

## • 药材与资源 •

## 基于 WGCNA 挖掘鸡血藤儿茶素和表儿茶素合成途径关键基因

张娟娟, 刘雪梅, 李美欢, 欧海洁, 张雅庭, 黄鼎\*, 田慧\*

广西中医药大学药学院, 广西 南宁 530200

**摘要:** 目的 挖掘参与鸡血藤 *Spatholobus suberectus* 有效成分儿茶素和表儿茶素合成的关键候选基因及调控网络, 为解析鸡血藤原花青素的生物合成路径及调控机制提供候选基因靶点。方法 以鸡血藤的嫩茎、嫩叶、老叶、木质部和韧皮部为材料, 对不同部位进行转录组测序, 并通过超高液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 技术分析儿茶素、表儿茶素黄酮类化合物在不同部位中含量, 利用加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 鉴定出与原花青素合成密切相关的模块和关键基因。另外, 挑选 8 个基因进行 qRT-PCR, 验证转录组数据的可靠性。结果 鸡血藤各组织中儿茶素与表儿茶素的分布呈现显著差异, 其中叶片中两者含量均显著低于茎部。通过 WGCNA, 将 18 828 个基因划分为 15 个共表达模块, 发现 turquoise、tan 和 brown 模块与儿茶素、表儿茶素含量呈显著正相关 ( $P < 0.05, r \geq 0.8$ )。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and 32 genomes, KEGG) 通路富集分析显示, 这 3 个模块的基因主要富集于代谢相关通路。进一步分析表明, turquoise、tan 和 brown 模块分别包含 7 个、4 个和 1 个原花青素生物合成的结构基因, 并鉴定出 2 个关键候选转录因子 SsMYB1 和 SsMYB3。qRT-PCR 验证结果显示, 目标基因的表达变化趋势与转录组数据基本一致, 证实了转录组分析结果的可靠性。结论 挖掘出的 3 个共表达模块和 11 个核心基因为深入解析鸡血藤原花青素合成的分子调控网络及关键基因的协同作用机制提供了重要研究基础。

**关键词:** 鸡血藤; 原花青素; 关键基因; 儿茶素; 表儿茶素; 转录组

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)24-9124-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.24.022

Identification of key genes in biosynthetic pathways of catechin and epicatechin in *Spatholobus suberectus* based on WGCNA

ZHANG Juanjuan, LIU Xuemei, LI Meihuan, OU Haijie, ZHANG Yating, HUANG Ding, TIAN Hui

College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

**Abstract: Objective** As potential active ingredients of *Spatholobus suberectus*, catechin and epicatechin play crucial roles in its medicinal properties. This study aimed to identify key candidate genes and regulatory networks involved in their biosynthesis, providing genetic targets for elucidating the biosynthetic pathway and regulatory mechanisms of proanthocyanidins in *S. suberectus*. **Methods** Young stems, young leaves, mature leaves, xylem, and phloem of *S. suberectus* were subjected to transcriptome sequencing. The contents of catechin, epicatechin, and other flavonoids in different tissues were analyzed using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was employed to identify key modules and genes closely associated with proanthocyanidin biosynthesis. Additionally, eight candidate genes were selected for qRT-PCR validation to confirm the reliability of the transcriptome data. **Results** The distribution of catechin and epicatechin varied significantly among different tissues, with both compounds showing significantly lower levels in leaves compared to stems. WGCNA analysis clustered 18 828 genes into 15 co-expression modules, among which the turquoise, tan, and brown modules exhibited highly significant positive correlations with catechin and epicatechin content ( $P < 0.05, r \geq 0.8$ ). KEGG enrichment analysis revealed that genes in these modules were primarily involved in metabolic pathways. Further analysis identified seven, four, and one

收稿日期: 2025-06-06

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFAA026363); 2022 年广西中医药大学引进博士科研启动基金项目 (2022BS010); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 2025 国家中医药管理局全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函[2025]181 号); 2025 广西壮瑶药重点实验室课题 (GXZYZY2025-02)

作者简介: 张娟娟, 硕士研究生, 研究方向为中药 (壮瑶药) 鉴定。E-mail: 1651581622@qq.com

\*通信作者: 田慧, 教授, 研究方向为中药质量评价与分子生药学。E-mail: 377244732@qq.com

黄鼎, 副研究员, 研究方向为中药资源开发与利用。E-mail: hdh016@126.com

structural genes related to proanthocyanidin biosynthesis in the turquoise, tan, and brown modules, respectively, along with two key candidate transcription factors, SsMYB1 and SsMYB3. The qRT-PCR validation confirmed that the expression trends of target genes were consistent with the transcriptome data, supporting the reliability of the findings. **Conclusion** The three co-expression modules and eleven core genes identified in this study provide a critical foundation for further exploration of the molecular regulatory network and synergistic mechanisms underlying proanthocyanidin biosynthesis in *S. suberectus*.

**Key words:** *Spatholobus suberectus* Dunn.; proanthocyanidins; key genes; catechin; epicatechin; transcriptome

鸡血藤为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn. 的干燥藤茎, 是我国传统活血补血类中药, 其药用记载可追溯至清代《本草纲目拾遗》<sup>[1]</sup>。本品性温, 味苦、甘, 归肝、肾经, 兼具“活血而不伤正, 补血而不壅滞”的药性特点。在传统中医临床中, 鸡血藤主要用于调理气血瘀滞及肝肾亏虚相关病症, 具有活血通经、养血补虚、舒筋通络等功效<sup>[2]</sup>。现代化学成分研究表明, 鸡血藤的药效物质基础具有多成分、多靶点特征, 主要包含黄酮类、酚酸类、萜类、醌类等活性成分<sup>[3-6]</sup>。前人研究表明, 儿茶素和表儿茶素作为鸡血藤发挥药效的核心物质, 已被确立为鸡血藤的有效成分, 可用于该药材的质量评价, 二者均属于原花青素类化合物<sup>[7]</sup>。药理研究显示, 鸡血藤中儿茶素、表儿茶素成分具有广泛的生物活性, 包括抗氧化、抗肿瘤及补血活血等作用<sup>[8-11]</sup>。这些研究不仅为其传统功效提供了现代科学诠释, 也为鸡血藤在创新药物研发及功能性健康产品开发中的应用奠定了理论基础。

原花青素 (proanthocyanidins, PAs) 是一类广泛存在于植物中的多酚类化合物, 属于黄酮类代谢途径的重要分支。由儿茶素 (catechin) 和表儿茶素 (epicatechin) 等黄烷-3-醇单体聚合而成, 在植物中主要分布于叶片、种子、果皮和树皮等组织, 具有其强大的抗氧化、抗炎、抗肿瘤和心血管保护活性, 原花青素在食品、保健品和医药领域具有重要应用价值<sup>[12]</sup>。在植物体内, 原花青素以苯丙氨酸为起始前体, 通过多酶催化的级联反应逐步合成, 具体而言, 可以分为以下 3 个阶段。合成起始阶段: 苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 的催化下生成反式肉桂酸, 随后经肉桂酸 4-羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumarate-coA ligase 4, 4CL) 的连续作用转化为香豆酰辅酶 A, 从而开启原花青素合成的核心通路。核心合成阶段: 查耳酮合成酶 (chalcone synthase, CHS) 催化香豆酰辅酶 A 与 3 分子丙二酰辅酶 A 缩合, 生成查耳酮; 查耳

