

DNA条形码技术在茶叶品种鉴定中的研究现状及展望

向禹澄, 吴长征, 刘来华*, 盛 崧*

中国农业大学资源环境学院, 北京
Email: *ll1025@cau.edu.cn, *shengsong@cau.edu.cn

收稿日期: 2021年8月9日; 录用日期: 2021年9月17日; 发布日期: 2021年9月29日

摘 要

茶树是重要经济作物, 因其叶片是世界范围内普遍使用的饮品原料。中国作为主要的茶叶生产和消费国, 商业市场中拥有种类繁多的茶产品; 但是, 茶叶加工制作后对其外观的改变, 严重影响对茶叶产品的植物品种来源的纯度鉴定。DNA条形码技术是一种利用种间特异性的基因序列信息快速、精准鉴定物种类型的分子检测的较新方法, 其目前已越来越多的应用于动植物及真菌等的生物多样性研究中。因此, 将DNA条形码技术应用于茶产品的鉴定, 具有保质和防伪的茶业市场运用价值。本文从DNA条形码技术及其在茶叶中的研究进展角度出发, 主要总结了该技术应用于茶叶(生产)上的现状以及存在的实践技术问题, 探讨了基于DNA条形码分析手段提高茶叶品种鉴定精确度和效率的可能性新方法。

关键词

中国茶叶类, DNA条形码, 市场运用

Research Status and Prospects of DNA Barcoding Technology in Tea Varieties Identification

Yucheng Xiang, Changzheng Wu, Laihua Liu*, Song Sheng*

College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing
Email: *ll1025@cau.edu.cn, *shengsong@cau.edu.cn

Received: Aug. 9th, 2021; accepted: Sep. 17th, 2021; published: Sep. 29th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 向禹澄, 吴长征, 刘来华, 盛崧. DNA 条形码技术在茶叶品种鉴定中的研究现状及展望[J]. 植物学研究, 2021, 10(5): 734-738. DOI: 10.12677/br.2021.105092

Abstract

Tea plant (*Camellia sinensis* L.) represents an important commercial crop, because its leaves are used worldwide as direct and raw material for a beverage(s). China is a major tea producing- and consuming-country, and a large variety of commercial tea products occur in Chinese market; however, because of a strong change of a leaf shape or appearance by a manufactory processing, it makes difficult to effectively distinguish/identify the purity of a tea product originated from a given plant species. The DNA barcoding technology, a recently emerged molecular approach for quick and accurate identification of a genotype of (intra) species on the base of (intra) species-specific gene sequence information, has been increasingly applied to investigate a bio-diversity of animals, plants and fungi, etc. Thus, the use of the DNA barcoding techniques for distinguishing tea products has an application value in relation to protecting quality and anti-counterfeiting in tea-industry and market. In this review, from a viewpoint of DNA barcoding technology and its use in tea plant research advance, we have mainly summarized the present application status and practical limitation of this technology as applied in the tea production, and discussed a possible new methodology aiming at improving an accuracy and efficiency for testing or identifying tea varieties based on DNA barcoding analysis.

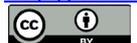
Keywords

Chinese Teas, The DNA Barcoding Technology, An Application of Market

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

茶(*Camellia sinensis*)源自中国, 已有 2000 余年历史。公元六世纪传至海外, 现今茶树种植已遍及全世界 60 余个国家, 饮茶文化遍布全球。作为世界三大饮料之一的茶叶, 其市场需求巨大。但在茶叶的销售过程中, 存在通过向高价茶掺入外观接近的其他品种茶叶或者以次充好用低价茶来冒充高价茶叶等掺假手段, 更甚者, 以同品种低端茶冒充高端茶以获取不当收益。以保靖黄金茶为例, 逐步改良过后的茶叶品种“黄金茶 1 号”所产茶叶是杂树茶叶售卖价格的一倍以上。目前, 市场上的茶产品已逾数百种, 因其制茶工艺的多样化, 经过初/精加工后的茶叶已很难简单通过人工感官检测或借助机械辅助检测。虽然部分技术如高光谱图像技术[1]能有效鉴定茶叶掺假, 但其检测机器复杂且时效性较低导致很难大范围推广。

2. DNA 条形码技术的特点及研究现状

DNA 条形码(DNA barcoding)技术于 2003 年首次被加拿大教授 Paul Hebert 提出[2], 受到商品条形码的启发, DNA 条形码希望利用一段较短的 DNA 序列对物种进行快速鉴定标记, 并希望以此建立 DNA 序列和生物物种之间的一一对应关系。同年, Paul Hebert 课题组报道了成功运用编码线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 1 (cytochrome c oxidase subunit 1)基因的序列鉴定近源物种的实验结果[3]。近年来, 该技术在中药材、红树等植物中的物种鉴定已有成效[4] [5]。DNA 条形码指一条具有物种特异性的 DNA 序列, 鉴定过程主要通过分子生物学手段(PCR 扩增等)将这条序列进行“读取”。这段特定 DNA 序列要求能够代

