

# 茶树萜类香气物质代谢谱与相关基因表达谱时空变化的关系

刘晶晶<sup>1,\*</sup>, 王富民<sup>1,\*</sup>, 刘国峰<sup>1</sup>, 贺志荣<sup>2</sup>, 杨 华<sup>1</sup>, 韦朝领<sup>1</sup>, 宛晓春<sup>1</sup>,  
魏 书<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学茶与食品科技学院, 茶叶生物化学与生物技术重点实验室, 合肥 230036; <sup>2</sup>攸县食品药品监督管理局, 湖南株洲 412300)

**摘 要:** 针对影响茶叶香气品质的关键物质在鲜叶和花中的含量和相关基因表达的关系, 以茶‘农抗早’ [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze ‘Nongkangzao’] 不同发育阶段鲜叶和花为试材, 进行气相色谱和质谱分析。结果表明, 茶树叶片萜类化合物含量受叶片发育阶段影响, 表现为幼叶中多、老叶中少; 糖苷态多、游离态少。此外, 对前期获得并初步注释的茶树转录组数据库进行挖掘, 发现了编码 10 个萜类合成酶——芳樟醇合成酶 (CsLIS)、香叶烯合成酶 (CsMYS)、(*E*) -  $\beta$  - 罗勒烯合成酶 (CsOCS)、(*R*) - 柠檬烯合成酶 (CsLIM)、(-) -  $\alpha$  - 萜品醇合成酶 (CsTES)、(+)- $\alpha$  - 水芹烯合成酶 (CsPHS)、大根香叶烯合成酶 (CsGES)、(*E,E*) -  $\alpha$  - 法尼烯合成酶 (CsFAS)、芳樟醇/橙花叔醇合成酶 (CsLIS/NES) 和橙花叔醇/香叶烯芳樟醇合成酶 (CsNES/GLS) 的基因序列 (按照植物基因命名的基本原则对上述基因进行命名)。上述基因在不同发育阶段叶片和茶树花中的转录水平与萜类香气物质丰度的时空变化有明显的正相关。此外, 逆境信号物质茉莉酸甲酯能显著增强芳樟醇合成酶基因等 6 个基因的表达。

**关键词:** 茶; 鲜叶; 花; 萜类合成酶基因; 萜类化合物; 代谢谱; 表达谱

**中图分类号:** S 571.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 10-2094-13

## Correlation Between Spatiotemporal Profiles of Volatile Terpenoids and Relevant Terpenoid Synthase Gene Expression in *Camellia sinensis*

LIU Jing-jing<sup>1,\*</sup>, WANG Fu-min<sup>1,\*</sup>, LIU Guo-feng<sup>1</sup>, HE Zhi-rong<sup>2</sup>, YANG Hua<sup>1</sup>, WEI Chao-ling<sup>1</sup>,  
WAN Xiao-chun<sup>1</sup>, and WEI Shu<sup>1,\*\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Tea Biochemistry and Biotechnology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; <sup>2</sup>Food and Drug Administration of Youxian, Zhuzhou, Hunan 412300, China)

**Abstract:** Monoterpenes and sesquiterpenes are the major tea aromatic compounds and important for tea quality. In this study, efforts were made to elucidate the molecular mechanism controlling volatile terpenoid biosynthesis in fresh tea leaves. Volatile terpenoid profiles in tea leaves and flowers were constructed using GC - MS technology. Tea leaves and flowers at different developmental stages exhibited distinct profiles of volatile terpenoids. Young leaves had more abundant terpenoids than old leaves, and the

**收稿日期:** 2014 - 05 - 05; **修回日期:** 2014 - 06 - 03

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31070614, 31370687); 教育部博士学科点专项科研基金项目 (20123418110002)

\* 同等贡献者

\*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: weishu@ahau.edu.cn)

amount of glycosidically bound terpenoids were higher than free ones. Bioinformatics approaches were employed to map tea terpenoid synthase genes from previously obtained tea transcriptome data. Genes encoding for the following ten terpenoid synthases in tea were found: Linalool synthase, myrcene synthase, (*E*)- $\beta$ -ocimene synthase, (*R*)-limonene synthase, (-)- $\alpha$ -terpineol synthase, (+)- $\alpha$ -phellandrene synthase, germacrene D synthase, (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene synthase, linalool/nerolidol synthase and nerolidol/geranyl linalool synthase. Gene expression profiling revealed spatiotemporal patterns of the tested genes in tea plants. Moreover, their expression patterns were positively correlated to the abundance of volatile terpenoids. Additionally, the expression of six terpenoid synthase genes were induced by methyl jasmonate (MeJA), suggesting that emission profile of aromatic terpenoids might be enhanced in practice through these gene expression manipulation.

**Key words:** *Camellia sinensis*; fresh leaf; flower; terpenoid synthase gene; volatile terpenoid biosynthesis; metabolic profiling; expression profile

茶 [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] 香气物质种类多、含量低。按香气物质的化学结构, 可将其分为萜烯类及其衍生物、脂肪族类及其衍生物, 芳香族衍生物, 含氮、氧等杂环类及其他化合物 (张婉婷 等, 2010)。其中, 萜类香气物质有百余种之多 (张正竹 等, 2000), 多为挥发性的单萜 ( $C_{10}$ , 如香叶醇和芳樟醇) 和倍半萜 ( $C_{15}$ , 如橙花叔醇) 以及降倍半萜 ( $C_{13}$ , 如紫罗兰酮)。这些物质香味活性高、感受阈值低 (Schieberle, 1995), 常带有浓郁的甜香、花香和木香, 对成品茶的香气香型有特别的影响 (Schuh & Schieberle, 2006)。

成品茶的香气物质均直接或间接源自茶鲜叶中的代谢产物。研究表明, 茶鲜叶中的萜类香气物质除了游离态外, 还有与糖分子结合的糖苷形态。这些积累在叶片中的糖苷态香气前体物质在加工和饮用时水解呈香 (Wang et al., 2000)。茶鲜叶中糖苷态萜类香气前体的种类和含量对红茶和乌龙茶等发酵和半发酵茶的香气品质起着关键作用 (Schuh & Schieberle, 2006; 贺志荣 等, 2012; 施梦南和龚淑英, 2012)。

生物学研究表明, 茶树挥发性萜类物质具有重要的生态学功能。茶树未受损伤的鲜叶基本无味或味轻微, 偶尔能检测到微量的游离态萜类香气物质 (许宁 等, 1999)。当茶树遭受昆虫侵害时, 叶片中一些萜类合成酶 (terpenoid synthase, TPS) 基因的表达明显增强 (Gohain et al., 2012)。茶树在被昆虫取食、UV-B (280 ~ 315 nm) 照射和茉莉酸甲酯处理后, 叶片挥发性萜类物质含量明显升高 (Izaguirre et al., 2003; 桂连友, 2004; Dong et al., 2011)。而茶树花, 清香带甜, 在花蕾绽放初期, 芳樟醇、香叶醇以及橙花醇的含量明显升高, 吸引昆虫进行虫媒授粉 (游小清 等, 1990; 顾亚萍和钱和, 2008; Joshi et al., 2011)。在模式植物拟南芥上的研究显示, 由萜类前体合成途径生成的异戊二烯焦磷酸及其异构体在相关的异戊烯基转移酶的作用下, 生成香叶烯基焦磷酸和法尼烯基焦磷酸, 再分别经单萜和倍半萜合成酶催化生成挥发性单萜和倍半萜 (Rohmer et al., 1993; Aharoni et al., 2003; Degenhardt et al., 2009)。而对有关茶树萜类香气物质生物合成的研究鲜见报道。Xiang 等 (2013) 发现, 在茶树萜类前体合成途径 (甲羟戊酸途径和赤藓糖醇途径) 中一些基因的表达受代谢前体的调控。但对有关茶树萜类合成酶的研究尚无报道。目前对茶树 TPS 家族基因的表达调控、对茶树萜类香气物质生物合成时空变化几无所知。

