

DOI:10.11686/cyxb2025115

http://cyxb.magtech.com.cn

陈丽娟, 高荣, 王建喜, 等. 紫花苜蓿与红豆草在不同生长时期缩合单宁合成差异的比较研究. 草业学报, 2026, 35(2): 221—236.

CHEN Li-juan, GAO Rong, WANG Jian-xi, et al. A comparative study of differences in condensed tannin synthesis between *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia* at different growth stages. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(2): 221—236.

## 紫花苜蓿与红豆草在不同生长时期缩合单宁合成差异的比较研究

陈丽娟, 高荣, 王建喜, 马晖玲\*

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**本研究以‘甘农3号’、‘甘农7号’、‘精英’紫花苜蓿及‘甘肃’红豆草为材料, 分析苗期至成熟期6个生长期茎、叶部位总酚、总黄酮、缩合单宁(CT)及次生代谢产物(芦丁、没食子酸、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、儿茶素)动态积累规律, 并测定苯丙烷代谢途径关键酶[苯丙氨酸解氨酶(PAL)、4-香豆酸-CoA连接酶(4CL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)]和类黄酮途径[花青素还原酶(ANR)、无色花色素还原酶(LAR)]活性, 以解析缩合单宁合成调控机制。结果表明:1)缩合单宁含量随生育期推进呈显著变化, ‘甘肃’红豆草现蕾期、紫花苜蓿结荚期为累积高峰期, 且叶部含量普遍高于茎部;2)总黄酮与芦丁含量变化趋势与缩合单宁相似;3)4CL、ANR、PAL、LAR和C4H活性在‘甘肃’红豆草现蕾期、紫花苜蓿结荚期显著升高, 表明苯丙烷代谢向缩合单宁合成方向增强。品种间比较显示, ‘甘农3号’紫花苜蓿缩合单宁含量在结荚期显著高于其他品种( $P<0.05$ ), 表示其具有更强单宁合成潜力。本研究明确了CT合成关键酶与代谢产物的动态关联, 为牧草CT代谢调控及高单宁品种选育提供理论依据。

**关键词:**紫花苜蓿; 红豆草; 缩合单宁; 酚酸

## A comparative study of differences in condensed tannin synthesis between *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia* at different growth stages

CHEN Li-juan, GAO Rong, WANG Jian-xi, MA Hui-ling\*

Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** In this study, we explored the differences in condensed tannin (CT) synthesis and accumulation between alfalfa (*Medicago sativa*) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Stems and leaves of the alfalfa cultivars ‘Gannong No. 3’, ‘Gannong No. 7’, and ‘Elite’, and the sainfoin ‘Gansu’ were sampled across six growth stages from seedling to maturity. The contents of total phenolics, total flavonoids, CTs, and secondary metabolites (rutin, gallic acid, epicatechin gallate, epicatechin, catechin) were determined. In addition, to decipher the regulatory mechanism of condensed tannin synthesis, we measured the activities of key enzymes in the phenylpropanoid metabolic pathway (phenylalanine ammonia-lyase, PAL; 4-coumarate-CoA ligase, 4CL; cinnamate 4-hydroxylase, C4H) and the flavonoid pathway (anthocyanidin reductase, ANR and leucoanthocyanidin reductase, LAR). The

收稿日期:2025-04-01;改回日期:2025-05-21

基金项目:农业生物育种国家科技重大专项(2022ZD0401102)和甘肃省高校研究生“创新之星”项目(No. 2025CXZX-838)资助。

作者简介:陈丽娟(2000—),女,甘肃张掖人,在读硕士。E-mail: clj5534@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: mahl@gsau. edu. cn

results show that: 1) The condensed tannin content varied significantly among growth stages, peaking at the bud stage in *O. viciifolia* ‘Gansu’ and the pod-setting stage in *M. sativa*, while the condensed tannin content was generally higher in leaves than in stems. 2) The trends in the contents of total flavonoids and rutin were analogous to those of condensed tannins. 3) The activities of 4CL, ANR, PAL, LAR, and C4H significantly increased at the bud stage of *O. viciifolia* ‘Gansu’ and the pod-setting stage of *M. sativa*, indicative of enhanced metabolic flow of the phenylpropanoid pathway towards condensed tannin synthesis. Among the alfalfa varieties, *M. sativa* ‘Gannong No. 3’ exhibited significantly higher condensed tannin content at the pod-setting stage ( $P < 0.05$ ), suggesting stronger tannin synthesis potential. The results of this study clarify the dynamic correlations between key CT synthesis enzymes and metabolites, providing a theoretical basis for metabolic regulation of CT in forage crops and for breeding high-tannin varieties.

**Key words:** *Medicago sativa*; *Onobrychis viciifolia*; condensed tannins; phenolic acids

缩合单宁(condensed tannins, CT)属于类黄酮物质,也被称为原花青素(phenolic acids, PA)<sup>[1]</sup>, CT的合成受苯丙烷代谢途径[苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、4-香豆酸-CoA连接酶(4-coumarate-CoA ligase, 4CL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)]<sup>[2]</sup>和类黄酮合成途径[花青素还原酶(anthocyanidin reductase, ANR)、无色花色素还原酶(leucoanthocyanidin reductase, LAR)]<sup>[3-4]</sup>关键酶的协同调控<sup>[3-4]</sup>, 其核心结构由儿茶素(catechin)和表儿茶素(epicatechin)单元构成<sup>[5]</sup>。缩合单宁广泛存在于植物界,是牧草中重要活性成分,通常存在于饲料豆科植物的叶、茎、花和种子中<sup>[6]</sup>。在豆科牧草中,CT可通过结合蛋白质形成难溶性复合物,减缓瘤胃微生物对蛋白质的快速降解,从而降低气体(如甲烷、CO<sub>2</sub>)瞬时过量产生,预防反刍动物臃胀病<sup>[7-9]</sup>。然而,CT在不同牧草中的含量差异显著,紫花苜蓿和红豆草是具有不同CT含量的优质牧草,其CT含量受生长期影响较大<sup>[10]</sup>。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)作为多年生豆科牧草,具有饲用价值好、营养丰富、适口性好、产量高且稳定等特点,被誉为“牧草之王”<sup>[11]</sup>。与禾本科植物和许多豆科植物相比,紫花苜蓿的初始蛋白质降解速度过快,苜蓿叶表皮细胞壁和叶肉细胞质地较薄,且叶部中几乎不含有CT,易导致反刍家畜大量采食后发生臃胀病<sup>[12-14]</sup>。

红豆草(*Onobrychis viciaefolia*)作为多年生豆科牧草,富含蛋白质、氨基酸、粗脂肪和矿物质,被誉为“牧草皇后”<sup>[15-17]</sup>。红豆草因富含缩合单宁而具有预防臃胀病的作用,是一种优良的豆科牧草<sup>[18]</sup>。

紫花苜蓿与红豆草同属豆科牧草,却在饲用价值形成机制上呈现显著分异——前者以高蛋白低单宁为特点,后者因富含CT可降低反刍动物胀气风险。目前关于紫花苜蓿、红豆草茎、叶组织中CT合成代谢的变化规律主要集中在不同发育阶段(如营养生长期、盛花期、成熟期)、不同部位含量动态研究、不同环境因子对CT合成的调控机制<sup>[17,19-21]</sup>,对不同生长期CT含量及前体物质(如儿茶素、表儿茶素)含量与相关酶活性的关联性仍不明确。本研究分析紫花苜蓿、红豆草茎、叶CT、前体物质、合成关键酶活性在不同发育期的含量变化,分析不同生育期茎、叶组织中CT及其前体物质积累规律以及关键限速酶活性动态变化,进一步分析代谢产物与酶活性的内在关联,以期对CT代谢调控机制及牧草品种改良提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试供材料

紫花苜蓿、红豆草草种均由甘肃创绿草业科技有限公司提供,品种包括:‘甘农3号’(Gannong No. 3);‘甘农7号’(Gannong No. 7);精英(Elite),‘甘肃’红豆草(*O. viciifolia* ‘Gansu’)。

甲醇、乙酸、乙腈:色谱纯。没食子酸、儿茶素、表儿茶素、芦丁、表儿茶素没食子酸酯、L-苯丙氨酸、肉桂酸、对香豆酸、矢车菊素、二氢槲皮素:纯度 $\geq 98\%$ ,购于北京索莱宝科技有限公司。

## 1.2 试验地概况

本研究于 2024 年在甘肃省张掖市高台县小海子村试验基地开展。试验区属温带大陆性干旱气候,年均温 8.0 °C,年降水量 250~350 mm。

## 1.3 试验设计

采用随机区组设计,设 3 次重复,小区面积 3 m×5 m (15 m<sup>2</sup>),株距 20~25 cm,行距 50 cm。田间管理按当地紫花苜蓿高产栽培模式进行,统一实施灌溉、除草及病虫害防治措施。

## 1.4 样品采集与处理

于紫花苜蓿 6 个关键生长期进行采样:苗期(2024-04-30)、分枝期(2024-05-17)、现蕾期(2024-06-06)、开花期(2024-06-20)、结荚期(2024-07-02)和成熟期(2024-07-30)。每小区随机选取 3 个样点,分别采集茎、叶组织样品各 50 g,迅速置于液氮中速冻,24 h 内转移至-80 °C 超低温冰箱保存,用于后续总酚、总黄酮、CT 含量、前体物质及代谢酶活性测定。

## 1.5 测定指标及方法

**1.5.1 前体物质含量测定** 1) 测定指标:芦丁(rutin)、没食子酸(gallic acid)、儿茶素(catechin)、表儿茶素(epicatechin)、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate)。

