

高晨曦, 郭义红, 孙威江, 陈志丹. 基于DNA条形码和代谢组学技术的闽南乌龙茶产品鉴别[J]. 应用与环境生物学报, 2021, 27 (6): 1645-1652
Gao CX, Guo YH, Sun WJ, Chen ZD. Identification of oolong tea in southern Fujian, based on DNA barcoding and metabonomics [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2021, 27 (6): 1645-1652

基于DNA条形码和代谢组学技术的 闽南乌龙茶产品鉴别

高晨曦^{1, 2, 4} 郭义红^{1, 2, 4, 5} 孙威江^{1, 2, 4} 陈志丹^{2, 3, 4}

¹福建农林大学园艺学院 福州 350002

²安溪现代现代农业产业协同创新中心 泉州 362400

³福建农林大学安溪茶学院 泉州 362400

⁴福建省茶产业工程技术研究中心 福州 350002

⁵莆田市涵江区三江口镇人民政府 莆田 351100

摘要 为探究DNA条形码与代谢组学技术对于不同乌龙茶产品的鉴定效果,以18份不同茶树品种加工的闽南乌龙茶产品为供试材料,对8条DNA序列片段扩增、测序,分析计算其遗传距离并构建系统进化树;利用UPLC-ESI-QTOF-MS技术对不同品种闽南乌龙茶产品进行非靶向代谢组分析;并计算样品的遗传-化学相关性。结果显示: *trnL-trnF* + ITS2扩增成功率及测序成功率均达到100%,具有较高的鉴定效率,将其作为鉴定样品的最适序列组合;筛选出闽南乌龙茶产品中9个最关键的差异代谢物,进一步分析发现,金观音、铁观音、本山、水仙,以及大叶乌龙、毛蟹、佛手、黄旦具有较为相似的代谢成分,并有效区分了不同品种的闽南乌龙茶产品;通过遗传-化学相关性分析发现, *trnL-trnF* 序列的遗传距离与差异代谢物间的相关性较高。本研究以 *trnL-trnF* + ITS2序列组合和代谢组学相结合的遗传-化学研究方法对闽南地区部分代表性乌龙茶产品进行了快速、准确的鉴定,实现茶叶品种的识别标准化和信息化,为茶叶识别技术开辟了一条新途径。(图4表7参32)

关键词 闽南乌龙茶; DNA条形码; 代谢组学; 茶叶品种鉴别

Identification of oolong tea in southern Fujian, based on DNA barcoding and metabonomics

GAO Chenxi^{1, 2, 4}, GUO Yihong^{1, 2, 4, 5}, SUN Weijiang^{1, 2, 4} & CHEN Zhidan^{2, 3, 4}

¹ College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

² Collaborative Innovation Center of Modern Agriculture Industrial Park of Anxi County, Quanzhou 362400, China

³ College of Tea, Fujian Agriculture and Forestry University, Quanzhou 362400, China

⁴ Engineering Technology and Research Center of Fujian Tea Industry, Fuzhou 350002, China

⁵ Sanjiangkou Town Government in Hanjiang District, Putian 351100, China

Abstract To explore the effect of DNA barcoding and metabonomics techniques on the identification of different oolong tea products, this study used 18 oolong tea products in southern Fujian (Minnan), China, processed by different tea plants, as the source materials for the amplification and analysis of DNA sequences. The genetic distance was calculated from these sequences, and a phylogenetic tree was constructed. UPLC-ESI-QTOF-MS technology was then applied to different types of oolong tea products in Minnan for an untargeted metabolome analysis; followed by calculation of the genetic-chemical correlation of the samples. The results show that the amplification success rate and sequencing success rate of the UPLC-ESI-QTOF-MS technology can reach 100%, and has a relatively high identification efficiency. This technology can thus be regarded as the most optimal sequence combination for identifying the samples. In this study, nine key different metabolites were selected from oolong tea products in Minnan. Through further analysis, there were more similar metabolic components in Jinguanyin, Tieguanyin, Benshan, Shuixian, as well as Daye Oolong, Maoxie, Foshou, and Huangdan. This effectively distinguished different varieties of oolong tea products in Minnan, which could provide a theoretical basis for the further identification of different varieties. Analysis of the genetic-chemical correlation revealed that the genetic distance of the *trnL-trnF* sequence had a relatively high correlation with

收稿日期 Received: 2020-08-19 接受日期 Accepted: 2020-09-18

国家重点研发计划专项课题(2019YFD1001601)、福建农林大学“双一流”建设科技创新能力提升培育计划项目(KSYLC005)和福建张天福茶叶发展基金会科技创新基金(FJZTF01)资助 Supported by the National Key R&D Project of China (2019YFD1001601), the "Double First Class" Construction Science and Technology Innovation Ability Enhancement Cultivation Plan Project of Fujian Agriculture and Forestry University (KSYLC005), and the Special Fund for Science and Technology Innovation of Fujian Zhang Tianfu Tea Development Foundation (FJZTF01)

✉ 通讯作者 Corresponding author (E-mail: swj8103@126.com; asbulletan@163.com)

different metabolites. Using a genetic-chemical research method combining the *trnL-trnF* sequence and metabonomics techniques, this study was able to identify part of the representative oolong tea products in Minnan accurately and rapidly, which can further develop the standardization and characterization of tea types and open a new way for the identification of existing teas.

Keywords oolong tea; DNA barcoding; metabonomics; tea identification

中国是茶树的发源地,茶树品种繁多,目前我国收集、保存的各类茶树种质资源已达3 100余份,截至目前,全国已有国家审(认、鉴)定茶树品种134个,新选育登记茶树品种34个^[1-2].神农尝百草至今,经过5000多年的发展和演变,虽然茶叶的种类越来越丰富,但是按加工工艺的不同,大体上可分为红茶、绿茶、白茶、黄茶、黑茶和乌龙茶六大类,其中乌龙茶的发源地是福建,福建乌龙茶又可分为闽南乌龙茶和闽北乌龙茶,以铁观音为代表的闽南乌龙茶因其独特的香气和滋味,自其诞生以来就深受大众的喜爱,而适制闽南乌龙茶的茶树品种丰富,以次充好的现象难免出现,为维持闽南乌龙茶乃至整个茶叶市场的健康发展,茶叶品种的鉴定方法成为研究的热点.

生长环境、贮存环境、加工方式的差异通常对成品茶外观形态造成不同程度的影响,因此在实际应用中很难通过表现型对其进行物种鉴定. DNA是一种稳定的生物大分子,利用DNA分子水平的鉴定方法能准确有效地对新鲜和加工过的植物样品进行鉴定,避免表型鉴定造成的误差和生化检测的繁杂操作. 目前常用的DNA鉴定方法有DNA指纹图谱技术、DNA芯片技术和DNA条形码技术等^[3-8]. DNA条形码技术是利用一段短而标准的DNA序列作为标记来实现快速、准确和自动化物种鉴定的方法,由加拿大的动物学家Herbert在2003年提出^[9],经过多年的发展, DNA条形码技术在分子系统发育、进化生态学等研究和动植物品种、食品组成、法医物证等鉴定中有广泛的应用^[10-12]. 利用DNA条形码识别技术,可以实现茶树品种的准确识别.