本研究中通过进一步挖掘前期获得的茶树转录组数据, 以期发现茶树萜类香气物质合成酶基因, 并探明茶鲜叶中主要挥发性萜类香气物质代谢谱及其相应的基因表达谱的时空表达特点与关系, 揭示茶树萜类香气物质生物合成和释放的分子机理; 同时利用茉莉酸甲酯 (MeJA) 等逆境信号物质对茶苗进行处理, 以探究茶叶增香的技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 茶树材料生长条件和取样

供试茶树为种植于安徽农业大学试验茶园(合肥大杨店)的5年生‘农抗早’。于2013年10—11月在田间剪取当年生枝条上的第1、第3和第5片叶(图1, A)和4个不同发育阶段的花(图1, B), 液氮速冻后, 带回实验室并置于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。



图1 茶树叶片和花取样图

Fig. 1 Sampling of tea leaves and flowers in this study

### 1.2 叶片中主要挥发性萜类物质的检测

参照 Arjan 等(2000)的方法提取并检测茶鲜叶的挥发性萜类物质丰度。取5 g 叶片样品, 液氮中磨碎, 加入50  $\mu\text{L}$  由酵母菌离体表达的黑曲酶 *BGLI* 所得到的 $\beta$ -葡萄糖苷水解酶(Wei et al., 2004)和5 mL 无菌水,  $37^{\circ}\text{C}$ 反应2 h后顶空抽气及GC-MS(HS-GC-MS)(Agilent HS-7697A/GC-7890A/MS-5975C; 气相色谱柱为DB-5)分析, 测得茶树叶片全部萜类物质的含量。柱温控制程序如下:  $50^{\circ}\text{C}$ 先保持1 min; 然后以 $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温到 $100^{\circ}\text{C}$ 并保持1 min; 此后以 $4^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温到 $200^{\circ}\text{C}$ 并保持1 min; 此后再以 $3^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度升温到 $280^{\circ}\text{C}$ 并保持7 min。用同样的方法磨样, 将研磨好的样品置于5 mL 葡萄糖酸内酯(糖苷水解酶活性抑制剂,  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )中, 再用相同方法测定茶样中的游离态萜类物质丰度。糖苷态萜类物质的丰度为总萜类物质含量与游离态萜类物质含量之差值。以癸酸内酯为内标, 按面积归一化法计算各组分含量。试验设3个生物重复, 每生物重复有3个技术重复。

### 1.3 转录组数据分析

此前本实验室获得了 Illumina 深度测序的茶树转录组数据库, 其中含有初步注释的55 088个Unigene(Shi et al., 2011)。在此基础上采用本课题组此前的方法(Xiang et al., 2013), 将转录组中可能为萜类合成酶的Unigene, 与已知功能的植物萜类合成酶序列进行蛋白质水平上的多重比对(Clastal W, Version 1.83), 对具备保守结构域的Unigene, 推定为萜类合成酶基因。

### 1.4 RNA提取及cDNA的合成

茶树各组织总RNA用RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa)并按使用说明提取。RNA样品经DNase I酶(TaKaRa)处理以去除基因组残留DNA。RNA浓度用NanoDrop 2000超微量分光光度计(Thermo)测定。RNA的完整性通过1%琼脂糖凝胶电泳检测。cDNA第一链合成使用PrimeScript RT reagent Kit

(TaKaRa) 并按说明书进行。

### 1.5 实时荧光定量 PCR

以反转录产物为模板，用基因专一性引物（表 1）进行相关基因的转录子的定量分析。荧光定量 PCR 用 TransStart Top Green qPCR Mix 试剂盒（TransGen）并按其说明书配制反应体系，使用 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad）。反应条件如下：95 ℃ 先预变性 30 s；然后 95 ℃ 变性 5 s，55 ℃ 退火 25 s，72 ℃ 延伸 20 s，进行 40 个循环；最后 72 ℃ 延伸 5 min。数据读取由 PCR 仪自动完成，供试基因的扩增效率均在 85% 以上。内参基因为 *CsGAPDH*（孙美莲 等，2010）。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算基因表达水平。3 次技术重复。

表 1 用于茶树萜类合成酶基因表达的定量 PCR 引物  
Table 1 Primers used for quantifying transcript levels of terpenoid synthase genes in tea

基因名称 Gene name	引物 Primer	序列 Sequence	产物大小/bp Product size
甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 <i>GAPDH</i>	CsGAPDH-F	5'-ttggcatcgttgagggtct-3'	206
	CsGAPDH-R	5'-cagtgggaacacggaagc-3'	
法尼烯合成酶基因 <i>Farnesene synthase</i>	CsFAS-F	5'-taatgctctattcttaggtcc-3'	226
	CsFAS-R	5'-tgaattggatattcttcagaat-3'	
大根香叶烯合成酶基因 <i>Germacrene synthase</i>	CsGES-F	5'-agtggagaaagatgttagtggcag-3'	217
	CsGES-R	5'-tcctgtgttctaagtaaccgaa-3'	
柠檬烯合成酶基因 <i>Limonene synthase</i>	CsLIM-F	5'-aacactaccttgggtgctctg-3'	211
	CsLIM-R	5'-aggcatgtccttatattgttg-3'	
罗勒烯合成酶基因 <i>Ocimene synthase</i>	CsOCS-F	5'-cttctgttcagttgaatggtc-3'	205
	CsOCS-R	5'-gaagcatagttcaggcagctct-3'	
香叶烯合成酶基因 <i>Myrcene synthase</i>	CsMYS-F	5'-acgatgggaattcaaac-3'	233
	CsMYS-R	5'-agacctagtcattgccattgt-3'	
水芹烯合成酶基因 <i>Phellandrene synthase</i>	CsPHS-F	5'-ctaaaaatctcaagaaaacctca-3'	220
	CsPHS-R	5'-tcagatctcttgtaagtgtt-3'	
萜品醇合成酶基因 <i>Terpineol synthase</i>	CsTES-F	5'-atctgcgaactaccaacctcc-3'	209
	CsTES-R	5'-ccttgaagtatagaacctcca-3'	
芳樟醇/橙花叔醇合成酶基因 <i>Linalool/Nerolidol synthase</i>	CsLIS/NES-F	5'-tgaagttcgctagagaccaacctctaa-3'	210
	CsLIS/NES-R	5'-tccacagcaccaagttcccatcta-3'	
橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因 <i>Nerolidol/Geranyl linalool synthase</i>	CsNES/GLS-F	5'-attcttaaaatggacgggct-3'	226
	CsNES/GLS-R	5'-tgaggacatcttgaacaag-3'	
芳樟醇合成酶基因 <i>Linalool synthase</i>	CsLIS-F	5'-cagcacaacgaaatttct-3'	226
	CsLIS-R	5'-cattccatgacccaagagaa-3'	