2) 样品处理:称取 0.2 g 样品于 10 mL 离心管,加入 2 mL 70% 的甲醇溶液,将样品混匀,50 °C 超声波提取 30 min 后,12000 r·min<sup>-1</sup> 室温条件下离心 10 min;将上清转移至新的 10 mL 离心管,其沉淀按上述步骤重新提取 2 次;将 3 次离心后的上清混匀后过 0.22 μm 滤膜备用<sup>[22-23]</sup>。

3) 仪器条件:色谱柱:Diamondsil C18 (250.0 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:40 °C;进样量:10 μL;检测波长:280 nm;流动相:A 为乙腈,B 为 0.5% 乙

酸<sup>[24-26]</sup>(表 1, 表 2)。

**1.5.2 总酚、总黄酮、缩合单宁含量测定** 总酚含量采用福林-酚比色法测定<sup>[27]</sup>。以没食子酸绘制标准曲线,得曲线方程为  $y=0.3267x+0.0016$ ,  $R^2=1$ 。

总黄酮含量:采用 NaNO<sub>2</sub>-AlCl<sub>3</sub> 比色法测定<sup>[28-29]</sup>。以芦丁绘制标准曲线,得曲线方程为  $y=0.2269x+0.0112$ ,  $R^2=0.9996$ 。

缩合单宁含量:采用香草醛-盐酸法测定<sup>[30]</sup>。以儿茶素绘制标准曲线,得曲线方程为  $y=0.2045x+0.0009$ ,  $R^2=0.9997$ 。

**1.5.3 酶活性测定** 4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)活性的测定:参照 Knobloch 等的方法<sup>[31]</sup>,略有改进。取 0.5 g 左右叶部研磨匀浆,转入离心管加提取液 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCL (pH 7.5) 2 mL, 4 °C 下 12000 r·min<sup>-1</sup> 离

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of the mobile phase

时间 Time (min)	流速 Flow rate (mL·min <sup>-1</sup> )	流动相 Mobile phase (A, %)	流动相 Mobile phase (B, %)
0.0	1.0	5	95
15.0	1.0	20	80
23.0	1.0	25	75
25.0	1.0	30	70
26.0	1.0	40	60
26.5	1.0	5	95
31.0	1.0	5	95

表 2 黄酮类化合物超高效液相色谱检测标准曲线

Table 2 Calibration curve analysis of flavonoid compounds by ultra performance liquid chromatography (UPLC)

化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Calibration curve equation	决定系数 Determination coefficient (R <sup>2</sup> )
芦丁 Rutin	20.911	$y=6072.9x+3.537$	1.0000
没食子酸 Gallic acid	7.043	$y=30842.0x-157055.000$	0.9999
表儿茶素没食子酸酯 Epicatechin gallate	21.957	$y=16244.0x-60958.000$	0.9994
表儿茶素 Epicatechin	16.745	$y=7278.5x-4627.600$	1.0000
儿茶素 Eatechin	13.979	$y=7794.4x-25134.000$	0.9993

心 20 min, 上清液为酶粗提取液用于测定 4CL 活性。反应系统由  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  对香豆酸,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP),  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  辅酶 A (coenzyme A, CoA),  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCL (pH 7.5) 缓冲液组成, 反应时加酶液 0.1 mL,  $30^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min, 333 nm 测定吸光值。设置空白对照, 除不加入酶液外, 其他反应体系成分和操作步骤与样品组相同, 下同。

花青素还原酶 (ANR) 活性的测定: 采用分光光度法测定<sup>[12, 32]</sup>, 略有改进。取 0.5 g 左右叶部研磨匀浆, 转入离心管加提取液  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 2 mL,  $4^\circ\text{C}$  下  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液为酶粗提取液用于测定 ANR 活性。反应体系包括  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  矢车菊素、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  辅酶 NADPH、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  抗坏血酸 (vitamin C, Vc) 和  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸缓冲液 (pH 7.0) 组成, 反应时加酶液 0.2 mL,  $25^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min, 在紫外可见分光光度计 340 nm 测定吸光值。

肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 活性的测定: 采用分光光度法测定<sup>[33-34]</sup>, 略有改进。酶液提取与 4CL 一致。反应体系包括  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  肉桂酸溶液、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  辅酶 NADPH、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCL (pH 7.5) 缓冲液组成, 反应时加酶液 0.1 mL,  $30^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min 后, 在 310 nm 处测定吸光值。

苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的测定: 采用苯丙氨酸比色法<sup>[35]</sup>。取 0.5 g 左右叶部研磨匀浆, 加入 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP), 转入离心管加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液 [pH 8.8, 含  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇和  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙二胺四乙酸二钠 (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA- $\text{Na}_2$ )],  $4^\circ\text{C}$  下  $12000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液为酶粗提取液用于测定 PAL 活性。反应系统由  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液 (pH 8.8),  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-苯丙氨酸溶液组成, 反应时加酶液 0.1 mL,  $37^\circ\text{C}$  水浴反应 30 min, 290 nm 测定吸光值。

无色花青素还原酶 (LAR) 活性的测定: 采用分光光度法测定<sup>[36]</sup>。称取 0.5 g 左右叶部研磨匀浆, 加入 0.5 g PVP, 转入离心管加  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸缓冲液 (pH 8.8), 混匀后, 静置 10 min,  $4^\circ\text{C}$ 、 $8500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 取上清, 即为粗酶液。反应体系包括  $0.82 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NADPH· $\text{Na}_4$ ,  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.7),  $0.024 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  二氢槲皮素, 在  $65^\circ\text{C}$  下反应 1 h; 再加入 8% HCl-甲醇, 6% 香草醛-甲醇, 在  $65^\circ\text{C}$  下反应 1 h (期间不断摇动试管); 反应结束后于 500 nm 处测定吸光值。

## 1.6 数据分析

用 Excel 和 SPSS(11.0) 软件进行数据处理, 采用 SPSS(11.0) 进行方差分析 (ANOVA), 检验各组间差异的显著性, 用 Origin 2024 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 超高效液相色谱 (UPLC) 测定缩合单宁合成前体物质

**2.1.1 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草芦丁含量** SE 时期, GSHD-L 芦丁含量最高 ( $13.760 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ), 此时期各品种芦丁含量叶部均高于茎部。BR 时期, 芦丁含量整体上升。BU 时期, GSHD-L 芦丁含量显著升高 ( $176.492 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ( $P < 0.05$ ), 此时期紫花苜蓿品种茎部芦丁含量高于叶部。FL 时期, 紫花苜蓿茎、叶部芦丁含量达到高峰, ‘甘肃’红豆草含量整体下降。PO 时期, 芦丁含量在不同品种间呈现分化趋势。GN3-L 的芦丁含量最高 ( $72.064 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 显著高于其他品种 ( $P < 0.05$ )。MT 时期, 紫花苜蓿叶部芦丁含量呈现回落趋势, 但茎部含量上升。‘甘肃’红豆草芦丁含量整体上升 (图 1)。

**2.1.2 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草没食子酸含量** SE 时期, 各品种的没食子酸含量较低, 其中 ALF-E-L 的没食子酸含量最高 ( $79.993 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 显著高于除 GN3-L 外的其他品种 ( $P < 0.05$ ), 此时期叶部没食子酸含量普遍高于茎部。BR 时期, 没食子酸含量整体呈上升趋势。BU 时期, 没食子酸含量继续上升, 总体趋势仍是叶部含量高于茎部。FL 时期, 含量大幅上升, 在多个品种中达到峰值。PO 时期, 不同品种的没食子酸含量出现分化趋势, 紫花苜蓿各品种茎部没食子酸含量均降低, 显著低于叶部 ( $P < 0.05$ ); ALF-E-L ( $103.503 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )、GN7-L ( $99.955 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 和 GN3-L ( $98.054 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 含量较高。MT 时期, 紫花苜蓿各品种没食子酸含量均下降, ‘甘肃’红豆草反而升高 (图 2)。

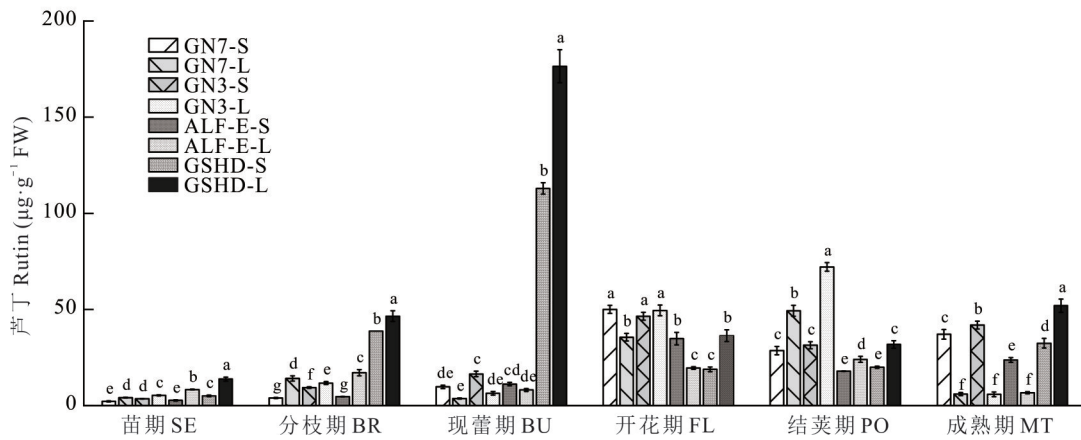


图 1 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草芦丁含量

Fig. 1 Rutin content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

SE: 苗期 Seedling; BR: 分枝期 Branching; BU: 现蕾期 Budding; FL: 开花期 Flowering; PO: 结荚期 Podding; MT: 成熟期 Maturity. GN3: ‘甘农 3 号’ Gannong No.3; GN7: ‘甘农 7 号’ Gannong No.7; ALF-E: 紫花苜蓿‘精英’ Alfalfa ‘Elite’; GSHD: ‘甘肃’红豆草 *O. viciifolia* ‘Gansu’. S: 茎 Stem; L: 叶 Leaf. GN7-S: ‘甘农 7 号’茎部位 Gannong No.7 stem; GN7-L: ‘甘农 7 号’叶部位 Gannong No.7 leaf; GN3-S: ‘甘农 3 号’茎部位 Gannong No.3 stem; GN3-L: ‘甘农 3 号’叶部位 Gannong No.3 leaf; ALF-E-S: 紫花苜蓿‘精英’茎部位 Alfalfa ‘Elite’ stem; ALF-E-L: 紫花苜蓿‘精英’叶部位 Alfalfa ‘Elite’ leaf; GSHD-S: ‘甘肃’红豆草茎部位 *O. viciifolia* ‘Gansu’ stem; GSHD-L: ‘甘肃’红豆草叶部位 *O. viciifolia* ‘Gansu’ leaf. 所有数据进行多重比较,不同小写字母表示不同品种不同部位同一时期差异显著 ( $P < 0.05$ );下同。Statistical analysis: All data were subjected to multiple comparison tests. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among cultivars and plant parts within the same growth stage. The same below.