随着代谢组学检测手段和数据分析技术不断发展和完善,代谢组学已广泛应用于生命科学研究的各个领域,如天然药物开发、食品安全、植物学和微生物学等^[13-16]. 代谢组学在茶叶中主要应用于植物的活性成分研究、分类研究和基因功能研究等^[17-19]. 随着茶叶需求量的上升,消费者对茶叶的质

量安全也日益关注,如何利用当前新兴的科学研究方法控制和提高茶叶质量,是众多茶学工作者亟待研究的重要课题之一. 虽然代谢组学在茶叶中的应用日渐增多,但大多都只是停留在茶叶品质的生物标志物的获取这个阶段,如何将代谢组学与其他组学数据结合起来,加快茶叶品质改良的进程是今后茶叶代谢组学研究的重点和难点.

我们以12种闽南乌龙茶产品为实验材料,拟通过DNA条形码技术对其进行品种鉴别,并利用UPLC-ESI-QTOP-MS进行化学成分定性定量研究,然后将闽南乌龙茶产品DNA条形码研究得到的遗传信息与闽南乌龙茶所含的差异代谢物进行相关性分析,探讨闽南乌龙茶产品遗传信息与差异代谢物间的关系,以期为闽南乌龙茶的品质评价提供新思路,为闽南乌龙茶品种的鉴别提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究收集的乌龙茶成茶样品共18份,涉及12个不同茶树品种,包括铁观音(TGY)、本山(BS)、黄旦(HD)、毛蟹(MX)、大叶乌龙(DYWL)、水仙(SX)各2份,金观音(JGY)、冻顶乌龙(DDWL)、佛手(FS)、梅占(MZ)、奇兰(QL)、丹桂(DG)各1份,其中铁观音、黄旦、本山、大叶乌龙、水仙和毛蟹样品均取有同一乡镇2个不同企业生产的样品. 样品信息见表1.

1.2 DNA条形码识别研究

1.2.1 仪器与试剂 新型植物基因组DNA快速提取试剂盒(Aidlab, 中国); 低温高速离心机(Eppendorf, 德国); PCR扩增仪(Biorad, 美国); 凝胶成像仪(Syngene, 美国); Nano drop 2000c 超微量分光光度计(Thermo, 美国); 恒温

表1 闽南乌龙茶产品样品采集信息

Table 1 Collection of the samples of Minnan oolong tea

品种名称 Species name	实验编号 Experiment number	来源 Location	经纬度 Longitude and latitude
铁观音 Tieguanyin	TGY1	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
	TGY2	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
本山 Benshan	BS1	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
	BS2	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
黄旦 Huangdan	HD1	安溪县虎丘镇 Huqiu Town, Anxi County	N25°00', E117°59'
	HD2	安溪县虎丘镇 Huqiu Town, Anxi County	N25°00', E117°59'
毛蟹 Maoxie	MX1	安溪县大坪乡 Daping Town, Anxi County	N26°05', E119°32'
	MX2	安溪县大坪乡 Daping Town, Anxi County	N26°05', E119°32'
大叶乌龙 Dayewulong	DY1	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
	DY2	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
金观音 Jinguanyin	JGY	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25°1', E117°56'
水仙 Shuixian	SX1	龙岩市漳平市 Zhangping City, Longyan City	N 25° 3', E117°42'
	SX2	龙岩市漳平市 Zhangping City, Longyan City	N 25° 3', E117°42'
冻顶乌龙 Dongdingwulong	DD	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25° 1', E117°56'
佛手 Foshou	FS	泉州市永春县 Yongchun County, Quanzhou City	N 25° 32', E118°3'
梅占 Meizhan	MZ	安溪县西坪镇 Xiping Town, Anxi County	N 25° 1', E117°56'
奇兰 Qilan	QL	漳州市平和县 Pinghe County, Zhangzhou City	N 24° 37', E117°3'
丹桂 Dangui	DG	漳州市南靖县 Nanjing County, Zhangzhou City	N 24° 52', E117°37'

摇床（天呈实验仪器制造有限公司，中国）。

1.2.2 DNA提取、扩增及测序 取20-30 mg茶叶样品用液氮速冻，在液氮中研磨至粉末，用改良的艾莱德新型植物DNA提取试剂盒方法提取DNA。叶绿体DNA片段（*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*、*trnL-trnF*、*rpl32-trnL*和*rpl16*）和核糖体DNA片段（PAL和ITS2）详细引物信息及PCR反应条件见表2。PCR产物用胶回收试剂盒纯化回收，详细方法参照OMEGA胶回收试剂盒的操作步骤。纯化后的PCR产物一部分送至福州尚辰生物有限公司进行测序，另一部分保存至-20℃冰箱备用。

1.3 基于代谢组学的产品鉴别研究

1.3.1 仪器与设备 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱系统（Waters，美国）；色谱柱（ACQUITY UPLC HSS T3 2.1x100 mm i.d., 1.8 μm, Waters，美国）。

1.3.2 样品前处理 闽南乌龙茶产品冷冻干燥后研磨至粉末，每份取30 mg样品粉末至2 mL离心管中，加入1.2 mL 70%预冷甲醇，涡旋振荡混匀，25℃超声提取20 min，12 000 r/min，4℃条件下离心10 min，取上清液，用70%预冷甲醇稀释100倍，储存于-4℃冰箱中待测。

1.3.3 色谱与质谱检测条件 色谱检测条件：流动相A（0.1%甲酸），流动相B（0.1%甲酸的乙腈）；流速：0.3 mL/min。进样体积为1 μL，流速0.3 mL/min，柱温40℃。洗脱梯度如下：0 min，A相100%，B相0%；2 min，A相93%，B相7%；13 min，A相60%，B相40%；14-17 min，A相1%，B相99%；17.1-20 min，A相100%，B相0%。质谱分析条件：离子源，ESI；数据采集，MSe；ramp，10-40 eV；毛细管电压，ESI+，2.0 kV（ESI-：2.5 kV）；离子源温度：120℃；反溶剂温度：450℃；扫描范围：50-1200 Da。

1.4 统计分析 DNA序列采用Clustal X2进行比对，代谢组数据采用QI软件筛选，通过Excel 2019、MEGA 7、EZinfo、Heml软件制图。

2 结果与分析

2.1 DNA提取、扩增成功率及测序成功率

用超微量分光光度计测得乌龙茶样品DNA的质量与浓度均符合后续实验的需要。由于 *rpl32-trnL*和*rpl16*的PCR扩增产物经凝胶电泳后没有单一的条带，而PAL片段虽经PCR扩增成功得到单一的条带，但在测序后发现该片段存在poly后双峰（单核苷酸poly A），即使经多次重新设计引物、修改PCR条件等均未克服这些问题。在18个样本中，*trnL-trnF*和ITS2的扩增成功率与测序成功率均为100%；*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*的扩增成功率分别为88%、75%和94%，8条DNA片段的测序成功率均为100%，因此最终选择*trnL-trnF*和ITS2两对引物进行后续的实验。