### 1.6 茉莉酸甲酯处理茶苗

选择在人工气候室（温度 25 ℃，湿度 50%）培养 90 d、生长一致的‘农抗旱’茶籽苗，使用浓度  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MeJA[溶解在 0.05% 二甲基亚砷（DMSO）中]充分喷施茶树叶片，对照组用 0.05% DMSO 溶液处理，6 h 后取样置于 -80 ℃ 备用。分别提取处理组和对照组茶苗叶片 RNA，反转录成 cDNA 后，进行实时荧光定量 PCR 检测。

在前期试验中发现，供试各萜类合成酶基因以及内参基因在实生茶苗群体中的表达变异与在扦插苗群体的相比没有显著差异。因此为了便于操作和减少室外环境的不稳定性，选择了室内种植的茶籽苗进行试验。

2 结果与分析

2.1 不同发育阶段叶片中萜类香气物质代谢谱的时空变化

在‘农抗早’不同发育阶段的鲜叶中检测到 7 种挥发性萜类化合物：芳樟醇、顺式 - 呋喃型芳樟醇氧化物、反式 - 呋喃型芳樟醇氧化物、β - 蒎烯、D - 柠檬烯、反式 - β - 罗勒烯和 β - 罗勒烯（表 2）。叶片发育程度不同，萜类化合物的含量随之发生变化。成熟度越高，含量越少。各化合物的糖苷态含量较为稳定，除第 3 叶的糖苷态 D - 柠檬烯稍高于第 1 叶的外，其他化合物的糖苷态均是第 1 叶最高，第 5 叶最低。而游离态化合物含量变化较大，β - 蒎烯和 D - 柠檬烯游离态化合物含量变化一致，随叶片发育程度的增加而降，反式 - β - 罗勒烯和 β - 罗勒烯游离态化合物含量表现出相同的趋势，第 1 叶最高，第 3 叶降低，第 5 叶检测不到。而游离态和糖苷态的芳樟醇均主要存在于第 1 叶，其他叶片仅含少量糖苷态芳樟醇而无游离态芳樟醇及其氧化产物。茶树叶片中萜类化合物含量整体表现为幼叶中多、老叶中少，糖苷态多、游离态少。萜类化合物总量也因此表现出幼叶多、老叶少的趋势。

表 2 茶树叶片中萜类化合物及其含量  
Table 2 Abundance of volatile terpenoid compounds in tea leaves (μg · g<sup>-1</sup>)

样品 Sample	化合物 Compound	游离态挥发性化合物含量 Free	糖苷态化合物含量 Glycosidically bound	萜类化合物总量 Total
第 1 叶 First leaf	β - 蒎烯 β-pinene	0.24 ± 0.137	0.32 ± 0.141	0.56 ± 0.249
	D - 柠檬烯 D-limonene	0.13 ± 0.056	0.10 ± 0.049	0.23 ± 0.105
	反式 - β - 罗勒烯 trans-β-ocimene	0.08 ± 0.033	0.07 ± 0.037	0.15 ± 0.067
	β - 罗勒烯 β-ocimene	0.12 ± 0.085	0.12 ± 0.089	0.24 ± 0.163
	反式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 trans-furanoid linalool oxide	-	0.10 ± 0.002	0.10 ± 0.002
	顺式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 cis-furanoid linalool oxide	0.05 ± 0.023	0.09 ± 0.056	0.14 ± 0.076
	芳樟醇 Linalool	0.08 ± 0.058	0.31 ± 0.200	0.39 ± 0.250
	β - 蒎烯 β-pinene	0.02 ± 0.002	0.20 ± 0.157	0.22 ± 0.159
第 3 叶 Third leaf	D - 柠檬烯 D-limonene	0.02 ± 0.001	0.11 ± 0.053	0.13 ± 0.053
	反式 - β - 罗勒烯 trans-β-ocimene	0.04 ± 0.023	0.03 ± 0.021	0.07 ± 0.043
	β - 罗勒烯 β-ocimene	-	0.09 ± 0.071	0.09 ± 0.071
	反式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 trans-furanoid linalool oxide	-	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.001
	顺式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 cis-furanoid linalool oxide	-	0.04 ± 0.019	0.04 ± 0.019
	芳樟醇 Linalool	-	0.03 ± 0.030	0.03 ± 0.030
	β - 蒎烯 β-pinene	0.08 ± 0.001	-	0.08 ± 0.001
	D - 柠檬烯 D-limonene	0.07 ± 0.001	-	0.07 ± 0.001
第 5 叶 Fifth leaf	反式 - β - 罗勒烯 trans-β-ocimene	-	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.006
	β - 罗勒烯 β-ocimene	-	0.04 ± 0.009	0.04 ± 0.009
	反式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 trans-furanoid linalool oxide	-	-	-
	顺式 - 呋喃型芳樟醇氧化物 cis-furanoid linalool oxide	-	0.02 ± 0.016	0.02 ± 0.016
	芳樟醇 Linalool	-	0.03 ± 0.006	0.03 ± 0.006
	β - 蒎烯 β-pinene	-	-	-
	D - 柠檬烯 D-limonene	-	-	-
	反式 - β - 罗勒烯 trans-β-ocimene	-	-	-

2.2 茶树单萜和倍半萜合成酶基因的挖掘

对初步注释的茶树转录组数据库（Shi et al., 2011）进行了筛选，得到 28 个可能的萜类合成酶基因序列，经 BLASTX 分析，确定了源自同一转录子的重叠序列，再经与已发表并已知功能的植物萜类合成酶蛋白质序列进行多重比较，认定了 10 个茶树萜类合成酶基因（表 3）。其中，6 个单萜合成酶基因：芳樟醇合成酶基因、(E)-β-罗勒烯合成酶基因、香叶烯合成酶基因、(R)-柠檬烯合成酶基因、(-)-α-萜品醇合成酶基因和(+)-α-水芹烯合成酶基因；2 个倍半萜合成酶基因：大根香叶烯合成酶基因和(E,E)-α-法尼烯合成酶基因；1 个单萜/倍半萜合成酶基因：(3S)-芳樟醇/(E)-橙花叔醇合成酶基因；1 个倍半萜/二萜合成酶基因：(E)-橙花叔醇/(E,E)-香叶基芳樟醇合成酶基因。这些基因序列在氨基酸水平上的大小和位置如图 2 所示。

表 3 转录组中茶树萜类合成酶基因  
Table 3 The genes coding for terpene syntheses found in tea transcriptome data

