

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-282-287>

Поступила 27.04.2024

Поступила после рецензирования 13.06.2024

Принята в печать 17.06.2024

© Вафин Р. Р., Михайлова И. Ю., Агейкина И. И., 2024

<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

Open access

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ГЕНОИДЕНТИФИКАЦИИ ЧАЙНОГО СЫРЬЯ И СЫРЬЕВОГО СОСТАВА БЕЗАЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ НА ОСНОВЕ ЧАЯ

Вафин Р. Р.*, Михайлова И. Ю., Агейкина И. И.

Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной
и винодельческой промышленности, Москва, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АННОТАЦИЯ

Camellia sinensis,
чай, напитки, SNPs,
ДНК-маркеры,
ПЦР, ПДРФ,
секвенирование,
геноидентификация

Чай, чайный куст, или камелия китайская — растение вида *Camellia sinensis*, листья которого, предварительно подготовленные специальным образом, являются традиционным сырьем для производства чайной продукции. Сортотиповая геноидентификация чая позволяет повысить уровень оценки подлинности чайного сырья и чайной продукции. Она преимущественно базируется на ДНК-технологиях детекции и интерпретации SNP-маркеров (Single Nucleotide Polymorphism — однонуклеотидный полиморфизм), представленных широким арсеналом как дорогостоящих высокотехнологичных методов, так и общедоступных лабораторных подходов. Видовая геноидентификация сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая является не менее важным направлением исследования в связи с риском фальсификации данного вида продукции. Цель настоящего исследования заключалась в изыскании методологических подходов к сортовой геноидентификации чайного сырья и к видовой геноидентификации сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая. В результате проведенного биоинформационного исследования по выявлению полиморфных сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях локусов генома *Camellia sinensis* были подобраны диагностически значимые рестриктазы, способные к детекции SNPs и к идентификации генотипов чая по анализируемым маркерам. При этом потенциалом практического применения обладали 16 локусов, из которых 11 относились к группе наиболее информативных SNP-маркеров. С ними и была проведена постаналитическая оценка сортов чая на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости в рамках решения первой задачи исследования. Для реализации второй задачи был протестирован молекулярно-генетический подход к видовой идентификации сырьевого состава безалкогольных напитков на основе зеленого чая. Исследование включало анализ экспериментальных напитков (с натуральным ароматизатором «Лимон» и синтетическим ароматизатором «Персик 716»), а также коммерческих концентратов «ТИАКВА» (на основе экстрактов из огрубелых стеблей зеленого или черного чая). В работе использовались методы ПЦР (полимеразная цепная реакция), ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) и прямого секвенирования амплифицированного локуса хлоропластной ДНК. Сочетание двух методов (ПЦР и секвенирование) показало свою эффективность в установлении принадлежности анализируемых образцов нуклеиновых кислот к виду *Camellia sinensis* — сырьевой основы исследованных напитков и концентратов. Однако для раскрытия аутентификационного потенциала ПЦР с праймерами #1 и #2, совмещенного с ПДРФ-анализом, потребуется подбор диагностически значимых рестриктаз, пригодных для генерации видоспецифичных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей маркерной последовательности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Работа выполнена в рамках Федеральной программы «Научное обоснование проектирования технологий новых видов напитков на основе изучения характеристических особенностей традиционного и нетрадиционного сырья растительного происхождения» FGUS-2022-0012.

БЛАГОДАРНОСТЬ: Авторы статьи выражают благодарность ведущим инженерам-исследователям лаборатории технологии безалкогольных напитков и минеральных вод ВНИИПБиВП — филиала ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, кандидату технических наук Соболевой Ольге Александровне и Ковалевой Ирине Львовне за предоставленные для исследования образцы приготовленных ими экспериментальных безалкогольных напитков на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон» и синтетическим ароматизатором «Персик 716».

Received 27.04.2024

Accepted in revised 13.06.2024

Accepted for publication 17.06.2024

© Vafin R. R., Mikhailova I. Yu., Ageykina I. I., 2024

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

Open access

METHODOLOGICAL APPROACHES TO GENE IDENTIFICATION OF TEA RAW MATERIALS AND RAW MATERIAL COMPOSITION OF TEA-BASED SOFT DRINKS

Ramil R. Vafin,* Irina Yu. Mikhailova, Irina I. Ageykina

All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Moscow, Russia

KEY WORDS:

Camellia sinensis, tea,
drinks, SNPs, DNA
markers, PCR, RFLP,
sequencing, gene
identification

ABSTRACT

Tea or tea shrub is a plant of the *Camellia sinensis* species, the leaves of which, previously prepared in a special way, are the traditional raw material for the production of tea products. Varietal gene identification of tea allows us to increase the level of assessment of the authenticity of tea raw materials and tea products. It is predominantly based on DNA technologies for the detection and interpretation of SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism), represented by a wide arsenal of both expensive high-tech methods and publicly available laboratory approaches. Species gene identification of the raw material composition of tea-based soft drinks is an equally important area of research due to the risk of falsification of this type of product. The purpose of this study was to find methodological approaches to the varietal gene identification of tea raw materials and to the

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И. (2024). Методологические подходы к геноидентификации чайного сырья и сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая. *Пищевые системы*, 7(2), 282–287. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-282-287>