2.2 序列与系统进化分析

序列*trnL-trnF*、ITS2和*trnL-trnF* + ITS2的长度、CG含量统计结果见表3。ITS2序列的长度为293-315 bp，*trnL-trnF*序列的长度为1 051-1 070 bp，*trnL-trnF* + ITS2序列组合的长度为1 361-1 385 bp。与叶绿体DNA片段*trnL-trnF*相比，细胞核糖体DNA片段ITS2的变异位点虽然较少，但ITS2变异位点和简约信息位点占自身片段长度的比例均比叶绿体DNA片段*trnL-trnF*的高，证明了细胞核DNA比叶绿体DNA具有更高的进化率^[20]。

利用MEGA 7对不同品种的闽南乌龙茶产品进行Kimura-2-Paramter（K2P）遗传距离分析，结果见表4。一般情况下，当种间距离大于种内距离时，不同品种才能有效区分^[5]。由表4可知，除了毛蟹ITS2序列的种内遗传距离大于部分的种间遗传外，铁观音、黄旦、本山、大叶乌龙、水仙的ITS2和*trnL-trnF*序列的种内遗传距离均小于等于种间遗传距离，而序列组合*trnL-trnF* + ITS2的种内遗传距离除了本山品种外均小于种间遗传距离，说明运用这两条序列或这两条序列的组合可能会有

表2 不同引物信息及PCR反应程序 Table 2 The information and PCR program of different primers

序列名称 Primer	序列 Sequence (5'-3')	引物长度 Primer length (bp)	PCR反应条件 PCR reaction condition
PAL	F: CAATGGGTGCCATCGAATCT R: TCTTGTTATGTTGCTCGGC	F: 21 bp R: 20 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 34 cycles: 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 10 min
ITS2	F: ATGCGATACTTGGTGTGAAT R: GACGCTTCTCCAGACTACAAT	F: 20 bp R: 21 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 34 cycles: 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 7 min
<i>rpl32-trnL</i>	F: CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT R: CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	F: 20 bp R: 22 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 34 cycles: 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 10 min
<i>rpl16</i>	F: TGGAAGGTGTATGGGTCATCT R: CGTTCCCATCGCTTCTTGTT	F: 21 bp R: 20 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 34 cycles: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 10 min
<i>trnH-psbA</i>	F: GTTATGCATGAACGTAATGCTC' R: CGCGCATGGTGGATTCCAAATCC	F: 22 bp R: 23 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 30 cycles: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 7 min
<i>matK</i>	F: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG R: ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC	F: 25 bp R: 27 bp	95℃ 2.5 min; 10 cycles: 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s; 25 cycles: 88℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s; 72℃ 10 min
<i>rbcL</i>	F: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC R: GAAACGGTCTCTCCAACGCAT	F: 26 bp R: 22 bp	95℃ 2.5 min; 35 cycles: 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s; 72℃ 10 min
<i>trnL-trnF</i>	F: CTCTGAAAAGCCCACATA R: CATAGCTTGATAAAC GAAAT	F: 18 bp R: 20 bp	Predenaturation at 94℃ for 5 min; 40 cycles: 94℃ 1 min, 57℃ 1 min, 72℃ 90 s; 72℃ 7 min

表3 序列特征 Table 3 Sequencing information

参数 Parameter	<i>trnL-trnF</i>	ITS2	<i>trnL-trnF</i> + ITS2
比对序列长度 Alignment length (bp)	1072	316	1388
GC含量 GC content	35.90%-36.45%	62.95%-64.77%	42.31%-42.74%
变异位点 Variants (bp)	17	13	32
简约信息位点 Parsimony informative sites (bp)	6	6	12

表4 不同品种闽南乌龙茶产品两个基因片段的种内种间遗传距离

Table 4 Intraspecific and interspecific genetic distance in two gene of the different varieties of commercial Minan oolong

品种 Species	种内遗传距离 Intraspecific genetic distance			种间遗传距离 Interspecific genetic distance		
	<i>trnL-trnF</i>	ITS2	<i>trnL-trnF</i> + ITS2	<i>trnL-trnF</i>	ITS2	<i>trnL-trnF</i> + ITS2
铁观音 Tieguanyin	0.000	0.007	0.001	0.000-0.004	0.003-0.034	0.002-0.010
本山 Benshan	0.001	0.001	0.003	0.001-0.004	0.003-0.037	0.002-0.011
黄旦 Huangdan	0.001	0.000	0.001	0.001-0.005	0.007-0.021	0.003-0.009
毛蟹 Maoxie	0.000	0.014	0.004	0.002-0.004	0.003-0.032	0.004-0.007
大叶乌龙 Dayewulong	0.000	0.000	0.000	0.002-0.004	0.000-0.030	0.001-0.010
金观音 Jinguanyin	-	-	-	-	0.004-0.034	0.005-0.011
水仙 Shuixian	0.000	0.000	0.000	0.003-0.007	0.007-0.027	0.005-0.010
冻顶乌龙 Dongdingwulong	-	-	-	0.000-0.004	0.007-0.032	0.004-0.008
佛手 Foshou	-	-	-	0.001-0.005	0.000-0.017	0.003-0.007
梅占 Meizhan	-	-	-	0.002-0.005	0.000-0.024	0.001-0.009
奇兰 Qilan	-	-	-	0.002-0.007	0.000-0.024	0.004-0.010
丹桂 Dangui	-	-	-	0.002-0.006	0.000-0.030	0.003-0.011

效地将不同品种的闽南乌龙茶产品区分开。

以山茶科猪血木属的模式植物猪血木 (*Euryodendron excelsum* H. T. Chang) 的 *trnL-trnF* (GenBank 登录号 HM061568) 和 ITS2 (GenBank 登录号 AY626886) 序列为外展值, 采用邻接法分别构建系统聚类树 (图1), 对这2个DNA序列片段进行系统进化分析, 结果表明, *trnL-trnF* 和 ITS2 序列虽然在一定程度上都能与外类群区分开, 但均无法有效地将相同品种的闽南乌龙茶聚在同一个分支上; 但是 *trnL-trnF* + ITS2 的片段组合除了无法将相同品种的本山聚在一起外, 其余样品的相同品种均能聚在同一簇。

综上分析, 虽然两个DNA片段PCR的扩增效率均为100%, 且不同的品种间均存在变异位点, 但由于构建的进化树无法将不同品种的闽南乌龙茶有效区分开, 因此均不能作为鉴别闽南乌龙茶品种的DNA条形码。但是 *trnL-trnF* + ITS2 的序列组合对样品却有较高的鉴别能力, 因此建议将 *trnL-trnF* + ITS2 的序列组合作为鉴别闽南乌龙茶产品的DNA条形码。

