

TCS1 等位基因的差异表达参与弄岛野茶低咖啡碱的形成

刘玉飞, 庞丹丹*, 陈春林, 田易萍, 孙云南, 李友勇, 陈林波**

云南省农业科学院茶叶研究所/云南省茶树种质资源创新与配套栽培技术工程研究中心/云南省茶学重点实验室, 云南勐海 666201

摘要: 本研究以弄岛野茶 (MHLC) 和云抗 10 号 (YK10) 茶树品种为实验材料, 通过 HPLC 测定不同样品不同季节以及 MHLC 不同发育阶段叶和茎的生物碱含量; 利用 RT-PCR 法克隆不同样品中的咖啡碱合成酶基因 1 (*TCS1*) 的编码区, 并对其表达量进行分析。结果显示: MHLC 是一份天然低咖啡碱、高可可碱茶树种质资源, 不同季节其可可碱含量均大于 23.00 mg/g, 而咖啡碱的含量不足 4.00 mg/g; 另外, MHLC 芽中积累的咖啡碱和可可碱最高, 在同一发育阶段下, 叶片比茎具有更高的咖啡碱和可可碱, 并且随着成熟度的提高, 叶片和茎中的咖啡碱和可可碱均逐渐减少。通过基因克隆和定量分析发现: MHLC 具有 2 种 *TCS1* 等位变异: *TCS1b* (仅具有可可碱合成酶活性) 和 *TCS1d* (同时具有可可碱和咖啡碱合成酶活性), 其中 *TCS1b* 的高表达、*TCS1d* 的极低表达很可能是导致 MHLC 高可可碱、低咖啡碱的关键原因。本研究为低咖啡碱茶树育种提供材料, 也为 MHLC 的有效利用提供分子基础。

关键词: 弄岛野茶; 特异资源; *TCS1*; 生物合成

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

Differential Expression of *TCS1* Allele Involved in the Formation of Low Caffeine in Nongdao Yecha

LIU Yufei, PANG Dandan*, CHEN Chunlin, TIAN Yiping, SUN Yunnan, LI Youyong, CHEN Linbo**

Tea Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences / Yunnan Technology Engineering Research Center of Tea Germplasm Innovation and Supporting Cultivation / Yunnan Provincial Key Laboratory of Tea Science, Menghai, Yunnan 666201, China

Abstract: The alkaloid content of different samples in different seasons and different developmental stages of MHLC of two tea varieties, Nongdao Yecha (MHLC) and Yunkang 10 (YK10) was determined by HPLC. Caffeine synthase 1 gene (*TCS1*) was cloned from the cDNA of tea plant by RT-PCR in different samples, and its expression level was analyzed. The results showed that MHLC was a natural tea germplasm resource with low caffeine and high theobromine. Theobromine content of MHLC in different seasons was greater than 23.00 mg/g, while the caffeine content was less than 4.00 mg/g. In addition, the accumulation of caffeine and theobromine in MHLC shoots was the highest, and the leaves at the same stage had higher caffeine and theobromine than stems, and the caffeine and theobromine in leaves and stems gradually decreased with the increase of maturity. Through gene cloning and quantitative analysis, it was found that MHLC had two *TCS1* allelic variants: *TCS1b* (with only theobromine synthase activity) and *TCS1d* (with both theobromine and caffeine synthase activities). Among them, the high expression of *TCS1b* and the extremely low expression of *TCS1d* are likely to be the key reasons for MHLC high theobromine and low caffeine. This research would provide material for low-caffeine tea breeding and molecular basis for the efficient utilization of MHLC.

Keywords: Nongdao Yecha; specific resources; *TCS1*; biosynthesis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.003

收稿日期 2022-10-12; 修回日期 2023-01-04

基金项目 云南省重大科技专项计划项目 (No. 202102AE090038); 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金项目 (No. SKLTOF20210124); 云南省农业基础研究联合专项 (No. 202301BD070001-081)。

作者简介 刘玉飞 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 茶树资源改良; *同等贡献作者: 庞丹丹 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 茶树遗传改良。**通信作者 (Corresponding author): 陈林波 (CHEN Linbo), E-mail: chenlinbo2002@sina.com。

