

Biosynthesis of Tanshinone and Its Regulation in *Salvia miltiorrhiza**

Lei Yang

Shanghai Chenshan Plant Science Research Center, Chinese Academy of Sciences, Chenshan Botanical Garden, Shanghai
Email: leiyang@sibs.ac.cn

Received: Jun. 19th, 2013; revised: Jun. 28th, 2013; accepted: Jul. 8th, 2013

Copyright © 2013 Lei Yang. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: *Salvia miltiorrhiza*, whose root and rhizome were often used as medicine, was classified in family of Labiatae. Many studies showed that tanshinone has significant effects in curing cardiovascular disease. As the secondary metabolites, it was reported that the biosynthesis for tanshinone was regulated by various biotic or abiotic factors. In the present article, new findings about the biosynthesis of tanshinone was discussed, many key genes in the biosynthesis pathway as well as many related investigation were summed. Moreover, a vision of futurity was also given on how to increase the product of active component from plant by gene engineering.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*; Tanshinone; Secondary Metabolism; Biosynthesis; Regulation

丹参中丹参酮类物质的生物合成及其调控研究进展*

杨 蕾

中国科学院上海辰山植物科学研究中心, 上海辰山植物园, 上海
Email: leiyang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013年6月19日; 修回日期: 2013年6月28日; 录用日期: 2013年7月8日

摘 要: 丹参(*Salvia miltiorrhiza*)为唇形科(Labiatae)鼠尾草属常用中药,以根和根茎入药,药理学表明丹参中丹参酮类化合物对于治疗心脑血管疾病具有显著疗效。据报道丹参酮作为丹参中的次生代谢产物,其生物合成途径受到各种生物及非生物因子的诱导调控。本文综述了近年来丹参酮类物质的生物合成,对其生物合成途径中关键酶基因及其诱导调控的相关研究进行了归纳总结,并对基因工程方法来提高药用植物中有效成分的含量做出了展望。

关键词: 丹参; 丹参酮; 次生代谢; 生物合成; 调控

1. 引言

丹参(*Salvia miltiorrhiza*)为唇形科(Labiatae)鼠尾草属常用中药,以根和根茎入药。丹参以中药入药史载于我国的《神农本草经》,被列为上品,具有活血,通心包络,治疝气痛的功效^[1]。现代化学及药理学研

*基金项目: 国家自然科学基金(31200222)。

究表明丹参中丹参酮类化合物对于治疗心脑血管疾病具有显著疗效,因此丹参作为药用植物的开发利用及其有效成分的代谢调控研究具有重要的意义。本文从丹参酮类的化学结构及其活性、丹参酮类的生物合成途径及其关键酶、丹参酮类的调控研究等几个方面进行综述。

2. 丹参酮类的化学结构及其活性

2.1. 丹参酮类的化学结构

唇形科鼠尾草属植物中大约有 50 多种二萜类化合物骨架, 包含 450 余种二萜类化合物, 根据这些化合物的结构可分为松香烷型(Abietaene)、意烯萜烷型(Icetexane)、海松烷型(Pimarane)、克洛登烷型(Clerodane)和半日花烷型(Labdane)五种类型, 其中数量最多的是松香烷型二萜及其多种变型^[2]。丹参中以丹参酮 IIA、丹参酮 I、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 为代表的化合物均属于松香烷型, 其化学结构如图 1 所示。

2.2. 丹参酮类的药理活性

丹参酮类独特的结构和较强的药理活性越来越受到人们的普遍重视^[3-5], 其中丹参酮 IIA 在丹参根中的含量较高, 且研究发现其具有保护心肌细胞抗氧化的功能^[6], 丹参酮 I 具有提高记忆力和学习能力的功效^[7], 而其他丹参酮类二氢丹参酮 I、丹参酮 IIB 和隐丹参酮等具有抗菌活性^[8]。因为丹参酮类具有显著的药用活性, 所以近年来对其生物合成以及通过诱导来提高丹参酮类含量的相关研究受到众多研究者的青睐。