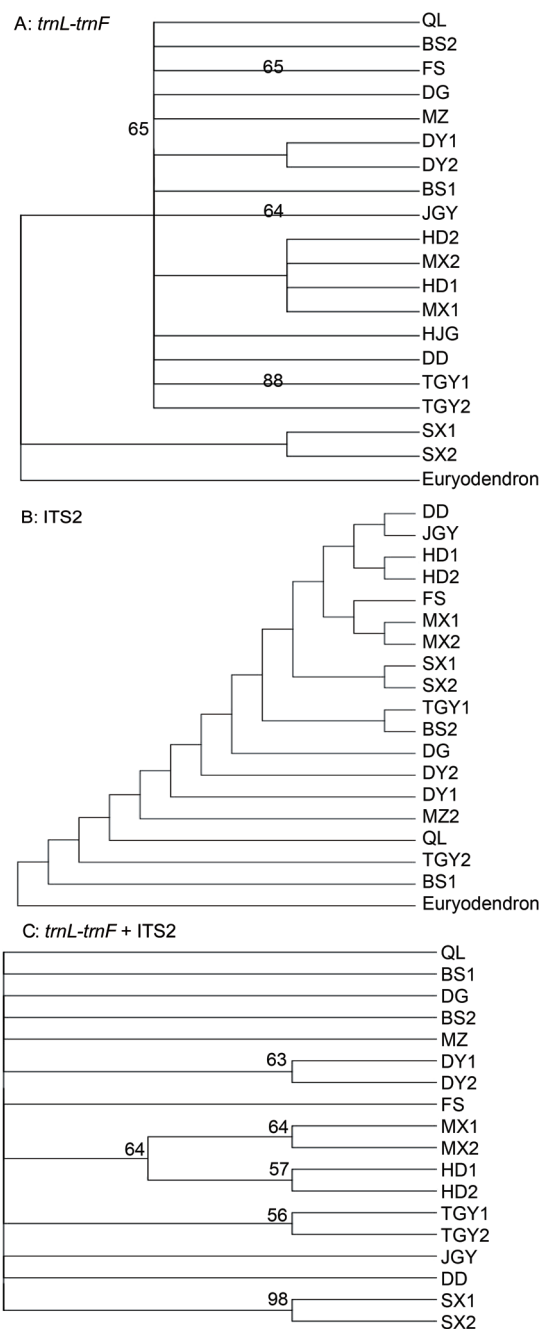
2.3 基于代谢组的闽南乌龙茶产品主成分分析

利用UPLC-ESI-QTOF-MS全扫描模式的质谱数据建立PCA分析, 结果如图2所示, 相同品种闽南乌龙茶能较好地聚在一起; 不同品种闽南乌龙茶样品 (每个样品重复进样分析3次, 图中显示已去除部分差异较大的样品), 在PCA图中, 分成了A、B 两大簇。A簇中不同品种茶树的分布相对聚集, 说明他们的代谢成分相似, 但是铁观音 (TGY) 品种样品与其他品种 (本山BS、水仙SX、金观音JGY) 茶样间有分散趋势, 说明铁观音品种制成的闽南乌龙茶的代谢成分与其他相比有较大的差异; B簇中各样品分布较为分散, 但部分品种之间的代谢成分含量较为相似, 如毛蟹 (MX) 和佛手 (FS) 有聚集的趋势, 而组内平行样本成分接近, 证明样本的可靠性。

2.4 代谢成分分析与鉴定

以 $VIP > 1$, $P < 0.05$ 和 $FC > 1.2$ 为筛选条件, 共筛选出9种差异较大的化合物, 并编号为1-9, 如表5所示。因同属闽南地区, 茶树产地相邻, 制作工艺相同, 所以差异代谢物较少。为了更明确地分析9种差异代谢物在不同品种闽南乌龙茶间含量的差异, 对其进行了相对含量分析, 发现指认出的9个差异代谢物间的相对含量有明显的差异, 其中, 如图3所示, 表没食子儿茶素在所有试验品种中均有较高的含量且存在较大的差异, 山柰素-3-O-鼠李葡萄糖苷的含量虽然较低, 但也存在较大的差异, 因此这两种化合物可能对PCA分类有较大的贡献。

将筛选出的差异表达代谢物相对含量导入Heml软件 (Heatmap Illustrator, Version 1.0) 建立热图, 如图4所示,

图1 基于 *trnL-trnF*、ITS2 和 *trnL-trnF* + ITS2 序列构建的邻接树。Fig. 1 Consensus tree obtained by the NJ method based on the *trnL-trnF*, ITS2, and *trnL-trnF* + ITS2 region.

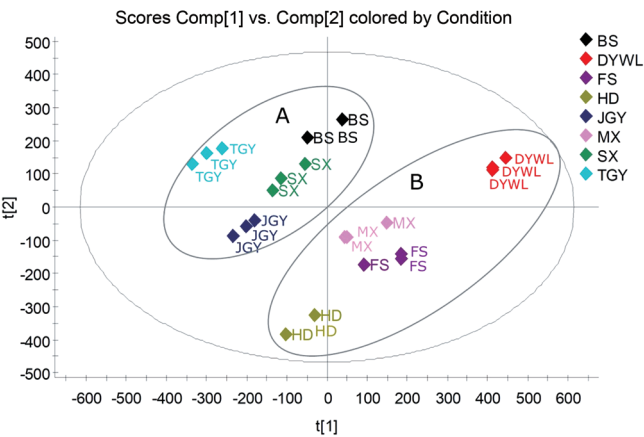


图2 不同品种闽南乌龙茶产品的主成分分析. Fig. 2 PCA analysis of the different Minnan oolong.

横坐标为差异表达代谢物, 编号1-9分别为表没食子儿茶素、槲皮素-3-O-葡萄糖芸香糖甙、山柰素-3-O-鼠李葡萄糖苷、奎尼酸、原花青素B-4、山柰素-3-O-芸香糖甙、槲皮素-3-O-半乳糖苷、儿茶素、原花青素B-2,3'-O-没食子酸盐, 纵坐标为不同品种的闽南乌龙茶产品, 颜色越偏向红色, 含量越高. 由图4可知相同品种的闽南乌龙茶产品除铁观音品种外都能聚在一起, 铁观音、大叶乌龙、毛蟹、佛手和水仙聚为一簇, 黄旦、

金观音、本山聚为一类. 所有品种的表没食子儿茶素都有较高的含量, 与其他品种相比, 水仙的原花青素B-4和原花青素B-2,3'-O-没食子酸盐的含量较低.