基因类别 Gene type	相似度最高基因及登录号 Homologue gene and accession	序列/bp Size	E 值 E value	覆盖度/% Query coverage	相似度/% Identity
倍半萜合成酶 Sesquiterpene synthase	大根香叶烯合成酶基因	210	6e-26	98	74
	Germacrene D synthase[ <i>Camellia sinensis</i> ]	293	1e-23	58	89
	AFE56211.1	701	3e-84	73	74
		916	1e-85	64	82
		933	0	96	93
		576	2e-96	96	76
	(E,E)-α-法尼烯合成酶基因	424	2e-34	76	57
	(E,E)-α-farnesene synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ]	878	5e-62	99	47
	XP_002264134.2	1 044	6e-120	88	63
		306	5e-35	99	63
单萜/倍半萜双合成酶 Monoterpene/ sesquiterpene synthase	(3S)-芳樟醇/(E)-橙花叔醇合成酶基因 (3S)-linalool/(E)-nerolidol synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ] AEY82696.1				
倍半萜/二萜双合成酶 Sesquiterpene/diterpene synthase	(E)-橙花叔醇/(E,E)-香叶基芳樟醇合成酶基因 (E)-nerolidol/(E,E)-geranyl linalool synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ] P_001268004.1	2 148	0	95	62
单萜合成酶 Monoterpene synthase	芳樟醇合成酶基因	1 345	0	82	70
	Linalool synthase[ <i>Actinidia arguta</i> ]	1 906	0	87	71
	ADD81294.1				
	(E)-β-罗勒烯合成酶基因	443	1e-76	98	78
	(E)-β-ocimene synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ]	455	1e-3	63	66
	ADR74204.1	765	2e-103	99	63
		207	2e-23	98	66
	香叶烯合成酶基因	871	6e-124	75	81
	Myrcene synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ]	342	5e-26	62	72
	XP_002266808.1	1 059	6e-102	83	55
		300	2e-33	80	76
		246	2e-19	98	56
		248	6e-35	99	72
	(R)-柠檬烯合成酶基因				
	(R)-limonene synthase[ <i>Ricinus communis</i> ]	1 293	3e-142	98	74
	XP_002515689.1				
	(-)-α-萜品醇合成酶基因	460	4e-51	69	78
	(-)-α-terpineol synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ]	327	3e-27	70	61
	NP_001268216.1	902	1e-30	14	50
		354	3e-40	32	61
	(+)-α-水芹烯合成酶基因				
	(+)-α-phellandrene synthase[ <i>Vitis vinifera</i> ] ADR74201.1				

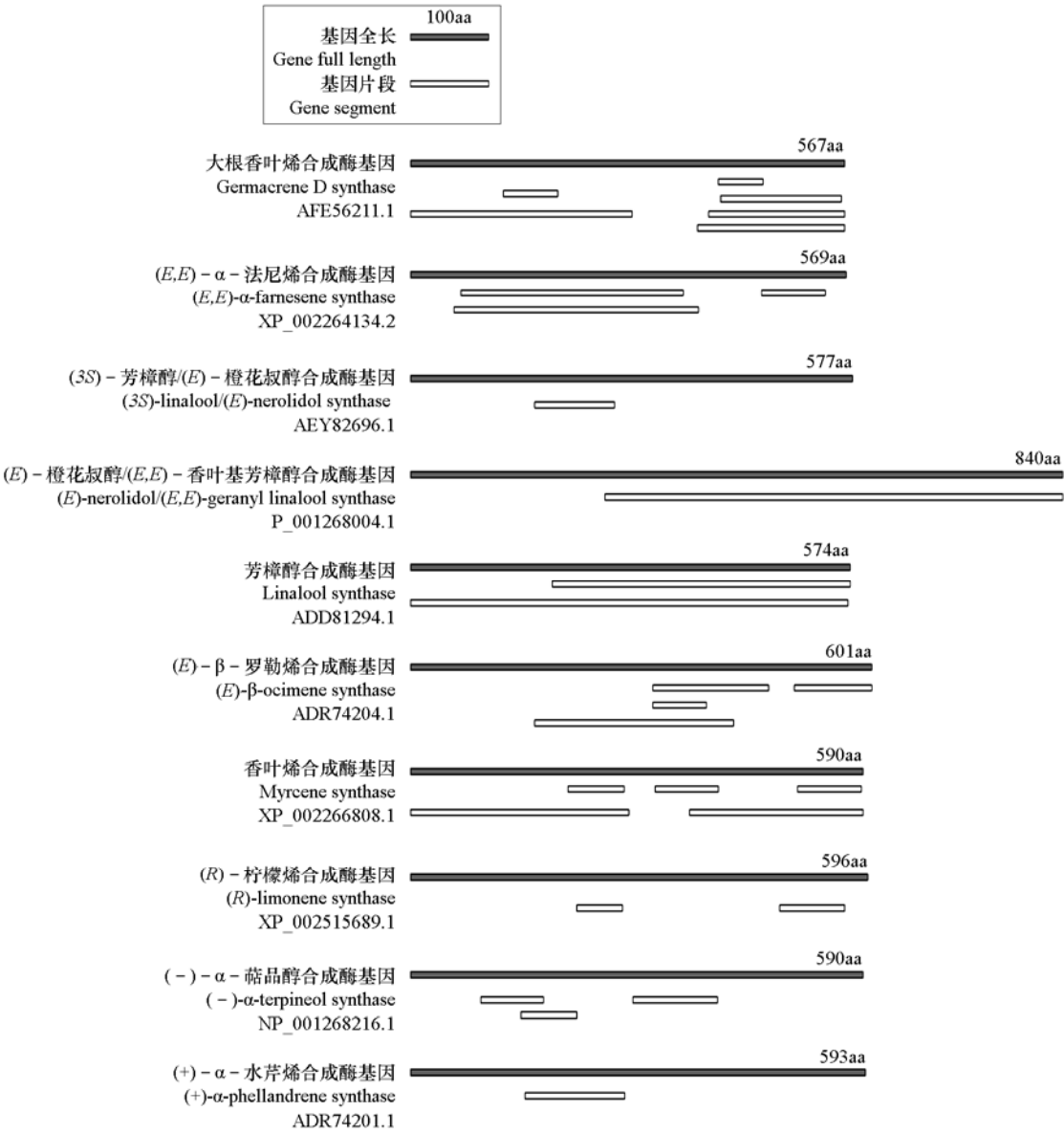


图 2 茶树萜类合成酶基因序列比对图

Fig. 2 Schematic demonstration of TPS gene segments found from transcriptomic data in *Camellia sinensis*

2.3 茶树叶片和花器官中单萜和倍半萜合成酶基因表达谱的时空变化

在茶树叶片中，设定第 1 叶中  $\alpha$ -法尼烯合成酶基因（*CsFAS*）的表达水平为对照 1，以此计算其他基因的相对转录水平（ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ）。图 3 显示，各基因的表达水平有较大差别，香叶烯合成酶基因（*CsMYS*）和  $\alpha$ -水芹烯合成酶基因（*CsPHS*）的表达均低于本研究的检测下限，而芳樟醇合成酶基因（*CsLIS*）的表达水平在供试叶片中均有较高水平。在第 1 叶中，大根香叶烯合成酶基因（*CsGES*）和芳樟醇合成酶基因（*CsLIS*）的表达水平远高于其他基因，二者的表达水平均在对照的 200 倍以上；在第 3 叶中， $\alpha$ -萜品醇合成酶基因（*CsTES*）、橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因（*CsNES/GLS*）和芳樟醇合成酶基因（*CsLIS*）的表达水平均在对照的 70 倍以上；在第 5 叶中，各基因的表达水平普遍降低， $\alpha$ -萜品醇合成酶基因（*CsTES*）和芳樟醇合成酶基因（*CsLIS*）的表达高于其他基因，为对照基因的 60 倍以上， $\alpha$ -法尼烯合成酶基因（*CsFAS*）、柠檬烯合成酶基因（*CsLIM*）