3. 丹参酮类的生物合成

3.1. 丹参酮类的生物合成途径及其关键酶

丹参酮类化合物属于萜类家族, 萜类化合物是植物次生代谢产物中最大的一个家族^[9], 目前发现的萜类化合物的生物合成都来自于一个共同的前体异戊烯基焦磷酸(IPP)及它的异构物二甲基烯丙基焦磷酸(DMAPP)^[10]。在植物里, 一共有两条途径参与了 IPP 和 DMAPP 的形成, 如图 2 所示。一条是经典的 MVA 途径: 首先两分子乙酰 CoA(acetyl-CoA)在乙酰乙酰 CoA 硫解酶(acetoacetyl-CoA thiolase, AACT1/2)的催

化下缩合生成乙酰乙酰 CoA(acetoacetyl-CoA); 乙酰乙酰 CoA 再与一分子的乙酰 CoA 被 HMG-CoA 合成酶(HMGs)缩合生成 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰 CoA(HMG-CoA); HMG-CoA 还原酶(HMGR1/2)利用 NADPH 将 HMG-CoA 还原为甲羟戊酸(MVA); 甲羟戊酸在 ATP 参与下经过 5-磷酸甲羟戊酸、5-焦磷酸甲羟戊酸最终转化为 C5 单位——异戊二烯焦磷酸(IPP), 参与该过程的酶依次是甲羟戊酸激酶(MVK)、磷酸甲羟戊酸激酶(PMK)、5-焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(PMD); 最终异戊二烯焦磷酸(IPP)在其异构酶(IPPI)的催化下可转变为二甲烯丙基焦磷酸(DMAPP)。该途径在细胞溶质中产生 IPP, 随后通过 IPP 异构酶实现到 DMAPP 的转化, 而且线粒体内的萜类成分(如泛醌)也是来源于该途径。另一条途径是存在于质体中的 MEP 途径^[11]: 最初的前体物质是丙酮酸(pyruvate)和 3-磷酸甘油醛(glycer aldehyde-3-phosphate, GAP)。丙酮酸和 GAP 由 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)合成 DXP; 接着在 DXP 还原异构酶(DXR)催化经过一步可逆反应转变为 MEP; 在 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸脱氢酶(MCT)催化下 MEP 被胞苷三磷酸(CTP)活化成 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-赤藓糖醇(CDP-ME); CDP-ME 在 4-焦磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶(CMK)进一步被磷酸化成 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-赤藓糖醇-2-磷酸(CDP-ME2P), 该过程消耗 1 个 ATP; CDP-ME2P 在 2-C-甲基赤藓醇-2,4-环焦磷酸合成酶(MDS)催化下脱去 1 个 CMP 环化成甲基赤藓糖醇环化焦磷酸(MEcPP); 接着在羟甲基丁烯基-4-磷酸合成酶(HDS)及羟甲基丁烯基-4-磷酸还原酶(HDR)催化下最终形成 IPP 和其异构体 DMAPP, 该途径亦存在于原生动物和很多致病细菌中, 但是在动物和真菌中尚未见报道, MEP 途径已成为新药研究的热点之一^[12]。

对于二萜类化合物生物合成途径的研究, 目前主

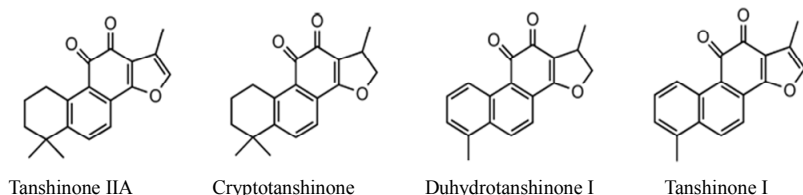


Figure 1. The chemical structure of four kinds of tanshinone compounds in *Salvia miltiorrhiza*
图 1. 丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中 4 种丹参酮类化合物的化学结构

