

多穗柯无色花青素还原酶基因的克隆及其表达与根皮苷含量的相关性分析

朱金丽¹, 王 卓², 王志焱¹, 张妍彤¹, 黄 剑^{3*}, 邢朝斌^{1*}

1. 华北理工大学生命科学学院, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学药学院, 河北 唐山 063210

3. 百色学院农业与食品工程学院, 广西 百色 533000

摘要: 目的 克隆多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* 的无色花青素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 基因, 并对其表达量与根皮苷含量的关系进行分析。方法 根据多穗柯转录组测序的结果 (Unigene 号: DN30711_c0_g1_i1), 利用 PCR 法扩增获得多穗柯 LAR 基因的全长 cDNA 序列, 进行生物信息学分析, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 LAR 基因的表达量, 使用 UPLC 法测定根皮苷的含量, 应用 SPSS 18.0 软件分析 LAR 基因表达量与根皮苷含量间的相关关系。

结果 多穗柯 LAR 基因的 cDNA 全长 1 053 bp, 包含一个完整的开放阅读框, 编码 350 个氨基酸。该蛋白不存在跨膜区域, 定位于细胞质中。多穗柯 LAR 蛋白属于 PCBER_SDR_a 家族, 与栓皮栎 LAR 蛋白具有较高的相似性 (95%), 且亲缘关系最近。多穗柯的根皮苷含量与 LAR 基因的表达量呈正相关 ($P < 0.05$) 关系。**结论** 首次克隆得到多穗柯 LAR 基因, 并证实多穗柯根皮苷含量与 LAR 基因的表达量呈正相关, 为揭示多穗柯中根皮苷的生物合成机制奠定理论和技术基础。

关键词: 多穗柯; 无色花青素还原酶; 克隆; 根皮苷; 表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3292-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.022

Cloning and expression of LAR gene and its correlation with phloridzin content in *Lithocarpus polystachyus*

ZHU Jin-li¹, WANG Zhuo², WANG Zhi-yan¹, ZHANG Yan-tong¹, HUANG Jian³, XING Zhao-bin¹

1. College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

3. College of Agricultural and Food Engineering, Baise University, Baise 533000, China

Abstract: Objective To clone the leucoanthocyanidin reductase (LAR) gene of *Lithocarpus polystachyus*, and analyze the relationship between LAR gene expression level and phloridzin content. **Methods** According to the results of *L. polystachyus* transcriptome sequencing (unigene: DN30711_c0_g1_i1), the full-length cDNA sequence of LAR gene was amplified by PCR and the bioinformatics analysis was carried out. Its expression was detected by quantitative Real-time PCR (qRT-PCR). The phloridzin content of *L. polystachyus* was measured by UPLC method and the correlation between LAR gene expression and phloridzin content was analyzed by SPSS 18.0 software. **Results** The full-length cDNA of the LAR gene was 1 053 bp and contained a complete open reading frame that encoded 350 amino acids. This protein did not exist a transmembrane domain and was localized in the cytoplasm. The LAR protein of *L. polystachyus* was the number of PCBER_SDR_a family and had a high similarity (95%) to the LAR protein of *Quercus suber* and their genetic relationship was close. The phloridzin content of *L. polystachyus* was positively correlated with the expression of LAR gene ($P < 0.05$). **Conclusion** The LAR gene of *L. polystachyus* was cloned for the first time. It was confirmed that the content of phloridzin was positively correlated with the expression of LAR gene of *L. polystachyus*, which laid a theoretical and technical basis for revealing the biosynthesis mechanism of phloridzin of *L. polystachyus*.

Key words: *Lithocarpus polystachyus* Rehd; leucoanthocyanidin reductase; clone; phloridzin; expression

收稿日期: 2019-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31760221); 华北理工大学培育基金资助项目 (SP201508)

作者简介: 朱金丽 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为生物信息在药用植物中的应用。

*通信作者 邢朝斌 (1975—), 男, 教授, 研究方向为分子生药学。Tel: (0315)3725859 Fax: (0315)3726341 E-mail: xzbheuu@126.com

黄 剑 (1979—), 男, 高级工程师, 研究方向为药用植物学。E-mail: huang_gxky@163.com

多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd 又名甜茶, 系壳斗科石柯属常绿乔木^[1], 主要分布于江西、广西、湖南等长江以南地区。多穗柯茶在我国民间具有悠久的历史, 其茶色鲜艳、茶香浓郁, 且具有抗氧化、降血糖、调血脂、降血压等功效^[2-3], 是药食同源的植物之一。多穗柯中的黄酮类次生代谢产物是其主要活性成分, 总黄酮量达到 10%^[4]。黄酮类具有多种生物学功能, 尤其是多穗柯中的二氢查耳酮葡萄糖苷——根皮苷已被证实在糖尿病治疗等领域具有较好的药理作用, 受到国内外学者的广泛关注^[2]。