和  $\beta$ -罗勒烯合成酶基因 (*CsOCS*) 的表达却几乎检测不到。

$\alpha$ -萜品醇合成酶基因 (*CsTES*) 和橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因 (*CsNES/GLS*) 在第 3 叶中表达水平最高, 且第 5 叶高于第 1 叶; 而  $\alpha$ -法尼烯合成酶基因 (*CsFAS*) 在第 1 叶和第 3 叶中表达水平基本不变, 在第 5 叶中最低。其余 5 个基因均在第 1 叶中的表达水平最高。其中, 柠檬烯合成酶基因 (*CsLIM*)、 $\beta$ -罗勒烯合成酶基因 (*CsOCS*) 和芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 的表达水平呈现相同的变化规律, 表现为第 1 叶中表达水平最高, 随后逐渐降低; 大根香叶烯合成酶基因 (*CsGES*) 和芳樟醇/橙花叔醇合成酶基因 (*CsLIS/NES*) 的表达也具有一致性, 均在第 1 叶中表达水平最高, 第 3 叶中最低, 第 5 叶有所回升。

茶苗叶片经 MeJA 处理后 (图 4), 依旧检测不到香叶烯合成酶基因 (*CsMYS*) 和  $\alpha$ -水芹烯合成酶基因 (*CsPHS*) 的表达, 同时  $\alpha$ -萜品醇合成酶基因 (*CsTES*) 和橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因 (*CsNES/GLS*) 的表达与对照组 (0.05% DMSO 处理, 设为 1) 相比基本无变化, 而其余 6 个基因均有不同程度升高, 其中芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 和大根香叶烯合成酶基因 (*CsGES*) 的升高尤为明显, 分别为对照组的 31 倍和 28 倍。

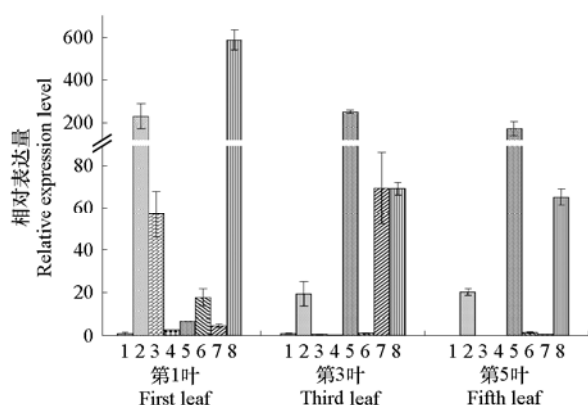


图 3 茶树叶片不同发育阶段萜类合成酶基因定量分析

Fig. 3 Quantitative analysis of the TPS genes in tea leaves at different developmental stages

1: *CsFAS*; 2: *CsGES*; 3: *CsLIM*; 4: *CsOCS*; 5: *CsTES*;  
6: *CsLIS/NES*; 7: *CsNES/GLS*; 8: *CsLIS*.

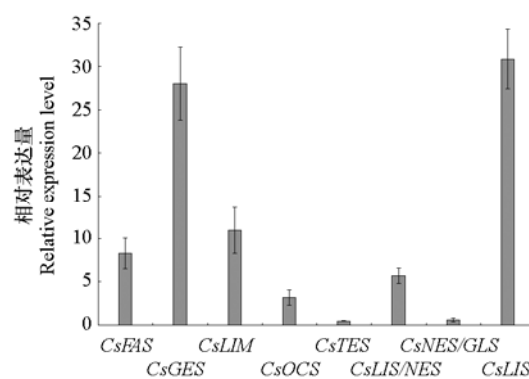


图 4 MeJA 处理后茶树叶片萜类合成酶基因表达情况

Fig. 4 Expression levels of the TPS genes in tea leaves after MeJA treatment

对茶树花 3 个部位不同发育时期各基因表达水平进行定量分析, 结果表明, 仅有 5 种萜类合成酶基因表达, 其中雌蕊中 4 种、雄蕊中 3 种、花瓣中 5 种 (图 5)。以第 1 阶段雌蕊中芳樟醇/橙花叔醇合成酶基因 (*CsLIS/NES*) 表达水平为对照 1 计算  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值。

结果显示, 大根香叶烯合成酶基因 (*CsGES*)、芳樟醇/橙花叔醇合成酶基因 (*CsLIS/NES*) 和芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 在茶树花 3 个部位均有表达, 且芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 的表达一直处于较高水平, 在第 2 阶段雄蕊中的表达水平是对照的 160 倍; 橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因 (*CsNES/GLS*) 仅在茶树花雌蕊和花瓣中少量表达, 且在雌蕊中的表达水平高于花瓣; 而香叶烯合成酶基因 (*CsMYS*) 仅在茶树花第 4 阶段花瓣中特异性表达, 在其他花器官和叶片中均无表达。在雌蕊和雄蕊中, 大根香叶烯合成酶基因 (*CsGES*) 和芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 的表达水平远远高于其他基因, 并都在第 2 阶段表达最高。



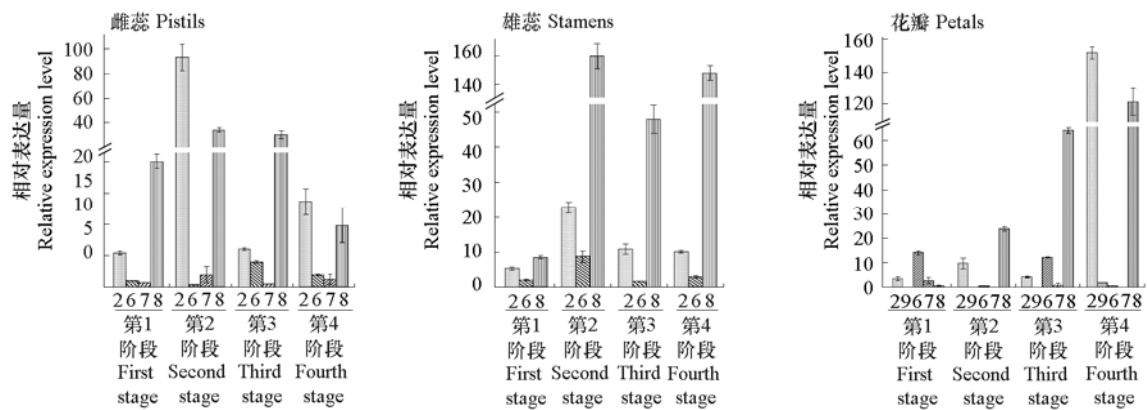


图5 茶树花中萜类合成酶基因的表达

Fig. 5 Transcript levels of TPS genes in tea flowers at the different stages

2: *CsGES*; 6: *CsLIS/NES*; 7: *CsNES/GLS*; 8: *CsLIS*; 9: *CsMYS*.