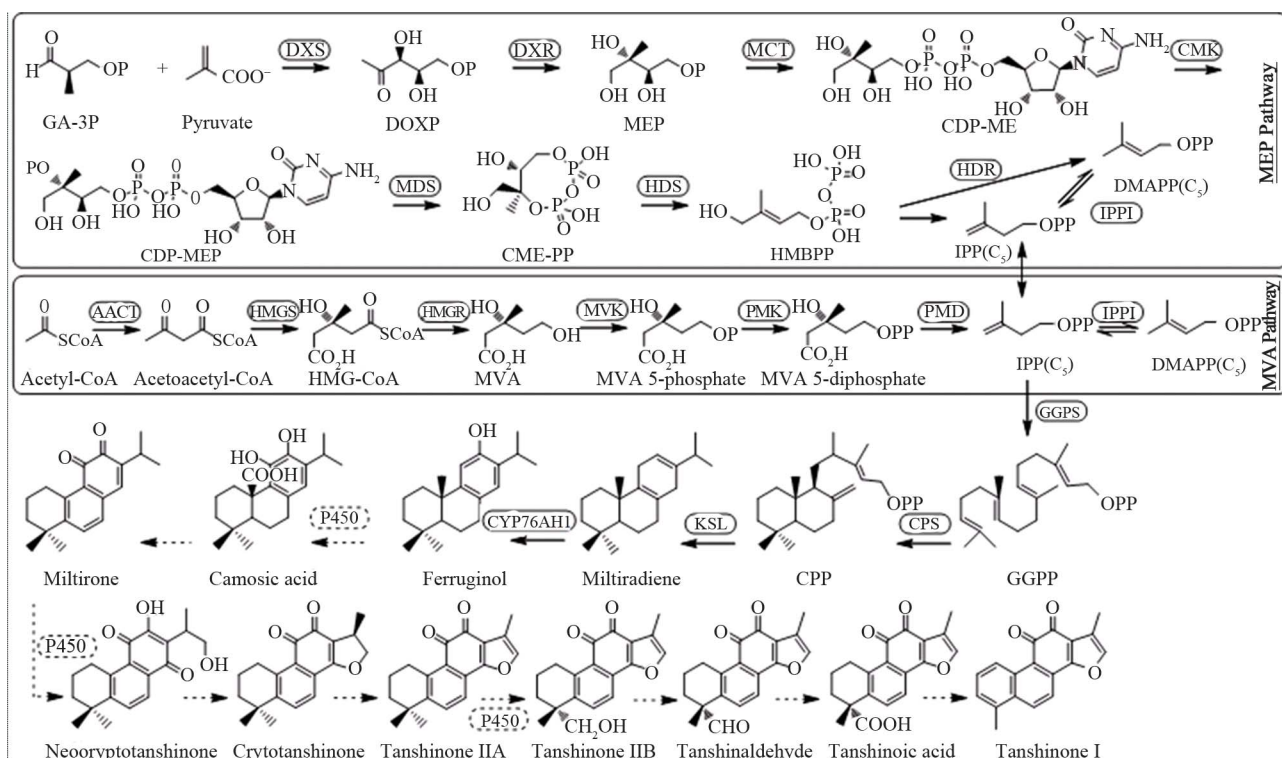


Figure 2. Biosynthetic pathway of tanshinone compounds (the solid arrow denotes identified steps and the dashed arrow denotes putative steps)

图 2. 丹参酮类的生物合成途径(实线箭头表示已知的途径, 虚线箭头表示推导的途径)