酮再经由查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 的催化, 转化为黄烷酮 (如柚皮素)。此后, 黄烷酮 3-羟化酶 (flavanone 3-hydroxylase, F3H) 催化引入 3-羟基, 生成二氢黄酮醇; 二氢黄酮醇在二氢黄酮醇还原酶 (dihydroflavonol 4-reductase, DFR) 的作用下, 进一步转化为无色花色素。产物分化阶段: 无色花色素可通过 2 条关键路径生成终产物: 其一, 无色花色素还原酶 (leucoanthocyanidin reductase, LAR) 直接催化生成儿茶素; 其二, 经花青素合成酶 (anthocyanidin synthase, ANS) 转化为不稳定花青素后, 由花青素还原酶 (anthocyanidin reductase, ANR) 特异性还原生成表儿茶素<sup>[13-16]</sup>。转录调控层面, 髓细胞增生病毒癌基因同源物 (MYB)、碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 家族的转录因子通过调控合成通路中关键酶基因的表达, 在原花青素的生物合成过程中发挥重要的调控作用<sup>[17-18]</sup>。这一复杂的合成与调控网络, 共同保障了植物体内原花青素的精准合成与积累。

原花青素的生物合成途径在拟南芥、葡萄等模式植物及黄芩、甘草等药用植物中已被深入解析<sup>[19-22]</sup>。然而, 当前关于鸡血藤的研究仍主要集中于药材鉴别、成分检测和药理活性评价等应用层面<sup>[23-27]</sup>, 对其次生代谢产物合成的分子机制探索相对滞后, 尤其是鸡血藤原花青素生物合成途径的系统解析仍处于起步阶段。值得注意的是, 作为鸡血藤质量标志物的儿茶素与表儿茶素, 其合成关键酶基因 (如 *DFR*、*LAR*、*ANR*) 的时空表达模式, 以及转录因子 (如 MYB、bHLH 家族) 介导的调控网络对次生代谢产物积累的影响, 尚未形成系统性研究。在分子层面, 不同组织 (茎、叶、韧皮部、木质部) 中原花青素合成通路的关键节点基因表达差异, 与质量标志物积累的关联性仍不明确。因此, 深入挖掘鸡血藤原花青素成分的生物合成关键基因, 将为其活性成分的生物合成路径解析和后续调控机制研究提供重要科学依据。

本研究以鸡血藤基因组为参考<sup>[28]</sup>, 选取嫩茎、嫩叶、老叶、木质部和韧皮部 5 个组织开展转录组测序分析。通过超高液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)

检测不同组织中儿茶素、表儿茶素的含量。借助加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 方法构建鸡血藤原花青素合成相关的共表达网络, 筛选出与儿茶素和表儿茶素含量紧密相关的特异性模块, 并对其进行深入的功能注释与分析, 进而挖掘出参与鸡血藤儿茶素和表儿茶素合成的核心基因及其互作网络。该研究不仅从分子层面揭示了鸡血藤活性成分的组织特异性合成机制, 更通过“代谢物-基因表达”的深度关联分析为深入解析鸡血藤原花青素的调控机制开辟新的思路。

## 1 仪器与材料

### 1.1 材料

本研究的样本在 2024 年 10 月采集于广西金陵中华仙草园 (北纬 26°51'30", 东经 108°71'7"), 采样时间在上午 9:00~10:30, 选择长势良好的健康植株。选取 5 株 7 年生鸡血藤植株, 其物种身份经广西中医药大学黄荣韶教授鉴定为密花豆 *S. suberectus* Dunn.。采集的植物组织包括嫩茎、嫩叶、老叶、韧皮部及木质部, 其中韧皮部与木质部取自鸡血藤老茎, 见图 1。具体采样流程为: 将 5 株植株的同类型组织分别混合后, 随机均分为 3 组, 每组作为 1 个生物学重复, 确保每个植物组织样本均有 3 次生物学重复。样本采集后立即经液氮速冻处理, 随后转移至 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于后续转录组与代谢组学分析。



图 1 鸡血藤 5 个不同组织

Fig. 1 Five different tissues of *S. suberectus*

### 1.2 仪器与试剂

QTRAP 6500+型 LC-MS/MS 仪器 (Sciex 公司); AS 60/220.R2 型电子分析天平 (RADWAG 公司); 5424R 型离心机 (Eppendorf 公司); MM400 型球磨仪 (Retsch 公司); MIX-200 型多管涡旋振荡器 (上海净信实业发展有限公司); KQ5200E 型

数控超声清洗器 (昆山舒美超声仪器有限公司); RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司); 全自动医用 PCR 分析系统 (西安天隆科技有限公司); ToloScript RT EasyMix for qPCR 逆转录试剂盒; 2 × Q3 SYBR qPCR Master Mix (Universal) 定量 PCR 试剂盒。对照品儿茶素 (批号 HY-N0898A)、表儿茶素 (批号 HY-N0001) 均购自 MCE 公司, 质量分数均 ≥ 98%; 甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯。

## 2 方法

### 2.1 儿茶素、表儿茶素的测定

**2.1.1 供试品溶液制备** 将鸡血藤样品真空冷冻干燥, 利用球磨仪研磨 (30 Hz, 1.5 min) 至粉末状, 称取 20 mg 的粉末, 加入 10 μL 浓度为 4 000 nmol/L 的混合工作液和 500 μL 70% 的甲醇溶液, 超声 30 min, 4 °C 条件下离心 (转速 12 000 r/min, 5 min), 吸取上清液, 用 0.22 μm 滤膜滤过样品, 并保存于进样瓶中, 用于 UPLC-MS/MS 分析。

**2.1.2 对照品溶液制备** 精密称定表儿茶素和儿茶素对照品, 用 70% 甲醇溶液溶解, 分别配制成浓度为 12.03、10.18 mmol/L 的混合对照品溶液。所得溶液经 0.22 μm 孔径滤膜滤过后, 置于 4 °C 条件下保存备用。

**2.1.3 色谱条件** 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A 相为超纯水 (含 0.05% 甲酸), B 相为乙腈 (含 0.05% 甲酸); 体积流量 0.35 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL; 洗脱梯度: 0~1 min, 90%~80% A; 1~9 min, 80%~30% A; 9~12.5 min, 30%~5% A; 12.5~13.5 min, 5% A; 13.5~13.6 min, 5%~90% A; 13.6~15 min, 90% A。