FOR CITATION: Vafin, R. R., Mikhailova, I. Yu., Ageykina, I. I. (2024). Methodological approaches to gene identification of tea raw materials and raw material composition of tea-based soft drinks. *Food Systems*, 7(2), 282–287. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-282-287>

species gene identification of the raw material composition of tea-based soft drinks. As a result of a bioinformatics study to identify polymorphic restriction sites in the nucleotide sequences of *Camellia sinensis* genome loci, diagnostically significant restriction enzymes were selected that were capable of detecting SNPs and identifying tea genotypes using the analyzed markers. At the same time, 16 loci had potential for practical application, of which 11 belonged to the group of the most informative SNP markers. A post-analytical assessment of tea varieties was carried out with them regarding their genotypic affiliation and identifiability as part of solving the first task of the study. To achieve the second task, a molecular genetic approach to the species identification of the raw composition of soft drinks based on green tea was tested. The study included the analysis of experimental drinks (with natural flavoring “Lemon” and synthetic flavoring “Peach 716”), as well as commercial concentrates “ТИАКВА” (based on extracts from the coarse stems of green or black tea). The methods used in the work were PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and direct sequencing of the amplified chloroplast DNA locus. The combination of two methods (PCR and sequencing) showed its effectiveness in establishing the belonging of the analyzed nucleic acid samples to the *Camellia sinensis* species, the raw material base of the studied drinks and concentrates. However, to unlock the authentication potential of PCR with primers #1 and #2 combined with RFLP analysis, it will be necessary to select diagnostically significant restriction enzymes suitable for generating species-specific combinations of PCR-RFLP profiles of marker sequence.

FUNDING: The work was carried out within the framework of the Federal program “Scientific substantiation of the design of technologies for new types of drinks based on the study of the characteristic features of traditional and non-traditional raw materials of plant origin” FGUS-2022-0012.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors of the article express their gratitude to the leading research engineers of the laboratory of technology of soft drinks and mineral waters of VNIIPBiVP — a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after. V. M. Gorbatova RAS, Candidate of Technical Sciences Soboleva Olga Aleksandrovna and Kovaleva Irina Lvovna for providing for research samples of experimental soft drinks they prepared based on green tea with natural flavoring “Lemon” and synthetic flavoring “Peach 716”.

1. Введение

Чай, чайный куст, или камелия китайская — растение вида *Camellia sinensis*, культивируемое для производства чая. Чай в качестве напитка получают путем заваривания листа, предварительно подготовленного специальным образом [1].

Геноидентификация сортов чая играет ключевую роль в маркер-ориентированной селекции. Она позволяет определить сортовую принадлежность и генетическую чистоту, что обеспечивает более точную оценку подлинности чайного сырья и чайной продукции. Геноидентификация также способствует распознаванию фальсификата и контрафакта [2].

Современный молекулярный анализ генетического разнообразия и сортовой идентификации чая преимущественно строится на ДНК-технологии детекции и интерпретации SNP-маркеров [3]. SNP-маркеры призваны постепенно вытеснить традиционные маркеры RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA — случайно амплифицированная полиморфная ДНК) [4] и SSR (Simple Sequence Repeats — простые повторяющиеся последовательности) [5]. Это обусловлено конкурентными преимуществами SNP-маркеров, в частности, более высоким уровнем информативности генотестирования [6].

Арсенал молекулярно-генетических подходов к детекции SNPs представлен как дорогостоящими высокотехнологичными методами, так и общедоступными лабораторными способами. Первые базируются на низко- и высокопроизводительном секвенировании [7], а также на использовании ДНК-чипов низкой и высокой плотности [8,9]. Общедоступные лабораторные способы детекции основаны на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10], в том числе совмещенной с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [11,12].

Геноидентификация сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая — не менее важное направление исследования, обусловленное риском фальсификации данного вида продукции путем подмены натурального чайного сырья синтетическими ароматизаторами и красителями или несоблюдения заявленного состава [13,14].

Безалкогольные напитки на основе чая потенциально могут быть приготовлены с использованием исключительно купажированного или даже моносортного чая вида *Camellia sinensis* в зависимости от выбранной рецептуры [15]. При этом они могут выпускаться как в готовой к употреблению жидкой форме, так и в виде чайных концентратов, геноидентификация сырьевого состава которых весьма актуальна [14,16].

Цель исследования — изыскание методологических подходов к сортовой геноидентификации чайного сырья и к видовой геноидентификации сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

□ выявить полиморфные сайты рестрикции у 21 отобранного SNP-маркера *Camellia sinensis*, подобрать SNP-специфичные рестриктазы и рассчитать ПЦР-ПДРФ-профили встречаемых генотипов. Затем провести постаналитическую оценку 349 китай-

ских сортов чая на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости, опираясь на биоинформационные данные о сортах из первоисточника [7];

□ протестировать подобранный молекулярно-генетический подход к видовой идентификации сырьевого состава экспериментальных безалкогольных напитков на основе зеленого и черного чая, используя методы ПЦР, ПДРФ и прямого секвенирования амплифицируемого локуса хлоропластной ДНК. Использовать в исследовании экспериментальные напитки с натуральным ароматизатором «Лимон» и с синтетическим ароматизатором «Персик 716», а также коммерческие концентраты «ТИАКВА» на основе экстрактов из огрубелых стеблей зеленого или черного чая.

2. Объекты и методы

Исследование проведено в Межотраслевом научно-техническом центре мониторинга качества пищевых продуктов Всероссийского научно-исследовательского института пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности — филиала ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН.

В качестве модельных объектов теоретико-аналитического исследования послужила биоинформация о 349 сортах чая, культивируемых на чайных плантациях 12 провинций Китая и идентифицируемых с помощью 21 отобранного SNP-маркера, данные о которых были взяты из работы Li et al. [7], в частности из дополнительных материалов статьи, доступных к скачиванию по ссылке <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants12081643/s1>.

При этом из дополнительных материалов статьи использована информация, представленная в двух табличных формах Excel: Table S10 — The 21 SNP markers polymorphism for 349 tea plants identification (полиморфизм 21 SNP-маркера для идентификации 349 чайных растений) и Table S11 — The 21 pairs of primers for 349 tea plants rapid identification (21 пара праймеров для быстрой идентификации 349 чайных растений).