要集中在植物激素赤霉素类(GAs)、裸子植物红豆杉中二萜类次生代谢产物紫杉醇^[13]和云杉中松香烷酸^[14]的关键酶基因的克隆和功能研究,有些生物合成途径已经明晰。丹参酮类化合物生物合成途径的相关研究,多集中于共同生源途径研究,包括 HMGR、DXR 和 GGPS 等^[15-18],GGPP 下游合成途径的相关研究还较少。对丹参基因组测序结果进行初步分析,筛选到 40 个与萜类合酶相关的基因,其中归属于 19 个家族的 27 个基因获得新注释^[19]。由 Gao 等克隆的 GGPP 下游的丹参酮类合酶基因柯巴基焦磷酸合酶 SmCPS 和类贝壳杉烯合酶 SmKSL^[20],分别为 GGPP 起始萜类合酶 II(class II terpene synthase)和下游相邻的萜类合酶 I(class I terpene synthase),分别含有 DXDD 和 DDXXD 基序,理论上可以在 GGPP 的环化过程中具有起始环化的功能和与 Mg^{2+} 结合而激活 class I 萜类合酶的磷酸离子化功能。它们位于 GGPP 代谢途径的下游,催化二萜共同前体 GGPP 形成 CPP,接着催化形成二萜化合物 Miltiradiene 的生成^[20],基于以上生物合成途径及其关键酶生产 Miltiradiene 的工程菌也被人工合成。最近,Guo 等克隆并鉴定了一个 P450

酶 CYP76AH1,催化 Miltiradiene 生成了 Ferruginol^[21],使丹参酮生物合成途径研究更深入了一步。尽管如此,丹参酮类化合物生物合成途径还尚需进一步发掘和研究,如图 2 所示,很多 P450 酶类被预测参与了生物合成下游的代谢途径,大量的研究工作还需要进一步去挖掘。随着第二代高通量测序技术的发展,未知基因的发现和功能挖掘方面的研究速度将大大提高^[22-24],基于 Solexa 的丹参转录组测序以及 cDNA 芯片的相关研究也都陆续展开,其对于我国传统中药材丹参的有效开发和利用至关重要。

3.2. 丹参酮类生物合成的组织分布特征

倪学斌等认为丹参酮类只分布在丹参的根部,而地上部分不含有脂溶性丹参酮类^[25]。通过组织化学定位观察,发现丹参地上部和根部均含有红色的脂溶性成分。我实验室利用 HPLC 对两年生栽培丹参的根、茎、叶和花中 4 种丹参酮含量的测定发现,在上市部的茎和花中能够检测到较低含量的丹参酮 IIA,而叶中未能检测到 4 种丹参酮类,结果如表 1 所示。将丹参根的周皮与中柱剥离开,分别测其丹参酮的含量,

Table 1. The contents of four kinds of tanshinone accumulated in different organs of *Salvia miltiorrhiza*
表 1. 丹参不同组织中 4 种丹参酮的含量

组织 organ	丹参酮含量 tanshinone contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)			
	隐丹参酮 cryptotanshinone	二氢丹参酮 I Dihydrotanshinone I	丹参酮 IIA tanshinone IIA	丹参酮 I tanshinone I
根 root	1428.29 \pm 48.79	611.8 \pm 22.44	3829.06 \pm 87.00	2903.18 \pm 13.04
茎 stem	-	-	263.41 \pm 0.40	-
叶 leaf	-	-	-	-
花 flower	-	-	268.97 \pm 0.92	-
根-周皮 root-periderm	3772.17 \pm 192.14	1307.94 \pm 272.97	5627.04 \pm 941.98	5192.48 \pm 900.24
根-中柱 root-stele	86.75 \pm 2.35	69.19 \pm 6.88	359.51 \pm 3.33	223.16 \pm 21.74