2.5 灰色关联度分析遗传-化学相关性

将闽南乌龙茶产品DNA条形码研究得到的遗传信息与闽南乌龙茶所含的差异代谢物进行相关性分析, 探讨闽南乌龙茶产品遗传信息与差异代谢物间的关系, 以期为闽南乌龙茶的品质评价提供新思路. 运用GM灰色关联度软件研究其遗传-化学相关性, 将闽南乌龙茶产品的种内距离和9个差异代谢物的平均值视为一个灰色系统, 其中种内遗传距离为母序列, 而差异代谢物的平均含量为子序列. 分辨系数为0.5, 计算关联度, 通过关联系数的大小确定闽南乌龙茶种内遗传距离与化学成分间的关联度, 结果见表6与表7. 闽南乌龙茶产品ITS2序列的遗传距离与差异显著成分间的相关性较低, 均小于0.7; 而trnL-trnF序列的遗传距离与差异显著成分间的相关性较高, 均大于0.8.

3 讨论

3.1 闽南乌龙茶产品的DNA条形码识别

闽南乌龙茶因其独特的香气和滋味, 自其诞生以来就深受大众的喜爱, 而适制闽南乌龙茶的茶树品种丰富, 传统的茶

表5 闽南乌龙茶中基于UPLC-ESI-QTOF-MS (负离子模式) 鉴定出的差异表达代谢物 Table 5 The differentially expressed metabolites of Minnan oolong based on the UPLC- ESI-QTOF-MS ([M-H]-)

编号 Number	分子式 Molecular formula	代谢物 Metabolite	t/min	[M-H] (m/z)	主要碎片离子 Main fragment ions (m/z)
1	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	4.919	305	261, 221, 219, 179, 167, 165
2	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	槲皮素-3-O-葡萄糖芸香糖甙 Quercetin-3-O-glucosyl-rutinoside	7.365	771	609, 301
3	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	山柰素-3-O-鼠李葡萄糖苷 Kaempferol-3-O-glucosyl-rhamnosyl-glucoside	8.008	755	593, 285
4	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎尼酸 Quinic acid	1.003	191	593, 285
5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	原花青素B-4 Prodelphinidin B-4	4.127	609	441, 423, 405
6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰素-3-O-芸香糖甙 Kaempferol-3-O-rutinoside	8.442	593	285
7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	槲皮素-3-O-半乳糖苷 Quercetin-3-O-galactoside	8.022	463	301
8	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素 Catechin	5.354	289	245, 205, 204, 137
9	C ₃₆ H ₂₈ O ₁₆	原花青素B-2,3'-O-没食子酸盐 Prodelphinidin B-2,3'-O-gallate	4.962	761	609, 591, 423

表6 闽南乌龙茶产品ITS2序列种内遗传距离与差异代谢物的关联度 (R) Table 6 The grey relational grades (R) between intraspecific genetic distance of ITS2 and different metabolites

样品 Sample	成分 Component									遗传距离 Genetic distance
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
TGY	214361.60	5115.59	17412.92	8434.22	2922.28	3990.20	2058.15	3510.32	2466.81	0.007
BS	261609.10	3495.89	5495.37	13764.70	6113.92	4891.19	1879.10	3580.81	3865.90	0.001
HD	217900.80	4916.26	23073.18	7715.18	2785.24	3998.17	2422.84	3634.09	2570.45	0.000
MX	242963.60	5185.70	27996.43	8739.65	2597.56	4491.05	3102.24	2601.48	2527.03	0.014
DYWL	286901.80	6534.78	45380.56	6167.86	5221.23	5635.81	4363.67	3835.55	4713.02	0.000
SX	252731.40	3425.64	11496.52	7256.26	827.52	4733.00	1946.32	5223.09	552.30	0.000
R	0.6213	0.6695	0.6907	0.6453	0.6269	0.6189	0.6399	0.6124	0.6440	

表7 闽南乌龙茶产品trnL-trnF序列种内遗传距离与差异代谢物的关联度 (R) Table 7 The grey relational grades (R) between intraspecific genetic distance of trnL-trnF and different metabolites

样品 Sample	成分 Component									遗传距离 Genetic distance
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
BS	261609.10	3495.89	5495.37	13764.70	6113.92	4891.19	1879.10	3580.81	3865.90	0.001
TGY	214361.60	5115.59	17412.92	8434.23	2922.28	3990.20	2058.15	3510.32	2466.81	0.000
HD	217900.80	4916.26	23073.18	7715.18	2785.24	3998.17	2422.84	3634.09	2570.45	0.001
MX	242963.60	5185.70	27996.43	8739.65	2597.56	4491.05	3102.24	2601.48	2527.03	0.000
DYWL	286901.80	6534.78	45380.56	6167.86	5221.23	5635.81	4363.67	3835.55	4713.02	0.000
SX	252731.40	3425.64	11496.52	7256.26	827.52	4733.00	1946.32	5223.09	552.30	0.000
R	0.8687	0.8235	0.5957	0.9050	0.9139	0.8671	0.8131	0.8646	0.8988	