**2.1.4 线性关系考察** 配制 0.5、1、5、10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 nmol/L 不同浓度的对照品溶液, 获取儿茶素、表儿茶素各个浓度对照品的对应定量信号的色谱峰强度数据; 以外标与内标浓度比或外标浓度为横坐标 (X), 外标与内标峰面积比或外标峰面积为纵坐标 (Y), 绘制儿茶素、表儿茶素的标准曲线, 线性方程见表 1。

表 1 线性方程

Table 1 Linear equations

成分	回归方程	<i>r</i>	定量下限/(nmol·L <sup>-1</sup> )	定量上限/(nmol·L <sup>-1</sup> )
儿茶素	$Y=836.330\ 03\ X+1\ 192.358\ 01$	0.999 9	20	2 000
表儿茶素	$Y=1\ 367.945\ 24\ X+1\ 964.285\ 20$	0.999 8	10	2 000

**2.1.5 方法学考察** 精密性、稳定性、重复性、加样回收率试验参考赵梦利等<sup>[8]</sup>方法, 结果均符合实验要求。

**2.2 总 RNA 提取、cDNA 文库构建及转录组测序**

取新鲜鸡血藤各组织样本约 0.5 g, 置于预冷研钵中充分研磨。采用乙醇沉淀法结合 CTAB-PBIOZOL 试剂进行总 RNA 提取, 经提取纯化后, 将 RNA 沉淀溶解于 50  $\mu$ L DEPC 处理水中。使用 Qubit 荧光定量仪与 Qsep400 高通量生物片段分析仪, 分别对 RNA 浓度、纯度及完整性进行严格质控。cDNA 文库构建完成后, 采用 phi29DNA 聚合酶对文库进行扩增, 将单分子 DNA 转化为包含 300 余个拷贝的 DNA 纳米球 (DNB)。将制备好的 DNB 加载至测序芯片, 于武汉迈维测序平台开展高通量测序, 确保数据的准确性与完整性。

**2.3 转录组测序文库质量评估与参考基因组比对**

基于 Qin 等<sup>[28]</sup>鸡血藤测序的基因组作为参考基因组, 利用 HISAT2<sup>[29]</sup>将 clean reads 与参考基因组进行序列比对。

**2.4 WGCNA**

首先对基因 FPKM $\leq$ 1 表达量文件进行过滤, 使用 R 语言 genefilter 包的 varFilter 函数去除在所有样品中低表达量的基因以及所有样品中表达量稳定不变的基因, 提高网络构建的精度, 过滤后的基因与 WGCNA 构建共表达网络并划分基因模

块。使用 R 软件 WGCNA 包进行加权基因共表达网络分析, 模块与性状相关性的 P 值是通过模块特征基因 (module eigengene) 与表型数据之间运用皮尔逊相关性计算方法进行统计检验, 统计检验使用的是 R 语言的 WGCNA 包中的 cor 函数。具体参数如下: 软阈值设置为 20, 模块最小基因数量为 50, 合并相似性模块高度设置为 0.25。采用动态剪切算法进行基因模块划分, 将具有相同表达模式的基因分类为 1 个模块。通过与儿茶素、表儿茶素相关性分析寻找关键基因模块。对转录组数据的注释信息进行比对分析, 重点筛选关键功能模块中的差异表达基因, 并基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库开展通路富集分析。

**2.5 qRT-PCR 验证**

为了验证黄酮类化合物生物合成关键基因的 qRT-PCR 的验证, 选取转录组差异基因进行 qRT-PCR 分析, 以验证转录组数据可靠性。qRT-PCR 引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司合成 (表 2)。采用 ToloScript RT EasyMix for qPCR 试剂盒, 从鸡血藤嫩茎、嫩叶、老叶、木质部、韧皮部的每个样品中提取 RNA 反转录成 cDNA, 采用荧光 PCR 仪进行 PCR 扩增。以 18S 为内参基因, 每个样品 3 个生物学重复, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算关键候选基因的相对表达量。

表 2 qRT-PCR 验证引物信息  
Table 2 Primer information for qRT-PCR validation

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')
<i>SsC4H</i>	Ss_CM014737.1_029200-F	AGCCAGATACCCACAAGC
	Ss_CM014737.1_029200-R	GTCATAGCCCCCAAGTTT
<i>Ss4CL</i>	Ss_CM014729.1_043250-F	GCTGATTGGGGGGTTTAA
	Ss_CM014729.1_043250-R	AAGAGCGGAAGCGTGAAC
<i>SsCHS</i>	Ss_CM014732.1_026990-F	GGTGACCGTGGAGGAAAT
	Ss_CM014732.1_026990-R	GGCTTGGATGACGCAGTT
<i>SsCHI</i>	Ss_CM014729.1_048260-F	GATGCTCTCATTCTGCTCC
	Ss_CM014729.1_048260-R	TGCCAACCTATCCCTCAC
<i>SsF3'HI</i>	Ss_CM014729.1_037890-F	CAACCCCTCTTTCTCTGC
	Ss_CM014729.1_037890-R	CCCAATAGGAACCTCTCG
<i>SsDFR1</i>	Ss_CM014733.1_002140-F	ACCCCGATGGACTTTGAT
	Ss_CM014733.1_002140-R	CATTGGCTTTTGGTGCTC
<i>SsLAR</i>	Ss_CM014735.1_019010-F	TTGGGCACGATGTGGACC
	Ss_CM014735.1_019010-R	TCAACCGCACGCCTAACC
<i>SsANR</i>	Ss_CM014732.1_001840-F	AGAGCAGGAACGGTGAAG
	Ss_CM014732.1_001840-R	TAACAGGGGTCCAGCAAG

**3 结果与分析**

**3.1 鸡血藤中不同组织儿茶素和表儿茶素含量测定**

本研究运用 UPLC-MS/MS 技术, 对鸡血藤嫩

茎、嫩叶、老叶、木质部及韧皮部中的儿茶素和表儿茶素含量进行精准定量分析, 并以这 2 种成分的含量总和来表征原花青素的总体水平。对鸡血藤不

同组织中儿茶素和表儿茶素成分含量分析,见表 3。结果表明,儿茶素和表儿茶素在各组织中的分布规律存在一定差异。具体来看,鸡血藤叶片中的儿茶素和表儿茶素含量均显著低于茎部,且在叶片中的含量极低。从各组织中儿茶素的积累水平来看,由

表 3 鸡血藤不同组织中儿茶素和表儿茶素成分含量分析

**Table 3 Analysis of catechin and epicatechin contents in different tissues of *S. suberectus***

部位	质量分数/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	
	儿茶素	表儿茶素
嫩茎	24.16	32.11
嫩叶	0.25	0.00
老叶	0.49	2.57
木质部	52.33	19.34
韧皮部	25.17	33.65