表明丹参酮类主要积累在成熟丹参根的周皮中。

4. 丹参酮类生物合成的调控研究

4.1. 丹参酮类生物合成的诱导条件

丹参酮作为萜类物质,是丹参中一类重要的次生代谢产物,次生代谢产物是植物在长期进化中与环境(生物的和非生物的)相互作用并适应环境的结果,次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上充当着重要的角色,其产生和变化比初生代谢产物与环境有着更强的相关性和对应性^[26,27]。人们对次生代谢的研究已经深入到分子生物学、基因工程等方面^[28]。植物次生代谢在植物对环境的适应过程中起着重要的作用,受到各种生物和非生物因子的调控,许多植物在受到病原微生物浸染后,产生并积累次生代谢产物,用以增强自身的抵抗力;有些次生代谢产物与植物异种相克,种子传播,吸引昆虫以及防御捕食有关;另有一些次生物质,可以作为信号物质参与植物的生理活动。丹参酮类次生代谢产物对于丹参等药用植物的生物学功能目前尚未见报道,还需要进一步的研究致力于此。

现有的研究发现,丹参酮类的生物合成受到各种环境因子(生物因子和非生物因子)的调控和诱导。参与丹参酮类生物合成上游 MVA 途径中的 *HMGS* 在 SA 处理的 48 h 表达最高,该途径中的 *HMGR* 在 MJ 处理后表达也达到较高水平^[29]。在丹参毛状根体系建立的基础上, YE 处理能够促进丹参酮类含量的明显增加^[30,31], Ag^+ 、 Co^{2+} 和 Cd^{2+} 等离子对丹参酮类的积累也起到积极的作用^[32],很多研究表明渗透胁迫也能

够促进丹参酮类次生代谢物质的生成和积累^[31]。在丹参的毛状根培养体系中,山梨醇处理过的丹参毛状根,其总丹参酮类物质的含量达到对照的 4.5 倍^[33]。本实验室前期的实验结果表明,光能够显著影响丹参酮类的生物合成,是丹参酮生物合成的负调控因子,完全避光培养的丹参不定根培养系中丹参酮类明显获得积累,而与避光相比较,在见光处理 2 h 其生物合成途径中的几种关键酶的转录水平即发生显著的表达差异。

4.2. 丹参酮类生物合成的调控因子

在植物中,多种转录因子参与了植物的次生代谢调控^[34],次生代谢产物的时空特异性分布和受诱导积累通常在转录水平严格地受到转录因子的调控^[35]。一些家族的转录因子已经被证实参与了植物次生代谢的调控,包括 MYB、bHLH、AP2/ERF、WRKY、Zinc finger、bZIP 和 NAC 等等。Hua 等通过 *De novo* Solexa 转录组测序从丹参中挖掘到 1341 条转录因子 unigene,包含了 C_2H_2 、Homeobox、WRKY、AP2-EREBP 和 MYB 等家族^[24]。我们实验室利用 454 转录组测序技术,也从丹参中找到了 600 余条转录因子,并进一步挖掘到能够调控丹参酮类生物合成相关的光调控因子 PIF 和 DET 等,响应激素处理相关的 ERF 类调控因子,以及参与根发育的 GRAS 家族的转录因子等,这些转录因子的功能还需要进一步的研究确认。

目前,对于丹参中转录因子调控丹参酮类生物合成的研究尚未见报道,但是其他物种中转录因子调控

萜类生物合成的相关研究已经有很多。WRKY 是调控萜类生物合成的一个重要的转录因子家族, 烟草中 WRKY3 和 WRKY6 与挥发性萜类的生物合成紧密相关^[36]。在棉花中 GaWRKY1 通过与(+)- δ -cadinene 合酶基因启动子的结合来正调控棉酚的生物合成^[37]。在药用植物黄花蒿(*Artemisia annua* L.)中, AaWRKY1 通过与倍半萜合酶基因启动子特异性结合来正调控青蒿素的生物合成。最近, 在黄花蒿中两个 AP2/ERF 家族的转录因子 AaERF1 和 AaERF2 被鉴定具有激活编码青蒿素(倍半萜)生物合成途径中紫穗槐二烯合酶(amorpha-4,11-diene synthase, ADS)和 CYP71AV1 基因的转录表达活性, 从而提高青蒿素和青蒿酸的产量^[38]。MYC2 通过结合倍半萜合酶基因启动子区域的顺式元件也能正调控倍半萜类的生物合成^[39]。这些转录因子调控萜类生物合成的生理及分子生物学机制研究和方法学, 为丹参酮类生物合成的转录调控研究提供了指导与借鉴。

