

柑橘中挥发性萜类物质代谢研究进展

张海朋¹, 刘翠华², 刘园¹, 温欢¹, 施要强³, 张红艳¹, 徐娟^{1,*}

(¹ 华中农业大学园艺林学学院, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070; ² 西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; ³ 四川水利职业技术学院生物工程系, 成都 610000)

摘 要: 柑橘中挥发性物质以萜类为主, 不仅影响植株与环境间的信号传递和赋予果实的香气, 而且对消费者的感官体验及人体健康有多样的功能。对柑橘中挥发性萜类物质生物学功能、代谢谱的种质及组织特异性、合成途径相关基因及挥发性物质与柑橘分类等研究进展进行了综述。提出目前对柑橘挥发性萜类物质的研究仅限于代谢通路及代谢谱分析; 在成分分析上多以游离态为主, 糖苷等键合态的分析较少; 已明确功能的结构基因及调控基因报道较少, 香气品质的形成机理尚有待深入解析。展望未来, 基础研究方面应重点揭示柑橘中挥发性萜类物质代谢的进化和演变规律、重要结构基因及转录因子调控机制等; 生产应用中关注开发利用现有具特异香味种质、创制特殊香味新品种以及提升香气品质的栽培措施。

关键词: 柑橘; 挥发性萜类物质; 香气品质; 代谢

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 08-1610-15

Research Advances of Volatile Terpenoids Metabolism in Citrus

ZHANG Haipeng¹, LIU Cuihua², LIU Yuan¹, WEN Huan¹, SHI Yaoqiang³, ZHANG Hongyan¹, and XU Juan^{1,*}

(¹Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education), College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ³Department of Biological Engineering, Sichuan Water Conservancy Vocational College, Chengdu 610000, China)

Abstract: Terpenoids are the most important volatile compounds in citrus fruit, which not only play important roles signal transmission between plant and environment, but also have multiple health benefits for humans. This article reviews the related research on volatile terpenoids in citrus, including the biological functions, specific profiles in different germplasms/tissues, biosynthesis-related genes and citrus taxonomy. The review demonstrates that the current research is limited to compound identification and biosynthetic analysis, and most studies are focused on free volatiles, while fewer reports focused on the bond volatiles, structural genes and regulatory genes, the mechanism of aromatic quality needs to be further dissected. In the future, exploration of the evolution of the metabolism of volatile terpenoids and the function of key genes and transcription factors will be the most important aspects of related research on

收稿日期: 2020-03-30; **修回日期:** 2020-07-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD1000200); 国家自然科学基金项目 (3122122)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xujuan@mail.hzau.edu.cn)

致谢: 感谢华中农业大学外国语学院刘座雄老师在本文英文摘要修改校正时提出宝贵的意见。

citrus. In future production, the hotspot of research may be the utilization of citrus germplasms with specific flavors, breeding of new cultivars with the accumulation of specific volatile terpenoids, and improvement of the aromatic quality of certain cultivars.

Keywords: citrus; volatile terpenoids; aroma; metabolism

挥发性物质是广泛存在于高等植物中的一类重要的低分子量代谢物,沸点为 50 ~ 260 °C (Brown et al., 1994), 目前已鉴定出 23 000 多种 (Cheng et al., 2007)。挥发性物质不仅赋予果实特殊风味, 影响果实感官性状, 而且多数挥发性物质还具有多样性的生物学活性, 并在植物与其他植物、微生物、昆虫及环境等互动中还起重要的信息转导和传递作用 (Rodríguez et al., 2011, 2014)。柑橘果皮中富含挥发性萜类物质, 如 *d*-柠檬烯和月桂烯等, 广泛应用于食品添加剂、香水、香皂及除臭剂 (Behr & Johnen, 2010)。柑橘挥发性物质的研究自 1925 年开展以来 (Hall & Wilson, 1925), 现已逐渐成为热点。本文中从生物学功能、组成、代谢通路相关基因及挥发性物质与柑橘分类学等方面, 对柑橘中含量占绝对优势的挥发性萜类物质的研究进展予以论述。

1 柑橘中挥发性萜类物质的主要生物学功能

柑橘果皮中挥发性物质以萜类物质为主, 通常占总挥发性物质的 90% 以上 (González-Mas et al., 2011, 2019; Liu et al., 2012; Zhang et al., 2017), 不仅对柑橘果实的感官品质有重要影响, 对人体健康也有多种益处。萜类物质广泛存在于高等植物中, 是次生代谢物中种类最多的一类。部分萜类物质为初生代谢物, 是植物生长发育所必需的, 如 ABA 和 GA 等 (Chappell, 1995); 部分属于次生代谢物, 如单萜、倍半萜、二萜、柠檬苦素类似物、类胡萝卜素等。挥发性萜类物质主要包括低分子量的单萜、倍半萜、二萜及三者衍生物等, 广泛存在于植物叶、花及果实等组织, 不仅对有害病菌及害虫等起到直接或间接的驱避或抵御作用, 还可吸引昆虫为植物授粉, 赋予果实特殊的气味, 吸引动物取食从而起到传播种子、繁衍后代的作用 (Baldwin, 2010), 如香柠檬烯和法尼烯可有效抵抗鳞翅目昆虫 (Schnee et al., 2006; Li et al., 2015); 芹子烯可抵御真菌病原体 (Ding et al., 2017); β -罗勒烯可直接抵御蚜虫侵扰 (Pasquale et al., 2015); β -香茅醛可吸引昆虫帮助授粉 (Bohman et al., 2018), (Z)-3-己烯醇、(Z)-3-己烯酯和水杨酸甲酯等在植物与植物间具有信号传导作用等 (Park et al., 2007; Cofer et al., 2018; Hu et al., 2019)。此外, 茶叶中橙花叔醇 (倍半萜物质) 也有抵抗低温的重要作用 (Zhao et al., 2019)。

挥发性萜类物质对人类也有非常重要的贡献, 因其具有强烈的风味和多种生物活性, 在工业和医药等方面有广泛的用途, 同时也可作为天然或人工精油的主要原料, 其中, 柑橘类风味物质 (25%) 是最重要的风味物质之一 (Liu et al., 2012)。芳樟醇常被用于合成香精油, 有抗菌、抗炎和抗感染的作用 (Huo et al., 2013); *d*-柠檬烯作为香料添加剂被广泛用于食品和化妆品, 同时具有化痰和抗癌作用 (Elegbede et al., 1984); 月桂烯不仅用于香水和除臭剂, 也是合成香叶醇、芳樟醇、新铃兰醛和柑青醛等香料的重要原料 (Behr & Johnen, 2010); 榄香烯具有多种抗癌和抗肿瘤作用等 (Yao et al., 2008)。近年来, 作为重要的精油原料, 已被开发利用的柑橘属植物有佛手、葡萄柚、柠檬、莱檬、苦橙及甜橙等 (Liu et al., 2012)。

2 柑橘挥发性物质的检测及其对特征气味贡献的分析方法

柑橘挥发性物质的提取方法主要包括溶剂萃取和固相微萃取法。检测仪器从气相色谱仪逐渐演变为气相色谱—质谱联用仪 (GC-MS)。物质鉴定主要基于标准样品和统一标准构建的 NIST/EPA/NIH 等质谱数据库。

挥发性物质能否被人体所识别是由其浓度、性质及人体对气味的敏感性共同决定的 (Aharoni et al., 2005)。气味敏感性因人而异, 导致对某一种挥发性物质的描述千差万别。因此, 笔者将多数人认为是“香”的挥发性物质称作香味物质, 其他则称为气味物质。挥发性物质对气味的贡献度主要由气味值决定, 即挥发性物质浓度和气味阈值的比值 (Guadagni et al., 1963)。不是每种挥发性物质都与某种气味相关, 含量高的也不一定是相应基质中的特征气味物质。

研究特征气味物质的仪器和方法主要有气相色谱嗅闻联用 (gas-chromatography olfactometry, GC-O)、香味提取物稀释分析法 (aroma extract dilution analysis, AEDA) 和气味重构试验 (Grosch, 2001)。GC-O 主要用于分离单个挥发性物质, 并经人工嗅闻评价。AEDA 主要用于人工嗅闻某挥发性物质的梯度稀释液而确定不同气味物质在基质中的最低嗅闻阈值 (Grosch, 2001)。气味重构试验主要用于检验构建的气味模型与原材料的气味是否吻合, 来验证潜在的挥发性物质的气味是否符合预期 (Grosch, 2001; Liu et al., 2012)。

