	-	BBR-BPC	0.008 ¹⁾	-1.000
-603	CHH	100	100	70	-	BBR-BPC	0.008 ¹⁾	-1.000
-602	CHH	90	100	70	-	BBR-BPC	0.220	-0.941
-600	CHH	100	100	80	-	BBR-BPC	0.008 ¹⁾	-1.000
-519	CHH	100	70	20	-	MIKC_MADS	0.234	-0.933
-515	CHH	100	40	70	+	MIKC_MADS	0.992	-0.012
-514	CHH	90	20	50	+	MIKC_MADS	0.940	-0.095
-506	CHH	100	70	100	-	MIKC_MADS	0.675	0.489
-501	CHH	90	70	100	-	MIKC_MADS	0.462	0.748
-484	CHH	100	90	90	+	TCP, GRAS, Dof	0.659	-0.511
-464	CHG	90	100	100	-	Dof	0.659	0.511
-450	CHG	100	100	70	-	AP2, MIKC_MADS	0.008 ¹⁾	-1.000
-448	CG	20	70	100	+	AP2, MIKC_MADS	0.417	0.793
-447	CHH	50	100	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.919	0.127
-444	CHH	80	100	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.675	-0.489
-443	CHH	70	100	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.887	-0.177
-442	CHH	90	100	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.341	-0.860
-440	CHH	80	50	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.675	0.489
-437	CHH	80	50	80	-	AP2, MIKC_MADS	0.675	0.489
-433	CHH	60	30	20	-	MIKC_MADS	0.504	-0.702
-247	CHH	0	0	10	+	AP2	0.008 ¹⁾	1.000
-122	CHH	0	0	10	+	ERF, C ₂ H ₂	0.008 ¹⁾	1.000

注:表达量显著相关的点¹⁾P < 0.01。

点,这增加解释了启动子区甲基化调节 *SmCPS1* 基因表达现象的难度,也暗示了甲基化调节基因表达机制的复杂性。由于当前研究发现有能识别特定甲基化的结合位点的转录因子的存在^[6],因此不能排除超甲基化的启动子区域通过集结特定转录因子从而促进基因表达的可能性,同理也就不能完全忽视超甲基化位点参与 *SmCPS1* 基因表达调控的可能。也许只有通过缺失分析、基因编辑、甲基化差异片段的构建或其他手段获得启动子区的更多特征,或结合丹参转录因子共表达数据,才能更好地理解 *SmCPS1* 启动子区甲基化对其表达的调节作用。

总而言之,本文以单碱基分辨率的水平研究了 *SmCPS1* 启动子区甲基化分布模式及其与 *SmCPS1* 组织差异性表达的相关性,从启动子区甲基化的角度为理解 *SmCPS1* 基因的表达调控机制研究提供了基础,填补了丹参关键酶基因启动子区在丹参酮类成分合成途径中作用知识的空白,也为甲基化调节基因表达机制的研究提供了素材。

[参考文献]

- [1] YAN X. *Dan Shen (Salvia miltiorrhiza) in Medicine* [M]. Beijing: Springer Netherlands and People's Medical Publishing House, 2015: 119-205.
- [2] CUI G H, DUAN L X, JIN B L, et al. Functional divergence of diterpene syntheses in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169 (3): 1607-1618.
- [3] MA Y, YUAN L, WU B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2809-2823.
- [4] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell 6th Edition* [M]. New York: Garland Science, 2014: 299-438.
- [5] Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, et al. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP α binding sites that activate some tissue-specific genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (47): 20311-20316.
- [6] HU S, WAN J, SU Y, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors [J]. *Elife*, 2013, 2(2): e00726.
- [7] Weinhold A, Kallenbach M, Baldwin I T. Progressive 35S promoter methylation increases rapidly during vegetative development in transgenic *Nicotiana attenuata* plants [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, doi: 10.1186/1471-2229-13-99.
- [8] Kloti A, HE X, Potrykus I, et al. Tissue-specific silencing of a transgene in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(16): 10881-10886.
- [9] 化文平, 刘文超, 王喆之, 等. 干涉丹参 *SmORA1* 对植物抗病和丹参酮类次生代谢的影响 [J]. *中国农业科学*, 2016, 49(3): 491-502.
- [10] 朱小亚. 丹参转录因子 *SmMYB4* 调控次生代谢物质合成的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.
- [11] 于海征. 丹参 WRKY 转录组分析及其在次生代谢物生物合成途径上的调控研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016.
- [12] 丁恺. 丹参 *SmMYB36* 基因的功能鉴定与代谢调控机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [13] Piotr S, Ewa S, Renata G, et al. Isolation and characterization of a copalyl diphosphate synthase gene promoter from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Soci Bot Pol*, 2016, 85(3): 3513-3530.
- [14] 甘晓燕. 不同遗传背景和生长阶段丹参的 MSAP 及相关基因分析 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [15] 何云飞. 丹参 CPS 基因家族的克隆及其 RNAi 对丹参酮类次生代谢的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [16] 张红瑞, 李志敏, 高致明. 丹参生长发育特性研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(19): 5783-5785.
- [17] ZHANG M Q. Computational analyses of eukaryotic promoters [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 (Suppl 6): S3.
- [18] Chinnusamy V, ZHU J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12(2): 133-139.
- [19] MA N, CHEN W, FAN T, et al. Low temperature-induced DNA hypermethylation attenuates expression of RhAG, an AGAMOUS homolog, and increases petal number in rose (*Rosa hybrida*) [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 237-240.

[责任编辑 全燕]