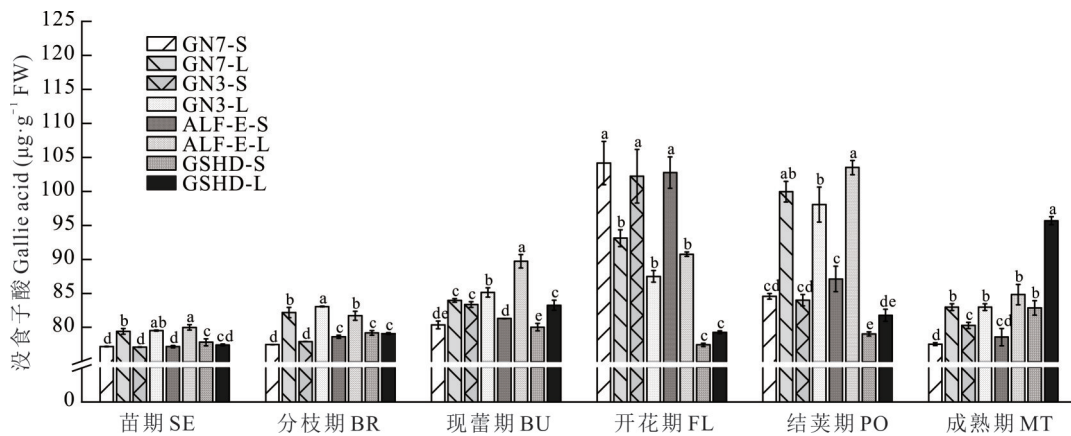


图 2 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草没食子酸含量

Fig. 2 Gallic acid content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

**2.1.3 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草表儿茶素没食子酸酯含量** SE时期,GSHD-L的表儿茶素没食子酸酯含量最高( $64.034 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于其他品种( $P < 0.05$ ),此时期叶部表儿茶素没食子酸酯含量普遍高于茎部。BR时期,表儿茶素没食子酸酯含量明显上升,部分品种大幅增加,GSHD-S的表儿茶素没食子酸酯含量最高( $306.830 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于所有其他品种( $P < 0.05$ )。BU时期,表儿茶素没食子酸酯含量整体呈下降趋势,但部分品种仍维持较高水平,其中GSHD-S的表儿茶素没食子酸酯含量依然最高( $255.308 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),但相比BR时期有所下降( $P < 0.05$ )。FL时期,表儿茶素没食子酸酯含量进一步下降。PO时期,表儿茶素没食子酸酯含量在不同品种间出现分化趋势,其中GSHD-S的含量最高( $94.692 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),且显著高于其他品种( $P < 0.05$ ),GN7-L( $80.743 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )和GN3-L( $78.179 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )的表儿茶素没食子酸酯含量仍然较高。MT时期,表儿茶素没食子酸酯含量整体呈下降趋势(图3)。

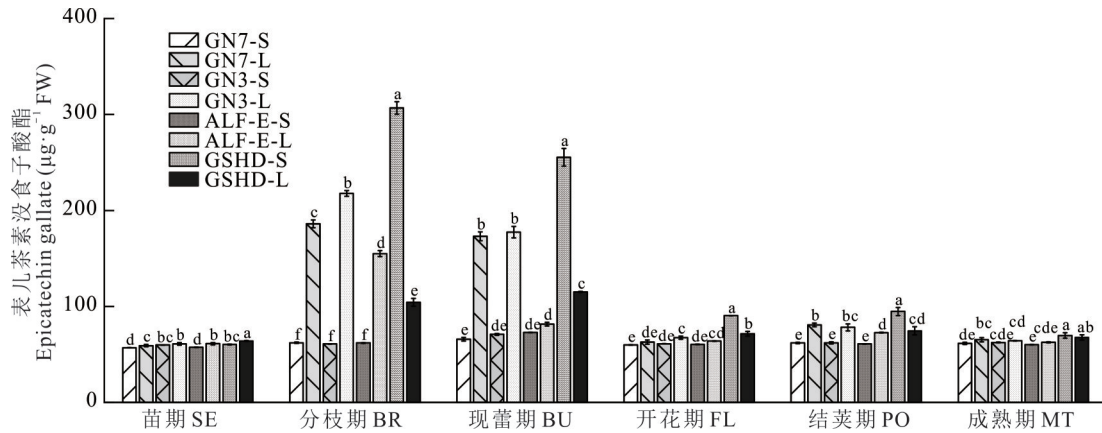


图3 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草表儿茶素没食子酸酯含量

Fig. 3 Temporal variation in epicatechin gallate content of alfalfa cultivars and *O. viciifolia* ‘Gansu’ during distinct growth stages

**2.1.4 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草表儿茶素含量** SE时期,不同品种的表儿茶素含量存在差异。其中,GSHD-L的表儿茶素含量最高( $40.306 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于其他品种( $P < 0.05$ );此时期叶部的表儿茶素含量普遍高于茎部。BR时期,各品种表儿茶素含量相比SE时期普遍上升;GSHD-L依然最高( $55.075 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),其次是GSHD-S( $36.782 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),二者均显著高于其他品种( $P < 0.05$ )。BU时期,表儿茶素含量在部分品种中进一步上升。FL时期,表儿茶素含量普遍上升。PO时期,GSHD-L( $171.392 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )达到峰值,显著高于所有其他品种( $P < 0.05$ )。MT时期,表儿茶素含量整体呈下降趋势(图4)。

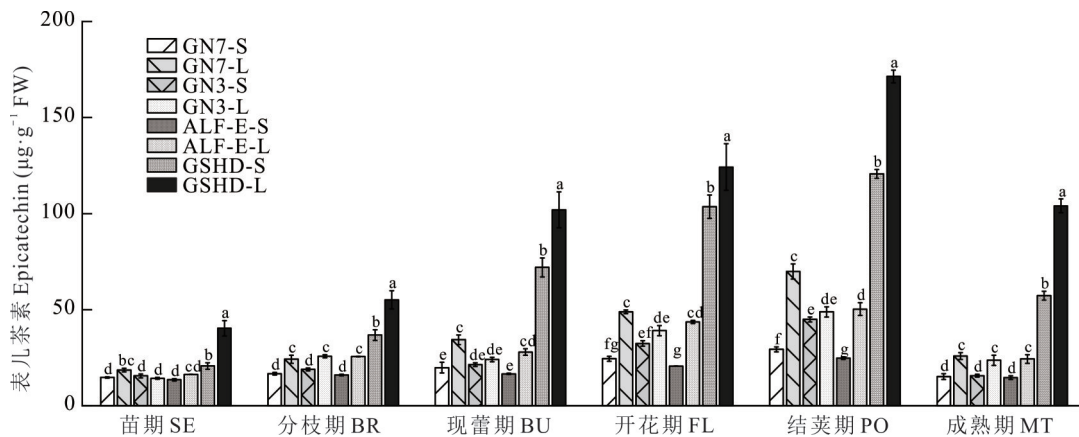


图4 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草表儿茶素含量

Fig. 4 Epicatechin content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

**2.1.5 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草儿茶素含量** SE时期,GSHD-S儿茶素含量最高( $54.295 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于除ALF-E-L外的其他品种所有部位( $P < 0.05$ )。BR时期,儿茶素含量整体上升,GN3-S含量最高( $69.537 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于其他品种( $P < 0.05$ )。BU时期,儿茶素含量明显上升,GN7-L( $116.807 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )最高,ALF-E-L和GSHD-L次之,三者显著高于其他品种其他部位( $P < 0.05$ ),该时期叶部儿茶素积累远高于茎部。FL时期,紫花苜蓿各品种叶部儿茶素含量降低,茎部含量增加,红豆草茎、叶部位含量均增加。PO时期,紫花苜蓿各品种茎部儿茶素含量降低,叶部含量增加;红豆草茎、叶部位含量均降低;GN3-L( $92.371 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )最高,显著高于其他品种( $P < 0.05$ )。MT时期,儿茶素含量再次升高,GSHD-L( $183.185 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )最高,显著高于紫花苜蓿( $P < 0.05$ )(图5)。