Проведенное нами биоинформационное исследование по выявлению полиморфных сайтов рестрикции у 21 отобранного SNP-маркера *Camellia sinensis* [7] с последующим подбором SNP-специфичных рестриктаз и расчетом ПЦР-ПДРФ-профилей встречаемых генотипов чая выполнено в программе NEBcutter V2.0 (<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

В качестве объектов экспериментального исследования послужили безалкогольные напитки на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон» и синтетическим ароматизатором «Персик 716», приготовленные в лаборатории безалкогольных напитков и минеральных вод. Данные напитки были получены на основе концентрата из экстракта зеленого чая «Гринфилд» с добавлением сахара, лимонной кислоты и ароматизаторов «Лимон» («БИОК», Россия) или «Персик 716» («Комбинат химико-пищевой ароматики», Россия). Дополнительно использованы в исследовании два коммерческих концентрата: концентрат «ТИАКВА» на основе экстракта из огрубелых стеблей зеленого чая («Курская биофабрика», Россия) и концентрат «ТИАКВА» на основе экстракта из огрубелых стеблей черного чая («Курская биофабрика», Россия).

Экстракция нуклеиновых кислот из разных объемов (25 мкл, 50 мкл, 100 мкл и 200 мкл) экспериментальных безалкогольных напитков на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон» и синтетическим ароматизатором «Персик 716», а также коммерческих концентратов осуществлена комплектом реагентов для экстракции ДНК из биологического материала «ДНК-сорб-С-М» («АмплиСенс», Россия).

ПЦР с выделенными образцами нуклеиновых кислот проведена с использованием набора реактивов Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) и праймеров (#1 и #2), инициирующих амплификацию локуса хлоропластной ДНК [17], в следующем режиме термоциклирования на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия): × 1: 95 °С — 5 мин; × 40: 95 °С — 10 сек, 61 °С — 10 сек, 72 °С — 10 сек; × 1: 72 °С — 1 мин.

Эндонуклеазное расщепление амплифицированного ПЦР-продукта выполнено инкубированием ПЦР-ПДРФ-пробы с рестриктазой *HinfI* (5 ед. на 1 пробу) в 1× SE-буфере «О» («СибЭнзим», Россия) при 37 °С в течение 4 часов в твердотельном термостате «Термит» («ДНК-технология», Россия).

Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов и ПДРФ-фрагментов осуществлено в камере для горизонтального электрофореза SE-1 («Хеликон», Россия) с использованием 2,5% агарозы в ТАЕ-буфере, окрашенном бромистым этидием. Визуализация полученных электрофореграмм проведена в трансиллюминаторе ECH-F15.M (Vilber Lourmat, Франция).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Теоретико-аналитическая часть

При реализации первой задачи в качестве модельных объектов теоретико-аналитического исследования послужила отраженная в работе Li и др. [7] биоинформация о 349 сортах чая, культивируемых на чайных плантациях 12 провинций Китая и идентифицируемых с помощью 21 отобранного SNP-маркера [7].

В ходе проведенного биоинформационного исследования по выявлению полиморфных сайтов рестрикции в нуклеотидных последовательностях локусов генома *Camellia sinensis*, ограниченных соответствующими наборами праймеров [7], нами были подобраны диагностически значимые рестриктазы, способные к детекции SNPs и к идентификации генотипов чая по анализируемым маркерам [7]. При этом расчет ПЦР-ПДРФ-профилей встречаемых генотипов чая выполнен в программе NEBcutter V2.0.

Сведения о локусах *Camellia sinensis*, о фланкирующих праймерах, SNPs и их позициях, а также об амплифицируемых ПЦР-продуктах [7] и генерируемых ПДРФ-фрагментах с подобранными рестриктазами, характеризующими определенные генотипы чая, представлены в Таблице 1.

Из 21 SNP-маркера *Camellia sinensis* [7] только в локусе Chr1_5870698 не было выявлено ни одного полиморфного сайта рестрикции, что в конечном счете не позволило подобрать для него диагностически значимую эндонуклеазу рестрикции. Для четырех SNP-маркеров (Chr2_21178624, Chr10_109925494, Chr11_74629953, Chr13_95750187) были подобраны рестриктазы (*Sau7718II*, *Aba1330II*, *Mba1II*, *SetI*), однако в настоящее время они не доступны в коммерческой продаже.

Таким образом, из 21 SNP-маркера потенциалом их практического применения методом ПЦР-ПДРФ-генотипирования обладают 16 локусов, 11 из которых входят в группу наиболее информативных при идентификации сортов чая, не производных по существу (non-EDV, Essentially Derived Varieties) [7].

Данные об этих 11 SNP-маркерах ввиду их информативности, а также доступности диагностически значимых рестриктаз и их изоизомеров приведены в начале Таблицы 1.

Полиморфная позиция локуса Chr1_39654059 затрагивает сайт узнавания (CC/WGG) эндонуклеазы рестрикции *BstNI* и ее изоизомера *Bst2UI* с генерацией ПЦР-ПДРФ-профиля анализируемого SNP-маркера, характеризующего два гомозиготных (CC и TT) и один гетерозиготный (CT) генотип по длине образующихся фрагментов ДНК.

Полиморфная позиция локуса Chr1_178707315 сцеплена с участком узнавания (GAAGAC(2/6)) рестриктазы *BbsI* и ее изоизомера *BstV2I*, генерирующего ПЦР-ПДРФ-профиль анализируемого SNP-маркера, идентифицирующий два гомозиготных (CC (224/145 bp) и TT (369 bp)) и один гетерозиготный генотип CT (369/224/145 bp).

HpyCH4IV-рестрикционное картирование локуса Chr2_117215365 и рассчитанный ПЦР-ПДРФ-профиль демонстрируют генерацию генотип-специфичных фрагментов различной длины: 233/162 bp (генотип CC), 395 bp (генотип TT) и 395/233/162 bp (генотип CT).