无色花青素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 作为黄酮类化合物生物合成过程中的一个关键酶, 对药用植物中黄酮类化合物的形成至关重要^[5]。LAR 的表达与原花青素 (PA) 的积累有着显著的相关性, 如可可 *Theobroma cacao* Linn. 中的 LAR 高表达对 PA 的合成起着积极的作用^[6]; 苹果 *Malus domestica* Mill. 中原花青素的生物合成由 LAR 与花青素合成酶 (ANS)、花色素还原酶 (ANR) 共同作用^[7]; 根皮苷是多穗柯黄酮类化合物发挥活性的主要成分之一, 苹果等物种中根皮苷的生物合成途径和作用已有部分报道^[8]。2017 年宋菊等^[9]对多穗柯进行了转录组测序分析, 找到部分多穗柯中参与黄酮类化合物合成的关键基因, 但尚未见有关多穗柯 LAR 基因的相关报道。本研究根据多穗柯转录组测序的结果 (Unigene 号: DN30711_c0_g1_i1)^[9], 通过 PCR 法扩增获得多穗柯 LAR 基因的全长 cDNA 序列, 并对其进行了生物信息学分析和 LAR 基因表达与根皮苷含量的相关性分析, 为揭示多穗柯中根皮苷的生物合成机制奠定理论和技术基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

选择自然生长的 10 株长势、生长发育状态相仿的多穗柯为研究对象 (编号 1~10), 且均采自广西壮族巴马瑶族自治县, 经华北理工大学生命科学院邢朝斌教授鉴定为壳斗科石柯属植物多穗柯 *Lithocarpus polystachyus* Rehd, 取其叶片, 去离子水洗净之后用滤纸吸干水分, 保存于-80 °C 备用。

植物总 RNA 提取试剂盒、Talent 荧光定量检测试剂盒、大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞、琼脂糖凝胶回收试剂盒、pLB 质粒 (天根生物技术有限公司); 琼脂糖 (Sigma-Aldrich 公司); RevertAid™ First

strand cDNA synthesis Kit (Thermo Fisher 公司); 10×LA Taq Buffer、LA Taq DNA 聚合酶、2.5 mmol/L dNTP 等购自大连宝生物公司; 根皮苷对照品 (批号 180228, 北京世纪奥科生物技术有限公司); 乙腈 (Sigma-Alorich 公司); 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂均为国产分析纯, 引物由北京诺赛公司合成。

1.2 仪器

ProFlex™ PCR 仪、实时荧光定量 PCR (Life Technologies); Azure c200 凝胶成像系统 (美国 Azure Biosystems 公司); 3K15 台式高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); JY1000C 通用型电泳仪 (北京市六一仪器厂); 电子天平 [奥豪斯仪器 (常州) 有限公司]; 超声波细胞破碎仪 (Branson 公司); ACQuity H-class 型超高效液相色谱仪 (Waters 公司)、色谱柱 (ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱, 50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters 公司)。

2 方法

2.1 多穗柯总 RNA 的提取与逆转录

10 株多穗柯分别编码 1~10, 每株称取叶片 0.1 g, 按照植物总 RNA 提取试剂盒的说明书提取多穗柯总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 将得到的完整的总 RNA 冻存于-80 °C 备用。取 8 μL 多穗柯总 RNA, 并以 Oligo (dT)₁₈ 为引物, 按照 RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit 说明书进行逆转录反应, 逆转录获得的 cDNA 冻存于-80 °C 备用。

2.2 多穗柯 LAR 基因 cDNA 的克隆

根据多穗柯转录组测序的结果 (unigene 号: DN30711_c0_g1_i1)^[9], 利用 Primer 5.0 软件设计扩增多穗柯 LAR 基因的引物, 上游引物 LARS1: 5'-ATGYGTGGTTCAAATCCTAATGT-3', 下游引物 LARX3: 5'-TCAAGCTGCAGWGAYTGCAAC-3'。以多穗柯叶片逆转录得到的 cDNA 为模板, PCR 扩增多穗柯 LAR 基因的全长 cDNA 序列。总反应体系为 25 μL, 其中上、下游引物和模板 cDNA 各 1.0 μL, 2×LA Taq 0.2 μL, 10×LA Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, dNTP 4.0 μL, ddH₂O 补至 25.0 μL。反应条件为预变性 94 °C, 30 s; 变性 95 °C, 30 s; 退火 62 °C, 30 s; 延伸 72 °C, 2 min。40 个循环后 72 °C 补延伸 10 min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 按琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行回收, 连接到 pLB 克隆载体上, 再