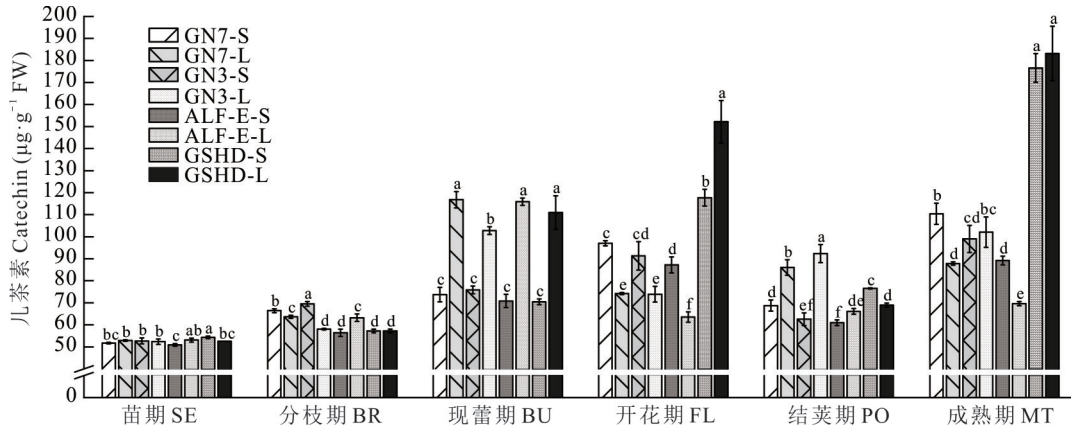


图 5 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草儿茶素含量

Fig. 5 Catechin content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

2.2 不同生长期紫花苜蓿品种和‘甘肃’红豆草总酚、总黄酮、缩合单宁含量动态分析

2.2.1 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草总酚含量 SE时期,GSHD-L总酚含量最高(24.943 mg·g<sup>-1</sup>),显著高于其他品种(P<0.05);其次为GN7-L(10.783 mg·g<sup>-1</sup>)和GN3-L(8.640 mg·g<sup>-1</sup>)。BR时期,总酚含量整体下降。BU时期,紫花苜蓿总酚含量整体下降,红豆草含量升高。FL时期,总酚含量开始回升,GSHD-L接近SE期(24.624 mg·g<sup>-1</sup>);GN3-L(12.738 mg·g<sup>-1</sup>)和GN7-L(12.363 mg·g<sup>-1</sup>)较高。PO时期,总酚含量继续上升。MT时期,总酚含量整体上升,GSHD-L最高(28.732 mg·g<sup>-1</sup>),显著高于其他品种所有部位(P<0.05);GN3-L(16.420 mg·g<sup>-1</sup>)和GN7-L(14.566 mg·g<sup>-1</sup>)较高;整体表现为叶部总酚含量高于茎部(图6)。

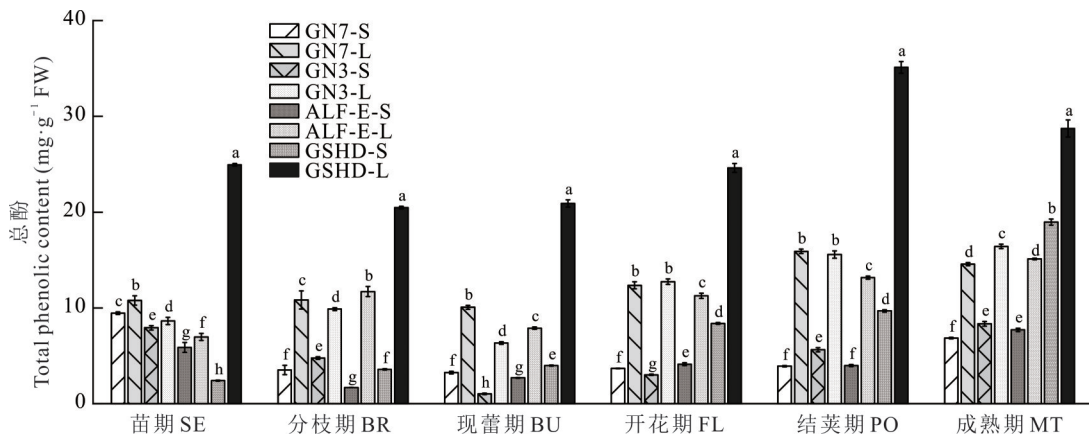


图 6 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草总酚含量

Fig. 6 Total phenolic content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

2.2.2 基于不同生长期紫花苜蓿品种、‘甘肃’红豆草总黄酮含量动态分析 SE时期,GSHD-L组分的总黄酮含量最高(12.485 mg·g<sup>-1</sup>),显著高于其他品种(P<0.05)。BR时期,总黄酮含量整体下降,GSHD-L仍为最高(7.767 mg·g<sup>-1</sup>)(P<0.05);紫花苜蓿各品种中ALF-E-L(1.312 mg·g<sup>-1</sup>)较高。BU时期,总黄酮含量略有回升,但仍低于SE时期,GSHD-L为最高(10.479 mg·g<sup>-1</sup>)。FL时期,紫花苜蓿总黄酮含量开始回升,GSHD-L有所下降,但仍为最高(7.682 mg·g<sup>-1</sup>);GN3-L(1.789 mg·g<sup>-1</sup>)和GN7-L(1.654 mg·g<sup>-1</sup>)较高。PO时期,总黄酮含量进一步上升。MT时期,总黄酮含量整体达到升高,GSHD-L仍为最高(7.460 mg·g<sup>-1</sup>)。紫花苜蓿各品种中ALF-E-L(3.936 mg·g<sup>-1</sup>)较高,整体表现为叶部总酚含量高于茎部(图7)。

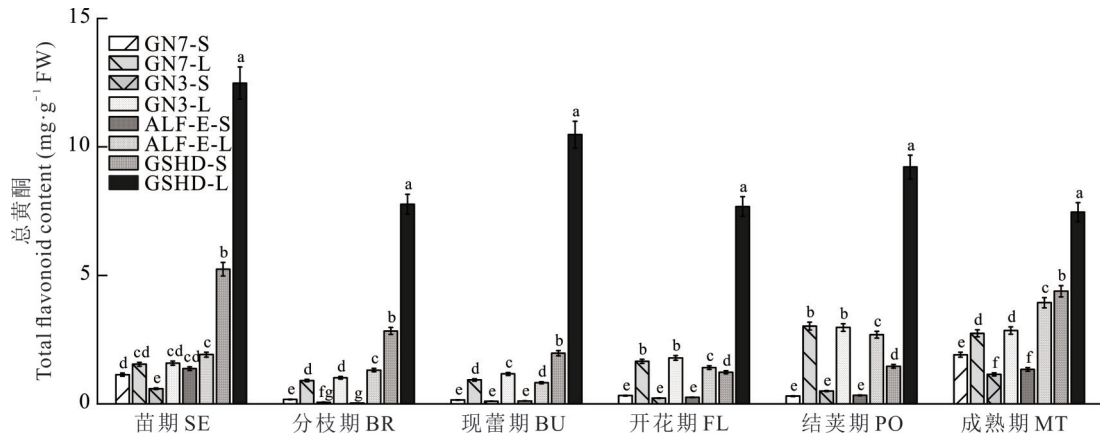


图7 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草总黄酮含量

Fig. 7 Total flavonoid content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

**2.2.3 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草缩合单宁含量** SE时期,GSHD-L组分含量最高( $1.471 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于其他品种( $P<0.05$ )。BR时期,GSHD-L缩合单宁含量( $5.760 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )迅速上升,显著高于其他品种( $P<0.05$ )。GN7-L( $0.846 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )和ALF-E-L( $0.761 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )次之。BU时期,缩合单宁含量略有回升。FL时期,紫花苜蓿各品种叶部缩合单宁含量上升,红豆草整体缩合单宁含量下降。PO时期,各品种缩合单宁含量整体升高。MT时期,各品种茎部缩合单宁含量上升,叶部缩合单宁含量降低,GSHD-L为最高( $4.821 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ),显著高于其他品种( $P<0.05$ );GN3-L( $1.741 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )和GN7-L( $1.312 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )较高。整体表现为叶部总酚含量高于茎部(图8)。

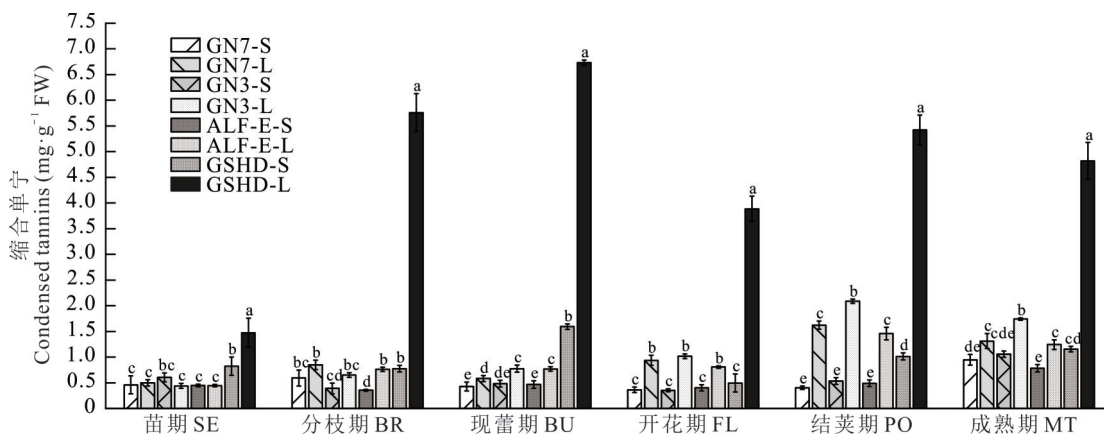


图8 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草缩合单宁含量

Fig. 8 Condensed tannins content in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

### 2.3 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草4CL、ANR、C4H、LAR和PAL酶活性动态

GSHD-L在现蕾期的4CL、ANR、C4H、LAR和PAL活性均高于分枝期( $P<0.05$ ),说明此阶段黄酮生物合成最活跃,可能是关键积累时期。GN3-L品种在结荚期4CL、ANR、C4H、LAR和PAL活性均显著高于开花期,但均显著低于GSHD-L( $P<0.05$ ),说明不同品种对酶活性的调控机制可能不同(图9)。