Таблица 1. Сведения о 21 SNP-маркере *Camellia sinensis*
Table 1. Information about 21 SNP markers of *Camellia sinensis*

№ п.п.	Локус	Праймер	SNP	Позиция SNP	ПЦР-продукт	Рестриктаза (изоизомер)	ПДРФ-фрагменты	Генотип
1	Chr1_39654059	F+R	C	78	426	<i>BstNI</i> (<i>Bst2UI</i>)	347/79	CC
			T				426	TT
			Y				426/347/79	CT
2	Chr1_178707315	F+R	C	157	369	<i>BbsI</i> (<i>BstV2I</i>)	224/145	CC
			T				369	TT
			Y				369/224/145	CT
3	Chr2_117215365	F+R	C	234	395	<i>HpyCH4IV</i> (<i>HpySE526I</i>)	233/162	CC
			T				395	TT
			Y				395/233/162	CT
4	Chr2_123557945	F+R	G	59	297	<i>HpyCH4III</i> (<i>Bst4CI</i>)	217/58/22	GG
			T				275/22	TT
			K				275/217/58/22	GT
5	Chr2_194290628	R+F	A	169	404	<i>ApoI</i> (<i>AscI</i>)	235/169	AA
			C				404	CC
			M				404/235/169	AC
6	Chr6_152338984	F+R	C	286	510	<i>EcoRI</i> (<i>EcoRI</i>)	510	CC
			T				282/228	TT
			Y				510/282/228	CT
7	Chr8_104369549	F+R	A	140	490	<i>Acil</i> (<i>BspACT</i>)	490	AA
			G				352/138	GG
			R				490/352/138	AG
8	Chr8_139071641	R+F	C	142	511	<i>BsrI</i> (<i>BseII</i>)	220/154/117/20	CC
			T				220/174/117	TT
			Y				220/174/154/117/20	CT
9	Chr12_134922457	R+F	A	216	513	<i>MlyI</i> (<i>PpsI</i>)	394/63/50/6	AA
			G				255/139/63/50/6	GG
			R				394/255/139/63/50/6	AG
10	CHR15_107174655	F+R	A	140	323	<i>AflII</i> (<i>BstAFT</i>)	323	AA
			G				188/135	GG
			R				323/188/135	AG
11	CHR15_37705498	F+R	A	131	537	<i>BsmI</i> (<i>PctI</i>)	537	AA
			C				405/132	CC
			M				537/405/132	AC
12	Chr2_21178624	R+F	C	312	382	<i>Sau7718II</i>	301/81	CC
			T				382	TT
			Y				382/301/81	CT
13	Chr10_109925494	R+F	A	216	315	<i>Aba1330II</i>	315	AA
			G				215/100	GG
			R				315/215/100	AG
14	Chr11_74629953	F+R	C	339	396	<i>Mba1II</i>	340/56	CC
			T				396	TT
			Y				396/340/56	CT
15	Chr4_83365171	F+R	A	327	443	<i>HpyCH4III</i> (<i>Bst4CI</i>)	443	AA
			G				326/117	GG
			R				443/326/117	AG
16	Chr6_77482863	F+R	A	197	350	<i>BtsCI</i> (<i>BstF5I</i>)	149/132/69	AA
			G				281/69	GG
			R				281/149/132/69	AG

Таблица 1. Окончание / Table 1. End

№ п.п.	Локус	Праймер	SNP	Позиция SNP	ПЦР-продукт	Рестриктаза (изоизомер)	ПЦР-фрагменты	Генотип
17	CHR10_61629141	F+R	C				182/161/101/63	CC
			T	242	528	<i>BtsCI</i> (<i>BstF5I</i>)	182/134/101/63/27	TT
			Y				182/161/134/101/63/27	CT
18	CHR10_160014631	F+R	C				445	CC
			G	141	445	<i>BciVI</i> (<i>BsuI</i>)	293/152	GG
			S				445/293/152	CG
19	CHR11_108419904	F+R	C				271/193	CC
			T	192	464	<i>Cac8I</i> (<i>BstC8I</i>)	464	TT
			Y				464/271/193	CT
20	CHR13_95750187	F+R	C				133/126/112/81	CC
			T	80	452	<i>SetI</i>	207/133/112	TT
			Y				207/133/126/112/81	CT
21	Chr1_5870698	F+R	G				-	GG
			T	279	386	-	-	TT
			K				-	GT

Генерация генотип-специфичных фрагментов также характерна и для других информативных SNP-маркеров, полиморфные позиции которых сцеплены с сайтами узнавания рестриктаз: *HpyCH4III* (ACN/GT) в локусе Chr2_123557945, *ApoI* (R/AATTY) в локусе Chr2_194290628, *EcoRI* (G/AATTC) в локусе Chr6_152338984, *AciI* (CCGC(-3/-1)) в локусе Chr8_104369549, *BsrI* (ACTGG(1/-1)) в локусе Chr8_139071641, *MlyI* (GAGTC(5/5)) в локусе Chr12_134922457, *AflII* (C/TТАAG) в локусе CHR13_107174655, *BsmI* (GAATGC(1/-1)) в локусе CHR15_37705498.

Постаналитическая оценка 349 китайских сортов чая на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости [7] показала возможность идентификации 213 сортов, в том числе 190 непроизводных (non-EDV) и 23 производных (EDV) по существу. Их идентификация ведется по сортоспецифичным комбинациям генотипов 11 информативных SNP-маркеров *Camellia sinensis*: Chr1_39654059, Chr1_178707315, Chr2_117215365, Chr2_123557945, Chr2_194290628, Chr6_152338984, Chr8_104369549, Chr8_139071641, Chr12_134922457, CHR13_107174655, CHR15_37705498.

При этом смешанные нуклеотиды (Y, K, M, R), указываемые в генотипическом профиле сорта, соответствуют определенным гетерозиготам (CT, GT, AC, AG), а обычные нуклеотиды (C, T, A, G) — конкретным гомозиготам (CC, TT, AA, GG).

Анализ 67 сортов чая (50 non-EDV и 17 EDV) [7] на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости по 11 SNP-маркерам не был проведен из-за неполной информации о детектируемых в них SNPs.