表物种且在物种内遗传稳定, 种间具有差异且易于扩增, 可通过测序并鉴定物种。目前, DNA 条形码已用于多种场景的动植物物种快速鉴定, 且在科研中可辅助生物学家进一步了解生态系统内发生的相互作用, 但与传统的分类学相比, DNA 条形码技术并未得到普及, 多为一种科研方法, 还需要大量的数据与技术的积累与创新, 如英国近年来正在对全国范围内的植物 DNA 条形码进行搜集、整理和统计[6]。

目前, 全球范围内科学家们已建立了多个 DNA 条形码数据库。现阶段, 加拿大生物多样性基因组学中心开发的 BOLD 数据库(The Barcoding of Life Data System, <http://www.boldsystems.org>)较为领先, 至今已收录 966.1 万条 DNA 条形码(其中 71.9 万已有条形码索引码 BIN, Barcoding Index Number), 覆盖 23.2 万种动物、7 万种植物、2.4 万种真菌及其他生物[7]。同时, 国际生物条形码协会数据库(International Barcoding of Life, <https://ibol.org/>)提供的数据也极大丰富了现有物种的 DNA 条形码的鉴定总量和覆盖群体范围。

我国地大物博, 植物资源丰富, 对精确鉴定植物种类有较大需求。早在 2009 年, 因陈士林课题组在植物 DNA 条形码筛选中的突出成绩, 国际生物条形码协会(Consortium for the Barcoding of Life, CBOL)邀请其在“第三届国际条形码大会”上做了题为“为何选择 ITS2 序列作为植物条形码”和“ITS2”序列作为通用条形码序列鉴定药用植物”的两个学术报告, 并将 ITS2(internal transcribed spacer 2)作为补充条形码序列进行评估。现今, 药用植物、藻类、烟草等物种 DNA 条形码的研究已取得卓越进展。

为快速鉴定疑似烟草制品中是否含有烟草成分以及判定非法贩卖的假烟制品, 白戈等[8]对三个烟草栽培品种的 *rbcL* 基因进行了克隆。*rbcL* (Rubisco 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), 即核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶, 对植物固定 CO₂ 有重要作用, 其在进化上的保守性是其被国际生物条形码协会(CBOL)定义为植物条形码基因的重要原因。通过对蛋白属性、进化关系的分析, 发现三组烟草主栽培品种间 *NtrbcL* 序列保守。同时, 进一步选取烟草、马铃薯、龙葵、辣椒、番茄、曼陀罗、茄子、莨菪小花、颠茄以及拟南芥、水稻的 *rbcL* 基因进行聚类, 发现茄科植物 *rbcL* 基因与其他植物聚类分离, 具有保守性, 与植物已知的进化结果相似, 因此 *rbcL* 基因序列可作为潜在 DNA 条形码鉴定序列。翌年, 白戈等[9]将 NCBI 上所搜索到的 *rbcL* 序列批量分析, 挑选在所有物种中均保守的多区域设计通用引物, 以便该引物具有足够的通用性, 同时设计引物扩增区域包含足够多的多态性以便区分不同植物, 最后选定烟草 *NtrbcL* 基因 N 端约 400 bp 左右的区域进行扩增。结果 PCR 检测扩增产物与目的片段大小一致且单一。双盲试验设计将混合多种植物样品与纯烟草进行比较, 成功区分出差别并鉴定出混合植物样品中各个组分的来源, 表明该方法可应对复杂混合样品。在后续双盲实验中, 其课题组成功区分出纯烟草样品和混合多种植物样品, 且鉴定出混合植物样品中各个组分的来源, 结果表明该方法在应对复杂混合样品时能取得不错的效果。

3. DNA 条形码技术鉴定茶叶品种的研究现状

DNA 条形码鉴定标准化流程如下: 1) DNA 条形码的序列分析, 获取鉴定物种的序列信息, 进行多序列比较, 计算遗传距离, 运用多种方法筛选候选 DNA 序列, 早期 CBOL 建议植物选取叶绿体 DNA 上的片段居多, 近年来逐渐有新的候选片段加入。2) DNA 条形码序列校对, 对第一步中得到的序列进行验证, 因试验过程中存在如样品污染、样品不准确、测序过程错误等, 都会影响序列的获取; 3) 评估 DNA 条形码的物种鉴定能力, 包括但不限于 BLAST 搜索鉴定(BLAST-based Method)以及不同序列间遗传距离比较(Distance-Based Method), 或进行基于系统进化关系的重建(Tree-Based Method)等; 4) 最后在实际生产中提取样品 DNA, 测序比对现有 DNA 条形码库, 鉴定样品品种信息。