5. 展望

植物的次生代谢产物是药物的重要来源, 有很多的工作集中在植物次生代谢过程的阐明, 其目的在于利用植物进行医药工程及天然产物的开发。丹参为我国的传统中药, 研究其丹参酮类次生代谢物质的生物合成, 探索和阐明次生代谢的调控机制, 既有利于提高资源植物生物工程的效率和质量, 也为植物有效成分的开发利用提供了科学依据。

6. 致谢

诚挚感谢我的合作导师中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所陈晓亚研究员对研究工作的指导, 以及对本论文撰写的支持与帮助。

参考文献 (References)

- [1] 陈大为, 王宝玲. 神农本草经图鉴[J]. 天津: 天津科学技术出版社, 2009.
- [2] S. A. V. Alvarenga, J. P. Gastmans AND G. V. Rodrigues. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies-diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry*, 2001, 56(6): 583-595.
- [3] L. Zhou, Z. Zuo AND M. S. S. Chow. Danshen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2005, 45(12): 1345-1359.
- [4] X. Wang, S. L. Morris-Natschke and K. H. Lee. New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Medicinal Research Reviews*, 2007, 27(1): 133-148.
- [5] K. K. Wong, T. W. Ho, H. Q. Lin, K. F. Lau, J. A. Rudd, C. K. Chung, K. P. Fung, P. C. Shaw and C. C. D. Wan. Cryptotanshinone, an acetyl-cholinesterase inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*, ameliorates scopolamine-induced amnesia in Morris water maze task. *Planta Medica*, 2010, 76(3): 228-234.
- [6] X. Yao, X. Q. Wang, S. L. Ma and B. Y. Chen. Sodium tanshinone IIA sulfonate derived from *Salvia miltiorrhiza* Bunge up-regulate the expression of prolactin releasing peptide (PrRP) in the medulla oblongata in ovariectomized rats. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 72: 582-587.
- [7] D. H. Kim, S. Kim, S. J. Jeon, K. H. Son, S. Lee, B. H. Yoon, J. H. Cheong, K. H. Ko and J. H. Ryu. Tanshinone I enhances learning and memory, and ameliorates memory impairment in mice via the extracellular signal-regulated kinase signalling pathway. *British Journal of Pharmacology*, 2009, 158(4): 1131-1142.
- [8] G. Honda, Y. Koezuka and M. Tabata. Isolation of an antidermatophytic substance from the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1988, 36: 408-411.
- [9] B. Nur Tana, M. Kalogaa and O. A. Radtke. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 2002, 61(8): 881-884.
- [10] S. T. Withers and J. D. Keasling. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(5): 980-990.
- [11] M. H. Hsieh and H. M. Goodman. The arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 641-653.
- [12] M. Seemann, B. Tse Sum Bui, M. Wolff, M. Miginiac-Maslow and M. Rohmer. Isoprenoid biosynthesis in plang chloroplasts via the Mep pathway: Direct thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG. *FEBS Letters*, 2006, 580(6): 1547-1552.
- [13] M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau and D. W. Christianson. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature*, 2011, 469(7328): 116-122.
- [14] D. M. Martin, J. Faldt and J. Bohlmann. Functional characterization of nine Norway Spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 1908-1927.
- [15] S. J. Wu, M. Shi and J. Y. Wu. Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoidtanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2009, 52(1): 89-95.
- [16] J. W. Wang and J. Y. Wu. Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2): 437-449.
- [17] Z. Dai, G. Cui, S. F. Zhou, X. Zhang and L. Huang. Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoidtanshinone accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(2): 148-157.
- [18] G. Kai, H. Xu, C. Zhou, P. Liao, J. Xiao, X. Luo, L. You and L. Zhang. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza*. *Metabolic Engineering*, 2011, 13(3): 319-327.
- [19] D. Ma, G. Pu, C. Lei, L. Ma, H. Wang, Y. Guo, J. Chen, Z. Du, G. Li, H. Ye and B. Liu. Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisin in biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(12): 2146-2161.
- [20] W. Gao, M. L. Hillwig, L. Q. Huang, G. H. Cui, X. Y. Wang, J. Q. Kong, B. Yang and R. J. Peters. Functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical in sighs. *Organic Letters*, 2009, 11(22): 5170-5173.
- [21] M. L. Hillwig, M. Xu, T. Toyomasu, M. S. Tiernan, G. Wei, G. Cui, L. Huang and R. J. Peters. Domain loss has independently occurred multiple times in plant terpene synthase evolution.