茶树富含咖啡碱、可可碱、茶叶碱等多种嘌呤生物碱,其中咖啡碱(2.5%~4.5%)是其含量较高并且较常见的嘌呤生物碱^[1]。咖啡碱具有兴奋、提高大脑记忆力和识别能力等多种对人体有利的生理功能^[2],但过量的摄入会使敏感人群出现失眠^[3],并且有可能引起骨质疏松和流产等不利反应^[4-5]。因此,低(无)咖啡碱茶以及相关的茶制品(咖啡碱含量低于1%)受到了有特殊需求消费群体的喜爱^[6]。目前常用的脱咖啡碱技术主要有溶剂萃取、物理吸附法、生物降解法以及培育低咖啡因茶树品种等^[7-8],其中低咖啡碱茶树育种是实现茶叶低(无)咖啡碱最经济、安全 and 有效的方法^[8]。咖啡碱代谢途径的解析以及低咖啡碱特异茶树资源的鉴定有利于茶树低咖啡碱育种工作的开展。

咖啡碱的生物合成途径已经明确,其可以通过从头合成嘌呤环,然后再合成咖啡碱,也可以利用已有的嘌呤类化合物为基础进行合成。NEGISHI 等^[9]根据同位素示踪研究,提出了茶树咖啡碱生物合成的核心途径,即以黄嘌呤核苷(xanthosine, XR)为底物,经 7-甲基黄嘌呤核苷、7-甲基黄嘌呤和可可碱等中间产物而合成,合成途径涉及 N-甲基转移酶类(N-methyltransferases, NMTs)、N-甲基核苷酶和 S-腺苷-L-甲硫氨酸合成酶(S-adenosyl-L-methionine synthetase, SAMS)。咖啡碱的合成涉及到多种酶类基因,如 SAMS (AB041534)^[10]、TIDH(inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, EU106658)^[11]和咖啡碱合成酶 TCS (caffeine synthase, AB031280)^[12]等。

TCS 是茶树咖啡碱代谢最为关键的基因,属于 NMT 家族,KATO 等^[12]通过克隆获得了茶树第一个 NMT,茶树咖啡碱合成酶基因 *TCS1*,接着 YONEYAMA 等^[13]在茶树中克隆与 *TCS1* 序列相似大于 89%的 *TCS2* (AB031281),随后金基强等^[14]根据 *TCS1* 序列从茶树基因组中克隆得到 4 种 *TCS* 基因(*TCS3*~*TCS6*)。前期的功能鉴定与进化分析结果表明,*TCS1* 是咖啡碱合成途径中的关键基因,对茶树合成咖啡碱最为重要^[12-14]。多项研究表明 *TCS1* 具有多种等位变异,现已报道 8 种 *TCS1* 的等位基因,分别命名为 *TCS1a*~*TCS1g* 和 *TCS1i*,其中 *TCS1a*、*TCS1b*、*TCS1c* 与之前克隆的 *TCS1*、*ICS1*、*PCS1* 序列相同^[15-17]。前期的进化分析以及酶学实验表明 *TCS1* 的不同等位变异可以分为 2 类,一类仅具有可可碱合成酶活性

(*TCS1b*、*TCS1c*、*TCS1g* 和 *TCS1i*);另一类同时具有可可碱和咖啡碱合成酶活性(*TCS1a*、*TCS1d*、*TCS1e* 和 *TCS1f*)^[15, 17]。

本课题组前期从国家大叶茶树资源圃(勐海)筛选获得 1 份低咖啡碱、高可可碱茶树种质——弄岛野茶(MHLC),然而,MHLC 低咖啡碱、高可可碱的形成原因尚不清楚。因此,本研究通过对 MHLC 和云抗 10 号(YK10,对照品种)不同季节以及 MHLC 不同部位嘌呤生物碱的含量进行分析,明确 MHLC 中的化学成分,并通过基因型鉴定和基因表达量分析初步解析 MHLC 低咖啡碱的形成机制。

1 材料与方法

1.1 材料

采摘弄岛野茶(MHLC)、云抗 10 号(YK10)(图 1)春、夏、秋的一芽二叶(春季:3 月 27 日;夏季:7 月 10 日;秋季:10 月 27 日),并收集 MHLC 新梢不同成熟度叶片和茎的样品(采于 10 月 27 日),微波固样 2 min,然后 80 °C 烘至足干,一部分用于生化成分的测定,另一部分液氮固样,并置于-80 °C 冰箱用于后期 RNA 的提取。



图 1 MHLC (左侧) 与 YK10 (右侧) 的表型照片
Fig. 1 Phenotypic photos of MHLC (left) and YK10 (right)