2011 年, Stoeckle 等[10]曾对 146 种茶产品中的茶叶成分进行抽样鉴定, 约 1/3 的茶品包含商标成分未列出的植物原材料, 即产品未达标。此外, DNA 条形码还可应用于茶叶从种植到生产中的多个环节,

具有巨大的应用潜力和未来的商业价值。目前为止,收录在澳大利亚 BOLD 数据库中的茶叶品种仅为 147 种,虽然来自我国的茶叶占 102 种,选取的基因片段除红皮糙果茶(*Camellia crapanelliana*)包含 *matK* 和 *rbcL* 基因外,其余均使用 ITS 或者 ITS2 基因,但相较于我国广博的茶叶种质资源,其数量和覆盖范围还远远有所不及。仅《2020 中国茶叶区域公用品牌价值评估报告》中参与评估的一定规模量产的茶叶品种高达 111 种,有效品牌 98 个,而据不完全统计,我国有超过千种的茶树资源以及众多潜藏的野生未发现茶树种质资源,若如无高效的鉴定方法,将可能导致鉴定效果正确率低而无法推广应用。因此,为了未来更直观的在不同应用场景中鉴别茶树品种,将其归类,茶叶的 DNA 条形码鉴定技术的研究势在必行。近年来,我国已逐渐开始有 DNA 条形码鉴定茶叶品种的技术应用的成功报道,王旻璇[11]成功鉴定了 37 份茶叶样品中掺杂的非茶类植物成分,同时对其选取的其中茶叶的(岳阳黄茶、铁观音、太姥银针、信阳毛尖、正山小种、宫廷普洱和六堡茶)DNA 条形码也有很好的鉴别效果。而陈莹等[12]已成功鉴别 28 种以上的山茶品种。综上,茶叶 DNA 条形码鉴定技术在实验室中已有良好表现,可尝试扩大鉴定品种,优化鉴定流程,提高鉴定效率。

4. 展望

相较于分类学(Taxonomy)的广泛应用,如今 DNA 条形码技术,多为科学研究的一种方法,实际生产中的应用正在研究和推广普及中。虽然该技术能利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段对物种进行快速鉴定,但即使通过大量测序,获取到具备鉴定条件的 DNA 条形码片段后,在一线生产中仍存在由测序仪器和操作人员培训难导致的成本高、过程较长等问题。高分辨率溶解分析(High-resolution melting analysis, HRM)是一门新兴的技术,与传统饱和染料 SYBR Green I 用于 RT-qPCR 不同,HRM 应用的饱和染料(LC Green, LC Green Plus 和 SYTO9 等)将饱和 DNA 双螺旋结构中的小沟,使得 DNA 解链过程中不会发生重排,使得其溶解曲线由更高的分辨率,进而微小的一个碱基突变也能检测其产生的解链温度差异,虽然温差仅为零点几摄氏度。HRM 仪器运行步骤和对应原理如下:HRM 首先对 PCR 的扩增子进行加热,温度从 50 度逐渐上升到 95 度。在此过程中,扩增子逐渐解链,在达到溶解温度(T_m)时, DNA 链完全分开。在 HRM 分析初期,荧光强度很高,随着温度升高,双链 NA 逐渐减少,荧光强度下降,而 HRM 仪器通过高频相机,记录下荧光变化的整个过程,形成能鉴别细小溶解曲线差异的最终图形,进而通过算法鉴定序列的微小差异。相较于经典的 DNA 条形码鉴定流程, Lagiotis 等[13]报道了应用高分辨率溶解分析(High-resolution melting analysis, HRM)检测 PCR 片段微小序列差异在 DNA 条形码鉴定中的应用。以茶为例,该技术成功鉴别出茶产品中体积比(v/v)在 1%的腰果参杂物,体现出很高的精度。因此,HRM 有可能在未来成为快速鉴定 DNA 条形码终端设备。同时,针对最易混淆的数个品种,可以针对具体序列分析,是否有单个或多个酶切位点能够将特定基因的产物片段切至可区分条带,对于少量(小于 10)的茶叶品种进行针对性快速区分,这可运用于偏远不发达地区的针对特定品种的茶叶进行快速鉴定。

最后,根据现有信息,提出未来全方位鉴定茶叶品种 DNA 条形码的预测方案:a) 两倍体茶树的基因组含有 15 对染色体($2n = 30$),约包含约 3.5 至 3.8 Gb。由于阿萨姆茶(*Camellia sinensis* var. *assamica*, CSA)和中国茶(*Camellia sinensis* var. *sinensis*, CSS)基因组的草图分别完成于 2017 和 2018 年[14] [15]。目前对于茶叶基因组以及相关基因的。并且,与功能基因组研究的方法和目的不同的是,茶叶品种的 DNA 条形码鉴定需要更多不同茶叶单倍型(haplotype)的序列信息,至少是包含茶叶质体(叶绿体和线粒体)中核酸序列信息。根据 CBOL 推荐,植物质体中包含的七个区域:*atpF-atpH* 间隔, *matK* 基因, *rbcL* 基因, *rpoB* 基因, *rpoC* 基因, *psbK-psbI* 间隔和 *trnH-psbA* 间隔,具有高稳定遗传以及显著种间差异且易于扩增的特点,可作为候选序列(CBOL Plant Working Group, PNAS, 2009)。在初步鉴定茶叶不同品种的 DNA