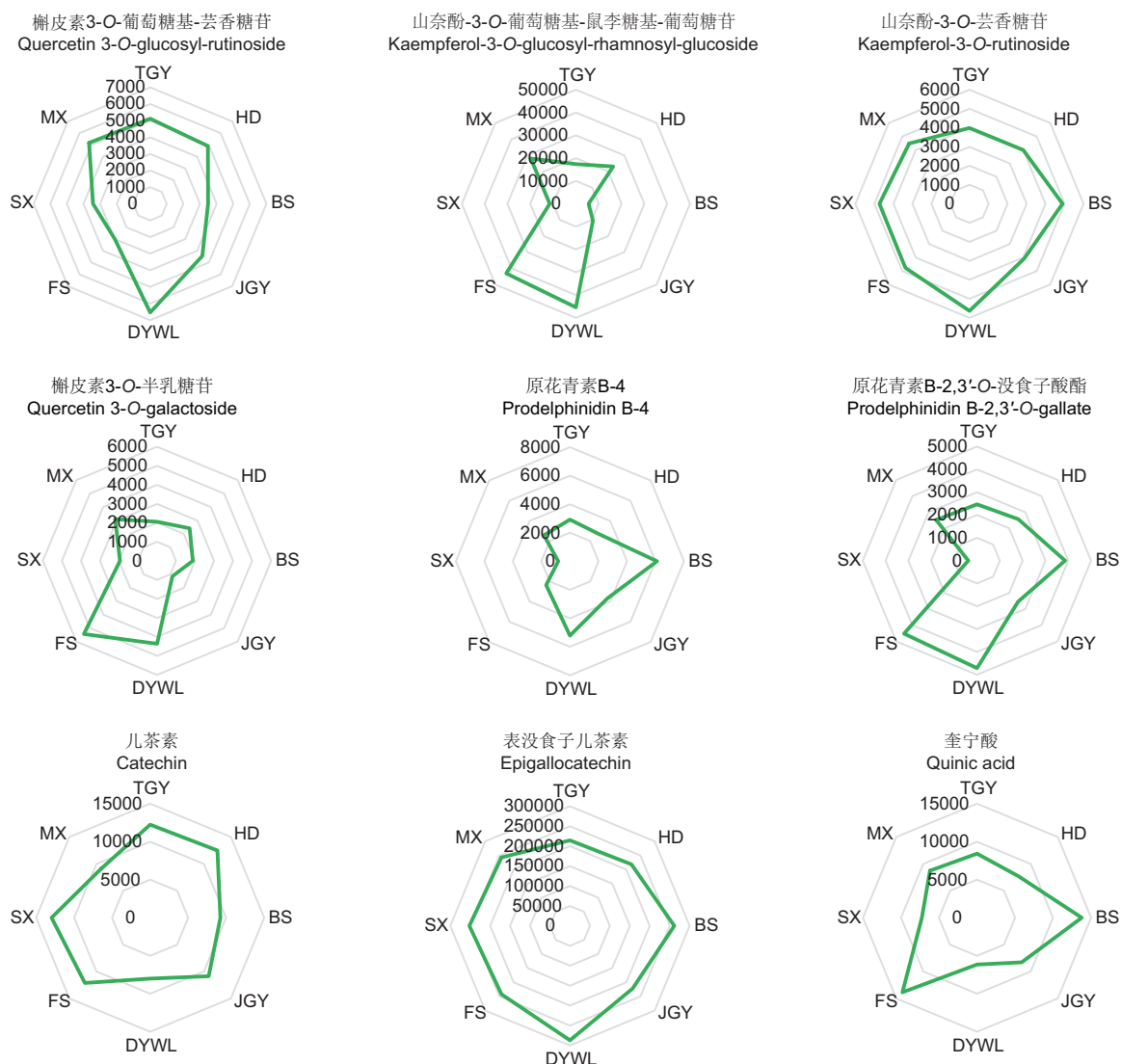


图3 不同品种闽南乌龙茶产品间的差异代谢物含量差异.

Fig. 3 Difference in metabolite contents among different varieties of Minnan oolong tea.

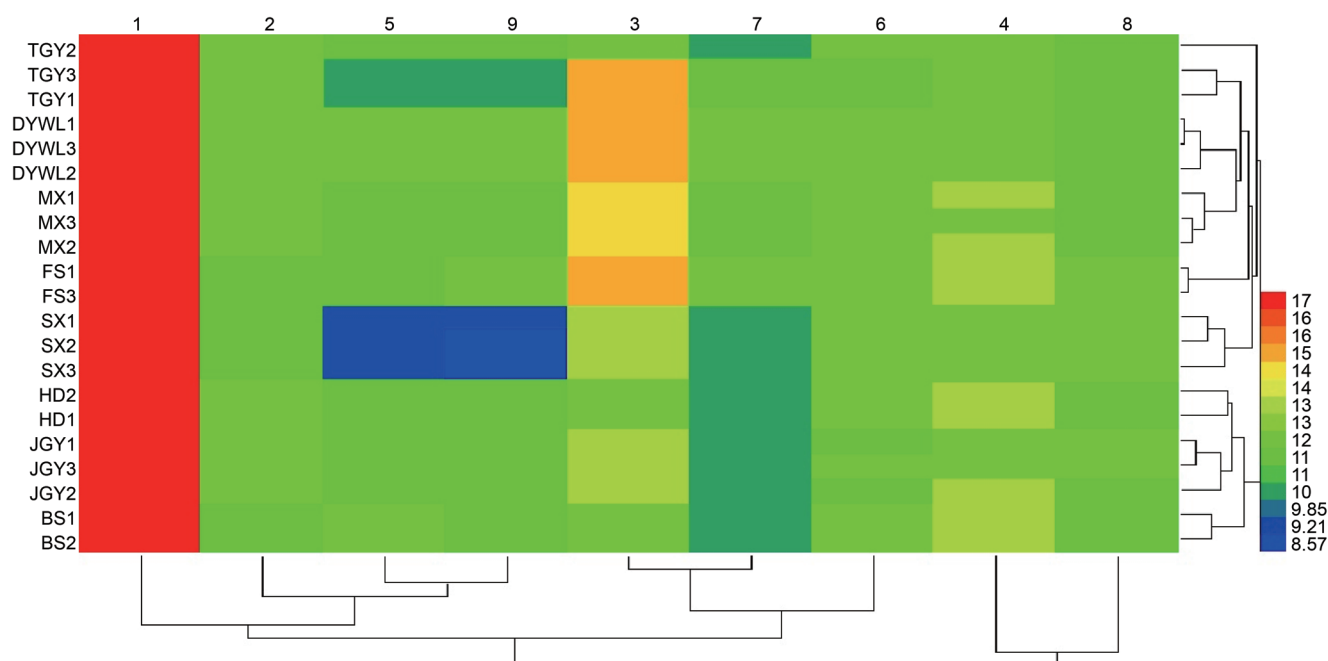


图4 不同品种闽南乌龙茶产品中差异代谢物的相对含量变化趋势热图.

Fig. 4 Heatmap of changes in relative contents of different metabolites in different varieties of Minnan oolong tea.

叶感官审评方法主要依赖于审评者的经验,由于具有这种评定能力的专家只有极少数,而且感官审评易受到外界的干扰,个人主观影响大,使得这种方法存在一定的局限性。DNA条形码技术重复性高,通用性强,近年来在植物鉴定中得到广泛应用。汤欢等研究表明,基于ITS2序列的DNA条形码技术可准确、有效地鉴定凉茶药材布渣叶及其混伪品^[21]。Michel和胡建霖等也证明了ITS2序列在中草药产品鉴定中的实用性^[22-23]。Seiji等人探讨了[24]。Olga等使用DNA条形码技术鉴别商品茶的掺假(混入非茶类成分)现象,表明rbcL + matK可有效区分茶叶中的其他掺杂物^[25]。

单独的基因片段无法完全实现对物种的准确鉴别时,基因片段组合的形式为研究人员提供了便利。本研究结果也表明, trnL-trnF和ITS2序列作为研究识别闽南乌龙茶产品品种的序列具有明显优势,但两者单独鉴别,都只有部分相同品种的乌龙茶产品可聚在同一分支上, trnL-trnF + ITS2序列组合构建的进化树,大大提高了闽南不同茶树品种乌龙茶产品的鉴定效率。在多次重复实验过程中,发现rpl32-trnL、rpl16和PAL均无法成功扩增或测序, rbcL、matK和trnH-psbA这3条序列的测序成功率和扩增成功率均不是最优。分析原因可能是闽南乌龙茶产品无论是形态还是品质特征都极为相似,在这些序列中闽南乌龙茶产品保守性好,变异信息位点少,因此其分子生物学鉴定还有待深入的研究。