不同类型柑橘种质气味属性有较大差异, 但这些差异是由哪些挥发性物质决定的, 相关研究还较少。很多柑橘种质有特殊香味, 如莽山野柑果实可散发出令人愉悦的甜香和膏香, 通过挥发性物质谱分析结合 GC-O、AEDA 及气味重构试验等证实, 顺式-、反式-芳樟醇氧化物和 β -月桂烯是莽山野柑果实的特征香气物质 (Liu et al., 2012)。此外, 以莽山野柑为父本对“华农红柚”授粉可显著提高汁胞中顺式-、反式-芳樟醇氧化物含量, 经感官评价分析证实这种果实的香气特性与自然授粉的果实具有显著差异 (刘翠华, 2014; Zhang et al., 2019a)。

近年来风味组学 (flavoromics) 的开展为研究多种代谢物对果实风味和品质的影响提供了新思路 (Charve, 2011)。结合感官评价和仪器检测可实现代谢物质与气味品质间的关联, 从而开发具有特殊气味的柑橘新品种, 并锚定其关键挥发性物质。

3 柑橘中的挥发性物质种类及积累特点

3.1 主要挥发性物质种类

柑橘中挥发性物质主要包括挥发性萜类物质、有机酸类、醛类、酮类、醇类、酯类和环氧化物等, 其中挥发性萜类物质中又以萜烯类化合物最为重要。据不完全统计 (表 1), 柑橘中已确定的挥发性萜类化合物约 137 种 (Gonzalez-Mas et al., 2011; Azam et al., 2013; Zhang et al., 2017, 2019a, 2020)。此外, 辛醛 (octanal) 和油酸甲酯 (methyl oleate) 分别是最主要的挥发性醛类和酯类物质 (Zhang et al., 2017)。

3.2 不同类型柑橘果皮中挥发性物质积累特点

柑橘挥发性物质有组织和发育时期特异性, 但均以萜类物质为主要成分 (图 1, Zhang et al., 2017, 2020)。挥发性物质总量以果皮中最高, 相关研究和报道也大多集中在成熟期的果皮上, 对不同发育时期的果皮及汁胞、叶片和花中相关的研究较少。柑橘挥发性物质的种质特异性也十分明显,

尤以果皮中的差异最为显著（图 1）。柑橘果皮中最主要的挥发性物质是单萜类，尤以 *d*-柠檬烯含量最高，于大多数种质中占总挥发性物质的 60%~95%（Zhang et al., 2017; González-Mas et al., 2019）。

表 1 柑橘中主要挥发性萜类物质
Table 1 The major volatile terpenoids in citrus

编号 ID	化合物 Compound	编号 ID	化合物 Compound
单萜 Monoterpenes			
1	α -蒎烯 α -Pinene	11	γ -蒎烯 γ -Terpinene
2	水合蒎烯 Sabinene	12	蒎油烯 Terpinolene
3	β -蒎烯 β -Pinene	13	<i>allo</i> -罗勒烯 <i>allo</i> -Ocimene
4	β -月桂烯 β -Myrcene	14	α -侧柏烯 α -Thujene
5	α -水芹烯 α -Phellandrene	15	坎烯 Camphene
6	α -蒎品烯 α -Terpinene	16	假柠檬烯 pseudolimonen
7	<i>d</i> -柠檬烯 <i>d</i> -Limonene	17	β -水芹烯 β -Phellandrene
8	顺式- β -罗勒烯 <i>cis</i> - β -Ocimene	18	β -侧柏烯 β -Thujene
9	反式- β -罗勒烯 <i>trans</i> - β -Ocimene	19	2-萆烯 2-Carene
10	3-萆烯 3-Carene		
单萜醇 Monoterpene alcohols			
20	顺式-4-香桉醇 <i>cis</i> -Sabinene hydrate	29	β -香茅醇 β -Citronellol
21	β -芳樟醇 β -Linalool	30	顺式-香芹醇 <i>cis</i> -Carveol
22	4-蒎烯醇 Terpinen-4-ol	31	反式-香叶醇 <i>trans</i> -Geraniol
23	顺式- <i>p</i> -薄荷-1醇 <i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	32	4-松油醇 4-Terpineol
24	反式-薄荷醇 <i>trans</i> -Piperitol	33	茨醇 Borneol
25	顺式-对-薄荷-2-烯-1-醇 <i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2-ene-1-ol	34	1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己醇 <i>p</i> -Menth-8-en-1-ol
26	桉树脑 Eucalyptol	35	顺式- β -松油醇 <i>cis</i> - β -Terpineol
27	反式-4-侧柏醇 <i>trans</i> -Sabinene hydrate	36	橙花醇 Nerol
28	α -松油醇 α -Terpineol		
单萜醛 Monoterpene aldehydes			
37	香茅醛 Citronellal	40	α -柠檬醛 α -Citral
38	橙花醛 Neral	41	香叶醛 Geranial
39	薄荷醛 Perillal	42	β -柠檬醛 β -Citral
单萜酮 Monoterpene ketones			
43	<i>d</i> -蒎酮 <i>d</i> -Camphor	45	胡椒酮 Piperitone
44	(+)-香芹酮 (+)-Carvon	46	对-薄荷-1,8-二烯-3-酮 <i>p</i> -Mentha-1,8-dien-3-one
单萜氧化物 Monoterpene oxides			
47	反式-芳樟醇氧化物 <i>trans</i> -Linalool oxide	49	顺式-柠檬烯氧化物 <i>cis</i> -Limonene oxide
48	顺式-芳樟醇氧化物 <i>cis</i> -Linalool oxide	50	反式-柠檬烯氧化物 <i>trans</i> -Limonene oxide
单萜酯 Monoterpene esters			
51	乙酸香芹酯 Carvyl acetate	55	乙酸香叶酯 Geranyl acetate
52	α -蒎品醇乙酸酯 α -Terpineol acetate	56	乙酸香茅酯 Citronellyl acetate
53	乙酸紫苏酯 Perillyl acetate	57	α -乙酸松油酯 α -Terpinyl acetate
54	橙花乙酸酯 Nerol acetate		
倍半萜 Sesquiterpenes			
58	依兰烯 Ylangene	86	δ -芹子烯 δ -Selinene
59	δ -榄香烯 δ -Elemene	87	双环大牻牛儿烯 Bicyclogermacrene
60	α -古巴烯 α -Copaene	88	甘香烯 Elixene
61	α -荜澄茄油烯 α -Cubebene	89	α -衣兰油烯 α -Murolene
62	α -依兰烯 α -Ylangene	90	α -布藜烯 Guaia-1(10),11-diene
63	(-)- β -波旁烯 (-)- β -Bourbonene	91	顺式- α -红没药烯 <i>cis</i> - α -Bisabolene
64	α -榄香烯 α -Elemene	92	α -雪松烯 α -Himachalene
65	γ -古芸烯 γ -Gurjunene	93	β -可巴烯 β -Copaene
66	γ -榄香烯 γ -Elemene	94	(\pm)-荜澄茄烯 (\pm)-Cadinene
67	α -愈创木烯 α -Guaiene	95	β -红没药烯 β -Bisabolene
68	石竹烯 Caryophyllene	96	顺式, 顺式- α -法尼烯 <i>cis,cis</i> - α -Farnesene
69	β -荜澄茄油烯 β -Cubebene	97	γ -杜松烯 γ -Cadinene
70	反式- α -波旁烯 <i>trans</i> - α -Bergamotene	98	(+)- δ -荜澄茄烯 (+)- δ -Cadinene
71	α -波旁烯 α -Bergamotene	99	β -倍半水芹烯 β -Sesquiphellandrene
72	(-)-马兜铃烯 (-)-aristolene	100	荜澄茄油烯 Cubenene