## 2.4 茶树叶片萜类香气物质代谢谱与相关基因表达谱时空变化的关系

对茶树叶片萜类化合物代谢谱和相关基因表达谱的时空变化进行了对比, 结果显示, 基因的时空表达与萜类化合物总量的时空变化呈现明显的正相关 (图 6)。在茶鲜叶中, D-柠檬烯的总量、反式- $\beta$ -罗勒烯和 $\beta$ -罗勒烯的总量、芳樟醇及其两种氧化产物的总量呈现相同的变化趋势, 均表现为在第 1 叶中最高, 随后逐渐降低。这与柠檬烯合成酶基因 (*CsLIM*)、 $\beta$ -罗勒烯合成酶基因 (*CsOCS*) 和芳樟醇合成酶基因 (*CsLIS*) 的定量 PCR 分析的结果一致。

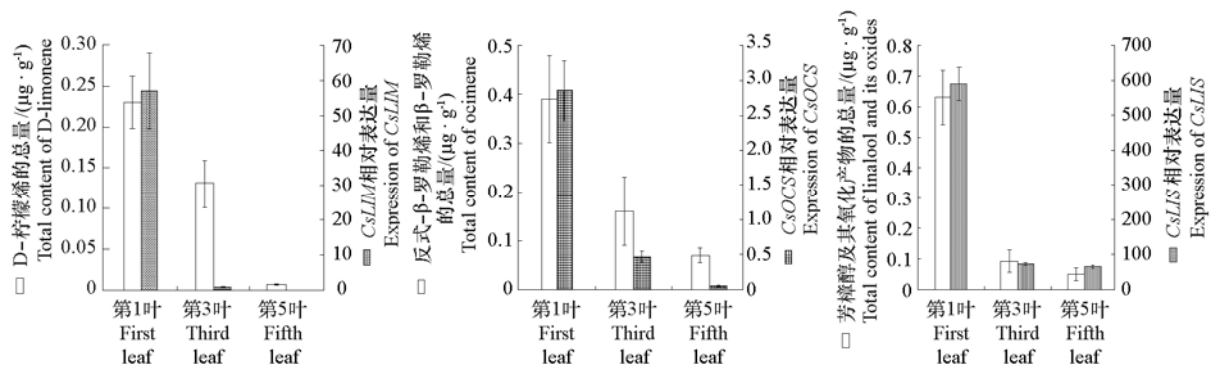


图6 茶树叶片中萜类香气物质代谢谱与相关基因表达谱时空变化的关系

Fig. 6 Correlation between the spatiotemporal changes in metabolic profile of main volatile terpenoid compounds and the expression profile of the relevant terpenoid synthase genes in tea leaves

## 3 讨论

### 3.1 茶树中单萜和倍半萜合成酶基因的挖掘

已有的研究表明, 拟南芥、水稻和葡萄具有功能的 TPS 基因数分别为 32、34 和 69 (Chen et al., 2011), 其中和萜类香气物质有关的多为单萜和倍半萜合成酶基因。拟南芥有 5 个功能已知的单萜合成酶基因、6 个倍半萜合成酶基因、2 个单萜/倍半萜双功能合成酶基因 (Acosta & Farmer, 2010); 葡萄有 10 个功能已知的单萜合成酶基因、18 个倍半萜合成酶基因、5 个单萜/倍半萜双功能合成酶基因、2 个倍半萜/二萜双功能合成酶基因、4 个单萜/倍半萜/二萜三功能合成酶基因 (Martin et al., 2010)。

有研究报道, 大多数植物 TPS 为多产物酶, 可催化同一底物生成多种产物, 这与其催化底物形成碳阳离子中间体的化学键可以随机重组有关 (Ogura & Koyama, 1998; Steele et al., 1998; Christianson, 2006)。根据生成产物的多寡又分为两种类型: 一是以一种产物为主, 如拟南芥的 1,8 - 桉叶素合成酶 (Chen et al., 2004), 挪威云杉的长叶松萜烯合成酶 (Martin et al., 2004), 分别主要生产 1,8 - 桉叶素和长叶松萜烯等; 另一种则是多种产物量基本相等, 如拟南芥的 *AtTPS24* (At3g25810) 以 GPP 为底物, 可催化生成 8 种单萜, 如  $\alpha$  - 蒎烯、香桉烯、(E) -  $\beta$  - 罗勒烯等 (Chen et al., 2003)。拟南芥 *AtTPS11* (At5g44630) 以 FPP 为底物时可生成多达 14 种倍半萜产物 (Tholl et al., 2005)。已有的研究表明, 植物中的单萜/倍半萜和倍半萜/二萜双功能合成酶可同时具有双重功能, 如草莓的 *FaNES1*, 在质体中以 GPP 为底物产生芳樟醇, 在细胞质中以 FPP 为底物产生橙花叔醇 (Aharoni et al., 2003), 葡萄中 *VvCSEnerGl* 和 *VvPNEnerGl* 两个基因是橙花叔醇/香叶基芳樟醇双功能合成酶基因, 二者均可以 FPP 为底物产生 (E) - 橙花叔醇, 以 GGPP 为底物产生 (E,E) - 香叶基芳樟醇 (Martin et al., 2010)。

本研究中以 RNA-seq 深度测序所获得的茶树转录组数据为基础, 运用生物信息学方法, 获得 28 条茶树单萜和倍半萜基因序列, 经过 NCBI 在线软件 BLASTX 比对分析, 发现这些基因序列分别与其他物种的 10 个 TPS 基因具有较高的相似度和覆盖度 (表 3)。进一步对上述基因编码的蛋白质序列进行功能性比对分析, 发现了 6 个不同的单萜合成酶基因和两个倍半萜合成酶基因。此外, 还发现了两个双功能合成酶基因。本研究中发现的茶树挥发性萜类合成酶基因是基于与已知功能的植物萜类合成酶同源基因序列的分析, 具有较高的序列比对跨度和相似度 (大多大于 60%)。但这些基因的化学功能仍需后续试验逐一验证。

### 3.2 茶树中萜类合成酶基因表达谱的时空变化及其与挥发性萜类化合物代谢谱的关系

已有的研究表明, 植物挥发性萜类物质的生物合成和释放普遍具有组织器官、发育阶段和昼夜节奏变化的特点 (Chen et al., 2003; Dudareva & Pichersky, 2006)。拟南芥的花所释放的挥发性萜类物质主要是 (E) -  $\beta$  - 石竹烯等 20 余种倍半萜和少数单萜 (Chen et al., 2003; Tholl et al., 2005)。此外, 拟南芥花中 TPS 基因的表达也限于花粉、萼片和柱头等器官, 花瓣中无明显表达, 具有高度组织特异性 (Chen et al., 2003; Tholl et al., 2005; Huang et al., 2010); 而在金鱼草中, 只有花瓣中有单萜合成酶基因的表达, 叶片和其他花器官均无表达 (Dudareva et al., 2003)。

本试验中通过实时荧光定量 PCR 分析茶树叶片和花中 TPS 基因的表达, 发现这 10 个 TPS 基因除香叶烯合成酶和  $\alpha$  - 水芹烯合成酶基因外, 均在茶鲜叶中有表达, 而茶树花雌蕊、雄蕊和花瓣则分别仅有 4、3 和 5 个基因表达, 其中香叶烯合成酶基因仅在第 4 阶段茶树花花瓣中有表达, 表现出明显的组织特异性。 $\alpha$  - 萜品醇合成酶基因和橙花叔醇/香叶基芳樟醇合成酶基因在中等发育叶片 (第 3 叶) 中的表达水平最高, 并且不受 MeJA 的诱导, 与其他基因的调控机制不同。