高到低依次为木质部>韧皮部≈嫩茎>老叶≈嫩叶;而各组织中表儿茶素的积累水平由高到低则依次为韧皮部≈嫩茎>木质部>老叶>嫩叶。

### 3.2 转录组测序与质量分析

本研究基于 Illumina 测序平台开展转录组测序,共获得 131.91G 的 clean read。测序数据显示,所有样本的 GC 含量分布于 43.77%~45.70%, $Q_{20}$  值( $\geq 98.57\%$ )与  $Q_{30}$  值( $\geq 95.42\%$ )均处于较高水平,表明测序质控结果良好, clean reads 质量符合分析要求。此外,各样本与参考基因组的总体比对率超过 94%,外显子区域比对率达 86%以上,显示样本与参考基因组的匹配度较高,数据结果具备可靠的生物学分析基础(表 4)。

表 4 鸡血藤转录组数据统计和质量评估

**Table 4 Transcriptome data statistics and quality assessment of *S. suberectus***

样品	clean reads	$Q_{20}/\%$	$Q_{30}/\%$	reads mapped (占比/%)	Unique mapped (占比/%)
嫩茎1	45386228	98.73	95.94	42 813 311 (94.33)	40 781 597 (89.85)
嫩茎2	58805442	98.61	95.54	55 707 507 (94.73)	53 235 812 (90.53)
嫩茎3	59895936	98.67	95.73	56 646 206 (94.57)	54 139 064 (90.39)
嫩叶1	59339144	98.63	95.59	57 232 870 (96.45)	52 962 834 (89.25)
嫩叶2	61397938	98.62	95.57	59 202 372 (96.42)	54 563 727 (88.87)
嫩叶3	60227434	98.67	95.73	58 123 473 (96.51)	54 275 197 (90.12)
老叶1	74050512	98.66	95.66	70 697 557 (95.47)	67 643 287 (91.35)
老叶2	77730248	98.72	95.86	74 259 911 (95.54)	70 820 598 (91.11)
老叶3	59424502	98.70	95.79	56 701 258 (95.42)	54 414 455 (91.57)
木质部1	55319352	99.36	97.04	53 537 528 (96.78)	50 232 793 (90.81)
木质部2	62051428	99.34	96.94	60 062 479 (96.79)	56 107 518 (90.42)
木质部3	55210784	99.36	97.06	53 436 002 (96.79)	50 408 751 (91.30)
韧皮部1	50507052	99.36	97.03	48 851 193 (96.72)	46 190 265 (91.45)
韧皮部2	42808724	99.36	97.07	41 418 941 (96.75)	39 276 229 (91.75)
韧皮部3	57243196	99.38	97.14	55 404 448 (96.79)	52 564 359 (91.83)

$Q_{20}$ 、 $Q_{30}$  分别表示不低于 20、30 的碱基数占总碱基数的百分比; reads mapped-比对到参考基因组 reads 数; Unique mapped-唯一比对上参考基因组的 reads 数。

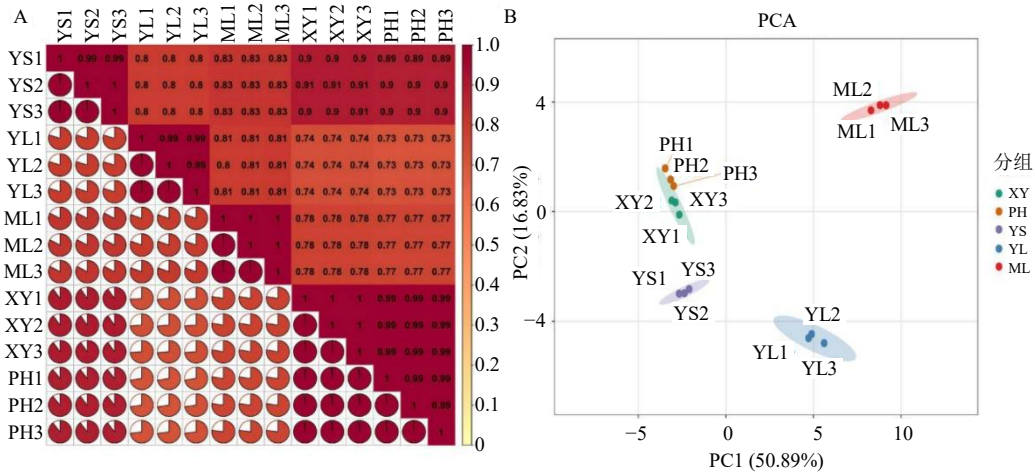
$Q_{20}$  and  $Q_{30}$  represent the percentage of the number of bases with not less than 20 and 30 in the total number of bases, respectively. Reads mapped : the number of reads aligned to the reference genome ; Uniq mapped : The number of reads uniquely aligned to the reference genome.

本研究通过主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和皮尔逊相关性分析,对不同样本间的基因表达模式进行了系统性评估(图 2)。皮尔逊相关性分析结果显示(图 2-A),3 个生物学重复间呈显著正相关,且各组间基因表达差异较小。PCA 结果(图 2-B)表明,各部位组内重复性良好,不同部位样本可清晰区分,15 个转录本被有效划分为 5 个组别。其中,第 1 主成分(PC1)和第 2 主成分(PC2)的贡献率分别为 50.59%和 16.83%,累积贡献率达 67.42%,能够有效反映样本间的表达差异。此外,每个样本的 3 个生物学重复间均表现出显著相关性,且组内相关

性显著高于组间相关性,与皮尔逊相关性分析结果高度一致,进一步验证了样本分组的合理性及组内重复性的可靠性。

### 3.3 WGCNA 模块构建

为探究转录组数据中的基因表达特征,挖掘与儿茶素和表儿茶素合成相关的基因模块及共表达基因,本研究对表达矩阵中变异度较低(标准偏差 $\leq 0.50$ )的基因进行筛选后,选取 18 828 个基因开展 WGCNA 分析。以所有基因间的相异系数为基础构建分层聚类树,采用动态剪切算法进行基因模块划分,并通过计算模块特征向量对模块划分进



YS-嫩茎; YL-嫩叶; ML-老叶; XY-木质部; PH-韧皮部。

YS-young stems; YL-young leaves ; ML-mature leaves; XY-xylem; PH-phloem.