续表 1			
编号 ID	化合物 Compound	编号 ID	化合物 Compound
73	β -愈创木烯 β -Guaiene	101	瓦伦烯 Valencene
74	α -石竹烯 α -Caryophyllene	102	β -橄榄烯 β -Maaliene
75	蛇麻烯 Humulene	103	反式- β -波旁烯 $trans$ - β -Bergamotene
76	反式- β -法尼烯 $trans$ - β -Farnesene	104	γ -愈创烯 γ -Guaiene
77	顺式- β -石竹烯 cis - β -Caryophyllene	105	β -依兰烯 β -Ylangene
78	顺式- β -法尼烯 cis - β -Farnesene	106	吉马烯 B Germacrene B
79	白菖油萜烯 Calarene	107	双环吉马烯 Bicyclogermacrene
80	香树烯 Alloaromadendrene	108	β -愈创烯 β -Guaiene
81	γ -衣兰油烯 γ -Murolene	109	顺式- α -波旁烯 cis - α -Bergamotene
82	吉马烯 D Germacrene D	110	β -檀香烯 β -Santalene
83	α -芹子烯 α -Selinene	111	β -芹子烯 β -Selinene
84	β -柏木萜烯 β -Funebrene	112	δ -杜松烯 δ -Cadinene
85	(-)-异喇叭烯 Isodene	113	α -杜松烯 α -Cadinene
倍半萜醇 Sesquiterpene alcohols			
114	(-)-桉油烯醇 (-)-Spathulenol	124	(-)-蓝桉醇 (-)-Globulol
115	β -桉叶油醇 β -Eudesmol	125	榄香醇 Elemol
116	β -桉叶醇 β -Selinol	126	异丁香醇 Hedycaryol
117	α -毕橙茄醇 α -Cadinol	127	α -菖蒲醇 α -Acorenol
118	α -没药醇 α -Bisabolol	128	(+)-蔡甲醇 (+)-Rosifoliol
119	顺式, 反式-法尼醇 $cis,trans$ -Farnesol	129	萆澄茄醇 Cubebol
120	法尼醇 Farnesol	130	反式-法尼醇 $trans$ -Farnesol
121	(-)-蓝桉醇 (-)-Globulol	131	橙花叔醇 Nerolidol
122	(-)-表蓝桉醇 Epiglobulol	132	蛇床烯醇 Selinol
123	吉马烯 D-4-醇 Germacrene D-4-ol	133	异桉油烯醇 Isospathulenol
倍半萜氧化物 Sesquiterpene oxide			
134	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide		
倍半萜醛 Sesquiterpene aldehydes			
135	反式, 反式-法尼醛 $trans,trans$ -Farnesal	136	α -甜橙醛 α -sinensal
二萜 Diterpenes			
137	香叶基芳樟醇 Geranyl linalool		

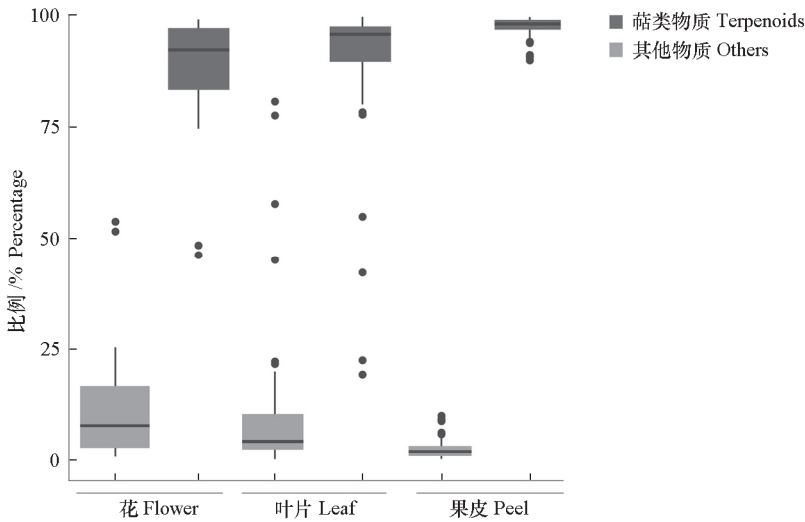


图 1 柑橘不同组织中挥发性物质比例
Fig. 1 The percentage of volatiles in different tissues of citrus
Zhang et al., 2017, 2020.

分析挥发性物质在不同类型柑橘中分布特点发现 (表 2), 4 种类型柑橘中, 宽皮柑橘 (除克里曼丁橘外) 中 β - 榄香烯、吉马烯 B、3- 己烯醛、 γ - 榄香烯、 α - 石竹烯、 δ - 榄香烯和 γ - 萜品烯等 7 种物质相对高积累, 而 (Z)- β - 法尼烯等 3 种物质含量相对较低; 柚中诺卡酮相对高积累, 而 3- 己烯醛等 5 种挥发性物质相对较低; 甜橙中瓦伦烯、石竹烯氧化物、 α - 水芹烯和反式- 柠檬烯氧化物含量较高, γ - 萜品烯等 4 种物质含量较低; 柠檬中柠檬内脂、香茅醛、 β - 红没药烯、*trans*- α - 香柠檬烯、*cis*- α - 香柑油烯、 β - 蒎烯、石竹烯、茨烯、 α - 萘澄茄油烯、 α - 萜品醇和 (Z)- β - 法尼烯等 11 种挥发性物质高积累 (Zhang et al., 2019b)。推测不同类型柑橘间差异积累的挥发性物质对其特征气味有一定贡献。

表 2 不同类型柑橘中标志性挥发性物质
Table 2 Potential biomarker volatiles in different citrus species

类型 Type	物质 Compound	VIP	P-value	含量 Content
宽皮柑橘 Loose-skin mandarin	β - 榄香烯 β -Elemene	1.98	3.85×10^{-10}	H
	瓦伦烯 Valencene	1.75	4.67×10^{-6}	L
	(Z)- β - 法尼烯 (Z)- β -Farnesene	1.63	7.15×10^{-6}	L
	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide	1.63	2.76×10^{-4}	L
	吉马烯 B Germacrene B	1.60	5.95×10^{-7}	H
	3- 己烯醛 3-Hexenal	1.56	3.69×10^{-2}	H
	γ - 榄香烯 γ -Elemene	1.54	9.47×10^{-5}	H
	α - 石竹烯 α -Caryophyllene	1.51	7.68×10^{-10}	H
	δ - 榄香烯 δ -Elemene	1.50	1.86×10^{-7}	H
	γ - 萜品烯 γ -Terpinene	1.50	8.75×10^{-4}	H
甜橙 Sweet orange	瓦伦烯 Valencene	2.54	6.19×10^{-9}	H
	石竹烯氧化物 Caryophyllene oxide	2.44	2.90×10^{-11}	H
	γ - 萜品烯 γ -Terpinene	1.61	2.16×10^{-8}	L
	α - 水芹烯 α -Phellandrene	1.56	5.68×10^{-5}	H
	α - 侧柏烯 α -Thujene	1.53	2.61×10^{-8}	L
	<i>trans</i> - 柠檬烯氧化物 <i>trans</i> -Limonene oxide	1.53	9.49×10^{-4}	H
	吉马烯 D Germacrene D	1.52	1.38×10^{-7}	L
	α - 萜品烯 α -Terpinene	1.50	2.05×10^{-7}	L
	柠檬内脂 Limettin	2.51	8.00×10^{-16}	H
	香茅醛 Citronellal	2.40	2.91×10^{-4}	H
柠檬 Lemon	<i>trans</i> - α - 香柠檬烯 <i>trans</i> - α -Bergamotene	2.30	1.26×10^{-13}	H
	β - 红没药烯 β -Bisabolene	2.22	1.16×10^{-13}	H
	<i>cis</i> - α - 香柠檬烯 <i>cis</i> - α -Bergamotene	1.96	5.52×10^{-9}	H
	β - 蒎烯 β -Pinene	1.95	1.56×10^{-3}	H
	石竹烯 Caryophyllene	1.89	9.80×10^{-4}	H
	茨烯 Camphene	1.81	2.00×10^{-3}	H
	α - 萘澄茄油烯 α -Cubebene	1.71	1.15×10^{-4}	H
	α - 萜品醇 α -Terpineol	1.57	1.03×10^{-3}	H
	(Z)- β - 法尼烯 (Z)- β -Farnesene	1.56	4.24×10^{-3}	H
	诺卡酮 Nootkanone	3.07	1.13×10^{-5}	H
柚 Pummelo	3- 己烯醛 3-Hexenal	2.01	1.51×10^{-3}	L
	<i>trans</i> - 柠檬烯氧化物 <i>trans</i> -Limonene oxide	1.87	2.70×10^{-3}	L
	β - 萘澄茄油烯 β -Cubebene	1.77	2.07×10^{-3}	L
	榄香醇 Elemol	1.77	5.16×10^{-4}	L
	古巴烯 Copaene	1.61	4.16×10^{-3}	L

注: 数据来源于 Zhang et al., 2019b。VIP: 投影变量重要性, P-value: 显著差异水平; H/L: 挥发性物质含量显著高/低于其他 3 个柑橘类型。

Note: Data were from Zhang et al., 2019b. VIP: Variable importance in projection. P-value: Significant level. H/L: Content of the compound was significantly higher/lower than that in other three species.