1.2 方法

1.2.1 化学组分提取与测定 准确称取 0.1 g (精确到 0.001) 样品,加入 10 mL 70%的甲醇溶液,摇匀,然后 70 °C 水浴 10 min,期间摇匀 2 次,提取结束后 7000 r/min 离心 1 min,取上清液过 0.45 μm 有机滤膜,用 HPLC 测定样品中的生物碱,具体方法参见 JIN 等^[15]的研究。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 以茶树 *GAPDH* 基因作为内参基因测定 MHLC 和 YK10 中嘌呤生物碱

关键基因 *SAMS*、*TIDH* 和 *TCS* 的表达量，其中 *SAMS*、*TIDH* 分别是 N-甲基核苷酶和 S-腺苷-L-甲硫氨酸合成酶基因、肌苷-5'-单磷酸脱氢酶基因；*TCS1-CS*、*TCS1-TS*、*TCS1-Total* 分别是表达蛋白同时具有可可碱、咖啡碱合成酶（*caffeine synthase*, *CS*）活性的等位变异、表达蛋白仅具有可可碱合成酶（*theobromine synthase*, *TS*）活性的等位变异以及 *TCS1* 整体表达水平的引物。引物序列来源于 JIN 等^[15]的研究（表 1），RT-qPCR 具体方法参照 PANG 等^[18]的研究。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物（5'-3'） Forward primer (5'-3')	反向引物（5'-3'） Reverse primer (5'-3')	注释 Note
TCS1	CACTGCTGTGGC AGCTGGC	GCAATACATTG GCACAACCCT	基因克隆
GAPDH	TTGGCATCGTTG AGGGTCT	CAGTGGGAACA CGGAAAGC	RT-qPCR
TIDH	TGCTGAAAGAAG TGGTGTGC	TCCCTTTTGTC TTGCTTCC	RT-qPCR
SAMS	ACCCAACACGAT GAGACCG	GCCAATGACAA AGCGACCA	RT-qPCR
TCS1-CS	TTACTTTTCTGAC GAGGCA	TGCGTTAAGAG CTTGAAGG	RT-qPCR
TCS1-TS	ATTACTTTTCT/CC GACGAGGCG	TGCAGTAAGAG CTTGAAGAA	RT-qPCR
TCS1-Total	AGCTGGCCTCTTT GCYATAA	ACTAYTTTCTCC TTCTCCTC	RT-qPCR

1.2.3 TCS1 等位变异 cDNA 全长的克隆 利用 *TCS1*（*TCS1a*, AB031280）的序列设计引物克隆不同样品中的 *TCS1* 基因，具体的基因克隆方法见 PANG 等^[18]的研究。利用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 在线软件进行序列比对，并利用 EXPASY 中的 BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html) 输出同源比对的结果。

2 结果与分析

2.1 不同季节化学组分含量

MHLC 和对照品种 YK10 三个季节（春、夏、秋）的可可碱与咖啡碱测定结果显示，MHLC 与 YK10 的嘌呤生物碱的总量和各组分含量均存在显著差异（表 2）。MHLC 生物碱总量和咖啡碱含量均显著低于 YK10，其中咖啡碱含量不足 YK10 的九分之一，但是其可可碱含量要高于 YK10；MHLC 中含量最高嘌呤生物碱是可可碱（大于

23.00 mg/g），其次是咖啡碱（小于 4.00 mg/g），而 YK10 与之相反。另外，春季到秋季 MHLC 中的可可碱和咖啡碱含量均有增加的趋势，但是除春季 MHLC 的咖啡碱极显著低外，其他差异均未达到极显著水平；而 YK10 中的可可碱则一直降低，咖啡碱先升高后降低。

表 2 不同季节 MHLC 和 YK10 的嘌呤生物碱含量
Tab. 2 Content of purine alkaloids of MHLC and YK10 in different seasons

样品名称 Sample name	采样时间 Sampling time	可可碱 Theobromine/ (mg·g ⁻¹)	咖啡碱 Caffeine/ (mg·g ⁻¹)	总嘌呤生物碱 Total purine alkaloids/ (mg·g ⁻¹)
YK10-3	2021-03-27	9.95±0.12 ^B	41.87±0.65 ^B	51.81±0.76 ^A
YK10-7	2021-07-10	7.81±0.15 ^C	44.34±0.42 ^A	52.15±0.56 ^A
YK10-10	2021-10-27	4.73±0.10 ^D	36.27±0.70 ^C	41.00±0.70 ^B
MHLC-3	2021-03-27	23.13±1.11 ^A	0.45±0.02 ^E	23.58±1.12 ^D
MHLC-7	2021-07-10	23.65±1.17 ^A	2.77±0.17 ^D	26.42±1.33 ^C
MHLC-10	2021-10-27	24.66±0.19 ^A	3.64±0.06 ^D	28.31±0.14 ^C

注：同列数据后不同大写字母表示差异极显著（*P*<0.01）。
Note: Different capital letters after the same column of data indicate extremely significant difference (*P*<0.01).