3.2 闽南乌龙茶产品的代谢组成分差异

本研究采用代谢组学技术,选取DNA条形码样品中的8个极具闽南乌龙茶代表性的茶树品种的非挥发性代谢物表型进行了研究,结合PCA分析发现,金观音、铁观音、本山、水仙聚为A簇,原因可能是金观音虽是铁观音和黄旦杂交的后代,但其遗传性状多数趋向母本,属于偏母本融合型杂种^[26];本山和铁观音同起源于安溪县西坪镇,且有较为相似的品质特征,成茶较难区分^[27];而水仙发源地较远,却与铁观音聚为一类,原因可能是两者的主要差异代谢成分含量接近,如图3所示,糖苷类前体等物质含量在铁观音和水仙中较为接近,与陈志辉等利用SSR分子标记得出的结论^[28]一致。大叶乌龙、毛蟹、佛手、黄旦聚为B簇,其中,毛蟹和佛手距离较近,这两种茶产品原花青素与缩酚酸类成分含量相近,大叶乌龙和黄旦分散

于两端,与林伟东等利用SCo T标记构建的进化树^[29]存在差异,分析过程中发现有些样品可按照产地来源聚为一类,而有些却不能,可能原因是茶树异花授粉,在长期繁育过程中,使茶树发生了杂交,因此应注重茶树资源的保护,尤其是当地优良品种和野生种质,避免珍贵资源丢失。利用代谢组学手段能够较好地地区分供试材料,差异代谢物相对含量分析结果与热图呈现一致,可用于区分闽南地区所产乌龙茶。

3.3 遗传-化学相关性

目前利用茶叶的品种鉴别及遗传多样性研究多集中于遗传信息、化学成分和表观性状,而单一的研究手段已不能满足鉴定物种多样化的需要,因此遗传信息与化学成分或表观形状相结合的方法成为更加全面了解物种差异、提高鉴定准确率与可信度的研究手段。苏凡等利用DNA条形码和形态学特征相结合的研究手段对五指山野生茶种进行分类,明确了其分类地位^[30]。Zhao等将DNA条形码与液质联用技术相机合,用于药用菌种的鉴别,并对其主要成分进行定量定性研究,确立了一种综合评价体系^[31]。本研究创新性地对闽南乌龙茶产品DNA条形码研究得到的遗传信息与差异代谢物进行相关性分析,运用GM灰色关联度软件研究其遗传-化学相关性,通过分析发现,用于本实验研究的闽南乌龙茶样品受叶绿体DNA序列trnL-trnF的影响较大,且代谢组数据显示,儿茶素等次生代谢物含量也有一定差异。已有研究表明,茶树等绿叶植物类黄酮的合成受光照强度影响,以提高茶树的光适应性^[32],这与叶绿体的功能息息相关。

本研究针对闽南乌龙茶产品,基于DNA条形码和UPLC-ESI-QTOF-MS联合技术对样品进行品种鉴别,利用初步筛选出的DNA序列trnL-trnF和ITS2及其组合trnL-trnF + ITS2分别对闽南乌龙茶产品进行鉴别,发现组合序列具有良好的判别效果;通过主成分分析、差异代谢产物的分析与鉴定、代谢成分的层次聚类分析等方法,基于代谢组数据,初步筛选出9种差异代谢物,有效区分出了不同品种的鲜叶样品;灰色关联度分析表明trnL-trnF序列可能对多酚类物质的合成有一定的影响,结果揭示了遗传信息对茶树次生代谢物质的影响,可为区分极为相似的茶产品提供一种全新的研究思路。不同茶树品种间叶绿体DNA序列的差异作为筛选优异茶树种质资源依据的可行性,则还有待深入研究。

参考文献 [References]

- 1 王新超,曾建明,王璐,郝心愿,郑梦霞. 茶园建设中茶树良种的选择[J]. 中国茶叶, 2018, 40 (3): 5-8 [Wang XC, Zeng JM, Wang L, Hao XY, Zheng MX. Selection of improved tea varieties in tea garden construction [J]. Chin Tea, 2018, 40 (3): 5-8]
- 2 陈亮,马建强. 茶树非主要农作物品种登记要求及进展[J]. 中国茶叶, 2020, 42 (3): 8-12 [Chen L, Ma JQ. Requirement and advance of non-major crop cultivar registration of tea plant [J]. Chin Tea, 2020, 42 (3): 8-12]
- 3 Feng TH, Jia QJ, Meng X, Chen XL, Wang FF, Chai WG, Liang ZS. Evaluation of genetic diversity and construction of DNA fingerprinting in *Polygonatum* Mill. based on EST-SSR and SRAP molecular markers [J]. 3 Biotech, 2020, 10 (7): 322-335
- 4 Bertalan L, Laurent EC, Mario G, Joana BM, Michael SK, Adelgunde K, Nadja VM. DNA Fingerprinting: An effective tool for taxonomic identification of precious corals in jewelry [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 2045-2322
- 5 王念武,马克争,于文涛,沈建国,胡美玲. 基于锁式探针技术的番茄病原细菌DNA芯片快速检测技术[J]. 农产品质量与安全, 2019 (6): 21-27 [Wang NW, Ma KZ, Yu WT, Shen JG, Hu ML. Rapid detection method for tomato bacterial species using DNA chip based on padlock probe [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2019 (6): 21-27]
- 6 Saifullah S, Satoshi F, Hiroshi N, Toshifumi T. Single nucleotide recognition using a probes-on-carrier DNA chip [J]. Biotechniques, 2019, 66 (2): 73-78
- 7 熊瑶,金晨,王晓云,曹岚,杜小浪,李彤,张凌. 鸡血藤及其混伪品的DNA条形码分子鉴定研究[J]. 中草药, 2020, 51 (12): 3274-3283 [Xiong Y, Jin C, Wang XY, Cao L, Du XL, Li T, Zhang L. Molecular identification of *Spatholobi caulis* and its adulterants based on DNA barcoding [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51 (12): 3274-3283]