此外, 克里曼丁橘由甜橙和宽皮柑橘杂交育种而来, 但其气味与其亲本显著不同。分析发现克里曼丁橘中主要以 17 种挥发性物质含量较高, 可能是由于这些物质的高积累引起克里曼丁橘特殊气味 (Zhang et al., 2019b)。其他资源中, 如莽山野柑果实中, β -月桂烯、顺式-、反式-芳樟醇氧化物为其特征香气物质 (Liu et al., 2012); 突变体牛肉红金橘可能由于 16 种挥发性物质的含量差异使其果实香气比其野生型朱红橘更为浓郁 (Li et al., 2017a); 处红柚 (红肉) 和翡翠柚 (绿肉) 果皮中有 40 种挥发性物质含量具有显著性差异 (Liu et al., 2015)。

综上所述, 由于不同类型柑橘挥发性物质积累的特异性, 在精油提取开发或特殊挥发性物质利用时, 需注意品种的选择。柑橘有很多特殊资源, 如茶枝柑富含邻氨基苯甲酸 (刘翠华, 2014), 红橘富含 d -柠檬烯, 苏柑富含月桂烯等 (Zhang et al., 2017)。

3.3 柑橘其他组织中的挥发性物质

3.3.1 汁胞

柑橘汁胞中挥发性物质含量极低, 研究报道也较少。Barboni 等 (2009) 研究柳叶橘与克里曼丁橘 65 个杂交后代的汁胞发现, 所有子代的挥发性物质谱几乎无差异, 仅 d -柠檬烯和 γ -蒎烯比例有小范围变化。红色果肉处红柚和绿色果肉翡翠柚汁胞中挥发性物质几乎没有差异 (Liu et al., 2015)。被人工授莽山野柑花粉的‘华农红柚’等汁胞中, 顺式-、反式-芳樟醇氧化物显著高于自然授粉果实汁胞, 果实香味品质提升 (Zhang et al., 2019a)。

前人对柑橘汁胞中键合态挥发性物质有一定的研究。在 6 种柑橘汁胞中共发现 17 种键合态挥发性物质, 其中以芳香族化合物为主; 键合态挥发性物质在不同种质间差异较大, 仅有对乙烯基愈创木酚在 6 种柑橘中共同存在 (Ren et al., 2015)。

3.3.2 叶片

柑橘叶片中挥发性物质研究也较少, 大多数挥发性物质种类与果皮中一致, 以挥发性萜类物质为主。与果皮不同的是叶片中最主要的挥发性成分在不同柑橘种质中变异度较大, 以 d -柠檬烯、芳樟醇、罗勒烯和乙酸芳樟酯为主 (Lota et al., 2002; Azam et al., 2013; Zhang et al., 2020), 如甜橙主要为香桉烯, 酸橙主要为乙酸芳樟酯, 大翼橙主要为香茅醛等 (Zhang et al., 2020)。

对分属 6 个类型的 65 个柑橘种质挥发性物质代谢谱分析, 发现宽皮柑橘和大翼橙中挥发性物质总量较高, 甜橙、酸橙、宜昌橙和枸橼居中, 柚中含量较低。此外, 野生种质资源叶片中萜烯类物质显著高于栽培种, 推测可能在驯化过程中挥发性萜烯物质代谢受负选择作用 (Zhang et al., 2020)。

叶龄对挥发性物质组成有一定影响。研究发现, 9 个柑橘种质嫩叶中挥发性物质总量比成龄叶高; 叶片发育过程中醛和单萜物质逐渐增多, 而单萜氧化物和倍半萜物质逐渐降低; 大多数种质嫩叶中芳樟醇是最主要的挥发性成分, 随叶片发育芳樟醇含量降低而 d -柠檬烯含量升高 (Azam et al., 2013)。

3.3.3 花

柑橘花中挥发性物质的研究也较少。研究表明挥发性萜类物质也是花中最主要的成分, 主要为 d -柠檬烯、芳樟醇和香叶醇等单萜烯物质及 (E)- β -法尼烯和 β -石竹烯等倍半萜物质 (Dugo et al., 2011; Sarrou et al., 2013; Družić et al., 2016)。花中最主要的挥发性物质因不同柑橘类型而异, 如柠檬和柚花中主要是芳樟醇 (Sarrou et al., 2013), 而甜橙中为香桉烯 (Zhang et al., 2020)。

不同花器官中挥发性物质含量有较大差异, 如柚整花、花芽、花瓣、花丝、花药和花粉中最主要的挥发性物质为芳樟醇、 d -柠檬烯、 β -蒎烯和 β -罗勒烯等, 而花托、子房和花柱中最主要

为 β -蒎烯、 d -柠檬烯和 β -罗勒烯等 (Huang et al., 2017)。

花的发育时期会影响挥发性物质组成及含量。研究发现, 甜橙完全开放的花朵与气球期花相比, 4 种萜烯醇物质 (芳樟醇、法尼醇、橙花叔醇和 8-羟基芳樟醇) 显著增加, 部分单萜物质 (香桉烯等) 显著降低, 可能是这些物质含量的变化, 引起完全开放期花呈现甜香味 (Zhang et al., 2020)。

3.4 柑橘中的键合态挥发性物质

键合态挥发性物质不具有挥发性, 但可通过酸解或酶解形成游离态挥发性物质, 从而影响果实气味。此类物质在葡萄中研究较多, 有萜烯醇类、乙醇、苯乙醇、苯甲醇、 C_{13} 降异戊二烯类物质等; 其糖苷键合态的糖苷基团主要有单糖苷和二糖苷 (问亚琴, 2015)。

柑橘中相关研究较少, 有报道, β -葡萄糖苷酶处理橙汁可显著增加其芳樟醇、苯甲醇和苯乙醇含量 (Gueguen et al., 1996)。在‘锦橙’果汁中发现 14 种键合态挥发性物质, 糖苷基团主要为葡萄糖、木糖和鼠李糖等; ‘锦橙’汁胞和果皮中分别检测到 11 种和 10 种键合态挥发性物质, 汁胞中主要为 5 种苯系物和 3 种羟基酯类化合物等, 尤以阿魏酸含量最高; 果皮中主要为 4 种萜烯类物质和 4 种苯系物, 以 3- O - α -紫罗兰醇含量最高; 成熟期汁胞中键合态挥发性物质最丰富, 果皮中键合态挥发性物质随果实生长发育逐渐降低 (范刚, 2010)。键合态挥发性物质在果实加工过程中具有通过酶解增加香气的潜力, 其在柑橘果实中的分布规律和对柑橘香气的贡献还有待深入研究。

4 挥发性萜类物质合成途径及其相关基因

4.1 挥发性萜类化合物合成途径

萜类化合物的共同前体物质为异戊烯焦磷酸 (IPP)。IPP 主要有两条合成途径, 即位于质体由丙酮酸 (Pyruvate) 和甘油醛-3-磷酸 (G3P) 为前体物质合成的甲基赤藓醇磷酸盐 (MEP) 途径, 以及位于胞质以乙酰辅酶 A 为前体物质合成甲羟戊酸 (MVA) 途径 (Vranová et al., 2013)。