### 2.4 主成分分析(PCA)

**2.4.1 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草茎部酚类和黄酮类化合物含量分析** 紫花苜蓿(ALF-E-S、GN3-S、GN7-S)和‘甘肃’红豆草(GSHD-S)的数据点聚集区域存在明显分离,‘甘肃’红豆草的数据点更靠近儿茶素、缩合单宁和总酚的负载向量,说明其在这类物质的积累上更具有优势。紫花苜蓿样本点主要集中在图的中心区

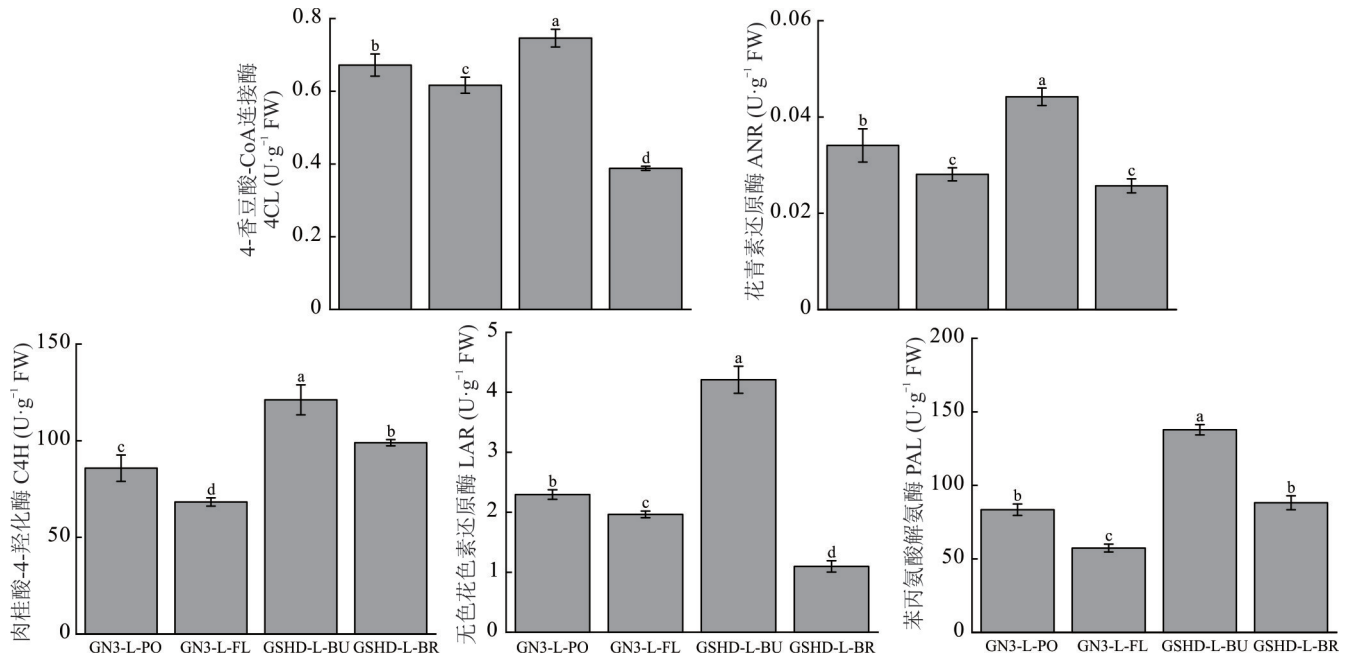


图 9 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草 4CL、ANR、C4H、LAR 和 PAL 酶活性动态

Fig.9 Dynamic analysis of 4CL, ANR, C4H, LAR and PAL enzyme activities in *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

GN3-L-PO: ‘甘农 3 号’叶部位结荚期 leaf part of ‘Gannong No.3’ at pod-setting stage; GN3-L-FL: ‘甘农 3 号’叶部位开花期 leaf part of ‘Gannong No.3’ at flowering stage; GSHD-L-BU: ‘甘肃’红豆草叶部位现蕾期 leaf part of *O. viciifolia* ‘Gansu’ at budding stage; GSHD-L-BR: ‘甘肃’红豆草叶部分分枝期 leaf part of *O. viciifolia* ‘Gansu’ at branching stage. 所有数据进行多重比较,不同小写字母表示不同品种不同部位同一时期差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同。Statistical analysis: All data were subjected to multiple comparison tests. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) among cultivars and plant parts within the same growth stage; The same below.

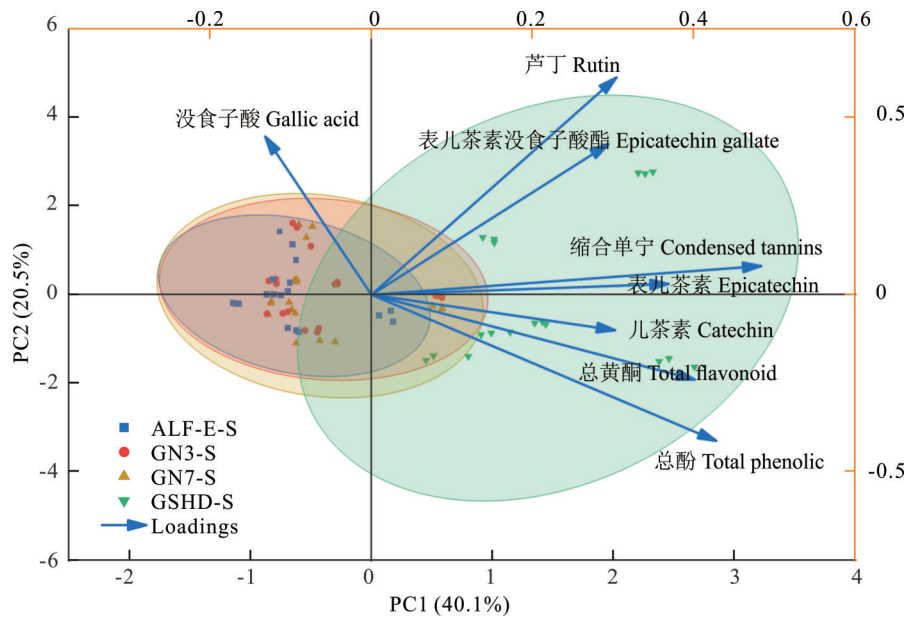


图 10 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草茎部酚类和黄酮类化合物含量分析

Fig. 10 Analysis of phenolic and flavonoid compound contents in the stems of *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

域,且与其他样本点有一定重叠,显示其代谢物积累较为多样,难以通过某一特定代谢物显著区分。缩合单宁、儿茶素和总酚的负载向量较长,并指向‘甘肃’红豆草的样本点,说明这些代谢物对 PC1(40.1%)的贡献较大,可以

作为物种间区分的主要标志。没食子酸和表儿茶素没食子酸酯的负载向量较短,贡献相对较小,与紫花苜蓿样本点较为接近,难以作为明显的物种区分指标(图10)。

**2.4.2 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草叶部酚类和黄酮类化合物含量分析** ‘甘肃’红豆草样本点在PC1的正向轴上有明显的分布特征,主要靠近儿茶素、缩合单宁、总酚和表儿茶素的负载向量。这表明‘甘肃’红豆草在这些代谢物的积累上有显著优势,可能是其次生代谢调控的重要特征。紫花苜蓿的样本点主要集中在PC1轴的负向区间,与没食子酸和表儿茶素没食子酸酯等代谢物的负载向量较为接近,显示出这类代谢物的积累特征。部分样本点与其他物种重叠,反映其代谢物积累的多样性和交集性。缩合单宁和儿茶素的负载向量较长,说明它们在PC1主成分上的贡献较大,并且在‘甘肃’红豆草中积累较多,是区分物种和处理的关键代谢物。没食子酸和表儿茶素没食子酸酯的负载向量相对较短,贡献相对较小,表现出重叠区域较多,难以作为物种间显著的区别标志(图11)。

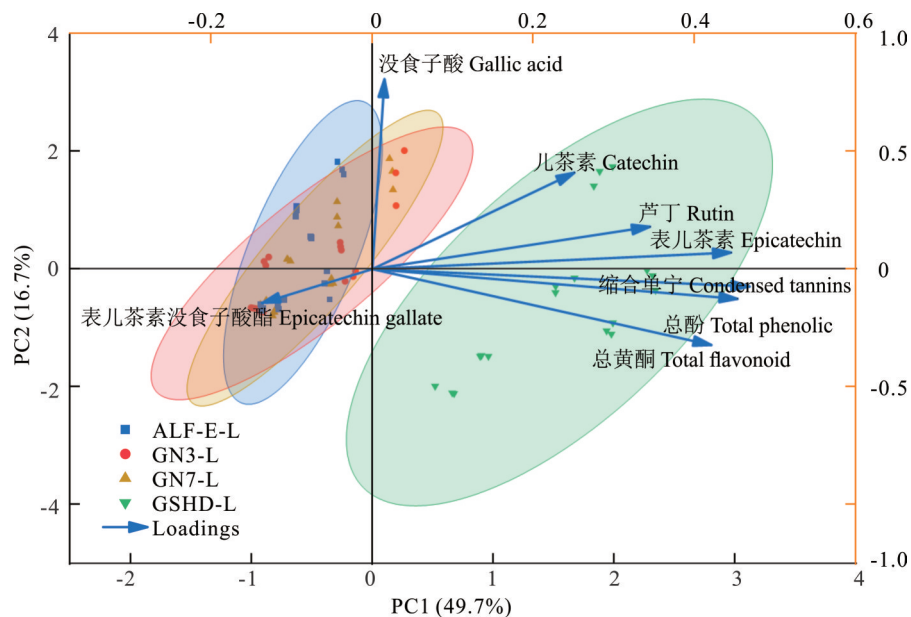


图 11 不同生长期紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草叶部酚类和黄酮类化合物含量分析

Fig. 11 Analysis of phenolic and flavonoid compound contents in the leaves of *M. sativa* and *O. viciifolia* ‘Gansu’ at different growth stages