茶树叶片经 GC - MS 分析, 共检测到 7 种萜类化合物, 大部分以糖苷态形式存在, 且糖苷态化合物总量与游离态化合物总量相比较为稳定。前人研究已证实, 植物中萜类香气物质易与糖分子结合, 多形成糖苷态香气前体物质储存 (Wang et al., 2000), 还有一些萜类物质易被氧化生成氧化产物释放和储存 (Luan et al., 2006)。茶树叶片中 TPS 基因的表达高低与萜类化合物的总含量呈现出一定的正相关: 鲜叶中柠檬烯合成酶基因、 $\beta$  - 罗勒烯合成酶基因和芳樟醇合成酶基因的表达与这 3 种化合物及其氧化产物的游离态和糖苷态总量均呈现出第 1 叶中最高, 随后逐渐降低的趋势。芳樟醇合成酶基因在各阶段叶片中的表达均处于较高水平, 但仅在第 1 叶中检测到少量游离态芳樟醇, 大部分的芳樟醇以糖苷态和氧化物的形式存在, 因此, 茶树 TPS 基因的表达影响萜类化合物及其氧化产物的总含量。本试验中并未发现蒎烯合成酶基因, 但其含量却很高 (第 1 叶中总含量为 0.56

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 这可能是因为萜类合成酶的多产物特性, 试验中也证实其含量趋势与单萜合成酶基因的整体表达趋势相同。而用同样的方法在茶树花各部位均检测到大量释放的苯乙酮, 其宽大的色谱峰可能覆盖了一些与其流出时间相近的挥发性萜类物质的色谱峰。因此, 后续研究茶树花中萜类合成酶基因与萜类物质的相关性, 需进一步研究高效色谱分离技术。

### 3.3 茉莉酸甲酯处理对茶树叶片萜类合成酶基因和挥发性萜类化合物的影响

植物许多生物学过程以及逆境诱导的生物学反应都有茉莉酸(JA)和脱落酸(ABA)等参与并主导。由茉莉酸途径产生的茉莉酸和茉莉酸甲酯(MeJA)等信号物质, 通过复杂的信号传导途径(Devoto & Turner, 2005; Acosta & Farmer, 2010; Kazan & John, 2013), 发挥调节植物生殖生长(花和种子)(Claus et al., 2013)以及抵御逆境胁迫等重要作用(Devoto & Turner, 2005; Nathan et al., 2012)。本研究中利用外源 MeJA 处理茶苗叶片, 以未处理的茶苗叶片为对照组。定量结果显示, 有 6 个 TPS 基因的表达水平有不同程度的升高, 其中大根香叶烯合成酶基因和芳樟醇合成酶基因的表达水平分别为对照组的 28 倍和 31 倍。

其他研究表明, 非生物胁迫和生物胁迫对茶树香气物质的含量均有影响, 如低温、紫外照射和干旱会使茶鲜叶中储存态萜类化合物明显提高(曹藩荣等, 2006, 曹潘荣等, 2006; Jang et al., 2010); ‘东方美人’乌龙茶, 因叶片被小绿叶蝉取食而导致芳樟醇及其氧化产物等化合物的升高而具有与众不同的香气品质(Cho et al., 2007)。本研究结果显示, 茉莉酸作为逆境信号物质有可能在高香茶的生产中替代生物逆境和非生物逆境的处理, 而起到增进茶叶香气品质的作用。

综上所述, 本研究发现了 10 个茶树重要挥发性萜类生物合成酶基因及其表达谱的时空变化特性, 以及萜类香气物质代谢谱的相关性。同时, MeJA 作为信号物质可诱导一些植物 TPS 基因的表达(Nathan et al., 2012)。为了更好的研究茶树萜类合成酶基因的功能, 今后还需克隆相关萜类合成酶基因, 并对其功能和启动子进行深入研究。本工作为进一步研究茶树萜类香气物质生物合成的机理打下基础, 同时为提高成品茶香气品质提供了新的途径。

## References

- Acosta I F, Farmer E E. 2010. Jasmonates. *Arabidopsis Book*, 8: e0129.
- Aharoni A, Giri A P, Deurlein S, Griepink F. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis plants*. *Plant Cell*, 5 (12): 2866 - 2884.
- Arjan G, Matias M I, Johan M, Robert H, Robert V. 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (5): 3051 - 3056.
- Cao Fan-rong, Liu Ke-bin, Liu Chun-yan, Wang Deng-liang. 2006. Studies on the induction of aromatic constituents in fresh leaves of Lingtou Dancong tea by low temperature stress. *Journal of Tea Science*, 26 (2): 136 - 140. (in Chinese)
- 曹藩荣, 刘克斌, 刘春燕, 王登良. 2006. 适度低温胁迫诱导岭头单枞香气形成的研究. *茶叶科学*, 26 (2): 136 - 140.
- Cao Pan-rong, Liu Chun-yan, Liu Ke-bin, Yu Xiong-hui. 2006. Aromatic constituents in fresh leaves of Lingtou Dancong tea as induced by drought stress. *Journal of South China Agricultural University*, 27 (1): 17 - 20. (in Chinese)
- 曹潘荣, 刘春燕, 刘克斌, 余雄辉. 2006. 水分胁迫诱导岭头单枞茶香气的形成研究. *华南农业大学学报*, 27 (1): 17 - 20.
- Chen F, Ro DK, Petri J, Gershenzon J, Bohlmann J, Pichersky E, Tholl D. 2004. Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiology*, 135 (4): 1956 - 1966.
- Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant Journal*, 66 (1): 212 - 229.
- Chen F, Tholl D, D'Auria J C, Farooq A, Pichersky E, Gershenzon J. 2003. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell*, 15 (2): 481 - 494.