IPP 由异戊烯基二磷酸异构酶 (IDI) 催化成其异构体二甲基丙烯基二磷酸 (DMAPP), 一分子 IPP 和一分子 DMAPP 在牻牛儿基焦磷酸合酶 (GPPS) 催化合成单萜物质的特异性 C10 骨架——牻牛儿基焦磷酸 (GPP); 一分子 IPP 和两分子 DMAPP 在法尼基焦磷酸合酶 (FPPS) 催化下形成倍半萜直接底物——法尼基焦磷酸 (FPP) (Liang et al., 2002)。GPP 和 FPP 分别在不同萜烯合酶 (TPS) 作用下形成种类繁多的单萜和倍半萜物质 (Bohlmann et al., 1998), 这些化合物再经过细胞色素 P450 (cytochromes P450, CYP450)、脱氢酶、还原酶和甲基转移酶等作用形成结构更加多样的衍生物, 极大丰富了萜烯类物质种类, 使其最终成为植物次生代谢物的第一大类物质 (McGarvey & Croteau, 1995; Weitzel & Simonsen, 2013)。

4.2 挥发性萜类化合物合成基因

MEP 途径和 MVA 途径合成 IPP 过程中分别有 7 和 6 个结构基因起作用。脱氧木酮糖-5-磷酸合酶 (DXS) 是 MEP 途径中最主要的限速酶。葡萄中的研究表明 DXS 在芳樟醇、香叶醇、香茅醇和 α -萜品醇等物质积累中起重要作用 (Battilana et al., 2009; Duchêne et al., 2009)。猕猴桃中有两个 DXS 基因, 其中 *DXS1* 与 *TPS* 共表达可显著提高单萜物质积累 (Nieuwenhuizen et al., 2015)。此外, 拟南芥和薄荷中的研究也表明 DXR 是主要限速酶之一, 超表达 DXR 基因可增加拟南芥中叶绿素和类胡萝卜素积累, 薄荷中则可促进精油物质积累 (Mahmoud & Croteau, 2001)。拟南芥中超

表达番茄 *HDR* 可增加叶绿素和类胡萝卜素含量 (Botella-Pavía et al., 2004)。烟草中超表达 GDP 合成酶小亚基可促进单萜物质积累, 同时类胡萝卜素、叶绿素和赤霉素含量降低 (Orlova et al., 2009)。

羟甲基乙酰辅酶 A 合酶 (HMGS) 是 MVA 途径的主要限速酶。拟南芥中超表达芥菜 (*Brassica juncea*) *HMGS1* 可以显著提高甾醇含量, 进而起到抗逆作用 (Wang et al., 2012)。外源 ABA 和水杨酸 (SA) 等可影响芥菜中 *HMGS* 的表达 (Alex et al., 2000)。烟草中超量表达橡胶 (*Hevea brasiliensis*) *HMGR*, 其甾醇含量可提高 2~6 倍 (Schaller et al., 1995)。

4.3 柑橘中萜烯合酶基因

萜烯合酶基因 (TPS) 是直接控制合成萜烯类物质的一类序列相似度高, 包含 RRX_8W 和 $DDXXD$ 保守结构域的基因 (Bohlmann et al., 1998)。单萜合酶基因定位于质体, 一般为 600~650 个氨基酸, 倍半萜合酶基因定位于细胞质, 一般比单萜合酶基因少 50~70 个氨基酸 (Alquézar et al., 2017)。

柑橘中关于萜烯合酶基因的研究也越来越多。基因家族分析表明甜橙 (*Citrus sinensis* ‘Valencia’) 基因组中共有 95 个 TPS 基因, 其中 55 个可编码完整蛋白序列, 聚类分析发现这 55 个 TPS 基因分属 TPS-a、TPS-b、TPS-c、TPS-e/f 和 TPS-g 等 5 个亚家族 (Alquézar et al., 2017)。目前为止, 仅有 20 个 TPS 基因的功能被证明 (表 3)。温州蜜柑 (*C. unshiu*) 中的研究表明, *CitMTSE1*、*CitMTS3*、*CitMTS61* 和 *CitMTS62* 分别合成 *d*-柠檬烯、 γ -萜品烯、 γ -萜品烯和 β -蒎烯等单萜物质 (Shimada et al., 2004)。Xu 等 (2017) 发现佛手 (*C. medica*) *CmTPS1* 合成倍半萜双环大牻牛儿烯。在 ‘伏令夏橙’ 和 ‘纽荷尔’ 脐橙 (*C. sinensis*) 中的研究发现 *CsTPS1* 具有合成 (+)-瓦伦烯的功能 (Sharon-Asa et al., 2003; Shen et al., 2016)。*‘凤梨’* 甜橙 (*C. sinensis*) 中的研究发现 *Cs5g23510* 主要合成 (*Z*)- β -毕澄茄烯, *Cs4g12120* 主要合成 β -毕澄茄烯, *orange1.1t03302* 主要合成法尼烯, *Cs4g12350* 主要合成 β -榄香烯, *Cs4g12400* 主要合成香树烯, *orange1.1t04360* 和 *Cs4g11980* 主要合成 β -石竹烯等 (Alquézar et al., 2017)。*‘纽荷尔’* 脐橙中的研究发现 *Cs3g04360*、*Cs7g17670* 和 *Cs8g14120* 主要行使单萜基因功能, 分别合成柠檬烯、香叶醇和 β -罗勒烯; *Cs4g12460*、

表 3 已证明功能的柑橘挥发性萜烯类合成基因
Table 3 The TPS genes were characterized in citrus

材料 Material	基因号 Gene ID	主要产物 Main product
温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> (Shimada et al., 2004)	<i>CitMTSE1</i>	<i>d</i> -柠檬烯 <i>d</i> -Limonene
	<i>CitMTSE3</i>	γ -萜品烯 γ -Terpinene
	<i>CitMTSE61</i>	γ -萜品烯 γ -Terpinene
	<i>CitMTSE62</i>	β -蒎烯 β -Pinene
	<i>CsTPS1</i>	瓦伦烯 Valencene
伏令夏橙 <i>C. sinensis</i> (Sharon-Asa et al., 2003)	<i>CmTPS1</i>	双环大牻牛儿烯 Bicyclogermacrene
佛手 <i>C. medica</i> (Xu et al., 2017)	<i>Cs5g23510</i>	(<i>Z</i>)- β -毕澄茄烯 (<i>Z</i>)- β -Cubebene
	<i>Cs4g12120</i>	β -毕澄茄烯 β -Cubebene
	<i>orange1.1t03302</i>	法尼烯 Farnesene
	<i>orange1.1t04360</i>	β -石竹烯 β -Caryophyllene
	<i>Cs4g11980</i>	β -石竹烯 β -Caryophyllene
	<i>Cs4g12350</i>	β -榄香烯或 β -芹子烯 β -Elemene or β -Selinene
	<i>Cs4g12400</i>	香树烯 Alloaromadendrene
	<i>Cs3g04360</i>	柠檬烯 <i>d</i> -Limonene
	<i>Cs7g17670</i>	香叶醇 Geraniol
	<i>Cs8g14120</i>	β -罗勒烯 β -Ocimene
凤梨甜橙; 纽荷尔脐橙 <i>C. sinensis</i> (Alquézar et al., 2017; Li et al., 2017)	<i>Cs4g12460</i>	α -香柑油烯 α -Bergamotene
	<i>orange1.1t02008</i>	δ -杜松烯 δ -Cadinene
	<i>Cs4g12090</i>	吉马烯 D Germacrene D
	<i>STPS</i>	香桉烯 Sabinene
纽荷尔脐橙 <i>C. sinensis</i> (Li et al., 2017)		
红肉脐橙 <i>C. sinensis</i> (Zhang et al., 2020)		

orange1.1t02008 和 Cs4g12090 分别合成 α - 香柑油烯、 δ - 杜松烯和吉马烯 D 等倍半萜物质(Li et al., 2017b)。*‘红肉’* 脐橙 (*C. sinensis*) 中研究发现, *STPS* 具有合成香桉烯的功能 (Zhang et al., 2020)。

4.4 调控萜烯合酶基因的转录因子

调控萜烯合酶基因的转录因子在其他作物上的研究较多。如, 猕猴桃中 NAC 和 EIL3 转录因子可调控 *AaTPS1*, 从而影响 β - 月桂烯等物质积累 (Nieuwenhuizen et al., 2015)。黄花蒿 G-box 转录因子 HY5 可调控 *QH6* 表达, 影响 β - 蒎烯积累 (Zhou et al., 2015)。玉米 EREB58 调控 *TPS10*, 进而影响 (*E*)- β - 法尼烯和 (*E*)- α - 香柑油烯合成 (Li et al., 2015)。月季中超量表达 *PAP1* 可上调吉马烯 D 合酶基因的表达, 从而提高萜烯类物质积累 (Zvi et al., 2012)。棉花中 WRKY 转录因子调控 (+)- δ - 杜松烯合酶基因表达, 促进倍半萜物质积累 (Xu et al., 2004)。拟南芥 MYC2 可调控 *TPS21* 表达, 影响倍半萜物质积累 (Hong et al., 2012)。