转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,阳性克隆委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

2.3 多穗柯 LAR 基因的生物信息学分析

通过 DNASTAR 5.0 软件和 BLAST 比对确定多穗柯 LAR 基因 cDNA 全长序列的开放阅读框 (ORF) 以及相对应的氨基酸序列;使用在线软件 ProtParam 预测蛋白质的基本理化性质;采用 SOPMA 分析其蛋白质二级结构;利用 NCBI BLAST 中的 Conserved Domain Database 软件对蛋白质功能结构域进行分析;通过 TargetP 1.1 Server 服务器对该蛋白的亚细胞定位;使用 SignalP 3.0 Server 预测其信号肽;运用 TMHMM Server v.2.0 对跨膜结构域进行预测;使用 MEGA 6.05 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ) 法构建系统发育树;使用 SWISS-MODEL 软件对蛋白质的三维结构进行预测。

2.4 多穗柯 LAR 基因的表达量分析

利用 Primer 5.0 软件设计 qRT-PCR 扩增多穗柯 LAR 基因的上游引物 DLARrtS2: 5'-TGGGAG-GAGAAGATTGGGCGTAA-3' 和下游引物 DLARrtX2: 5'-TCGTTGCTTATTGGCTTGTTG-ACA-3', 预期扩增长度 287 bp; 扩增多穗柯 GAPDH 基因的上游引物 DGrtS1: 5'-GGTCAAGATC-GGAATCAACGGAT-3' 和下游引物 DGrtX1: 5'-CGACGGACTTCTCACCAAAGAGA-3', 预期扩增长度 221 bp。以“2.1”项中获得的 10 株多穗柯叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系为 10 μ L: 上下游引物各 0.3 μ L, cDNA 0.5 μ L, 2 $\times$ Talent qPCR PreMix 5 μ L, 50 $\times$ ROX $\times$ Reference Dye 1 μ L, 补 RNase-Free ddH₂O 至 10 μ L。PCR 条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 3 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火 65 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 15 s, 40 个循环后 72 $^{\circ}$ C 补延伸 5 min。表达量的计算方法参照文献方法^[10]进行。

2.5 多穗柯根皮苷含量的测定

2.5.1 对照品溶液的制备 精密称取根皮苷 10.00 mg, 并用甲醇准确定容至 10 mL, 摇匀, 即得。

2.5.2 供试品溶液的制备 精密称取“1.1”项中 10 株多穗柯叶片各 0.2 g, 60 $^{\circ}$ C 烘干至恒定质量后研磨粉碎, 加入 10 mL 95% 的乙醇溶液, 400 W 超声 20 min 后 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过。

2.5.3 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC[®] BEH

C₁₈ 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m); 流动相为乙腈-水 (27:73); 检测波长 285 nm; 体积流量 0.2 mL/min; 进样量 10 μ L; 柱温 30 $^{\circ}$ C^[11]。

2.5.4 线性关系考察 分别精密吸取根皮苷对照品溶液 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25 mL 于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 得系列质量浓度溶液, 进样, 测定峰面积, 每个质量浓度梯度平行测定 3 次。分别以各色谱峰峰面积积分值 (Y) 对质量 (X) 进行线性回归, 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y=6\times 10^7 X+195\ 578$, $r^2=0.999$ 。

2.5.5 多穗柯根皮苷含量的测定 各多穗柯样品按“2.5.2”项下制备供试品溶液, 以“2.5.3”项色谱方法进行测定, 记录峰面积, 代入回归方程, 计算各样品中根皮苷含量。根皮苷对照品及样品 1 的 UPLC 色谱图见图 1。

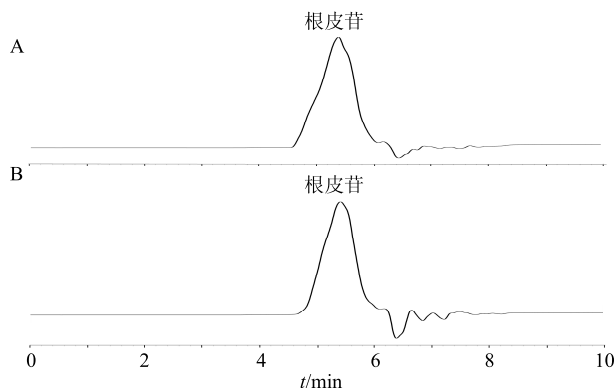


图 1 根皮苷对照品 (A) 及多穗柯样品 (B) 的 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC of phloridzin reference substance (A) and *L. polystachyus* sample (B)