- Cho J Y, Mizutani M, Shimizu B. 2007. Chemical profiling and gene expression profiling during the manufacturing process of Taiwan oolong tea "Oriental Beauty". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71 (6): 1476 - 1486.
- Christianson D W. 2006. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical Reviews*, 106 (8): 3412 - 3442.
- Claus W, Susanne F, Miroslav S, Bettina H. 2013. Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie*, 95 (1): 79 - 85.
- Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70: 1621 - 1637.
- Devoto A, Turner J G. 2005. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiologia Plantarum*, 123 (2): 161 - 172.
- Dong F, Yang Z, Baldermann S, Sato Y, Asai T, Watanabe N. 2011. Herbivore-induced volatiles from tea (*Camellia sinensis*) plants and their involvement in intraplant communication and changes in endogenous nonvolatile metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (24): 13131 - 13135.
- Dudareva N, Martin D, Kish C M, Kolosova N, Gorenstein N, Fäldt J, Miller B, Bohlmann J. 2003. (*E*)- $\beta$ -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell*, 15 (5): 1227 - 1241.
- Dudareva N, Pichersky E. 2006. Floral scent metabolic pathways: Their regulation and evolution//Dudareva N, Pichersky E. *Biology of Floral Scent*. Boca Raton: CRC Press: 55 - 78.
- Gohain B, Borchetia S, Bhorali P, Agarwal N, Bhuyan L P, Rahman A, Sakata K, Mizutani M, Shimizu B, Gurusubramaniam G, Ravindranath R, Kalita M C, Hazarika M, Das S. 2012. Understanding darjeeling tea flavour on a molecular basis. *Plant Molecular Biology*, 78 (6): 577 - 597.
- Gu Ya-ping, Qian He. 2008. Analysis and microencapsulation of the essential oil from the flowers of *Camellia sinensis*. *Food Research and Development*, 29 (1): 187 - 190. (in Chinese)
- 顾亚萍, 钱 和. 2008. 茶树花香气成分研究及其香精的制备. *食品研究与开发*, 29 (1): 187 - 190.
- Gui Lian-you. 2004. The induction and mechanism of exogenous methyl jasmonate on tea plant and insect resistance [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 桂连友. 2004. 外源茉莉酸甲酯对茶树抗虫作用的诱导及其机理 [博士论文]. 杭州: 浙江大学.
- He Zhi-rong, Xiang Wei, Xu Yan, Gao Li-ping, Xia Tao, Wei Shu. 2012. Progress in the research of biosynthesis of volatile terpenoids and their glycosides in tea plant. *Journal of Tea Science*, 32 (1): 259 - 262. (in Chinese)
- 贺志荣, 项 威, 徐 燕, 高丽萍, 夏 涛, 魏 书. 2012. 茶树挥发性萜类物质及其糖苷化合物生物合成的研究进展. *茶叶科学*, 32 (1): 259 - 262.
- Huang M, Abel C, Sohrabi R, Petri J, Haupt I, Cosimano J, Gershenzon J, Tholl D. 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiology*, 153: 1293 - 1310.
- Izaguirre M M, Scopel A L, Baldwin I T, Ballaré C L. 2003. Convergent responses to stress. solar ultraviolet-B radiation and manduca sexta herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology*, 132 (4): 1755 - 1767.
- Jang J, Yang Y C, Zhang G H, Chen H, Lu J L, Du Y Y, Ye J H, Ye Q, Borthakur D, Zheng X Q, Liang Y R. 2010. Effect of ultra-violet B on release of volatiles in tea leaf. *International Journal of Food Properties*, 13 (3): 608 - 617.
- Joshi R, Poonam, Saini R, Guleria S, Babu G D, Kumari M, Gulati A. 2011. Characterization of volatile components of tea flowers (*Camellia sinensis*) growing in Kangra by GC/MS. *Natural Product Communications*, 6 (8): 1155 - 1158.
- Kazan K, John M M. 2013. MYC2: The master in action. *Molecular Plant*, 6 (3): 686 - 703.
- Luan F, Mosand A, Degenhardt A, Gubesch M, Wust M. 2006. Metabolism of linalool and substrate analogs in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Morio Muscat: Demonstration of stereoselective oxygenation and glycosylation. *Analytica Chimica Acta*, 563: 353 - 364.
- Martin D M, Aubourg S, Schouwey M B, Daviet L, Schalk M, Toub O, Lund S T, Bohlmann J. 2010. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *Journal of Medical Humanities*, (10): 226.
- Martin D M, Fäldt J, Bohlmann J. 2004. Functional characterization of nine norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiology*, 135 (4): 1908 - 1927.

- Nathan D G, Azra G, Sofie G, Alain G. 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17 (6): 349 – 359.
- Ogura K, Koyama T. 1998. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chemical Reviews*, 98 (4): 1263 – 1276.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahm H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal*, 295: 517 – 524.
- Schieberle P. 1995. Recent developments in method for analysis of flavor compounds and their precursors//Goankar A. *Characterization of Food: Emerging methods*. Amsterdam: Elsevier: 403 – 431.
- Schuh C, Schieberle P. 2006. Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea quantitative differences between tea leaves and infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (3): 916 – 924.
- Shi C Y, Yang H, Wei C L, Yu O, Zhang Z Z, Jiang C J, Sun J, Li Y Y, Chen Q, Xia T, Wan X C. 2011. Deep sequencing of the *Camellia sinensis* transcriptome revealed candidate genes for major metabolic pathways of tea-specific compounds. *BMC Genomics*, 12: 131.
- Shi Meng-nan, Gong Shu-ying. 2012. Research progress on tea aroma. *Journal of Tea*, 38 (1): 19 – 23. (in Chinese)
- 施梦南, 龚淑英. 2012. 茶叶香气研究进展. *茶叶*, 38 (1): 19 – 23.
- Steele C L, Crock J, Bohlmann J, Croteau R. 1998. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (4): 2078 – 2089.
- Sun Mei-lian, Wang Yun-sheng, Yang Dong-qing, Wei Chao-ling, Gao Li-ping, Xia Tao, Shan Yu, Luo Yang. 2010. Reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR in *Camellia sinensis*. *Bulletin of Botany*, 45 (5): 579 – 587. (in Chinese)
- 孙美莲, 王云生, 杨冬青, 韦朝领, 高丽萍, 夏涛, 单育, 骆洋. 2010. 茶树实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的选择. *植物学报*, 45 (5): 579 – 587.
- Tholl D, Chen F, Petri J, Gershenzon J, Pichersky E. 2005. Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Plant Journal*, 42 (5): 757 – 771.
- Wang D, Yoshimura T, Kubota K, Kobayashi A. 2000. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves 1. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglycons as aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (11): 5411 – 5418.
- Wei S, Marton I, Dekel M, Shalitin D, Lewinsohn E, Bravdo B A, Shoseyov O. 2004. Manipulating volatile emission in tobacco leaves by expressing *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase in different subcellular compartments. *Plant Biotechnology Journal*, 2 (4): 341 – 350.
- Xiang Wei, Xu Yan, Wang Fu-min, Gao Li-ping, Gao Ming-jun, Zhang Zheng-zhu, Wan Xiao-chun, Wei Shu. 2013. *In Silico* analysis and feeding assays of some genes in the early steps of terpenoid biosynthetic pathway in *Camellia Sinensis*. *Journal of Tea*, 39 (4): 191 – 198.
- Xu Ning, Chen Zong-mao, You Xiao-qing. 1999. Isolation and identification of tea plant volatiles attractive to tea geometrid parasitoids. *Acta Entomologica Sinica*, 42 (2): 126 – 131. (in Chinese)
- 许宁, 陈宗懋, 游小清. 1999. 引诱茶尺蠖天敌寄生蜂的茶树挥发物的分离与鉴定. *昆虫学报*, 42 (2): 126 – 131.
- You Xiao-qing, Wang Hua-fu, Li Ming-jun. 1990. The volatile components and terpene index in tea flower. *Journal of Tea Science*, 10 (2): 71 – 75. (in Chinese)
- 游小清, 王华夫, 李名君. 1990. 茶花的挥发性成分与萜烯指数. *茶叶科学*, 10 (2): 71 – 75.
- Zhang Wan-ting, Zhang Ling-zhi, Wang Deng-liang. 2010. Research progress in the effect of processing technology on oolong tea aroma components. *China Tea*, (4): 10 – 13. (in Chinese)
- 张婉婷, 张灵枝, 王登良. 2010. 加工工艺对乌龙茶香气成分影响的研究进展. *中国茶叶*, (4): 10 – 13.
- Zhang Zheng-zhu, Shi Zhao-peng, Wan Xiao-chun. 2000. Terpenoid substances and tea aroma (review). *Journal of Anhui Agricultural University*, 27 (1): 51 – 54. (in Chinese)
- 张正竹, 施兆鹏, 宛晓春. 2000. 萜类物质与茶叶香气 (综述). *安徽农业大学学报*, 27 (1): 51 – 54.