柑橘中萜烯合酶的转录调控研究较少, 仅在 *‘纽荷尔’* 脐橙中研究发现 CitERF71 和 CitAP2.10 可分别调控 *CitTPS16* 和 *CsTPS1*, 进而影响 *E*- 香叶醇和瓦伦烯合成 (Shen et al., 2016; Li et al., 2017b)。

4.5 细胞色素 P450

细胞色素 P450 因其在 450 nm 处有特征吸收峰和血红素结合域的保守结构域而得名 (Myasoedova, 2008)。CYP450 能参与羟基化和环氧化等多种催化类型。萜类衍生物, 如羟基化、氧化、环氧化等衍生物, 大都在 CYP450 作用下催化而来, 但对 CYP450 参与挥发性物质代谢的研究仅有少数报道 (Aharoni et al., 2005; Weitzel & Simonsen, 2013)。

拟南芥上的研究表明, CYP76C1 和 CYP76C3 酶参与芳樟醇的修饰, 主要形成多种羟基化芳樟醇或羧基化芳樟醇 (Boachon et al., 2015); CYP71B31 和 CYP76C2 可催化不同手性的芳樟醇, 形成多种相应的芳樟醇衍生物 (Ginglinger et al., 2013)。此外, 柠檬烯、橙花醇和香叶醇, 吉马烯 A、瓦伦烯、 α - 蛇麻烯也可被 CYP450 酶催化成相应的衍生物 (Weitzel & Simonsen, 2013), 而柑橘中仅发现 *CitLO1* 在芳樟醇氧化物形成中可能起重要作用 (Zhang et al., 2019a)。

5 挥发性物质与柑橘分类

柑橘属于芸香科柑橘亚科柑橘族, 包括柑橘属、金柑属、枳属、澳指橘属、澳沙檬属和多蕊橘属等 (Swingle & Reece, 1967)。中国柑橘资源丰富, 分布范围广, 多胚且彼此之间均能自然杂交, 使得柑橘分类学研究困难 (Moore, 2001; 邓秀新和彭抒昂, 2003)。柑橘分类学研究方法主要有形态学、地理分类学、细胞分类学、化学分类学和重测序分析等 (周志钦, 1993; Wu et al., 2014, 2018; Wang et al., 2018)。Scora 和 Malik (1970) 提出植物次生代谢物, 尤其是挥发性精油成分可用于研究柑橘分类, 研究表明, 枸橼、柚和橘为柑橘属 3 个基本种, 甜橙、酸橙、柠檬和葡萄柚等均由 3 个基本种相互杂交而来。分析在同一条件下生长的 12 种宽皮柑橘发现, 挥发性物质是最主要的判别因子 (Merle et al., 2004), 进一步证明挥发性物质应用于柑橘分类的可靠性。近年来基于柑橘精油成分对柑橘分类等进行了广泛的探讨, 如基于 24 个枸橼种质研究其遗传多样性 (Luro et al., 2012); 以 30 种柑橘种质果实和叶片挥发性物质可区分柑橘属、枳属和金柑属, 并研究了野生种质莽山野柑的起源 (Liu et al., 2013); 以 20 个柑橘种质研究甜橙、酸橙、柠檬和葡萄柚等杂交柑橘起源关系等 (Jing et al., 2015); 基于 10 种柑橘挥发性物质分析发现, 宽皮柑橘、柚、甜橙、葡萄

柚及酸橙因含有高含量脂肪族和烯烴类化合物而聚类在一组, 香橙、枸橼、莱檬和佛手因富含单萜和倍半萜类物质而聚在一组, 而柠檬因富含硫代单萜化合物及酯和醛类物质而聚类在最外圈 (González-Mas et al., 2019); 以 108 种柑橘种质挥发性物质分析发现, 同一类型柑橘资源聚类较近, 而不同类型柑橘 (宽皮柑橘、甜橙、柚和柠檬) 聚类较远 (Zhang et al., 2017)。经偏最小二乘法分析筛选出的 30 种潜在挥发性标志物可区分宽皮柑橘、甜橙、柠檬和柚等, 以最高辨识度的 4 种标志物 (β -榄香烯、瓦伦烯、诺卡酮和柠檬内酯) 区分 30 种柑橘种质, 辨别准确率分别为 90%、96.7%、96.7%和 100% (Zhang et al., 2019b)。综上所述, 基于挥发性物质的化学分类研究柑橘分类是一种操作简便且可靠的方法, 可作为柑橘分类的初步鉴别方法之一。

6 展望

目前关于柑橘中挥发性萜类物质的研究已基本实现了游离态物质的资源评价 (Gonzalez-Mas et al., 2011; Liu et al., 2012; Zhang et al., 2017, 2019a, 2019b, 2020)。结合态挥发性物质对食用香味品质也有重要贡献, 但相关研究尚未系统地开展。目前主要工作集中在代谢物质鉴定和分析方面, 对不同类型柑橘特征气味的贡献尚需进一步明确。

已明确了古老的柑橘种质叶片中挥发性物质总量高于栽培种, 在尚未商业化种植的基因型较为古老的宜昌橙中, 丰富的倍半萜种类和含量可能对害虫有驱避作用或对益虫有吸引作用。黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 等柑橘近缘植物耐黄龙病, 是否与其特殊挥发性物质有关尚未阐明。因此, 柑橘挥发性物质与其抗 (耐) 病性的机理; 在耐/抗黄龙病、木虱及其他病虫害侵害的柑橘种质中, 挥发性物质代谢谱及相关基因的挖掘; 不同萜类挥发性物质的抗虫性、抑菌性差异及在产业上的应用前景等, 亟需深入展开。

目前, 随着柑橘基因组测序和数百个种质的重测序分析完成, TPS 等基因在序列上的差异已明晰, 但其与挥发性物质表型的关联分析, 还有待进一步开展; 相关合成基因和调控因子有待挖掘, 其相关调控机理有待阐明。更深入的研究可着眼于揭示柑橘进化过程中种类繁多且有种质特异性的 TPS 及 CYP450 基因表达和多态性的变化趋势和演变规律等。

上述相关研究, 需要与感官评价学、基因组学、生物信息学、病理学及昆虫学等学科密切合作, 其结果将为不同萜类挥发性物质的大量合成提供丰富的基因资源, 为创制特殊香味柑橘新种质提供亲本信息或材料来源, 且为开发利用现有特异香味和抗/耐病虫害柑橘种质, 提升栽培品种的香气品质提供坚实的理论支撑。

References

- Aharoni A, Jongsma M A, Bouwmeester H J. 2005. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*, 10: 594 - 602.
- Alex D, Bach T J, Chye M L. 2000. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive. *The Plant Journal*, 22: 415 - 426.
- Alquézar B, Rodríguez A, Peña M D L, Peña L. 2017. Genomic analysis of terpene synthase family and functional characterization of seven sesquiterpene synthases from *Citrus sinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1481.
- Azam M, Jiang Q, Zhang B, Xu C, Chen K. 2013. Citrus leaf volatiles as affected by developmental stage and genetic type. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 17744 - 17766.
- Baldwin I T. 2010. Plant volatiles. *Current Biology*, 20: 392 - 397.