条形码时, 可批量取样并测序不同品种的叶绿体和线粒体中基因组的序列。目前阿萨姆茶的叶绿体和线粒体约检测到 70 和 17 万个碱基, 分别注释 141 和 71 个编码蛋白质的基因。因此, 测序质体基因组的工作量是远小于全基因组测序以筛选候选 DNA 条形码序列; b) 高通量完成质体基因组测序后, 进行 blast 比对, 选取符合 DNA 条形码条件的片段序列, 进行引物设计及扩增验证, 并将产物测序比对, 选取合适的 DNA 条形码序列; c) 双盲测试, 多样品、多混合组分的茶叶及类似原材料混合, 用步骤 2 中筛选出的条形码序列进行鉴定; d) 确定现有 DNA 条形码鉴定能力的适用范围, 选取检测灵敏度最高的数个 DNA 条形码作为最终的实际试验对象; e) 运用 DNA 条形码对市场上的茶叶产品进行实际鉴定; f) 相比较传统的 DNA 条形码需测序比对鉴定, 引入高分辨率溶解分析(High-resolution melting analysis, HRM)检测以提高检测精度和速度, 提高鉴定流程的效率。

参考文献

- [1] 葛啸. 基于高光谱图像技术的茶叶品种分类及掺假程度检测研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- [2] Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and de Waard, J.R. (2003) Biological Identifications through DNA Barcodes. *The Royal Society*, **270**, 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- [3] Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and de Waard, J.R. (2003) Barcoding Animal Life: Cytochrome oxidase Subunit 1 Divergences among Closely Related Species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **270**, S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- [4] 吕小旭, 关鉴茹, 樊敏, 赵小荣. DNA 条形码技术在中药领域的应用[J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(1): 42-45.
- [5] 孙稚颖, 李强, 田晓萌, 等. 中国红树类海桑属植物 DNA 条形码研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(6): 2036-2042.
- [6] Jones, L., Twyford, A.D., Ford, C.R., Rich, T.C.G., Davies, H., Forrest, L.L., et al. (2021) Barcode UK: A Complete DNA Barcoding Resource for the Flowering Plants and Conifers of the United Kingdom. *Molecular Ecology Resources*, **21**, 2050-2062. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13388>
- [7] Ratnasingham, S. and Hebert, P.D.N. (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 355-364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- [8] 白戈, 杨大海, 姚恒, 谢贺. 烟草 *Ntrbc1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 4967-4972.
- [9] 白戈, 杨大海, 姚恒, 谢贺. 利用 *rbcL* 基因鉴定烟草制品组成成份[J]. 分子植物育种, 2020(10): 1-11.
- [10] Stoeckle, M.Y., Gamble, C.C., Kirpekar, R., Young, G., Ahmed, S. and Little, D.P. (2011) Commercial Teas Highlight Plant DNA Barcode Identification Successes and Obstacles. *Scientific Reports*, **1**, Article No. 42. <https://doi.org/10.1038/srep00042>
- [11] 王旻璇. 茶叶中掺杂植物成分的分析[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西大学, 2018.
- [12] 陈莹, 郭蓓琳, 姚丽敏, 潘王韵, 曾菁菁, 吕祉龙, 等. 基于 DNA 条形码进行金花茶组种间鉴别[J]. 种子, 2021, 40(2): 139-142.
- [13] Lagiotis, G., Stavridou, E., Bosmali, I., Osathanukul, M., Haider, N. and Madesis, P. (2020) Detection and Quantification of Cashew in Commercial Tea Products Using High Resolution Melting (HRM) Analysis. *Journal of Food Science*, **85**, 1629-1634. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15138>
- [14] Xia, E.-H., Zhang, H.-B., Sheng, J., Li, K., Zhang, Q.-J., Kim, C., et al. (2017) The Tea Tree Genome Provides Insights into Tea Flavor and Independent Evolution of Caffeine Biosynthesis. *Molecular Plant*, **10**, 866-877. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.04.002>
- [15] Wei, C.L., Yang, H., Wang, S.B., Zhao, J., Liu, C., Gao, L., et al. (2018) Draft Genome Sequence of *Camellia sinensis* var. *Sinensis* Provides Insights into the Evolution of the Tea Genome and Tea Quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, E4151-E4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719622115>