**2.4.3 紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草酚类和黄酮类化合物及酶活性分析** 4CL 的箭头指向与儿茶素、ANR、LAR、芦丁的箭头指向较为一致,呈正相关关系。PAL 的箭头指向与表儿茶素、总黄酮、总酚、表儿茶素没食子酸酯的箭头指向相近,呈正相关关系。C4H 的箭头指向与总黄酮、缩合单宁、总酚的箭头指向相近,呈正相关关系。ANR 和 LAR 的箭头指向与表儿茶素、芦丁相近,呈正相关关系。缩合单宁与总黄酮、总酚、表儿茶素没食子酸酯等方向趋同,呈正相关关系。缩合单宁与儿茶素、表儿茶素的箭头指向呈现出一定程度的趋同性。5 个酶(4CL、PAL、C4H、ANR、LAR)的箭头指向与没食子酸的箭头指向相反,表现为负相关关系(图12)。

## 2.5 紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草酚类和黄酮类化合物及酶活性相关性分析

4 个样品中,4CL 与芦丁呈正相关,C4H 与表儿茶素没食子酸酯呈负相关,PAL 与没食子酸呈正相关关系。GN3-L-PO、GSHD-L-BU 中,LAR 与儿茶素呈正相关,表儿茶素、总酚、ANR 与缩合单宁呈正相关。GN3-L-PO、GN3-L-FL 中,儿茶素与缩合单宁呈正相关。GN3-L-PO、GN3-L-FL、GSHD-L-BU 中,总黄酮与缩合单宁呈正相关(图13)。

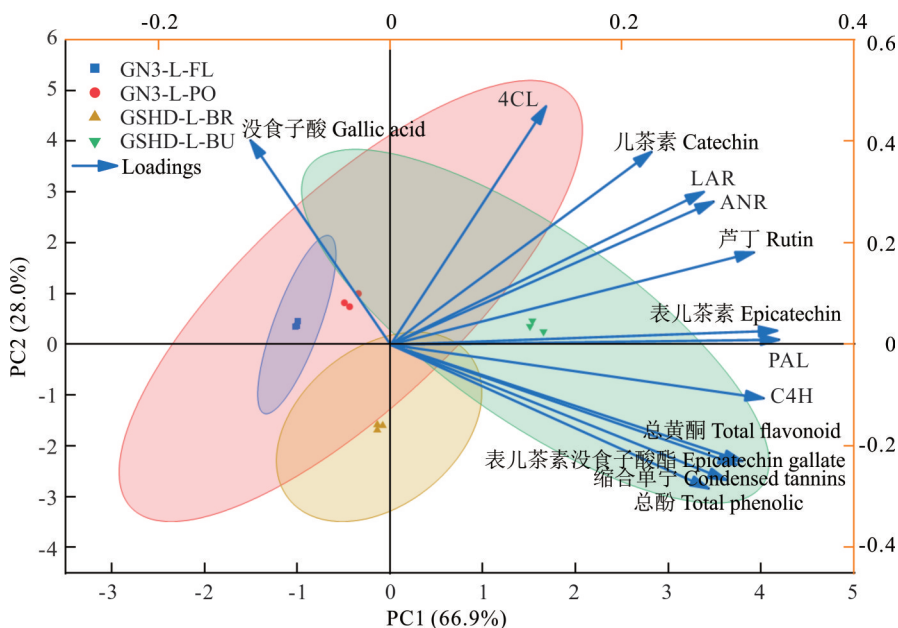
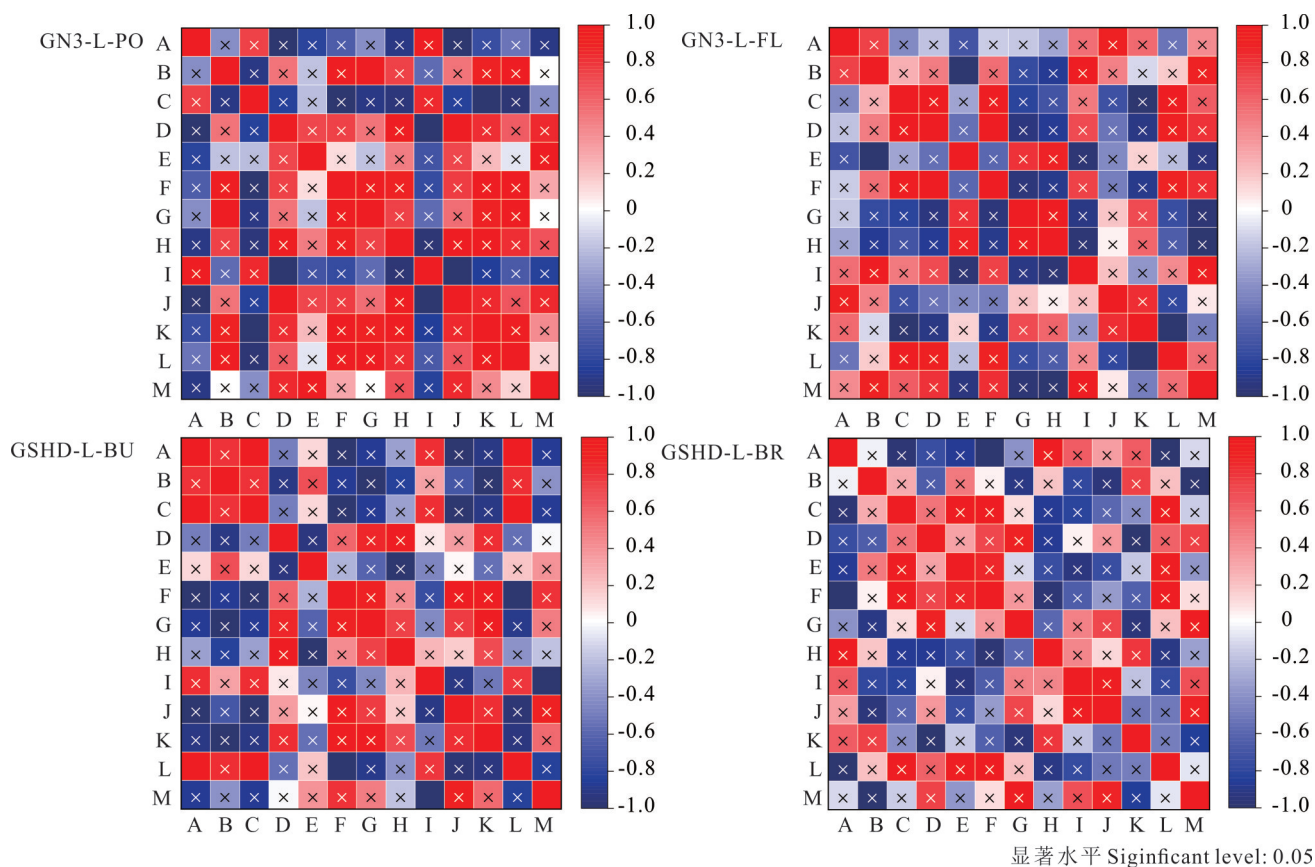


图 12 紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草酚类和黄酮类化合物及酶活性分析

Fig. 12 Analysis of phenolic, flavonoid compounds and enzyme activities in *M. sativa* and *O. vicifolia* ‘Gansu’



显著水平 Significant level: 0.05

图 13 ‘甘农 3 号’紫花苜蓿和‘甘肃’红豆草酚类和黄酮类化合物及酶活性相关性分析

Fig. 13 Analysis of the correlation among phenolic and flavonoid compounds and enzyme activities in *M. sativa* ‘Gannong No.3’ and *O. vicifolia* ‘Gansu’

A: 芦丁 Rutin; B: 没食子酸 Gallic acid; C: 表儿茶素没食子酸酯 Epicatechin gallate; D: 表儿茶素 Epicatechin; E: 儿茶素 Catechin; F: 总酚 Total phenols; G: 总黄酮 Total flavonoids; H: 缩合单宁 Condensed tannins; I: 4CL; J: ANR; K: C4H; L: PAL; M: LAR; 红色/蓝色示正/负相关, 颜色越深相关性越强; 黑色斜点/白色斜杠示相关性不显著 ( $P \geq 0.05$ ), 无标表示显著 ( $P < 0.05$ )。Red/blue colors indicate positive/negative correlations, with darker shades representing stronger correlations. Black diagonal dots or white slashes denote non-significant correlations ( $P \geq 0.05$ ), while the absence of symbols indicates significant correlations ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 缩合单宁及其前体物质变化趋势

酚类和黄酮类化合物是苯丙烷代谢途径的重要产物,其含量变化通常与次生代谢产物的积累密切相关<sup>[37]</sup>。酚类物质的含量在不同叶组织中变化很大,生理阶段和环境胁迫也会影响酚类物质的组成和含量<sup>[38-39]</sup>。本研究发现,‘甘农3号’紫花苜蓿叶部在结荚期总酚和总黄酮含量显著高于开花期,这可能与结荚期植物需要合成更多的次生代谢产物以抵御外界环境压力有关<sup>[40-42]</sup>。而‘甘肃’红豆草在现蕾期总黄酮含量表现出显著的积累趋势,而总酚含量在现蕾期与分枝期相近,这一现象可能与现蕾期植物生理活动的变化密切相关<sup>[43]</sup>,表明苯丙烷代谢途径在这些时期被强烈激活,总酚和总黄酮的积累为缩合单宁的合成提供了充足的底物<sup>[44]</sup>。此外,芦丁的含量也表现出类似的趋势,可能作为缩合单宁合成的前体或中间产物参与了代谢过程。而没食子酸、表儿茶素没食子酸酯、表儿茶素和儿茶素的含量变化趋势与缩合单宁不一致,表明这些化合物可能通过不同的代谢途径或调控机制参与次生代谢过程。已有研究表明,4CL催化生成的香豆酰CoA除用于缩合单宁合成外,还可作为前体参与木质素、黄酮醇等物质的合成<sup>[45]</sup>;当这些竞争途径在特定时期被激活时,即使4CL酶活性升高,表儿茶素、儿茶素的积累仍可能受限<sup>[46]</sup>。同时类黄酮物质的合成不仅受基因型的调控,还受多种外部因素的显著影响<sup>[47]</sup>。例如,气候变量(如水分<sup>[48]</sup>、光照<sup>[49]</sup>和温度<sup>[50]</sup>)以及栽培管理措施<sup>[51]</sup>等环境因子,均会显著影响类黄酮物质的类型、含量及其积累动态。