图 2 相关性分析 (A) 与 PCA 分析 (B)

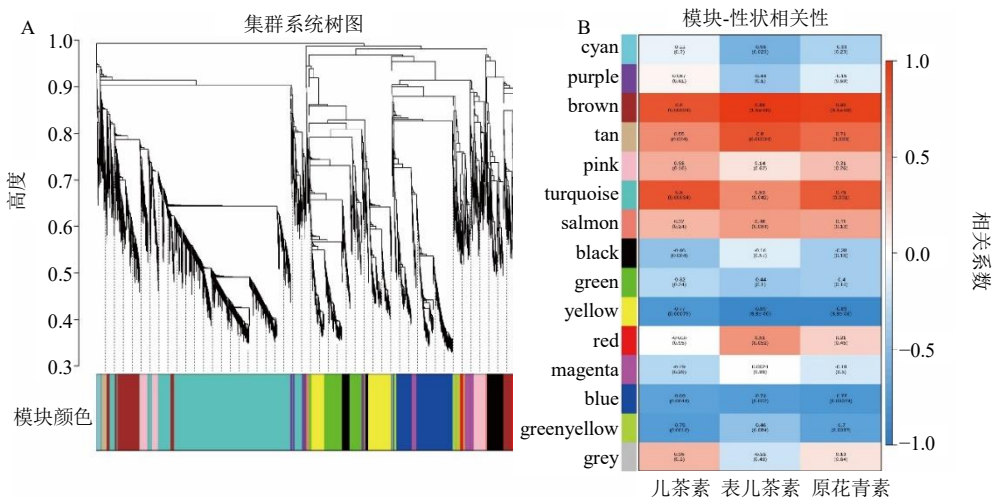
Fig. 2 Correlation analysis (A) and principal component analysis (B)

行优化合并, 最终获得 15 个基因共表达模块, 各模块由聚类分支及特征颜色标识 (图 3-A), 用不同的颜色代表基因模块, 同一分支表示相关性较高, 各模块中基因数目从 19 个到 6276 个不等, turquoise 模块最多, tan 模块最少, 平均每个模块 1255 个基因。为进一步筛选鸡血藤原花青素合成的关键基因, 将不同组织中儿茶素和表儿茶素含量与 15 个基因模块进行相关性分析 (图 3-B)。研究将相关性系数高于 0.80 ( $P < 0.01$ ) 的模块定义为原花青素合成相关关键模块, 最终鉴定到 3 个关键模块。其中, 模块 turquoise、brown 与儿茶素的相关系数均为 0.80 ( $P < 0.01$ ), 模

块 tan 和 brown 与表儿茶素的相关系数分别为 0.80 ( $P < 0.01$ ) 和 0.96 ( $P < 0.01$ ), turquoise、brown 和 tan 3 个关键模块中, 分别包含 7 个、4 个和 1 个结构基因 (表 5)。上述结果表明, 模块 turquoise、tan 和 brown 与原花青素合成过程密切相关, 其内部可能蕴含鸡血藤原花青素合成的关键基因。

### 3.4 关键基因模块 KEGG 富集分析

为探究关键模块的具体功能, 本研究对各关键模块内的基因进行功能富集分析, 针对 3 个模块中富集程度最高的前 20 条通路开展 KEGG 通路富集分析 (图 4)。结果显示, 3 个模块中共有 2285 差



A-样本层次聚类树; B-基因模块与儿茶素、表儿茶素及原花青素关联热图。

A-sample hierarchical clustering tree; B-gene module associated with catechin, epicatechin and proanthocyanidin heat map.

图 3 鸡血藤样本层次聚类分析与基因模块-原花青素关联热图分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of *S. suberectus* samples and heatmap analysis of gene module-proanthocyanidin associations

表 5 模块 turquoise、brown、tan 与原花青素合成相关的关键基因

Table 5 Key genes associated with proanthocyanidin biosynthesis in turquoise, brown, and tan modules

模块	基因	基因ID	基因	基因ID
turquoise	<i>SsC4H</i>	Ss_CM014737.1_029200	<i>SsCHI</i>	Ss_CM014729.1_048260
	<i>SsF3'H1</i>	Ss_CM014729.1_037890	<i>SsF3'H2</i>	Ss_CM014729.1_037910
	<i>SsCHS</i>	Ss_CM014732.1_026990	<i>SsDFR2</i>	Ss_CM014733.1_002210
	<i>SsLAR</i>	Ss_CM014735.1_019010		
brown	<i>Ss4CL</i>	Ss_CM014729.1_043250	<i>SsDFR1</i>	Ss_CM014733.1_002140
	<i>SsDFR3</i>	Ss_CM014729.1_065740	<i>SsANR</i>	Ss_CM014732.1_001840
tan	<i>SsCHR</i>	Ss_CM014733.1_026170		

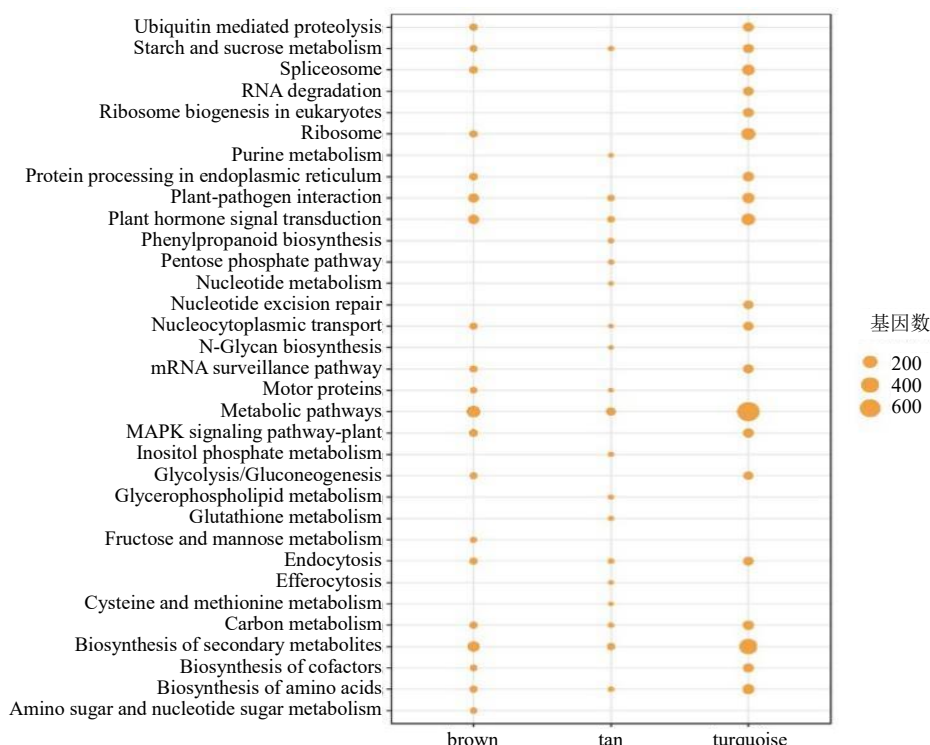


图 4 brown、tan 和 turquoise 模块 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of brown, tan, and turquoise modules

异基因被注释各个通路中，其中 turquoise 模块中被注释到的差异基因数最多，有 2 222 条，其次是 brown 模块有 556 条差异基因被注释，tan 模块被注释到的差异基因最少，只有 107 条差异基因被注释到各个通路中。3 个模块中富集基因数最多的通路均为代谢途径 (metabolic pathways) 和次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)。此外，苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) 和氨基酸合成 (biosynthesis of amino acids) 在 3 个模块中均呈现显著富集特征。该结果表明，这 3 个模块可能在苯丙烷类化合物生物合成及氨基酸代谢过程中发挥重要调控作用，为深入解