Оставшиеся 69 неидентифицируемых китайских сортов чая (39 non-EDV и 30 EDV) [7] формируют 29 SNP-ассоциированных групп, из которых 23 группы включают по 2 сорта, в 3 группы входят по 3 сорта, 2 группы вмещает 4 сорта и еще 1 группа объединяет 6 сортов чая соответственно. Для их сортовой идентификации могут быть применены различные молекулярно-генетические подходы, включая SNP-специфичную ПЦР или прямое секвенирование амплифицируемого локуса анализируемого SNP-маркера *Camellia sinensis* [7].

Настоящая работа стала логическим продолжением ранее проведенного нами биоинформационного исследования [12], где картированием выявленных полиморфных сайтов рестрикции и последующим профилированием встречаемых генотипов была установлена возможность детектирования полиморфных позиций других 8 SNP-маркеров *Camellia sinensis* [8] методом ПЦР-ПДРФ-анализа. Также была проведена постаналитическая оценка 117 китайских сортов [8] на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости [12].

Таким образом, проведенные нами биоинформационные исследования направлены на развитие общедоступных молекулярно-генетических подходов к сортовой идентификации чая детекцией полиморфных позиций отобранных SNP-маркеров методом ПЦР, в том числе в сочетании с ПДРФ-анализом (как в двух конкретных научных работах).

Помимо сортовой идентификации чайного сырья методами ДНК-технологий представляется возможной также видовой идентификация готового напитка. Несмотря на значительную деградацию и удаление нуклеиновых кислот *Camellia sinensis* в процессе переработки чая, в экстрагированной форме остается достаточное количество наследственного материала для молекулярно-генетического анализа, особенно в концентрированной основе напитка [13,14].

3.2. Экспериментальная часть

В настоящей работе для видовой идентификации сырьевого состава экспериментального безалкогольного напитка на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон», произведенного в лаборатории института, использован метод ПЦР с праймерами #1 и #2, инициирующими амплификацию локуса хлоропластной ДНК растений, с последующим прямым секвенированием наработанного ПЦР-продукта.

Предварительно выровненные референсные нуклеотидные последовательности анализируемого локуса хлоропластной ДНК *Camellia sinensis* и *Citrus limon*, представленные на Рисунке 1, служили

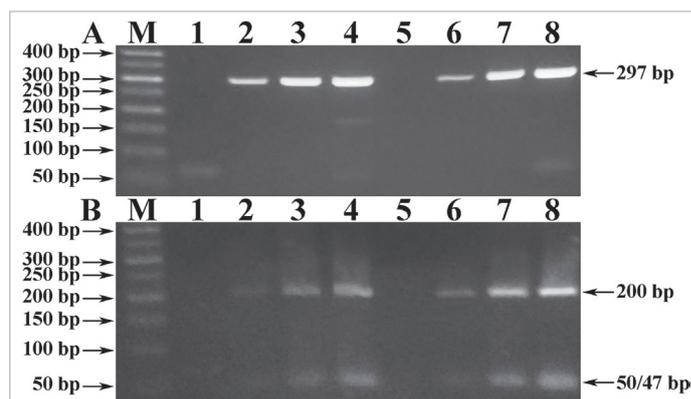
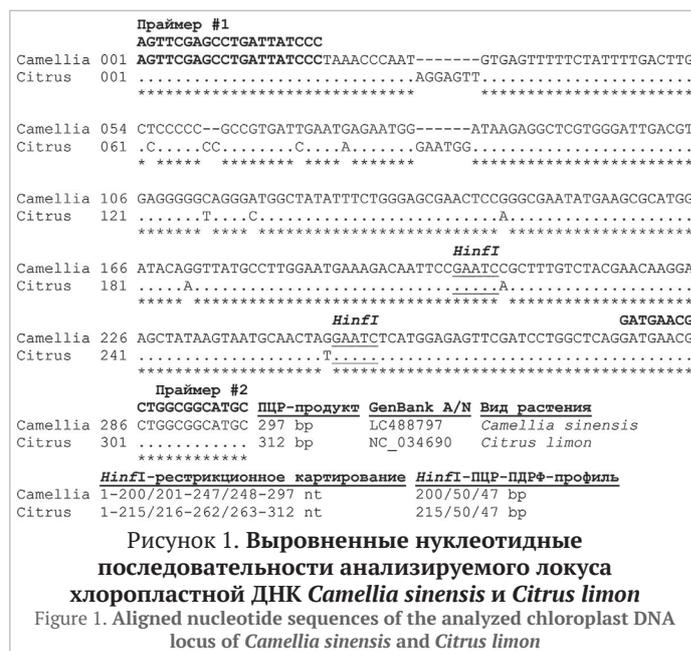


Рисунок 2. Электрофореграммы результатов ПЦР-ПДРФ-анализа образцов ДНК, экстрагированных из разных объемов экспериментального безалкогольного напитка на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон»

Figure 2. Electropherograms of the results of PCR-RFLP analysis of DNA samples extracted from different volumes of an experimental soft drink based on green tea with natural flavoring "Lemon"

Примечание: А — результат ПЦР; В — результат ПДРФ; М — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1, 5–2 и 3 мкл образца ДНК, выделенного из 25 мкл напитка; 2, 6–2 и 3 мкл образца ДНК, выделенного из 50 мкл напитка; 3, 7–2 и 3 мкл образца ДНК, выделенного из 100 мкл напитка; 4, 8–2 и 3 мкл образца ДНК, выделенного из 200 мкл напитка.

Note: A — PCR result; B — RFLP result; M — DNA length marker (50+ bp DNA Ladder); 1, 5–2 and 3 µl of DNA sample isolated from 25 µl of drink; 2, 6–2 and 3 µl of DNA sample isolated from 50 µl of drink; 3, 7–2 and 3 µl of DNA sample isolated from 100 µl of drink; 4, 8–2 and 3 µl of DNA sample isolated from 200 µl of drink.

теоретической базой для прогнозирования длины амплифицируемых ПЦР-продуктов и генерируемых ПДРФ-фрагментов при эндонуклеазном расщеплении ампликонов рестриктазой *HinfI*.