- Barboni T, Luro F, Chiaramonti N, Desjobert J M, Muselli A, Costa J. 2009. Volatile composition of hybrids *Citrus* juices by headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116: 382 – 390.
- Battilana J, Costantini L, Emanuelli F, Sevini F, Segala C, Moser S, Grando M S. 2009. The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 653 – 669.
- Behr A, Johnen L. 2010. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. *Chemsuschem*, 2: 1072 – 1095.
- Boachon B, Junker R R, Miesch L, Bassard J E, Höfer R, Caillieudeaux R, Seidel D E, Lesot A, Heinrich C, Ginglinger J F. 2015. CYP76C1 (Cytochrome P450) -mediated linalool metabolism and the formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers: a strategy for defense against floral antagonists. *The Plant Cell*, 27: 2972 – 2990.
- Bohlmann J, Meyer-Gauen G, Croteau R. 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 4126 – 4133.
- Bohman B, Phillips R D, Flematti G R, Peakall R. 2018. (Methylthio)phenol semiochemicals are exploited by deceptive orchids as sexual attractants for *Campylothynnus* thynnine wasps. *Fitoterapia*, 126: 78 – 82.
- Botella-Pavía P, Besumbes Ó, Phillips M A, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodríguez-Concepción M. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal*, 40: 188 – 199.
- Brown S K, Sim M R, Abramson M J, Gray C N. 1994. Concentrations of volatile organic compounds in indoor air – a review. *Indoor Air*, (4): 123 – 134.
- Chappell J. 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*, 107: 1 – 6.
- Charve J I M. 2011. Prediction of mandarin juice flavor: a flavoromic approach [Ph. D. Dissertation]. Minnesota: University of Minnesota.
- Cheng A X, Lou Y G, Mao Y B, Lu S, Wang L J, Chen X Y. 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 179 – 186.
- Cofer T M, Seidladsams I H, Tumlinson J H. 2018. From acetoin to (Z)-3-hexen-1-ol: the diversity of volatile organic compounds that induce plant responses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66: 11197 – 11208.
- Deng Xiu-xin, Peng Shu-ang. 2013. *Citrus*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 邓秀新, 彭抒昂. 2013. 柑橘学. 北京: 中国农业出版社.
- Ding Y, Huffaker A, Köllner T G, Weckwerth P, Robert C A M, Spencer J L, Lipka A E, Schmelz E A. 2017. Selinene volatiles are essential precursors for maize defense promoting fungal pathogen resistance. *Plant Physiology*, 175: 1455 – 1468.
- Družić J, Jerković I, Marijanović Z, Roje M. 2016. Chemical biodiversity of the leaf and flower essential oils of *Citrus aurantium* L. from Dubrovnik area (Croatia) in comparison with *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Washington navel, *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Tarocco and *Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Doppio Sanguigno. *Journal of Essential Oil Research*, 28: 283 – 291.
- Duchêne E, Butterlin G, Claudel P, Dumas V, Jaegli N, Merdinoglu D. 2009. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-d-xylulose synthase gene colocalizes with a major quantitative trait loci for terpenol content. *Theoretical and Applied Genetics*, 118: 541 – 552.
- Dugo G, Cotroneo A, Bonaccorsi I, Trozzi A. 2011. Composition of the volatile fraction of citrus peel oils//Dugo G, Mondello L. Composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity. Taylor and Francis group. Boca Raton, FL, USA: 1 – 162.
- Elegbede J, Elson C, Qureshi A, Tanner M, Gould M. 1984. Inhibition of DMBA-induced mammary cancer by the monoterpene *d*-limonene. *Carcinogenesis*, 5: 661 – 664.
- Fan Gang. 2010. Study on free and bound volatile compounds in oranges and its processing products [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 范 刚. 2010. 柑橘及其加工制品中游离态和键合态挥发性物质的研究 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Ginglinger J F, Boachon B, Höfer R, Paetz C, Köllner T G, Miesch L, Lugan R, Baltenweck R, Mutterer J, Ullmann P. 2013. Gene coexpression analysis reveals complex metabolism of the monoterpene alcohol linalool in *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell*, 25: 4640 – 4657.
- González-Mas M C, Rambla J L, Alamar M C, Gutierrez A, Granell A. 2011. Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different *Citrus* species. *PLoS ONE*, 6: e22016.

- González-Mas M C, Rambla J L, López-Gresa M P, Blázquez M A, Granell A. 2019. Volatile compounds in citrus essential oils: a comprehensive review. *Frontiers in Plant Science*, 10: 12.
- Grosch W. 2001. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, 26: 533 – 545.
- Guadagni D G, Buttery R G, Okano S. 1963. Odour thresholds of some organic compounds associated with food flavours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14: 761 – 765.
- Gueguen Y, Chemardin P, Jandon G, Arnaud A, Galzy P. 1996. A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2336 – 2340.
- Hall J A, Wilson C P. 1925. The volatile constituents of Valencia orange juice. *Journal of the American Chemical Society*, 47: 2575 – 2584.
- Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, Wang L J, Chen X Y. 2012. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *The Plant Cell*, 24: 2635 – 2648.
- Hu L, Ye M, Erb M. 2019. Integration of two herbivore-induced plant volatiles results in synergistic effects on plant defence and resistance. *Plant, Cell & Environment*, 42: 959 – 971.
- Huang H H, Lin L Y, Chiang H M, Lay S J, Wu C S, Chen H C. 2017. Analysis of volatile compounds from different parts of *Citrus grandis* (L.) Osbeck flowers by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Essential Oil-bearing Plants*, 20: 1057 – 1065.
- Huo M, Cui X, Xue J, Chi G, Gao R, Deng X, Guan S, Wei J, Soromou L W, Feng H. 2013. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. *Journal of Surgical Research*, 180: 47 – 54.
- Jing L, Lei Z, Zhang G, Pilon A C, Huhman D V, Xie R J, Xi W P, Zhou Z Q, Sumner L W. 2015. Metabolite profiles of essential oils in citrus peels and their taxonomic implications. *Metabolomics*, 11: 952 – 963.
- Liang P H, Ko T P, Wang A H J. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry*, 269: 3339 – 3354.
- Li S Y, Wang H, Li F Q, Chen Z L, Li X Y, Zhu L, Wang G R, Yu J J, Huang D F, Lang Z H. 2015. The maize transcription factor EREB58 mediates the jasmonate-induced production of sesquiterpene volatiles. *The Plant Journal*, 84: 296 – 308.
- Li W Y, Liu C H, He M, Li J Q, Cai Y Q, Ma Y H, Xu J. 2017a. Largely different contents of terpenoids in beef red-flesh tangerine and its wild type. *BMC Plant Biology*, 17: 36.
- Li X, Xu Y, Shen S, Yin X, Klee H, Zhang B, Chen K. 2017b. Transcription factor CitERF71 activates the terpene synthase gene *CitTPS16* involved in the synthesis of *E*-geraniol in sweet orange fruit. *Journal of Experimental Botany*, 68: 4929 – 4938.
- Liu C, Cheng Y, Zhang H, Deng X, Chen F, Xu J. 2012. Volatile constituents of wild citrus Mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauriro) peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2617 – 2628.
- Liu C, Jiang D, Cheng Y, Deng X, Chen F, Fang L, Ma L, Xu J. 2013. Chemotaxonomic study of *Citrus*, *Poncirus* and *Fortunella* genotypes based on peel oil volatile compounds-deciphering the genetic origin of mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauriro). *PLoS ONE*, 8: e58411.
- Liu C, Yan F, Gao H, He M, Wang Z, Cheng Y, Deng X, Xu J. 2015. Features of citrus terpenoid production as revealed by carotenoid, limonoid and aroma profiles of two pummelos (*Citrus maxima*) with different flesh color. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 111 – 119.
- Liu Cui-hua. 2014. Studies on characteristic aromas and xenia effect of Mangshanyegan (*Citrus nobilis* Lauriro) [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘翠华. 2014. 莽山野柑果实特征香气及其花粉直感效应的解析[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Lota M L, de Rocca Serra D, Tomi F, Jacquemond C, Casanova J. 2002. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 796 – 805.
- Luro F, Venturini N, Costantino G, Paolini J, Ollitrault P, Costa J. 2012. Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition. *Phytochemistry*, 77: 186 – 196.
- Mahmoud S S, Croteau R B. 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 8915 – 8920.
- McGarvey D J, Croteau R. 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1015 – 1026.
- Merle H, Moron M, Blazquez M A, Boira H. 2004. Taxonomical contribution of essential oils in mandarins cultivars. *Biochemical Systematics and*