析其在苯丙烷类物质合成中的功能机制提供了关键线索。

### 3.5 关键模块中原花青素合成核心基因筛选与调控网络构建

基于 R2R3-MYB 转录因子在原花青素合成中的核心调控作用，研究从模块中筛选出 MYB 家族转录因子：turquoise 模块包含 34 个 MYB 转录因子，brown 模块包含 5 个，tan 模块包含 1 个。通过序列比对和系统发育树分析进一步筛选，在 turquoise 和 brown 模块中分别获得 6 个和 2 个 R2R3-MYB 候选转录因子，这些候选因子与已报道的原花青素调控 R2R3-MYB 转录因子具有高度序

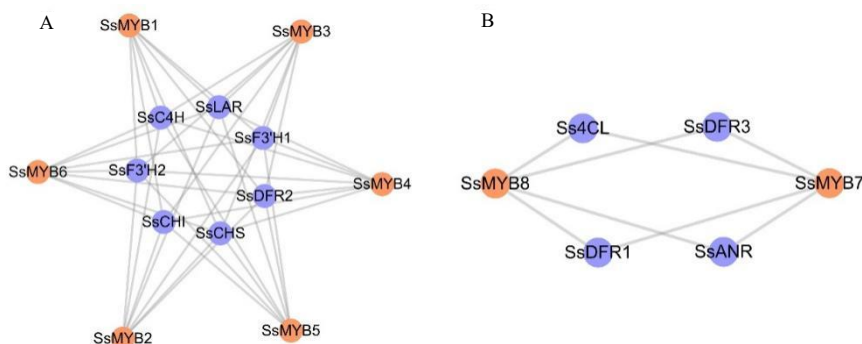
列同源性(表 6)。利用 Cytoscape3.10.3 软件分别对 2 个模块结构基因和 R2R3-MYB 转录因子的互作绘制网络图(图 5)。结果显示,在 turquoise 模块中,6 个 R2R3-MYB 转录因子与 7 个原花青素合成

的关键结构基因(*SsC4H*、*SsCHI*、*SsF3'H1*、*SsF3'H2*、*SsDFR2*、*SsLAR*、*SsCHS*)都密切相关; brown 模块中,2 个 R2R3-MYB 转录因子与 4 个结构基因(*Ss4CL*、*SsDFR1*、*SsDFR3*、*SsANR*)都密切相关。

表 6 模块 turquoise、brown 的候选转录因子

Table 6 Candidate transcription factors in turquoise and brown modules

模块	基因	基因	同源转录因子
turquoise	<i>SsMYB1</i>	Ss_CM014729.1_019780	葡萄 <i>VvMYBPA1</i> <sup>[30]</sup> ; 海棠 <i>McMYB12a/b</i> <sup>[31]</sup>
	<i>SsMYB2</i>	Ss_CM014732.1_002670	葡萄 <i>VvMYB14</i> <sup>[32]</sup> ; 苹果 <i>MdMYB23</i> <sup>[33]</sup>
	<i>SsMYB3</i>	Ss_CM014733.1_028460	拟南芥 <i>AtTT2</i> <sup>[34]</sup> ; 葡萄 <i>VvMYBPA2</i> <sup>[35]</sup>
	<i>SsMYB4</i>	Ss_CM014734.1_007830	小苍兰 <i>FhMYB5</i> <sup>[36]</sup> ; 葡萄 <i>VvMYBPA2</i> <sup>[35]</sup>
	<i>SsMYB5</i>	Ss_CM014734.1_048410	拟南芥 <i>AtTT2</i> <sup>[34]</sup> ; 桃 <i>PpMYB7</i> <sup>[37]</sup>
	<i>SsMYB6</i>	Ss_QUWT01000781.1_003370	枇杷 <i>EjMYB5</i> <sup>[38]</sup>
brown	<i>SsMYB7</i>	Ss_CM014729.1_014670	桃 <i>PpMYB7</i> <sup>[37]</sup>
	<i>SsMYB8</i>	Ss_CM014731.1_051640	枇杷 <i>EjMYB5</i> <sup>[38]</sup>



A-模块 turquoise 转录因子与结构基因互作网络图; B-模块 brown 转录因子与结构基因互作网络图。

A-module turquoise transcription factor and structural gene interaction network diagram; B-module brown transcription factor and structural gene interaction network diagram.

图 5 2 个关键模块的 R2R3-MYB 转录因子与核心基因互作网络图

Fig. 5 Interaction network of R2R3-MYB transcription factors and core genes in two key modules

该结果不仅验证了 R2R3-MYB 转录因子在原花青素合成通路中的核心调控地位,还揭示了不同模块中转录因子与结构基因的特异性调控模式,为解析鸡血藤原花青素的组织特异性合成机制提供了重要理论依据。

### 3.6 qRT-PCR 验证

选取原花青素生物合成途径中在鸡血藤不同组织存在显著差异且也是关键基因的 8 个基因 *SsC4H*、*Ss4CL*、*SsCHS*、*SsCHI*、*SsF3'H1*、*SsDFR1*、*SsLAR* 和 *SsANR* 进行 qRT-PCR,分析它们的表达水平。如图 6 所示,这 8 个基因在不同组织部位的表达水平与转录组数据中 FPKM 值的表达模式趋势保持一致,研究结果进一步验证了转录组分析结果的准确性,表明本研究的分析结果可靠性高。

## 4 讨论

鸡血藤是中医临床中用于补血活血的经典中药,其药用价值已得到广泛认可。基于化学成分特有性、药性特征、药效关联性、入血成分特性及可测性等多维标准,对鸡血藤的潜在质量标志物(quality marker, Q-Marker)进行预测分析,结果显示原儿茶酸、儿茶素、表儿茶素、芒柄花素、染料木素、大豆苷、芒柄花苷等成分具有潜在 Q-Marker 属性<sup>[6]</sup>。功效物质在不同组织中的差异化积累直接决定了各部位的药用价值,本研究发现:老茎木质部的儿茶素含量显著高于韧皮部,而韧皮部的表儿茶素含量则高于木质部。值得注意的是,李小莹等<sup>[39]</sup>研究显示木质部中儿茶素和表儿茶素含量均高于韧皮部。这一显著差异提示,除组织部位外,样本的