#### 3.2 前体物质的变化趋势

主成分分析(PCA)结果显示,在叶部样本中,儿茶素、芦丁、表儿茶素等成分与PC1呈显著正相关关系,说明这些成分在代谢过程中可能具有一定的协同作用。芦丁可能作为黄酮类化合物的代表,参与苯丙烷代谢途径的调控,与Hou等<sup>[52]</sup>的研究一致。缩合单宁的变化趋势与儿茶素密切相关,儿茶素含量增加时,缩合单宁含量也随之增加。表儿茶素可能通过ANR途径(表儿茶素→原花青素)参与缩合单宁的合成<sup>[53]</sup>。另外,没食子酸和表儿茶素没食子酸酯的箭头方向相反,表明它们在代谢途径中可能处于不同的合成支路,或受到不同的调控机制。在茎部样本中,缩合单宁、表儿茶素、总黄酮、儿茶素、总酚等成分与PC1呈显著正相关关系,说明这些成分在茎中的代谢模式具有一定的一致性。与叶部相比,茎部的代谢模式可能更加依赖于某些关键代谢物(如缩合单宁和总黄酮)的积累,这可能与茎部的生理功能(如支撑和运输)密切相关。

#### 3.3 紫花苜蓿与红豆草缩合单宁合成生长期差异及关键酶协同调控机制

PAL催化苯丙氨酸脱氨基形成肉桂酸,是整个苯丙烷代谢途径的起始酶和限速酶<sup>[54]</sup>。C4H催化肉桂酸的苯环羟化形成4-香豆酸<sup>[55]</sup>。4CL以ATP供能,将CoA通过高能硫酯键与4-香豆酸连接,产物香豆酰CoA作为活化形式参与到后续合成<sup>[56]</sup>。ANR催化花青素转化为原花青素<sup>[57]</sup>,是缩合单宁合成的关键酶<sup>[58-59]</sup>。LAR直接催化无色花色苷还原生成儿茶素,是缩合单宁合成的关键单体之一<sup>[60]</sup>。这些关键酶的活性变化直接影响缩合单宁及其前体物质的合成,但酶促反应与代谢产物积累之间的关系往往受到多种因素调控。从代谢物测定数据来看,‘甘农3号’紫花苜蓿在结荚期叶部缩合单宁含量最高,而‘甘肃’红豆草在现蕾期叶部缩合单宁含量最高,这与刘秀丽等<sup>[19]</sup>、Wang等<sup>[61]</sup>及Rufino-Moya等<sup>[10]</sup>的研究一致,进一步证实紫花苜蓿与红豆草在缩合单宁合成过程中,存在“关键积累时期不同”与“叶部含量高于茎部”的特异性积累,这为解析本研究中缩合单宁合成与关键酶活性的动态关联提供了基础数据支撑。‘甘农3号’紫花苜蓿在结荚期PAL、ANR、C4H、LAR及4CL酶活性显著高于开花期,而‘甘肃’红豆草在现蕾期也表现出较高的PAL、ANR、C4H、LAR和4CL酶活性,表明苯丙烷代谢途径在这些时期被激活,从而为缩合单宁的合成提供了充足的前体物质。C4H主要靠近总黄酮、总酚、缩合单宁等代谢物,说明它可能影响苯丙烷代谢途径的多个下游产物,与Jia等<sup>[62]</sup>的研究一致。PAL、C4H、4CL、ANR、LAR酶活性同步升高,表明单宁合成并非依赖单一酶调控。

### 4 结论

不同生长期中,叶部缩合单宁、总酚和总黄酮含量普遍高于茎部。‘甘农3号’紫花苜蓿在结荚期叶部缩合单

宁含量最高,而‘甘肃’红豆草在现蕾期叶部缩合单宁含量最高。紫花苜蓿没食子酸及其衍生物(如表儿茶素没食子酸酯)的含量相对较高,与这些物质显著相关的代谢物主要是表儿茶素和儿茶素。PCA 分析进一步揭示,‘甘肃’红豆草的缩合单宁、表儿茶素及总黄酮积累水平较高,并与 PAL、C4H、4CL、LAR 和 ANR 酶活性相关性较强。因此,调控 PAL、C4H、4CL、LAR 和 ANR 酶活性可能是提高紫花苜蓿缩合单宁合成的有效途径。

### 参考文献 References:

- [1] Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, *et al.* Proanthocyanidins: a comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 116: 108999.
- [2] Yu Z, Ouyang L J, Zhao Y G, *et al.* Research progress of 4-coumaric acid coenzyme aligase (4CL). *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(15): 1–11.  
余珠, 欧阳乐军, 赵永国, 等. 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4CL) 的研究进展. *分子植物育种*, 2023, 21(15): 1–11.
- [3] Zhou M, Wei L, Sun Z, *et al.* Production and transcriptional regulation of proanthocyanidin biosynthesis in forage legumes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(9): 3797–3806.
- [4] Chen C Y. Cloning and functional analysis of two key genes in the rocyanidins synthesis in Gansu sainfoin. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.  
陈春艳. 甘肃红豆草原花青素合成途径的两个关键酶基因的克隆和功能分析. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [5] Lu N, Jun J H, Li Y, *et al.* An unconventional proanthocyanidin pathway in maize. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 4349.
- [6] Jonker A, Yu P. The occurrence, biosynthesis, and molecular structure of proanthocyanidins and their effects on legume forage protein precipitation, digestion and absorption in the ruminant digestive tract. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 1105.
- [7] Gou L M. Metabolic engineering of isoflavone and proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and the screening of isoflavone transporter. Beijing: China Agricultural University, 2016.  
苟蓝明. 苜蓿异黄酮和缩合单宁代谢路径调控及异黄酮转运蛋白筛选. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [8] Wang Y S. Prevention of rumen bloat in goats by addition of condensed tannins to high concentrate diets. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2024.  
王芋苏. 高精料日粮中添加缩合单宁预防山羊瘤胃胀气的研究. 雅安: 四川农业大学, 2024.
- [9] Naumann H, Sepela R, Rezaire A, *et al.* Relationships between structures of condensed tannins from texas legumes and methane production during *in vitro* rumen digestion. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2018, 23(9): 2123.
- [10] Rufino-Moya P J, Blanco M, Bertolín J R, *et al.* Methane production of fresh sainfoin, with or without PEG, and fresh alfalfa at different stages of maturity is similar but the fermentation end products vary. *Animals (Basel)*, 2019, 9(5): 197.
- [11] Jonker A, Yu P. The role of proanthocyanidins complex in structure and nutrition interaction in alfalfa forage. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 793.
- [12] Dong W K. The transformation of BAN genes by *Agrobacterium*-mediated method and its expression analysis in alfalfa. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.  
董文科. 农杆菌介导的 BAN 基因在紫花苜蓿中的转化和表达的研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [13] Wang Y X. Studies on molecular manipulation of condensed tannin synthesis and genetic transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2010.  
王延秀. 浓缩单宁合成的分子调控及紫花苜蓿遗传转化研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [14] Li Y H, Jin L, Han G D, *et al.* Research progress on the role of plant tannins in ruminant nutrition and healthy farming. *Acta Agrestia Sinica*, 2013, 21(6): 1043–1051.  
李元恒, 金龙, 韩国栋, 等. 植物单宁在反刍动物营养和健康养殖作用中的研究进展. *草地学报*, 2013, 21(6): 1043–1051.
- [15] Wu G Q, Li H, Lei C R, *et al.* Effects of additional KCl on growth and physiological characteristics of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) under high salt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(6): 45–55.  
伍国强, 李辉, 雷彩荣, 等. 添加 KCl 对高盐胁迫下红豆草生长及生理特性的影响. *草业学报*, 2019, 28(6): 45–55.
- [16] Li S Q. Study on drought and saline-alkali resistance of 16 alfalfa varieties and comprehensive evaluation. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019.