- Ecology, 32: 491 – 497.
- Moore G A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. Trends in Genetics, 17: 536 – 540.
- Myasoedova K. 2008. New findings in studies of cytochromes P450. Biochemistry (Moscow), 73: 965 – 969.
- Nieuwenhuizen N J, Chen X, Wang M Y, Matich A J, Perez R L, Allan A C, Green S A, Atkinson R G. 2015. Natural variation in monoterpene synthesis in kiwifruit: transcriptional regulation of terpene synthases by NAC and ETHYLENE-INSENSITIVE3-like transcription factors. Plant Physiology, 167: 1243 – 1258.
- Orlova I, Nagegowda D A, Kish C M, Gutensohn M, Maeda H, Varbanova M, Krichevsky A. 2009. The small subunit of snapdragon geranyl diphosphate synthase modifies the chain length specificity of tobacco geranylgeranyl diphosphate synthase in planta. The Plant Cell, 21: 4002 – 4017.
- Park S W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig D F. 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science, 318: 113 – 116.
- Pasquale C, Iodice L, Maffei M, Bossi S, Arimura G, Guerrieri E. 2015. Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. Journal of Plant Physiology, 173: 28 – 32.
- Ren J N, Tai Y N, Dong M, Shao J H, Yang S Z, Pan S Y, Fan G. 2015. Characterization of free and bound volatile compounds from six different varieties of citrus fruits. Food Chemistry, 185: 25 – 32.
- Rodríguez A, San Andrés V, Cervera M, Redondo A, Alquézar B, Shimada T, Gadea J, Rodrigo M J, Zacarías L, Palou L, López M M, Castañera P, Peña L. 2011. Terpene down-regulation in orange reveals the role of fruit aromas in mediating interactions with insect herbivores and pathogens. Plant Physiology, 156: 793 – 802.
- Rodríguez A, Shimada T, Cervera M, Alquézar B, Gadea J, Gómez-Cadenas A, de Ollas C J, Rodrigo M J, Zacarías L, Peña, L. 2014. Terpene down-regulation triggers defense responses in transgenic orange leading to resistance against fungal pathogens. Plant Physiology, 164: 321 – 339.
- Sarrou E, Chatzopoulou P, Dimassi-Theriou K, Therios I. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. Molecules, 18: 10639 – 10647.
- Schaller H, Grausem B, Benveniste P, Chye M L, Tan C T, Song Y H, Chua N H. 1995. Expression of the *Hevea brasiliensis* (HBK) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. Plant Physiology, 109: 761 – 770.
- Schnee C, Kollner T G, Held M, Turlings T C, Gershenzon J, Degenhardt J. 2006. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 1129 – 1134.
- Scora R W, Malik M N. 1970. Chemical characterization of citrus as a tool in phylogeny. Taxon, 19: 215 – 228.
- Sharon-Asa L, Shalit M A, Bar E, Holland D, Or E, Lavi U. 2003. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. The Plant Journal, 36: 664 – 774.
- Shen S L, Yin X R, Zhang B, Xie X L, Jiang Q, Grierson D, Chen K S. 2016. CitAP2.10 activation of the terpene synthase *CsTPS1* is associated with the synthesis of (+)-valencene in ‘Newhall’ orange. Journal of Experimental Botany, 67: 4105 – 4115.
- Shimada T, Endo T, Fujii H, Hara M, Ueda T, Kita M, Omura M. 2004. Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc. Plant Science, 166: 49 – 58.
- Swingle W T, Reece P C. 1967. The botany of citrus and its wild relatives//Reuther W, Webber H J, Batchelor L D. The citrus industry. Berkeley, 1: 190 – 430.
- Vranová E, Coman D, Gruijssem W. 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. Annual Review of Plant Biology, 64: 665 – 700.
- Wang H, Nagegowda D A, Rawat R, Bouvier-Navé P, Guo D, Bach T J, Chye M L. 2012. Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in *Arabidopsis* up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance. Plant Biotechnology Journal, 10: 31 – 42.

- Wang L, He F, Huang Y, He J, Yang S Z, Zeng J W, Deng C L, Jiang X L, Fang Y W, Wen S H, Xu R W, Yang X M, Zhong G Y, Chen C W, Yan X, Zhou C F, Zhang H Y, Xie Z Z, Larkin R M, Deng X X, Xu Q. 2018. Genome of wild mandarin and domestication history of mandarin. *Molecular Plant*, 11: 1024 – 1037.
- Weitzel C, Simonsen H T. 2013. Cytochrome P450-enzymes involved in the biosynthesis of mono- and sesquiterpenes. *Phytochemistry Reviews*, 14: 7 – 24.
- Wen Ya-qin. 2015. Accumulation of free and glycosidically-bound terpenes and its transcriptional regulation in wine grapes [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 问亚琴. 2015. 酿酒葡萄果实游离态和糖苷结合态萜烯的积累及其转录调控[博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Wu G A, Prochnik S, Jenkins J, Salse J, Hellsten U, Murat F, Perrier X, Ruiz M, Scalabrin S, Terol J, Takita M A, Labadie K, Poulain J, Couloux A, Jabbari K, Cattonaro J, Fabbro C D, Pinosio S, Zuccolo A, Chapman J, Grimwood J, Gmitter F, Rokhsar D. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32: 656 – 662.
- Wu G A, Terol J, Ibanez V, Lopezgarcia A, Perezroman E, Borreda C, Domingo C, Tadeo F Rr, Caballero C J, Alonso R, Curk F, Du D L, Ollitrault P, Roose M L, Dopazo J, Gmitter F G, Rokhsar D S, Talon M. 2018. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. *Nature*, 554: 311 – 316.
- Xu Y H, Wang J W, Wang S, Wang J Y, Chen X Y. 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A. *Plant Physiology*, 135: 507 – 515.
- Xu Y, Wu B, Cao X, Zhang B, Chen K. 2017. Citrus CmTPS1 is associated with formation of sesquiterpene bicyclogermacrene. *Scientia Horticulturae*, 226: 133 – 140.
- Yao Y Q, Ding X, Jia Y C, Huang C X, Wang Y Z, Xu Y H. 2008. Anti-tumor effect of β -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Letters*, 264: 127 – 134.
- Zhang H P, Chen M J, Wen H, Wang Z H, Chen J J, Fang L, Zhang H Y, Xie Z Z, Jiang D, Cheng Y J, Xu J. 2020. Transcriptomic and metabolomic analyses provide insight into the volatile compounds of citrus leaves and flowers. *BMC Plant Biology*, 20: 1 – 14.
- Zhang H P, Liu C H, Yao J L, Deng C H, Chen S S, Chen J J, Wang Z H, Yu Q M, Cheng Y J, Xu J. 2019a. *Citrus mangshanensis* pollen confers a xenia effect on linalool oxide accumulation in pummelo fruit by enhancing the expression of a cytochrome P450 78A7 gene *CitLOI*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67: 9468 – 9476.
- Zhang H P, Wen H, Chen J J, Peng Z X, Shi M Y, Chen M J, Yuan Z Y, Liu Y, Zhang H Y, Xu J. 2019b. Volatile compounds in fruit peels as novel biomarkers for the identification of four citrus species. *Molecules*, 24: 4550.
- Zhang H P, Xie Y X, Liu C H, Chen S S, Hu S S, Xie Z Z, Deng X X, Xu J. 2017. Comprehensive comparative analysis of volatile compounds in citrus fruits of different species. *Food Chemistry*, 230: 316 – 326.
- Zhao M, Zhang N, Gao T, Jin J, Jing T, Wang J, Wu Y, Wan X, Schwab W, Song C. 2019. Sesquiterpene glucosylation mediated by glucosyltransferase UGT91Q2 is involved in the modulation of cold stress tolerance in tea plants. *New Phytologist*, 226: 362 – 372.
- Zhou F, Sun T H, Zhao L, Pan X W, Lu S. 2015. The bZIP transcription factor HY5 interacts with the promoter of the monoterpene synthase gene QH6 in modulating its rhythmic expression. *Frontiers in Plant Science*, 6: 304.
- Zhou Zhi-qin. 1993. Advances in citrus taxonomy: literature review. *Acta Horticulturae Sinica*, 20 (3): 243 – 250. (in Chinese)
- 周志钦. 1993. 柑桔分类研究进展—文献综述. *园艺学报*, 20 (3): 243 – 250.
- Zvi M M B, Shklarman E, Masci T, Kalev H, Debener T, Shafir S, Ovadis M, Vainstein A. 2012. PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytologist*, 195: 335 – 345.