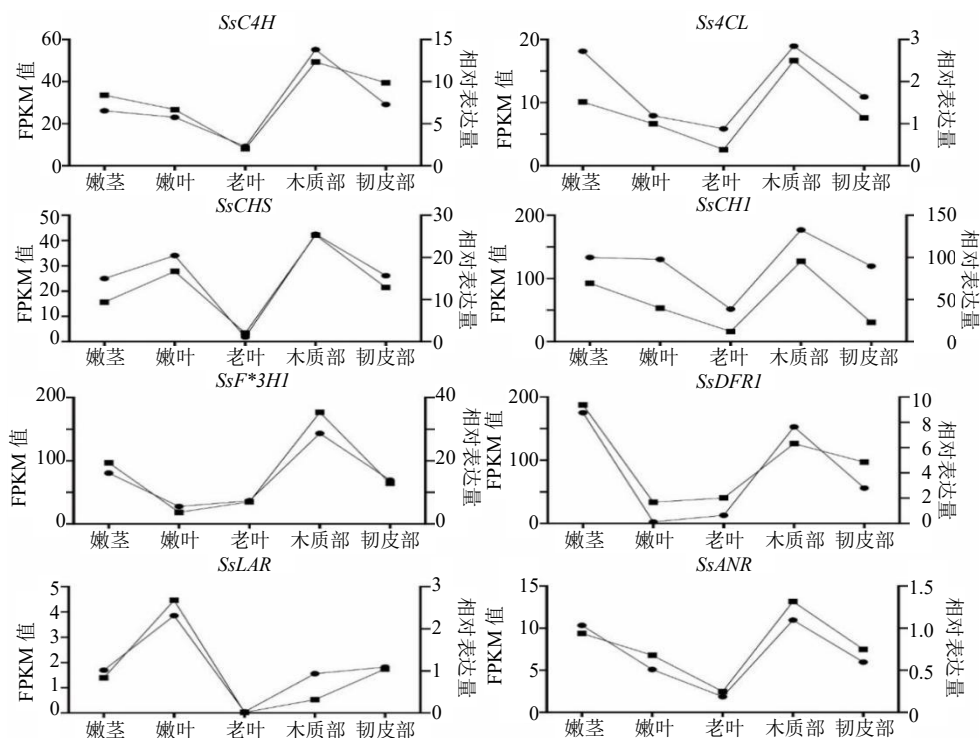


图 6 鸡血藤原花青素生物合成途径基因 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR validation of genes involved in proanthocyanidin biosynthetic pathway in *S. suberectus*

生长年限、产地环境（如光照、温度、降水、土壤特性、海拔等）可能是调控鸡血藤活性成分（尤其是原花青素类）积累与分布的关键变量。尽管存在上述局部含量差异，总原花青素在组织间的分布趋势仍表现出一定的一致性。该研究结果为鸡血藤药用部位的合理开发及质量评价体系的构建提供了重要科学依据，同时也凸显了环境因素在药材品质形成中的不可忽视的作用。该差异可能与样本生长年限和产地环境不同有关，但总原花青素的分布趋势仍具有一致性。该研究结果为鸡血藤药用部位的合理开发及质量评价体系的构建提供了重要科学依据。

WGCNA 通过构建基因关联网络并划分功能模块，能够有效识别与特定表型特征密切相关的候选基因。该方法基于基因表达模式的相似性将转录组数据划分为若干共表达模块，进而筛选出与目标性状显著相关的关键模块，已被广泛应用于组学数据的挖掘与研究。本研究运用 WGCNA 技术，在鸡血藤中成功鉴定出 11 个与原花青素生物合成途径密切相关的关键基因，具体包括 3 个 *SsDFR*、2 个 *SsF3'H*、*SsC4H*、*Ss4CL*、*SsCHS*、*SsCHI*、*SsLAR*、*SsANR* 基因。已有大量研究表明，这些基因在原花青素生物合成过程中发挥着至关重要的作用。在茶

树 *Camellia sinensis* L. 中，*C4H* 与 *PAL* 的高表达可推动苯丙烷代谢流向原花青素合成途径，进而促进儿茶素的积累<sup>[40]</sup>。此外，研究表明 *DFR*、*ANS*、*ANR*、*LAR* 等的表达水平与枣树、葡萄和苹果等果实中的原花青素含量密切相关<sup>[41-43]</sup>。因此推测，上述基因在鸡血藤中的差异表达可能是导致儿茶素和表儿茶素在不同组织中出现差异积累现象的重要原因，进而影响了鸡血藤中这 2 种化合物的形成和分布。

此外，在 *turquoise* 和 *brown* 模块中，分别筛选出 6 个和 2 个关键的候选转录因子。其中，*SsMYB1* 与海棠转录因子 *McMYB12a/b* 高度同源，而 *SsMYB3* 则与拟南芥 *AtTT2* 和葡萄 *VvMYBPA2* 转录因子高度同源。已有研究表明，在海棠中，*McMYB12a* 和 *McMYB12b* 协同调控原花青素和花青素的生物合成<sup>[31]</sup>。葡萄 *VvMYBPA2* 能显著激活原花青素途径中的关键酶基因（*LAR*、*ANR*），其中 *LAR* 和 *ANR* 分别参与儿茶素和表儿茶素生物合成的特定末端步骤<sup>[35]</sup>。拟南芥 *AtTT2* 能直接结合并激活原花青素合成途径中多个结构基因的启动子，包括 *ANR*、*DFR*、*ANS*<sup>[34]</sup>。以上结果表明，本研究鉴定出的这些转录因子与原花青素合成核心基因之间存在着紧密的联系。这暗示着 11 个核心基因与 *SsMYB1* 和 *SsMYB3* 转录因子共同构成了鸡血

藤原花青素生物合成的核心调控网络。其特定的表达模式与协同作用机制，可能是决定鸡血藤中特征性原花青素（如儿茶素、表儿茶素）组织特异性积累的关键分子基础，为进一步揭示鸡血藤原花青素合成的转录调控机制提供了重要理论依据。