2.2 MHLC 不同组织化学组分含量

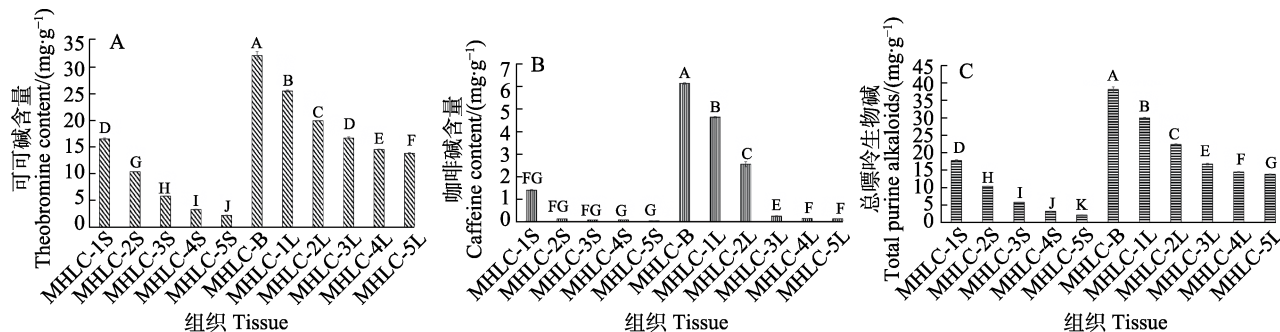
为了明确 MHLC 嘌呤生物碱不同发育阶段的变化规律，本研究测定了 MHLC 芽（MHLC-B）、不同发育阶段的叶片（芽下第一片叶子用 MHLC-1L 表示，其它依次类推）和茎（芽至第一片叶子之间的茎用 MHLC-1S 表示，第一片叶子至第二片叶子之间的茎用 MHLC-2S 表示，其它依次类推）的嘌呤生物碱。结果显示，MHLC 芽中具有最高的可可碱（32.16 mg/g）和咖啡碱（6.14 mg/g）含量，同一发育阶段叶片中可可碱和咖啡碱含量高于茎，另外，随着叶片和茎成熟度的增加，可可碱、咖啡碱以及嘌呤生物碱总量均逐渐下降（图 2）。

2.3 咖啡碱合成酶基因的克隆

根据 *TCS1*（*TCS1a*, AB031280）的基因序列设计引物，成功从 MHLC 和 YK10 中克隆得到 *TCS1* 基因的编码区全长。在 YK10 中克隆到 1 个 *TCS1* 的等位变异，命名为 *YK10_TCS1*，其与 *TCS1a*（具有可可碱和咖啡碱合成酶活性）有 3 个核苷酸的差异，虽然它们引起了编码氨基酸残基的变化，但是均不影响 *TCS* 的保守基序和关键活性位点。在 MHLC 中克隆得到 2 种 *TCS1* 的等位变异，分别命名为 *MHLC_TCS1b* 和 *MHLC_*

TCS1d。其中 *MHLC_TCS1b* 与已经报道的仅具有可可碱合成酶活性的 *TCS1b* (AB056108) 虽然有 3 个核苷酸的差异, 但是编码蛋白序列完全相同; *MHLC_TCS1d* 与已经报道的具有可可碱和咖

啡碱合成酶活性的 *TCS1d* (KT215399), 有 1 个核苷酸的差异, 并且引起编码氨基酸残基的变化, 但并不影响 TCS 的保守基序和关键活性位点 (图 3)。