- 8 Gao Z, Liu Y, Wang X, Wei X, Han J. DNA Mini-Barcoding: a derived barcoding method for herbal molecular identification [J]. *Front Plant Sci*, 2019, **10**: 987
- 9 Hebert NPD, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *P Roy Soc B-Biol Sci*, 2003, **270** (1512): 313-321
- 10 裴男才. DNA条形码在进化生态学研究中的应用[J]. 生物多样性, 2015, **23** (3): 291-292 [Pei NC. Applications of DNA barcoding in evolutionary ecology [J]. *Biodivers Sci*, 2015, **23** (3): 291-292]
- 11 Stefanos S, Annie M, Catherine LP, Rudi LV, Gregory DDH. DNA barcoding reveals incorrect labelling of insects sold as food in the UK [J]. *Peer J*, 2020, **8**: e8496
- 12 刘萌妍, 刘艳磊, 吴平, 陈庆, 周世良. 利用人体携带植物基因信息推断居住地[J]. 法医学杂志, 2019, **35** (6): 710-715 [Liu MY, Liu YL, Wu P, Chen Q, Zhou SL. Determination of place of residence using the gene information of plants carried by the human body [J]. *J Forensic Med*, 2019, **35** (6): 710-715]
- 13 Zhao DS, Jiang LL, Fan YX, Dong LC, Ma J, Dong X, Xu XJ, Li P, Li HJ. Identification of urine tauro- β -muricholic acid as a promising biomarker in *Polygoni Multiflori* Radix-induced hepatotoxicity by targeted metabolomics of bile acids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, **108**: 532-542
- 14 Shi YN, Li X, Huang AX. A metabolomics-based approach investigates volatile flavor formation and characteristic compounds of the Dahe black pig dry-cured ham [J]. *Meat Sci*, 2019, **158**: 107904
- 15 Wang PJ, Zheng YC, Guo YC, Liu BS, Jin S, Liu SZ, Zhao F, Chen XJ, Sun Y, Yang JF, Ye NX. Widely targeted metabolomic and transcriptomic analyses of a novel albino tea mutant of "Rougui" [J]. *Forests*, 2020, **11** (2): 229-244
- 16 Jisoo L, Debasree B. Metabolomics and the microbiome as biomarkers in sepsis[J]. *Crit Care Clin*, 2020, **36** (1): 105-113
- 17 Chen S, Liu HH, Zhao XM, Li XL, Shan WN, Wang XX, Wang SS, Yu WQ, Yang ZB, Yu XM. Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture [J]. *Food Res Int*, **128**: 108778
- 18 李鑫磊, 俞晓敏, 林军, 赵小嫚, 张妍, 林宏政, 郝志龙, 金心怡. 基于非靶向代谢组学的白茶与绿茶、乌龙茶和红茶代谢产物特征比较[J]. 食品科学, 2020, **41** (12): 197-203 [Li XL, Yu XM, Lin J, Zhao XM, Zhang Y, Lin HZ, Hao ZL, Jin XY. Comparative metabolite characteristics of white tea with green tea, oolong tea and black tea based on non-targeted metabolomics approach [J]. *Food Sci*, 2020, **41** (12): 197-203]
- 19 Wang PJ, Chen SR, Gu MY, Chen XM, Chen XJ, Yang JF, Zhao Feng, Ye NX. Exploration of the effects of different blue LED light intensities on flavonoid and lipid metabolism in tea plants via transcriptomics and metabolomics [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21** (13): E4606
- 20 唐萍, 彭程. 叶绿体基因组进化的速率和方式[J]. 生物学通报, 2010, **45** (6): 8-10 [Tang P, Peng C. The rate and mode of chloroplast genome evolution [J]. *Bull Biol*, 2010, **45** (6): 8-10]
- 21 汤欢, 师玉华, 屠鹏飞, 郑希龙, 孙伟, 叶萌. 凉茶药材布渣叶及其混伪品的DNA条形码鉴定[J]. 中国药学杂志, 2015, **50** (17): 1479-1484 [Tang H, Shi YH, Tu PF, Zheng XL, Sun W, Ye Y. Identification of herbal tea ingredient microcos paniculata and its adulterants using DNA barcoding [J]. *Chin Pharm J*, 2015, **50** (17): 1479-1484]
- 22 Michel CI, Rachel SM, Yanille T, Molina J. The nuclear internal transcribed spacer (ITS2) as a practical plant DNA barcode for herbal medicines [J]. *J Appl Res Med Aroma*, 2016, **3** (3): 94-100
- 23 胡建霖, 刘志芳, 慈秀芹, 李捷. DNA条形码在热带龙脑香科树种鉴定中的应用[J]. 植物学报, 2019, **54** (3): 350-359 [Hu JL, Liu ZF, Ci XQ, Li J. Use of DNA barcoding in identifying tropical trees from Dipterocarpaceae [J]. *Chin Bull Bot*, 2019, **54** (3): 350-359]
- 24 Seiji T, Michiho I. DNA barcoding for identification of agarwood source species using trnL-trnF and matK DNA sequences [J]. *J Nat Med*, 2020, **74** (1): 42-50
- 25 Olga DC, Comparone M, Antonietta DM, Emanuele DG, Bruno M, Jacopo T, Francesco A, Marco T, Marco G. What is in your cup of tea? DNA Verity Test to characterize black and green commercial teas [J]. *PLoS ONE*, 2018, **13** (1): e0178262
- 26 姚雪倩, 郑玉成, 王鹏杰, 林滢, 郑知临, 陈桂信, 叶乃兴. 金观音与其亲本差异基因表达的遗传分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2019, **48** (2): 155-160 [Yao XQ, Zheng YC, Wang PJ, Lin Y, Zheng ZL, Chen GX, Ye NX. Genetic analysis of differential gene expression between Jinguanyin and its parents [J]. *J Fujian Agric For Univ (Nat Sci)*, 2019, **48** (2): 155-160]
- 27 Guo YQ, Zhu C, Zhao SS, Zhang ST, Wang WJ, Fu HF, Li XZ, Zhou CZ, Chen L, Lin YL, Lai ZX. De novo transcriptome and phytochemical analyses reveal differentially expressed genes and characteristic secondary metabolites in the original oolong tea (*Camellia sinensis*) cultivar 'Tieguanyin' compared with cultivar 'Benshan' [J]. *BMC genomics*, 2019, **20** (1): 265-289
- 28 陈志辉, 单睿阳, 游小妹, 林郑和, 钟秋生, 陈常颂. 43个福建省茶树品种指纹图谱构建及遗传多样性分析. 热带亚热带植物学报, 2017, **25** (6): 579-586 [Chen ZH, Shan RY, You XM, Lin ZH, Zhong QS, Chen CS. Constructing fingerprints and analyzing genetic diversity of 43 tea cultivars in Fujian province [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2017, **25** (6): 579-586]
- 29 林伟东, 陈志丹, 孙威江, 杨如兴. 基于SCoT标记的福建茶树品种(系)遗传多样性分析[J]. 茶叶科学, 2018, **38** (1): 43-57 [Lin WD, Chen ZD, Sun WJ, Yang RX. Analysis of genetic diversity of Fujian tea varieties by SCoT markers [J]. *J Tea Sci*, 2018, **38** (1): 43-57]
- 30 苏凡, 杨小波, 李东海. 基于形态学特征和psbA-trnH叶绿体编码基因序列明确五指山野生茶的分类地位[J]. 热带作物学报, 2019, **40** (8): 1565-1570 [Su F, Yang XB, Li DH. The classification status of Wuzhishan wild tea based on morphological features and psbA-trnH chloroplast encoding gene sequence [J]. *Chin J Trop Crops*, 2019, **40** (8): 1565-1570]
- 31 Zhao WL, Liu MY, Shen C, Liu HQ, Zhang ZT, Dai WL, Liu XF, Liu JH. Differentiation, chemical profiles and quality evaluation of five medicinal *Stephania* species (Menispermaceae) through integrated DNA barcoding, HPLC-QTOF-MS/MS and UHPLC-DAD [J]. *Fitoterapia*, 2020, **141**: 104453
- 32 Zhang QF, Liu MY, Ruan JY. Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves [J]. *BMC Plant Biol*, 2017, **17** (1): 1-10