- Plant Journal, 2011, 68(6): 1051-1060.
- [22] J. Guo, Y. J. Zhou, M. L. Hillwig, Y. Shen, L. Yang, Y. J. Wang, X. A. Zhang, W. J. Liu, R. J. Peters, X. Y. Chen, Z. K. Zhao and L. Q. Huang. CYP76AH1 catalyzes turnover of miltiradiene in tanshinones biosynthesis and enables heterologous production of ferruginol in yeasts. PNAS, 2013, in press.
- [23] M. L. Metzker. Sequencing technologies-the next generation. Nature Genetics, 2010, 11(1): 31-46.
- [24] W. Hua, Y. Zhang, J. Song, L. Zhao and Z. Wang. *De novo* transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. Genomics, 2011, 98(4): 272-279.
- [25] 倪学斌, 苏静. 丹参地上部分有效成分的初步分析[J]. 中国药理学杂志, 1995, 30(6): 336-338.
- [26] J. Gershenzon. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. New York: Plenum Press, 1984: 273-320.
- [27] A. L. Shelton. Variable chemical defences in plants and their effects on herbivore behavior. Evolutionary Ecology Research, 2000, 2(2): 231-249.
- [28] 陈晓亚, 刘培. 植物次生代谢的分子生物学及基因工程[J]. 生命科学, 1996, 8(2): 8-11.
- [29] L. Zhang, X. Yan, J. Wang, S. Li, P. Liao and G. Kai. Molecular cloning and expression analysis of a new putative gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Salvia miltiorrhiza*. Acta Physiologiae Plantarum, 2011, 33(3): 953-961.
- [30] H. Chen and F. Chen. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. Process Biochemistry, 2000, 35(8): 837-840.
- [31] J L Zhao, L G Zhou and J Y Wu. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(1): 137-144.
- [32] X. C. Ge and J. Y. Wu. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. Plant Science, 2005, 168(2): 487-491.
- [33] M. Shi, K. W. Kwok and J. Y. Wu. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2007, 46(Pt 4): 191-196.
- [34] N. De Geyter, A. Gholami, S. Goormachtig and A. Goossens. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 349-359.
- [35] C. Q. Yang, X. Fang, X. M. Wu, Y. B. Mao, L. J. Wang and X. Y. Chen. Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(10): 703-712.
- [36] M. Skibbe, N. Qu, I. Galis and I. T. Baldwin. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory. Plant Cell, 2008, 20(7): 1984-2000.
- [37] Y. H. Xu, J. W. Wang, S. Wang, J. Y. Wang and X. Y. Chen. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates these squiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. Plant Physiology, 2004, 135(1): 507-515.
- [38] Z. X. Yu, J. X. Li, C. Q. Yang, W. L. Hu, L. J. Wang and X. Y. Chen. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Molecular Plant, 2012, 5(2): 353-365.
- [39] G. J. Hong, X. Y. Xue, Y. B. Mao, L. J. Wang and X. Y. Chen. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. Plant Cell Online, 2012, 24(6): 2635-2648.