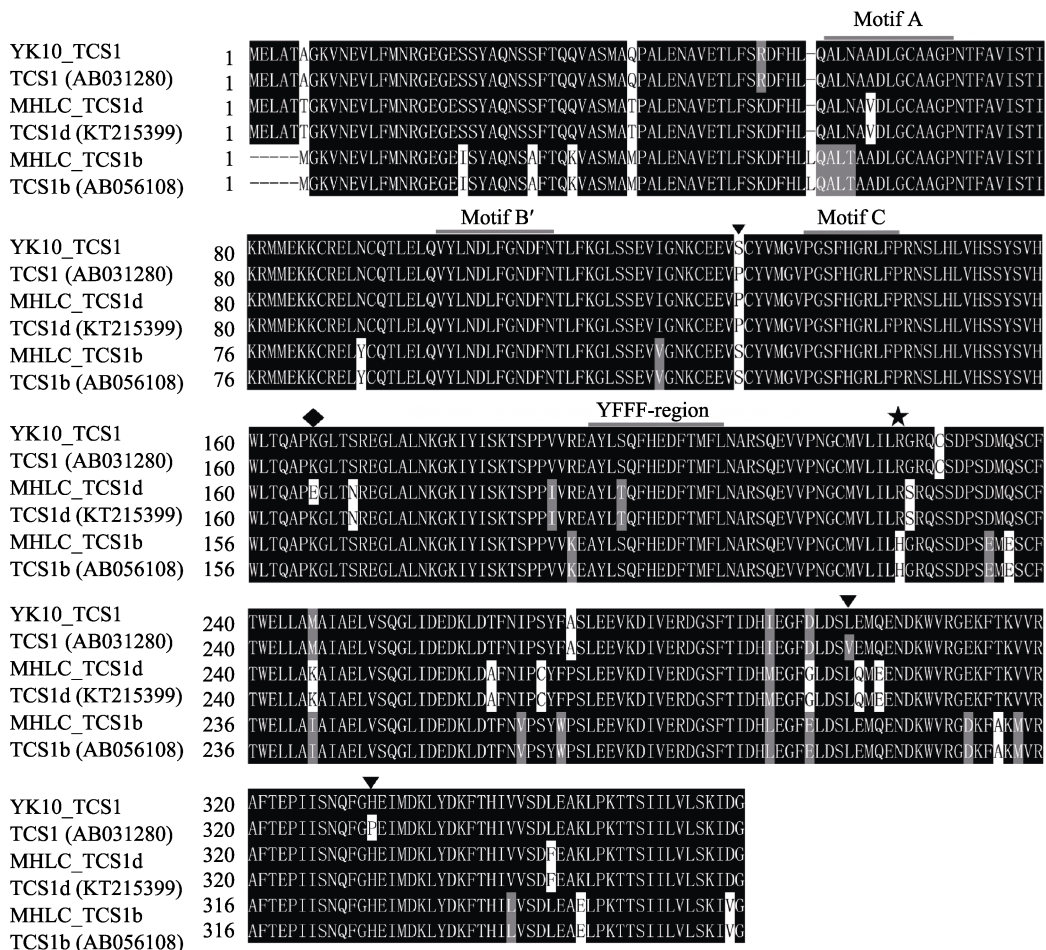


不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different capital letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 2 不同发育阶段 MHLC 嘌呤生物碱含量

Fig. 2 Contents of purine alkaloids in MHLC at different developmental stages



SAM 的结合域 A、B' 和 C 以及一个保守域 YFFF 用灰色线条标出; 与底物特异性结合的关键位点用五角星标出;

相同 *TCS1* 等位基因的变异位点用三角或菱形标出。

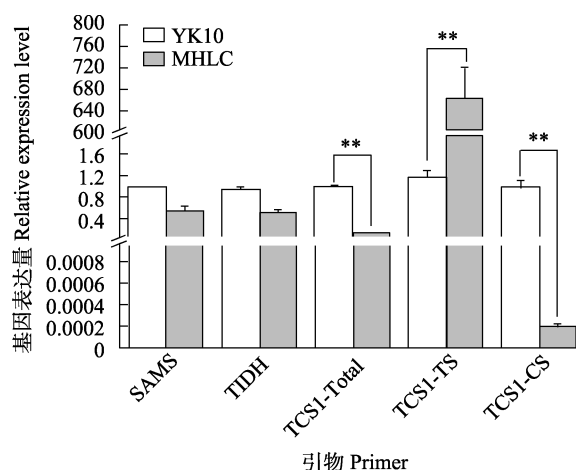
The binding domains of SAM (A, B' and C) and a conserved domain (YFFF) are marked with grey lines; Key sites for substrate-specific binding are marked with five-pointed stars; Variation sites for the same *TCS1* allele are marked with triangles or diamonds.