本研究发现的鸡血藤原花青素合成核心调控网络（关键结构基因与转录因子）为深入理解环境因子影响活性成分积累提供了关键的分子切入点。大量研究表明，在植物次生代谢中，环境信号（如光强与光质、温度胁迫、水分状况、矿质营养等）常通过调控关键转录因子（如 MYB 家族）的表达与活性，进而影响下游结构基因的表达和代谢物合成<sup>[44-46]</sup>。结合本研究中观察到的与文献<sup>[39]</sup>报道的成分积累差异（可能源于环境条件不同），以及鉴定出的核心调控网络（SsMYB1、SsMYB3、SsLAR、SsANR 等），据合理推测：不同的环境条件（如特定产地的气候、土壤、海拔或种植管理措施）很可能通过调控该核心网络中 SsMYB1/SsMYB3 等转录因子的表达水平或转录活性，进而精细调控下游 SsLAR、SsANR 等基因的表达，最终导致鸡血藤不同组织（如木质部与韧皮部）乃至不同产地来源药材中原花青素类（如儿茶素、表儿茶素）含量与比例的显著差异。因此，系统研究关键环境因子如何影响该核心调控网络的动态变化及其与最终活性成分积累的定量关系，是未来提升鸡血藤药材品质可控性与资源利用效率的核心方向之一。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 清·赵学敏著. 闫冰等校注. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 230.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 202.
- [3] Yoon J S, Sung S H, Park J H, *et al.* Flavonoids from *Spatholobus suberectus* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(6): 589-592.
- [4] Huang Y W, Chen L, Feng L, *et al.* Characterization of total phenolic constituents from the stems of *Spatholobus suberectus* using LC-DAD-MS(n) and their inhibitory effect on human neutrophil elastase activity [J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 7549-7556.
- [5] 符影, 程悦, 陈建萍, 等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(6): 1229-1234.
- [6] 崔艳君, 刘屏, 陈若芸. 鸡血藤有效成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(2): 121-123.
- [7] 廖佳伟, 金晨, 陈志, 等. 鸡血藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6866-6877.
- [8] 赵梦利, 刘妍如, 宋忠兴, 等. 基于成分-抗氧化活性相关的鸡血藤饮片等级评价研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 943-949.
- [9] 林飞, 黄丹, 陈婷婷, 等. 基于网络药理学的黄芪-鸡血藤配伍治疗白细胞减少症作用机制研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(6): 882-887.
- [10] Kwon K R, Alam M B, Park J H, *et al.* Attenuation of UVB-induced photo-aging by polyphenolic-rich *Spatholobus suberectus* stem extract via modulation of MAPK/AP-1/MMPs signaling in human keratinocytes [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1341.
- [11] 李小莹. 基于谱效结合对鸡血藤不同部位药效成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [12] Zhang Y, Chen S G, Wei C Y, *et al.* Dietary compound proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves attenuate chemotherapy-resistant ovarian cancer stem cell traits via targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and inducing G<sub>1</sub> cell cycle arrest [J]. *Food Funct*, 2018, 9(1): 525-533.
- [13] Sunil L, Shetty N P. Biosynthesis and regulation of anthocyanin pathway genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, 106(5/6): 1783-1798.
- [14] Liu H M, Liu Z J, Wu Y, *et al.* Regulatory mechanisms of anthocyanin biosynthesis in apple and pear [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8441.
- [15] Jonsson L M, Aarsman M E, Poulton J E, *et al.* Properties and genetic control of four methyltransferases involved in methylation of anthocyanins in flowers of *Petunia hybrida* [J]. *Planta*, 1984, 160(2): 174-179.
- [16] Xu R, Luo M, Xu J W, *et al.* Integrative analysis of metabolomic and transcriptomic data reveals the mechanism of color formation in corms of *Pinellia ternata* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7990.
- [17] Yan H L, Pei X N, Zhang H, *et al.* MYB-mediated regulation of anthocyanin biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3103.
- [18] Zhao P C, Li X X, Jia J T, *et al.* bHLH92 from sheepgrass acts as a negative regulator of anthocyanin/proanthocyanidin accumulation and influences seed dormancy [J]. *J Exp Bot*, 2019, 70(1): 269-284.
- [19] Albert S, Delseny M, Devic M. BANYULS, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat [J]. *Plant J*, 1997, 11(2): 289-299.
- [20] Bogs J, Downey M O, Harvey J S, *et al.* 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.
- [21] Zhao Q, Zhang Y, Wang G, *et al.* A specialized flavone biosynthetic pathway has evolved in the medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* [J]. *Sci Adv*, 2016, 2(4): e1501780.
- [22] Wang C C, Chen L H, Cai Z C, *et al.* Comparative proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying the accumulation difference of bioactive constituents in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch under salt stress [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(5): 1480-1493.
- [23] 黄琼林, 马新业, 詹若挺, 等. 基于 rbcL 条形码的鸡血藤真伪鉴别 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(6): 57-60.
- [24] 陈军, 孟爽爽, 李苗苗, 等. 不同树脂环纹数鸡血藤药材质量的分析和评价 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(3): 392-399.
- [25] 李小莹, 林裕英, 陈丰连. 鸡血藤木质部、韧皮部黄酮类成分比较及药效成分分布规律研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(5): 1137-1140.
- [26] 萧晓吉, 李苗苗, 詹若挺, 等. 密花豆野生及栽培资源调查与分析 [J]. *中药材*, 2022, 45(7): 1582-1588.
- [27] 刘军民, 安冉, 翟明, 等. 鸡血藤商品药材质量评析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(5): 573-575.
- [28] Qin S S, Wu L Q, Wei K H, *et al.* A draft genome for *Spatholobus suberectus* [J]. *Sci Data*, 2019, 6(1): 113.
- [29] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357-360.
- [30] Bogs J, Jaffé F W, Takos A M, *et al.* The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1347-1361.
- [31] Tian J, Zhang J, Han Z Y, *et al.* McMYB12 transcription factors co-regulate proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis in *Malus crabapple* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43715.
- [32] Zhang X Q, Ma W Y, Guan X Q, *et al.* VvMYB14 participates in melatonin-induced proanthocyanidin biosynthesis by upregulating expression of VvMYBPA1 and VvMYBPA2 in grape seeds [J]. *Hortic Res*, 2022, 10(2): uhac274.
- [33] An J P, Li R, Qu F J, *et al.* R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple [J]. *Plant J*, 2018, 96(3): 562-577.
- [34] Nesi N, Jond C, Debeaujon I, *et al.* The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(9): 2099-2114.
- [35] Terrier N, Torregrosa L, Ageorges A, *et al.* Ectopic expression of VvMybPA2 promotes proanthocyanidin biosynthesis in grapevine and suggests additional targets in the pathway [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149(2): 1028-1041.
- [36] Li Y Q, Shan X T, Zhou L D, *et al.* The R2R3-MYB factor FhMYB5 from *Freesia hybrida* contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 9: 1935.
- [37] Zhou H, Kui L W, Liao L, *et al.* Peach MYB7 activates transcription of the proanthocyanidin pathway gene encoding leucoanthocyanidin reductase, but not anthocyanidin reductase [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 908.
- [38] Zhang Y, Hu L Y, Wang S M, *et al.* Genome-wide identification of R2R3-MYB family in *Eriobotrya japonica* and functional analysis of EjMYB5 involved in proanthocyanidin biosynthesis [J]. *Plant Sci*, 2024, 347: 112198.
- [39] 李小莹, 周龙颖珍, 赖丽嫦, 等. 鸡血藤干、鲜品黄酮部位的高效液相指纹图谱比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(20): 72-75.
- [40] Singh K, Kumar S, Rani A, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea [J]. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9(1): 125-134.
- [41] Li X, Shi Q Q, Liu Y, *et al.* Comprehensive transcriptomic analysis revealed the mechanism of ZjLAR and ZjANR promoting proanthocyanidin biosynthesis in jujube fruit [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 288: 138291.
- [42] Trabelsi N, Petit P, Manigand C, *et al.* Structural evidence for the inhibition of grape dihydroflavonol 4-reductase by flavonols [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, D64(Pt 8): 883-891.
- [43] Liao L, Vimolmangkang S, Wei G C, *et al.* Molecular characterization of genes encoding leucoanthocyanidin reductase involved in proanthocyanidin biosynthesis in apple [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 243.
- [44] Dai X Y, Xu Y Y, Ma Q B, *et al.* Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, OsMYB3R-2, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [45] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, *et al.* MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.
- [46] Ma D W, Peter Constabel C. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2019, 24(3): 275-289.