3 结果与分析

3.1 多穗柯 LAR 基因克隆及序列分析

以多穗柯 cDNA 为模板, 利用特异性引物 LARS1 和 LARX3 进行 PCR 扩增获得一条长为 1 000 bp 左右的条带 (图 2), 其大小与预期一致, 经测序, 确认长为 1 053 bp。测序结果经 NCBI 的 BLAST 比对后, 确定该片段包含一个长为 1 053 bp 完整的开放阅读框 (ORF), 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 共编码 350 个氨基酸。

3.2 多穗柯 LAR 基因的生物信息学分析

在线软件 ProtParam 分析的结果显示, 多穗柯 LAR 蛋白质的理论等电点 (pI) 为 5.32, 为酸性蛋白; 相对分子质量为 38 647.18; 在体外红细胞中的半衰期为 30 h, 不稳定指数为 35.30, 属于稳定蛋

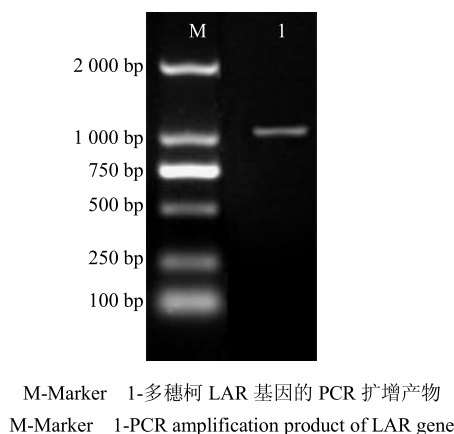


图 2 多穗柯 LAR 基因的克隆

Fig. 2 Cloning of LAR gene of *L. polystachyus*

白；亲水性的平均值为-0.085，属于亲水性蛋白；脂肪系数为 93.89，富含异亮氨酸 (Ile)、缬氨酸 (Val)、天冬氨酸 (Asp)。

SOMPA 软件对 LAR 基因编码的蛋白质的二级结构分析显示，该蛋白含 α 螺旋 (alpha helix) 121 个，占 34.57%；延伸链 (extended strand) 70 条，占 20%； β 转角 (beta turn) 20 个，占 5.71%；无规卷曲 (random coil) 139 个，占 39.71%。PROSITE 程序预测该蛋白具有 1 个 NAD (P) 结合位点和 1 个赖氨酸活性位点。对保守结构域分析表明，该蛋白属于 PCBER_SDR_a 家族。结合同源建模的方法，以 3i52.1.A 为模板蛋白，运用 SWISS-MODEL 在线软件对多穗柯 LAR 蛋白的三级结构进行预测，结果表明 LAR 蛋白以无规卷曲和 α 螺旋为主，兼有少量的延伸链和 β 转角，与二级结构的预测结果基本一致。TargetP 1.1 Server 在线工具分析，多穗柯 LAR 定位于细胞质中，预测可靠性等级为 5.14，而且 SignalP 3.0 Server 在线分析表明，多穗柯 LAR 基因编码的蛋白质不存在信号肽。经过对多穗柯 LAR 氨基酸序列的跨膜结构域进行预测，结果显示多穗柯 LAR 基因编码的多肽不存在跨膜区。

3.3 LAR 的系统进化分析

将多穗柯 LAR 与 GenBank 中登载的 19 种其他物种的 LAR 蛋白进行聚类分析，构建 LAR 的系统进化树，结果见图 3。在双子叶植物内部，多穗柯 LAR 蛋白与同为壳斗科的栓皮栎 *Quercus suber* L. 亲缘关系最近，首先聚为一支，支持率达 97%，随后与杨柳目的黑杨 *Populus nigra* Linn.、鼠李目的枣 *Ziziphus jujube* Mill.、蔷薇目的苹果 *Malus domestica* Mill.、锦葵目的可可等聚为一个分支，与桃金娘