图 3 *TCS1* 等位变异的氨基酸序列比对

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of allelic variants of *TCS1*

2.4 咖啡碱合成途径关键基因的表达分析

MHLC 和 YK10 中嘌呤生物碱关键基因 *SAMS*、*TIDH* 和 *TCS* 的表达分析结果显示, *SAMS* 和 *TIDH* 在 MHLC 中的表达量均低于 YK10, 但是差异未达到极显著水平。另外, MHLC 中 *TCS1*-Total (检测仅具有可可碱以及具有可可碱和咖啡碱合成酶活性的 *TCS1* 等位变异, *MHLC-TCS1b*、*MHLC-TCS1d*) 和 *TCS1*-CS (检测具有可可碱和咖啡碱合成酶活性的 *TCS1* 等位变异, *MHLC-TCS1d*) 检测的基因表达量极显著低于 YK10, 而 *TCS1*-TS (检测仅具有可可碱合成酶活性的 *TCS1* 等位变异, *MHLC-TCS1b*) 检测的基因表达量极显著高于 YK10, 其中 YK10 中 *TCS1*-CS 检测的基因表达量是 MHLC 的 4800 倍左右, 而 MHLC 中 *TCS1*-TS 检测的基因的表达量是 YK10 的 560 倍左右 (图 4)。



**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 4 咖啡碱合成途径关键基因的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of key genes in caffeine synthesis pathway

3 讨论

我国具有丰富的茶树资源, 低咖啡碱茶树资源已在广东^[19]、福建^[16, 20]、四川^[6]、云南^[21-22]等多个省份发现。已报道的云南省低咖啡碱茶树来源于文山壮族苗族自治州^[21]、西双版纳傣族自治州^[22-23]以及昭通市^[24], 本研究报道的低咖啡碱 (不足 4.00 mg/g) 和高可可碱 (大于 23.00 mg/g) 的弄岛野茶 (MHLC) 来源于云南省德宏傣族景颇族自治州瑞丽市, 是该地区首次报道的低咖啡碱茶树资源。瑞丽市 MHLC 为低 (无) 咖啡碱茶

树育种提供了可利用的亲本材料, 并扩大了筛选低咖啡碱茶树资源的区域。

MHLC 中可可碱和咖啡碱由春季到秋季均有增加的趋势, 但除春季咖啡碱显著低外, 可可碱或咖啡碱不同季节间的差异均未达到极显著水平; 而 YK10 中可可碱从春季到秋季则一直降低, 咖啡碱先升高后降低。这说明不同茶树种质资源, 咖啡碱和可可碱不同季节间的变化趋势有所差异, 李金^[25]对 25 个茶树品种的研究结果也指出, 不同品种在不同季节咖啡碱和可可碱的变化趋势具有一定的差异, 这可能与茶树品种自身的调控和代谢机制相关。茶树中咖啡碱和可可碱主要分布在幼嫩部位, 其中在新梢部分的分布最为集中, 越老化的叶片含量越少^[16, 26-27]。MHLC 中咖啡碱和可可碱在不同成熟度叶片和茎中的分布规律与之前的结果一致, 也是在幼嫩的部位含量较高。

本研究发现, MHLC 中含有 2 种 *TCS1* 等位变异基因: *MHLC_TCS1b* 和 *MHLC_TCS1d*。其中 *MHLC_TCS1b* 与已经报道的 *TCS1b*^[15] (AB056108, 仅具有可可碱合成酶活性) 编码蛋白序列基本完全相同; 虽然 *MHLC_TCS1d* 与 *TCS1d*^[15-16] (KT215399, 同时具有可可碱和咖啡碱合成酶活性) 的编码蛋白序列有 1 个氨基酸残基的差异, 但是并不影响 NMT 保守基序和 TCS 的关键活性位点, 推测 *MHLC_TCS1d* 与 *TCS1d* 具有相似的功能。以上分析可知, MHLC 同时具有 TS 活性和 CS 活性的 *TCS1* 等位变异。基因表达量分析发现, *MHLC_TCS1b* 在 MHLC 中的表达量很高, 这与 MHLC 相比 YK10 在芽叶中积累较多的可可碱相符; 而 *MHLC_TCS1d* 在 MHLC 中表达量极低 (不足 YK10 中 *TCS1d* 基因表达量的 1/4800), 很可能是 MHLC 低咖啡碱含量的一个主要原因。JIN 等^[15]和刘玉飞等^[28]的研究均表明 *TCS1* 不同等位变异的启动子序列存在显著差异, 但 *MHLC_TCS1d* 的低表达是否由启动子序列变异引起还需进一步研究。

参考文献

- [1] 金基强, 周晨阳, 马春雷, 姚明哲, 马建强, 陈亮. 我国代表性茶树种质嘌呤生物碱的鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 279-285.
- JIN J Q, ZHOU C Y, MA C L, YAO M Z, MA J Q, CHEN L. Identification on purine alkaloids of representative tea germplasms in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014,