Результаты ПЦР-ПДРФ-анализа образцов ДНК, экстрагированных из разных объемов экспериментального безалкогольного напитка на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон», представлены на Рисунке 2.

Рисунок 2 демонстрирует усиление сигнала амплификации ПЦР-продукта по мере увеличения объема напитка, отобранного на выделение из него ДНК. При этом наблюдаемые длины амплифицированных ПЦР-продуктов и сгенерированных ПДРФ-фрагментов проанализированных образцов ДНК соответствовали профилю *Camellia sinensis*.

Последующий же результат прямого секвенирования амплифицированного локуса хлоропластной ДНК, чей фрагмент аналитической картины наглядно отображен на Рисунке 3, окончательно подтвердил принадлежность анализируемых образцов ДНК к виду *Camellia sinensis*.

Аналогичное заключение молекулярно-генетического тестирования было получено и в отношении образцов ДНК, экстрагированных как из разных объемов экспериментального безалкогольного напитка на основе зеленого чая с искусственным ароматизатором «Персик 716», так и из коммерческих концентратов «ТИАКВА» на основе экстрактов из огрубелых стеблей зеленого или черного чая.

Наглядная электрофореграмма результата ПЦР с праймерами #1 и #2, инициировавшими наработку ампликона локуса хлоропластного генома *Camellia sinensis* длиной 297 bp у исследованных образцов ДНК, представлена на Рисунке 4.

При этом праймеры #1 и #2, использованные в ПЦР, также были применены и в качестве сиквенсных при расшифровке амплифицированной нуклеотидной последовательности. Готовая смесь праймеров, валидированных на большом количестве видов растений, входит в состав набора Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, США) [18]. Этот набор ранее использовался нами при моделировании ДНК-технологий для видовой идентификации

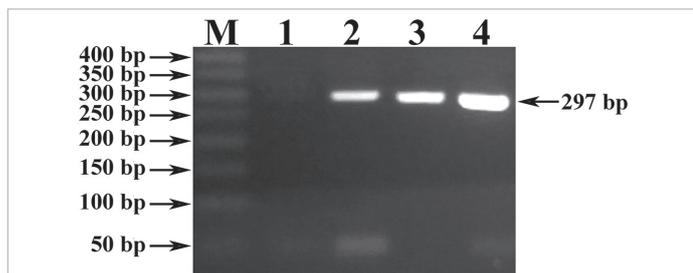


Рисунок 4. Электрофореграмма результата ПЦР образцов ДНК, экстрагированных из разных объемов экспериментального безалкогольного напитка на основе зеленого чая с искусственным ароматизатором «Персик 716»

Figure 2. Electropherogram of the PCR result of DNA samples extracted from different volumes of an experimental soft drink based on green tea with artificial flavoring "Peach 716"

Примечание: М — маркер длин ДНК (50+ bp DNA Ladder); 1–4 мкл образца ДНК, выделенного из 25 мкл напитка; 2–4 мкл образца ДНК, выделенного из 50 мкл напитка; 3–4 мкл образца ДНК, выделенного из 100 мкл напитка; 4–4 мкл образца ДНК, выделенного из 200 мкл напитка.

Note: M — DNA length marker (50+ bp DNA Ladder); 1–4 µl of DNA sample isolated from 25 µl of drink; 2–4 µl of DNA sample isolated from 50 µl of drink; 3–4 µl of DNA sample isolated from 100 µl of drink; 4–4 µl of DNA sample isolated from 200 µl of drink.

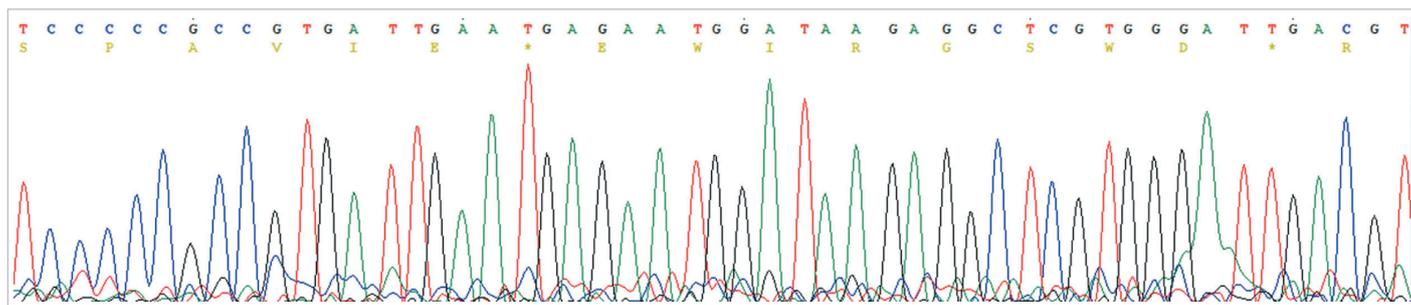


Рисунок 3. Фрагмент аналитической картины результата секвенирования амплифицированного локуса хлоропластной ДНК *Camellia sinensis*

Figure 3. Fragment of the analytical picture of the result of sequencing the amplified chloroplast DNA locus of *Camellia sinensis*

растительных напитков [19] и с целью определения ботанического происхождения меда [20].

Высококонсервативный регион хлоропластной ДНК растений (межгенный спейсерный участок ISR tRNA-Val-16S rRNA) [21,22], амплифицируемый с этими праймерами, рассматривался в качестве маркерной последовательности. Ее идентификационный потенциал в ранее опубликованных работах [19,20] раскрывался нами методом ПЦР-ПДРФ-анализа с подобранными эндонуклеазами рестрикции.