目的大桉 *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden 亲缘关系较远，与外类群人、原生生物格氏奈氏菌 (*Naegleria gruberi* strain NEG-M)、假单胞菌病毒 D3 (*Pseudomonas virus* D3) 和阴沟肠杆菌复合体 *SP. Enterobacter cloacae complex sp.* 分别聚为一个分支，这与传统的分类结果相符，也暗示了多穗柯 LAR 基因与其他植物的 LAR 基因具有共同的进化起源。

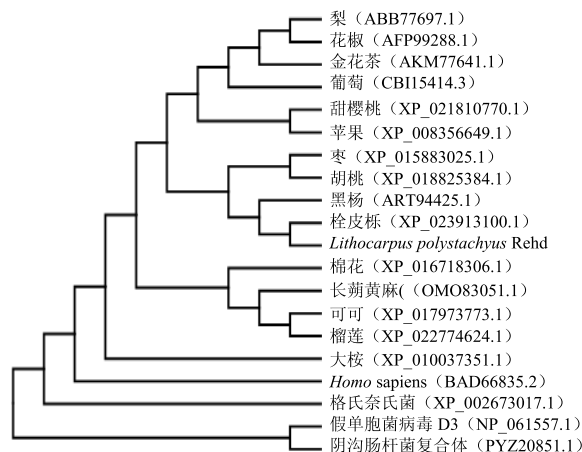


图 3 不同物种 LAR 蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of LAR proteins from 20 species

3.4 多穗柯 LAR 基因的表达及其与根皮苷含量的相关性分析

LAR 基因在 10 株多穗柯叶片中均有表达，但表达量具有显著差异 ($P < 0.05$)。LAR 基因的最大表达量为最低表达量的 13.8 倍 (图 4)。10 株多穗柯的叶片中均含有根皮苷，根皮苷的质量分数为 0.550~1.316 g/kg，平均质量分数为 1.088 g/kg，根皮苷最高含量是最低含量的 2.4 倍 (图 4)。相关性的分析结果表明，多穗柯根皮苷含量与 LAR 基因表达量间的相关系数较高 ($r = 0.898$)，呈显著的正相关关系 ($P < 0.01$)。表明 LAR 基因的相对表达量对根皮苷积累有积极的作用。

4 讨论

植物无色花色还原酶属于短链脱氢酶/还原酶家族和 PIP 家族，可促进植物组织中的类黄酮化合物的形成和积累，其生物合成过程中的关键酶编码基因逐渐被分离，相关功能也得到鉴定。如葡萄中的 LAR1 和 LAR2 基因有助于果实中 PA 的合成，并且编码 LAR 的基因的组织和时间特异性调节决定了葡萄 *Vitis vinifera* L. 果实发育过程中 PA 的积

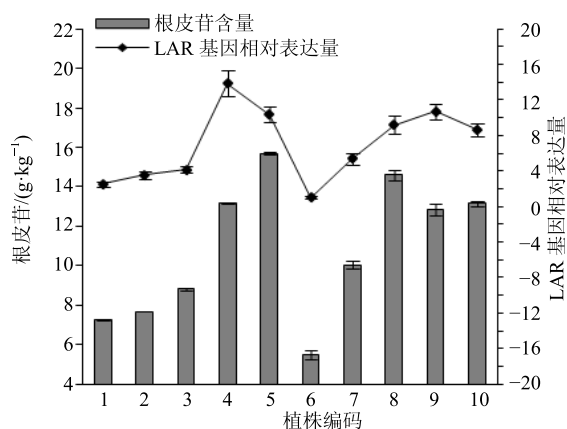


图 4 多穗柯叶片中 LAR 表达量及根皮苷的含量分析

Fig. 4 Analysis of LAR expression and phloridzin content in leaves of *L. polystachyus* plants

累和形成^[12]；苹果中 LAR1 基因在烟草中异位表达后，导致烟草的花青素和 PA 的积累减少^[7]。这些研究表明，LAR 家族成员在植物黄酮类化合物的合成途径中扮演不同的角色。

本研究所克隆的多穗柯 LAR 基因包含 1 个完整的开放阅读框，长 1 053 bp，编码 350 个氨基酸，序列分析表明与栓皮栎、黑杨、枣、苹果、可可等其他双子叶植物的 LAR 基因的一致性高达 62%~95%，说明成功克隆了多穗柯的 LAR 基因。其二级结构以无规卷曲和 α 螺旋为主，兼有少量的延伸链和 β 转角，这与已报道的芒果^[13]、葡萄^[12]等略有差别，这可能与它们的来源物种不同有关，存在一定的进化差异。多穗柯 LAR 基因编码蛋白具有 1 个 NAD(P) 结合位点和 1 个赖氨酸活性位点，这与依赖无色还原酶合成 PA 需要 NAD(P)H 参与的研究结果相一致^[14]。研究发现苹果和可可中 LAR 蛋白同样含有 NAD(P) 结合位点，说明多穗柯的 LAR 具有无色花青素还原酶的典型特征。多穗柯 LAR 的跨膜分析和亚细胞定位显示其无跨膜结构，定位于细胞质中，这与其他植物 LAR 在细胞质中合成前体蛋白的观点相一致^[15]。