- 15(2): 279-285. (in Chinese)
- [2] 宛晓春. 茶叶生物化学: 3 版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 8-63.
- WAN X C. Tea biochemistry[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 2008: 8-63 (in Chinese)
- [3] 吴华玲, 陈栋, 李家贤. 茶树咖啡碱代谢及低咖啡碱茶树育种研究进展[J]. 热带作物学报, 2011, 32(9): 1780-1785.
- WU H L, CHEN D, LI J X. Research progress in caffeine metabolism and low caffeine content germplasm breeding of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze][J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(9): 1780-1785. (in Chinese)
- [4] HALLSTROM T, WOLK A, GLYNN A, MICHAELSSON K. Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women[J]. Osteoporosis International, 2006, 17(7): 1055-1064.
- [5] WENG X P, ODOULI R, LI D K. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study[J]. Obstetric Anesthesia Digest, 2008, 28(4): 229-230.
- [6] 陈盛相, 齐桂年, 吴国宏, 夏建冰. 低咖啡碱茶树种质资源筛选[J]. 福建茶叶, 2009, 31(3): 9-10.
- CHEN S X, QI G N, WU G H, XIA J B. Screening of low-caffeine tea plant germplasm resources[J]. Tea in Fujian, 2009, 31(3): 9-10. (in Chinese)
- [7] 刘念, 李摇摇, 李霜. 茶叶脱咖啡因技术的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(24): 218-224.
- LIU N, LI Y Y, LI S. Research progress of decaffeination technology in tea[J]. Food Research and Development, 2021, 42(24): 218-224. (in Chinese)
- [8] 许勇泉, 尹军峰, 袁海波, 陈建新, 汪芳. 茶叶脱咖啡因技术研究进展[J]. 茶叶科学, 2008, 28(1): 1-8.
- XU Y Q, YIN J F, YUAN H B, CHEN J X, WANG F. A review on the technique of tea decaffeination[J]. Journal of Tea Science, 2008, 28(1): 1-8. (in Chinese)
- [9] NEGISHI O, OZAWA T, IMAGAWA H. Conversion of xanthosine into caffeine in tea plants[J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1985, 49: 251-253.
- [10] 冯艳飞, 梁月荣. 茶树 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析[J]. 茶叶科学, 2001, 21(1): 21-25.
- FENG Y F, LIANG Y R. Cloning and sequencing of S-adenosylmethionine synthetase gene in tea plant[J]. Journal of Tea Science, 2001, 21(1): 21-25. (in Chinese)
- [11] KEYS C A, CROZIER A, ASHIHARA H. Inhibition of caffeine biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) plants by ribavirin[J]. FEBS Letters, 2003, 554(3): 473-477.
- [12] KATO M, MIZUNO K, CROZIER A, FUJIMURA T, ASHIHARA H. Caffeine synthase gene from tea leaves[J]. Nature, 2000, 406: 956-957.
- [13] YONEYAMA N, MORIMOTO H, YE C X, ASHIHARA H, MIZUNO K, KATO M. Substrate specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2006, 275: 125-135.
- [14] 金基强, 姚明哲, 马春雷, 马建强, 陈亮. 合成茶树咖啡碱相关的 N-甲基转移酶基因家族的克隆及序列分析[J]. 茶叶科学, 2014, 34(2): 188-194.
- JIN J Q, YAO M Z, MA C L, MA J Q, CHEN L. Cloning and sequence analysis of the N-methyltransferase gene family involving in caffeine biosynthesis of tea plant[J]. Journal of Tea Science, 2014, 34(2): 188-194. (in Chinese)
- [15] JIN J Q, YAO M Z, MA C L, MA J Q, CHEN L. Natural allelic variations of *TCS1* play a crucial role in caffeine biosynthesis of tea plant and its related species[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 100: 18-26.
- [16] JIN J Q, CHAI Y F, LIU Y F, ZHANG J, YAO M Z, CHEN L. Hongyacha, a naturally caffeine-free tea plant from Fujian, China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(43): 11311-11319.
- [17] 刘玉飞, 金基强, 姚明哲, 陈亮. 茶树咖啡碱合成酶基因稀有等位变异 *TCS1g* 的筛选、克隆及功能[J]. 中国农业科学, 2019, 52(10): 1772-1783.
- LIU Y F, JIN J Q, YAO M Z, CHEN L. Screening, cloning and functional research of the rare allelic variation of caffeine synthase gene (*TCS1g*) in tea plants[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(10): 1772-1783. (in Chinese)
- [18] PANG D D, LIU Y F, SUN Y N, TIAN Y P, CHEN L B. Menghai Huangye, a novel albino tea germplasm with high theanine content and a high catechin[J]. Plant Science, 2021, 311: 110997.
- [19] 张宏达, 叶创兴, 张润梅, 马应丹, 曾沛. 中国发现新的茶树资源-可可茶[J]. 中山大学学报, 1988(3): 131-133.
- ZHANG H D, YE C X, ZHANG R M, MA Y D, ZENG P. A discovery of new tea resource-cocoa tea tree containing theobromine from China[J]. ACTA Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 1988(3): 131-133. (in Chinese)
- [20] 陈潇敏, 赵峰, 王淑燕, 邵淑贤, 吴文晞, 林钦, 王鹏杰, 叶乃兴. 福建野生茶树资源嘌呤生物碱构成评价及特异资源筛选[J]. 茶叶科学, 2022, 42(1): 18-28.
- CHEN X M, ZHAO F, WANG S Y, SHAO S X, WU W X, LIN Q, WANG P J, YE N X. Purine alkaloid evaluation and excellent resources screening of Fujian wild tea[J]. Journal of Tea Science, 2022, 42(1): 18-28. (in Chinese)
- [21] 唐一春, 宋维希, 矣兵, 季鹏章, 王平盛, 张俊. 低咖啡碱茶树种质资源的鉴定及评价[J]. 西南农业学报, 2010,