Эндонуклеазное расщепление рестриктазой *HinfI* амплифицированного ПЦР-продукта длиной 297 bp, проведенное в настоящей работе, приводило к генерации ПДРФ-фрагментов длиной 200/50/47 bp. Выбор данной рестриктазы, имеющей два мономерных сайта рестрикции в анализируемом локусе хлоропластной ДНК *Camellia sinensis* и *Citrus limon* (Рисунок 1), сделан для повышения разрешающей способности электрофоретического разделения ДНК в агарозном геле, и соответственно, для более точной интерпретации результатов ПЦР-ПДРФ-анализа. Это, в свою очередь, способствовало констатации факта детекции лишь ДНК *Camellia sinensis* — сырьевой основы исследованного напитка. Отсутствие же амплификации ПЦР-продукта длиной 312 bp можно объяснить сравнительно низким исходным количеством нуклеиновых кислот *Citrus limon* в образцах ДНК, экстрагированных из разных объемов напитка.

Дальнейшие исследования, направленные на подбор диагностически значимых рестриктаз, пригодных для видовой идентификации сырьевого состава безалкогольных напитков на основе чая методом ПЦР-ПДРФ, позволят полнее раскрыть аутентификационный потенциал данного молекулярно-генетического подхода. При этом в качестве генетической мишени могут быть выбраны и другие маркерные последовательности, в том числе стандартизированные наборы маркеров для ДНК-штрихкодирования растений [23].

4. Заключение

Биоинформационное исследование выявило полиморфные сайты рестрикции в нуклеотидных последовательностях локусов генома *Camellia sinensis*. В результате были подобраны рестриктазы, способные к детектированию SNPs и к идентификации генотипов чая. Из 16 локусов, имеющих потенциал для практического применения, 11 относятся к наиболее информативным SNP-маркерам, с которыми и была проведена постаналитическая оценка китайских сортов чая на предмет их генотипической принадлежности и идентифицируемости. Молекулярно-генетический подход к видовой идентификации сырьевого состава чайной продукции, включающий ПЦР и прямое секвенирование амплифицированного локуса хлоропластной ДНК, был протестирован на экспериментальных безалкогольных напитках на основе зеленого чая с натуральным ароматизатором «Лимон» и искусственным ароматизатором «Персик 716», а также на коммерческих концентратах «ТИАКВА» на основе экстрактов из огрубелых стеблей зеленого или черного чая. Этот подход эффективно определил принадлежность анализируемых образцов нуклеиновых кислот к виду *Camellia sinensis* — сырьевой основе исследованных напитков и концентратов. Таким образом, результаты проведенного исследования экспериментальных напитков и коммерческих концентратов указывают на надежность выбранного генодиагностического подхода и на его применимость для определения видовой подлинности чайной продукции. Для дальнейшего же раскрытия аутентификационного потенциала метода ПЦР с праймерами #1 и #2, совмещенного с ПДРФ-анализом, потребуется подбор диагностически значимых рестриктаз, пригодных для генерации видоспецифичных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей маркерной последовательности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК / REFERENCES