LAR 基因表达量分析的结果表明，LAR 基因在 10 株多穗柯叶片中表达量差异显著 ($P < 0.05$)，原因可能是 10 株多穗柯属于不同的品种，这与已报道的苹果^[7]、茶树^[16]中 LAR 基因的表达在不同的品种中表达量具有显著差异的结论相一致。多穗柯根皮苷的含量与 LAR 基因的表达量呈正相关，表明 LAR 基因的表达对根皮苷的合成有积极的调控作用，这与 Bogs 等^[12]对葡萄类黄酮代谢相关酶活

性的研究结果较为相符，他们也得到了 LAR 基因促进 PA 的生物合成和积累的结论，马春雷等^[16]研究证明茶树 LAR 基因的表达与总儿茶素含量的增加有紧密的关系，这些都表明 LAR 基因是植物黄酮化合物生物合成途径中一个重要的基因。因此调控 LAR 基因的相对活性有可能改变植物组织中黄酮化合物的含量和组成，如何通过调控 LAR 基因的相对表达量调节多穗柯根皮苷的合成有待进一步的研究。

本实验首次克隆了多穗柯的 LAR 基因，生物信息研究表明该基因具有 LAR 活性所必须的活性位点，并证实 LAR 基因表达量和根皮苷含量在不同的多穗柯中存在显著差异，且 LAR 基因的表达促进根皮苷的合成。研究结果为揭示多穗柯中根皮苷的生物合成机制奠定理论和技术基础，以期促进多穗柯资源的开发利用。

参考文献

- [1] 林丽梅, 龙月红, 冯若宣, 等. 多穗柯查耳酮异构酶基因的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5080-5084.
- [2] Wang J, Huang Y, Li K, *et al.* Leaf extract from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. promote glycogen synthesis in T2DM mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166557.
- [3] Hou S, Xu S, Jiang D, *et al.* Effect of the flavonoid fraction of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. on spontaneously hypertensive and normotensive rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2): 441-447.
- [4] 李胜华, 伍贤进, 曾军英. 多穗柯中总黄酮的体内和体外抗氧化研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(9): 731-735.
- [5] Punyasiri P A, Abeysinghe I S, Kumar V, *et al.* Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia ainenais*: Properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 431(1): 22-30.
- [6] Liu Y, Shi Z, Maximova S, *et al.* Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: Genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13(1): 202.
- [7] Liao L, Vimolmangkang S, Wei G, *et al.* Molecular characterization of genes encoding leucoanthocyanidin reductase involved in proanthocyanidin biosynthesis in apple [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 243.

- [8] Dare A P, Tomes S, Cooney J M, *et al.* The role of enoyl reductase genes in phloridzin biosynthesis in apple [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 72: 54-61.
- [9] 宋 菊, 黄 剑, 李志栋, 等. 多穗柯转录组分析及黄酮类化合物合成相关基因的挖掘 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 675-679.
- [10] 邢朝斌, 龙月红, 李非非, 等. 刺五加鲨烯合酶基因家族两成员的表达及其与皂苷含量的关系 [J]. 西南农业学报, 2014, 27(3): 1252-1255.
- [11] 张亚洲, 王 涛, 朱晶晶, 等. 木姜叶柯中根皮苷与三叶苷含量测定研究 [J]. 中国药业, 2018, 27(18): 5-8.
- [12] Bogs J. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 652-663.
- [13] 赵志常, 高爱平, 黄建峰, 等. 芒果LAR基因的克隆及其表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 31-34.
- [14] Tanner G J, Francki K T, Abrahams S, *et al.* Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 31647-31656.
- [15] 李 蒙, 鲍 锋. 不同植物无色花青素还原酶及其基因的生物信息学分析 [J]. 江西农业学报, 2017, 29(9): 5-9.
- [16] 马春雷, 乔小燕, 陈 亮. 茶树无色花色素还原酶基因的克隆及表达分析 [J]. 茶业科学, 2010, 30(1): 27-36.