- 李诗琴. 16个苜蓿品种抗旱、耐盐碱性研究及综合评价. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [17] Theodoridou K, Aufrère J, Andueza D, *et al.* Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 2010, 160(1): 23–38.
- [18] Huang H J, Zhang Y Q, Du W X, *et al.* Research progress on germplasm resources of sainfoin (*Onobrychis viciaefolia*). *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(8): 2346–2356.  
黄海军, 张雨琪, 杜文宣, 等. 红豆草种质资源研究进展. *草地学报*, 2024, 32(8): 2346–2356.
- [19] Liu X L, Li Y H. Research situation on tannins from sainfoin. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2016, 37(12): 52–57.  
刘秀丽, 李元恒. 红豆草单宁的研究概况. *畜牧与饲料科学*, 2016, 37(12): 52–57.
- [20] Theodoridou K, Aufrère J, Andueza D, *et al.* Effect of plant development during first and second growth cycle on chemical composition, condensed tannins and nutritive value of three sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) varieties and lucerne. *Grass and Forage Science*, 2011, 66(3): 402–414.
- [21] Zong Y Q, Quan W, Li J P, *et al.* Comparative analysis of pigment and condensed tannin content between red-stem and green-stem alfalfa. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2023, 38(6): 1067–1072.  
宗亚倩, 全伟, 李建平, 等. 红茎与绿茎紫花苜蓿色素及缩合单宁含量的比较分析. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2023, 38(6): 1067–1072.
- [22] Zhang X N. Anti-diabetic activity of phenolic-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits extracts and its mechanism. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.  
张夏南. 杨梅果实酚类物质提取物降糖活性及其相关机理研究. 杭州: 浙江大学, 2016.
- [23] Dhanani T, Singh R, Kumar S. Extraction optimization of gallic acid, (+)-catechin, procyanidin-B2, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin gallate, and (–)-epicatechin gallate; their simultaneous identification and quantification in *Saraca asoca*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2017, 25(3): 691–698.
- [24] Su T X, Zhou Y, Sun X H, *et al.* Determination of polyphenols in kiwifruit by HPLC. *Food Science and Technology*, 2019, 44(9): 327–331.  
苏天霞, 周艳, 孙晓红, 等. HPLC测定猕猴桃不同部位中的7种多酚类化合物. *食品科技*, 2019, 44(9): 327–331.
- [25] Harbart V, Frede K, Fitzner M, *et al.* Regulation of carotenoid and flavonoid biosynthetic pathways in *Lactuca sativa* var. *capitata* L. in protected cultivation. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1124750.
- [26] Sun Q Y. Studies on the analytic method for non-anthocyanin phenolic compounds in raspberry fruits. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.  
孙侨冶. 树莓果实中非花色苷酚类物质分析方法的研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [27] Feng X L, Cao S Y, Xu X Y, *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 11 grape varieties. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(6): 68–75.  
冯晓翎, 曹诗瑜, 徐晓瑜, 等. 11个鲜食葡萄品种总酚含量和抗氧化活性的评价. *食品工业科技*, 2019, 40(6): 68–75.
- [28] Zou P, Zhang Y Y, Zou L L. Extraction and composition analysis of flavonoids in peony seed shells. *Food & Machinery*, 2023, 39(4): 44–50.  
邹平, 张迎阳, 邹林玲. 牡丹籽壳中黄酮类化合物提取及组分分析. *食品与机械*, 2023, 39(4): 44–50.
- [29] Bai X L, Shen S Y, Chen H Y, *et al.* Microwave-assisted extraction technology of flavonoid from mango peel. *Farm Products Processing*, 2015 (6): 29–32.  
白雪莲, 沈淑雅, 陈怀玉, 等. 微波辅助提取芒果皮黄酮工艺研究. *农产品加工*, 2015 (6): 29–32.
- [30] Wang Y. The main components and antioxidant capacity of samara during *Acer truncatum* bunge fruit maturation. Yangling: Northwest A & F University, 2019.  
王瑶. 元宝枫果实成熟过程中主要成分测定及抗氧化能力研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [31] Knobloch K H, Hahlbrock K. 4-Coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1977, 184(1): 237–248.
- [32] Peng Q Z, Zhu Y, Liu Z, *et al.* An integrated approach to demonstrating the ANR pathway of proanthocyanidin biosynthesis in plants. *Planta*, 2012, 236(3): 901–918.
- [33] Jiang X. Effects of water supply on the key enzyme of flavonoids metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.  
姜雪. 水因子对黄芩黄酮类代谢影响研究. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [34] Liu R, Wang Z Y, Huang Y Y, *et al.* Effects of rare earth elements La<sup>3+</sup> and Eu<sup>3+</sup> on the polyphenols contents and PAL, C4H

- activities of *Pinus koraiensis* seedlings. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(8): 168–173.
- 刘冉, 王振宇, 黄雨洋, 等. 稀土元素对红松幼苗松多酚含量及 PAL, C4H 活性的影响. *林业科学*, 2014, 50(8): 168–173.
- [35] Liu C J, Zhang H Y, Sun L X, *et al.* Effects of isobavachalcone on the resistance to TMV and activity of defense enzymes of tobacco. *Agrochemicals*, 2022, 61(10): 767–770.
- 刘澄瑾, 张洪雨, 孙礼雪, 等. 苯丙烯酮诱导烟草抗烟草花叶病毒(TMV)及对几种防御酶活性的影响. *农药*, 2022, 61(10): 767–770.
- [36] Xing Y F. The accumulation of flavanols, expression of leucoanthocyanidin reductase induced by UV-C irradiation in grape berry. Taiyuan: Shanxi Agricultural University, 2013.
- 邢延富. UV-C对葡萄果实黄酮醇类多酚积累及隐色花色素还原酶表达的研究. 太原: 山西农业大学, 2013.
- [37] Chen C, Zhang H, Dong C, *et al.* Effect of ozone treatment on the phenylpropanoid biosynthesis of postharvest strawberries. *RSC Advances*, 2019, 9(44): 25429–25438.
- [38] Ainsworth E A, Gillespie K M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 875–877.
- [39] Mikami-Konishide I, Murakami S, Nakanishi K, *et al.* Antioxidant capacity and polyphenol content of extracts from crops cultivated in Japan, and the effect of cultivation environment. *Food Science and Technology Research*, 2013, 19(1): 69–79.
- [40] Pourzand A, Tajaddini A, Pirouzpanah S, *et al.* Associations between dietary allium vegetables and risk of breast cancer: a hospital-based matched case-control study. *Journal of Breast Cancer*, 2016, 19(3): 292–300.
- [41] Bilger W, Rolland M, Nybakken L. UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2007, 6(2): 190–195.
- [42] Hawrylak-Nowak B, Dresler S, Stasińska-Jakubas M, *et al.* NaCl-induced elicitation alters physiology and increases accumulation of phenolic compounds in *Melissa officinalis* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6844.
- [43] Ramarosan M L, Koutouan C, Helesbeux J J, *et al.* Role of phenylpropanoids and flavonoids in plant resistance to pests and diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2022, 27(23): 8371.
- [44] Xu W Y, Gao W W, He C N. The influence of environmental factors on the biosynthesis of flavonoids in plants. *World Science and Technology*, 2006 (6): 68–72.
- 徐文燕, 高微微, 何春年. 环境因子对植物黄酮类化合物生物合成的影响. *世界科学技术*, 2006(6): 68–72.
- [45] Eudes A, Pereira J H, Yogiswara S, *et al.* Exploiting the substrate promiscuity of hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase to reduce lignin. *Plant & Cell Physiology*, 2016, 57(3): 568–579.
- [46] Bontpart T, Marlin T, Vialet S, *et al.* Two shikimate dehydrogenases, VvSDH3 and VvSDH4, are involved in gallic acid biosynthesis in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(11): 3537–3550.
- [47] Zhang F C. Comparative study on regulation mechanism of rootstock on growth and berry flavonoid metabolism of wine grape. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- 张付春. 砧木对酿酒葡萄生长及果实类黄酮物质代谢调控机制的比较研究. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- [48] Torres N, Martínez-Lüscher J, Porte E, *et al.* Optimal ranges and thresholds of grape berry solar radiation for flavonoid biosynthesis in warm climates. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 931.
- [49] Qin Y, Liu X, Li C, *et al.* Effect of light intensity on celery growth and flavonoid synthesis. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 14: 1326218.
- [50] Blancquaert E H, Oberholster A, Ricardo-Da-Silva J M, *et al.* Grape flavonoid evolution and composition under altered light and temperature conditions in cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1062.
- [51] Ma D, Guo Y, Ali I, *et al.* Accumulation characteristics of plant flavonoids and effects of cultivation measures on their biosynthesis: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, 215: 108960.
- [52] Hou S, Du W, Hao Y, *et al.* Elucidation of the regulatory network of flavonoid biosynthesis by profiling the metabolome and transcriptome in tartary buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(25): 7218–7229.
- [53] Jun J H, Lu N, Docampo-Palacios M, *et al.* Dual activity of anthocyanidin reductase supports the dominant plant proanthocyanidin extension unit pathway. *Science Advances*, 2021, 7(20): 4682.
- [54] Fraser C M, Chapple C. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0152.
- [55] Schilmiller A L, Stout J, Weng J K, *et al.* Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and

- development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2009, 60(5): 771–782.
- [56] Ehrling J, Büttner D, Wang Q, *et al.* Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 1999, 19(1): 9–20.
- [57] Tai Z J, Wang X H, Song X J, *et al.* Research progress of the biosynthesis, abiotic stress regulation and physiological functions in plant polyphenols. *Science and Technology of Food Industry*, 2025: 1–15[2025-06-11] <https://doi.org/10.13386/j.issn/002-0306.2024110180>.
- 邵振甲, 王欣卉, 宋雪健, 等. 植物多酚的生物合成、非生物胁迫调控与生理功能研究进展. *食品工业科技*, 2025: 1–15 [2025-06-11] <https://doi.org/10.13386/j.issn/002-0306.2024110180>.
- [58] Wu L, Xiong S, Shi X, *et al.* AP3 promotes the synthesis of condensed tannin in fruit by positively regulating ANR expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 261: 129558.
- [59] Chen Q, Liang X, Wu C, *et al.* Overexpression of leucoanthocyanidin reductase or anthocyanidin reductase elevates tannins content and confers cassava resistance to two-spotted spider mite. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 994866.
- [60] Zhao L, Jiang X L, Qian Y M, *et al.* Metabolic characterization of the anthocyanidin reductase pathway involved in the biosynthesis of flavan-3-ols in elite shuchazao tea (*Camellia sinensis*) cultivar in the field. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2017, 22(12): 2241.
- [61] Wang Y, Mcallister T A, Acharya S. Condensed tannins in sainfoin: composition, concentration, and effects on nutritive and feeding value of sainfoin forage. *Crop Science*, 2015, 55(1): 13–22.
- [62] Jia K, Zhang X, Meng Y, *et al.* Metabolomics and transcriptomics provide insights into the flavonoid biosynthesis pathway in the roots of developing *Aster tataricus*. *Journal of Plant Research*, 2023, 136(1): 139–156.