- 23(4): 1051-1054.
- TANG Y C, SONG W X, YI B, JI P Z, WANG P S, ZHANG J. Identification and evaluation on low caffeine content in tea germplasm[J]. *Southwest China Journal of Agricultural*, 2010, 23(4): 1051-1054. (in Chinese)
- [22] 段志芬, 成浩, 尚卫琼, 李友勇, 杨毅坚, 杨盛美, 刘本英, 矣兵, 杨兴荣, 郭顺云. 云南景洪市野生古茶树低咖啡碱资源的筛选[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(9): 32-35.
- DUAN Z F, CHENG H, SHANG W Q, LI Y Y, YANG Y J, YANG S M, LIU B Y, YI B, YANG X R, GUO S Y. Screening of ancient tea tree germplasms with low caffeine in Jinghong city of Yunnan province[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2016, 48(9): 32-35. (in Chinese)
- [23] 刘玉飞, 庞丹丹, 蒋会兵, 田易萍, 李友勇, 孙云南, 陈林波. 66 份云南茶树种质生化成分的分析及特异种质筛[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(3): 693-699.
- LIU Y F, PANG D D, JIANG H B, TIAN Y P, LI Y Y, SUN Y N, CHEN L B. Biochemical component analysis and specific resource selection of 66 accessions of tea germplasms in Yunnan[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52(3): 693-699. (in Chinese)
- [24] 张梁, 陈琪, 宛晓春, 李大祥. 中国茶叶生物化学研究 40 年[J]. *中国茶叶*, 2019, 41(9): 1-10.
- ZHANG L, CHEN Q, WAN X C, LI D X. 40 years of tea biochemical research in China[J]. *China Tea*, 2019, 41(9): 1-10. (in Chinese)
- [25] 李金. 茶树咖啡碱与可可碱含量、关键酶基因表达量及 cSNP 相关性分析[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- LI J. A correlation study of caffeine contents with theobromine contents, transcriptional expression and cSNP of key enzyme genes in tea plants[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013. (in Chinese)
- [26] ASHIHARA H, SANO H, CROZIER A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(4): 841-856.
- [27] HOLLINGSWORTH R G, ARMSTRONG J W, CAMPBELL E. Caffeine as a repellent for slugs and snail: at high concentrations this stimulant becomes a lethal neurotoxin to garden pests[J]. *Nature*, 2002, 417: 915-916.
- [28] 刘玉飞, 庞丹丹, 李友勇, 蒋会兵, 田易萍, 孙云南, 陈林波. 苦茶碱代谢关键转录因子基因的筛选鉴定[J]. *茶叶科学*, 2022, 42(1): 41-50.
- LIU Y F, PANG D D, LI Y Y, JIANG H B, TIAN Y P, SUN Y N, CHEN L B. The screening and identification of key transcription factor genes for theacrine metabolism[J]. *Journal of Tea Science*, 2022, 42(1): 41-50. (in Chinese)