- Ding, Y., Huang, H., Cui, H., Wang, X., Zhao, Y. (2023). A non-destructive method for identification of tea plant cultivars based on deep learning. *Forests*, 14(4), Article 728. <https://doi.org/10.3390/f14040728>
- De Castro, O., Comparone, M., Di Maio, A., Del Guacchio, E., Menale, B., Troisi, J. et al. (2017). What is in your cup of tea? DNA verity test to characterize black and green commercial teas. *PLoS ONE*, 12(5), Article e017826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178262>
- Fang, W., Meinhardt, L. W., Tan, H., Zhou, L., Mischke, S., Wang, X. et al. (2016). Identification of the varietal origin of processed loose-leaf tea based on analysis of a single leaf by SNP nanofluidic array. *The Crop Journal*, 4(4), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.02.001>
- Mphangwe, N. I. K., Vorster, J., Steyn, J. M., Nyirenda, H. E., Taylor, N. J., Apostolides, Z. (2013). Screening of tea (*Camellia sinensis*) for trait-associated molecular markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0370-4>
- Hu, C. Y., Tsai, H. T., Chiu, C. F., Su, T. C., Le, N. H. K., Yeh, S. D. (2023). SSR-based molecular diagnosis for Taiwan tea cultivars and its application in identifying cultivar composition of the processed tea. *Journal of Food and Drug Analysis*, 31(3), 446–457. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.3465>
- Li, J.-W., Li, H., Liu, Z.-W., Wang, Y.-X., Chen, Y., Yang, N. et al. (2023). Molecular markers in tea plant (*Camellia sinensis*): Applications to evolution, genetic identification, and molecular breeding. *Plant Physiology and Biochemistry*, 198, Article 107704. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107704>
- Li, L., Li, X., Liu, F., Zhao, J., Zhang, Y., Zheng, W. et al. (2023). Preliminary investigation of essentially derived variety of tea tree and development of SNP markers. *Plants*, 12(8), Article 1643. <https://doi.org/10.3390/plants12081643>
- Wang, L., Xun, H., Aktar, S., Zhang, R., Wu, L., Ni, D. et al. (2023). Development of SNP markers for original analysis and germplasm identification in *Camellia sinensis*. *Plants*, 12(1), Article 162. <https://doi.org/10.3390/plants12010162>
- Wei, K., Wang, X., Hao, X., Qian, Y., Li, X., Xu, L. et al. (2022). Development of a genome-wide 200K SNP array and its application for high-density genetic mapping and origin analysis of *Camellia sinensis*. *Plant Biotechnology Journal*, 20(3), 414–416. <https://doi.org/10.1111/pbi.13761>
- Fan, K., Zhang, J., Wang, M., Qian, W., Sun, L., Shen, J. et al. (2022). Development and application of SNP-KASP markers based on genes related to nitrogen uptake, assimilation and allocation in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Agronomy*, 12(10), Article 2534. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102534>
- Khiavi, J. S., Falakro, K., Chaeikar, S. S. (2021). PCR-RFLP analyses of chloroplast DNA in some cultivated tea (*Camellia* sp.) genotypes. *Journal of Horticulture and Postharvest Research*, 4(1), 25–36. <https://doi.org/10.22077/jhpr.2020.3116.1121>
- Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И., Харламова, Л. Н. (2024). Прогнозная модель сортовой идентификации чая ПЦР-ПДРФ-анализом SNP-маркеров *Camellia sinensis*. *Пищевая промышленность*, 1, 74–77. [Vafin, R. R., Mikhailova, I. Yu., Ageykina, I. I., Kharlamova, L. N. (2024). Predictive model for tea varietal identification by PCR-RFLP analysis of *Camellia sinensis* SNP markers. *Food Industry*, 1, 74–77 (In Russian)] <https://doi.org/10.52653/PPI.2024.1.1.014>
- Ульянова, Е. В., Михайлова, И. Ю. (2024). Современные технологии в производстве напитков на основе чая. *Чай и напитки*, 1, 23–27. [Ulyanova, E. V., Mikhailova, I. Yu. (2024). Modern technologies in the production of tea-based drinks. *Beer and Beverages*, 1, 23–27. (In Russian)] <https://doi.org/10.52653/PIN.2024.01.09>
- Faller, A. C., Ragupathy, S., Shanmughanandhan, D., Zhang, Y., Lu, Z., Chang, P. et al. (2019). DNA quality and quantity analysis of *Camellia sinensis* through processing from fresh leaves to a green tea extract. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1798–1807. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0518>
- Wu, Z., Li, X., Xu, X., Xing, A., Xu, Y., Yang, X. et al. (2023). Quality components identification and formation analysis of tea (*Camellia sinensis* L.) flower beverages from three cultivars. *LWT*, 181, Article 114739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114739>
- Ujihara, T., Hayashi, N., Tanaka, J. (2012). Identification of Material Cultivar of Green Tea Infusions by Simple Sequence Repeat Markers. *Food Science and Technology Research*, 18(2), 209–217. <https://doi.org/10.5136/fstr.18.209>
- Al-Janabi, S. M., McClelland, M., Petersen, C., Sobra, I. B. W. S. (1994). Phylogenetic analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: Saccharinae. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(8), 933–944. <https://doi.org/10.1007/BF00220799>
- Hwang, H., Bae, S. C., Lee, S., Lee, Y.-H., Chang, A. (2013). A rapid and simple genotyping method for various plants by direct-PCR. *Plant Breeding and Biotechnology*, 1(3), 290–297. <https://doi.org/10.9787/PBB.2013.1.3.290>
- Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И., Харламова, Л. Н. (2023). Моделирование ДНК-технологии видовой идентификации сырьевого состава напитков на растительной основе. *Пищевая промышленность*, 8, 107–111. [Vafin, R. R., Mikhailova, I. Yu., Ageykina, I. I., Kharlamova, L. N. (2023). Modeling of DNA technology for species identification of the raw composition of plant-based beverages. *Food Industry*, 8, 107–111 (In Russian)] <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.8.8.020>
- Вафин, Р. Р., Михайлова, И. Ю., Агейкина, И. И., Свиридов, Д. А., Ганин, М. Ю. (2023). Моделирование ДНК-технологии определения ботанического происхождения меда. *Пищевая промышленность*, 11, 72–75. [Vafin, R. R., Mikhailova, I. Yu., Ageykina, I. I., Sviridov, D. A., Ganin, M. Y. (2023). Modeling of DNA technology for determining the botanical origin of honey. *Food Industry*, 11, 72–75 (In Russian)] <https://doi.org/10.52653/PPI.2023.11.11.015>
- National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). tRNA-Val [*Camellia sinensis*]. Gene ID: 14412475, updated on 02-Apr-2022. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14412475>. Accessed April 21, 2024.
- National Institutes of Health (NIH). National Library of Medicine (NLM). National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2022). 16S ribosomal RNA [*Camellia sinensis*]. Gene ID: 14412476, updated on 02-Apr-2022. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14412476>. Accessed April 21, 2024.
- Шеховцов, С. В., Шеховцова, И. Н., Пельтек, С. Е. (2019). ДНК-штрихкодирование: методы и подходы. *Успехи современной биологии*, 139(3), 211–220. [Shekhovtsov, S. V., Shekhovtsova, I. N., Peltek, S. E. (2019). DNA barcoding: Methods and approaches. *Uspehi Sovremennoj Biologii*, 139(3), 211–220 (In Russian)] <https://doi.org/10.1134/S0042132419030074>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Принадлежность к организации

Рамиль Ришадович Вафин — доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель заведующего, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности
119021, Москва, ул. Россолимо, 7
Тел.: +7-937-778-88-21
E-mail: vafin-ramil@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-0053>
* автор для контактов

Ирина Юрьевна Михайлова — научный сотрудник, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности
119021, Москва, ул. Россолимо, 7
Тел.: +7-916-250-88-76
E-mail: irina-mikhailova54@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9180-1043>

Ирина Игоревна Агейкина — младший научный сотрудник, Межотраслевой научно-технический центр мониторинга качества пищевых продуктов, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности
119021, Москва, ул. Россолимо, 7
Тел.: +7-915-101-75-84
E-mail: agira_@ro.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5667-1335>

Критерии авторства

Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR INFORMATION

Affiliation

Ramil R. Vafin, Doctor of Biological Science, Professor of RAS, Deputy Head, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry
7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia
Tel.: +7-937-778-88-21
E-mail: vafin-ramil@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0914-0053>
* corresponding author

Irina Yu. Mikhailova, Researcher, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry
7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia
Tel.: +7-916-250-88-76
E-mail: irina-mikhailova54@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9180-1043>

Irina I. Ageykina, Junior Researcher, Intersectoral Scientific and Technical Center for Monitoring the Quality of Food Products, All-Russian Scientific Research Institute of Brewing, Beverage and Wine Industry
7, Rossolimo Str., 119021, Moscow, Russia
Tel.: +7-915-101-75-84
E-mail: agira_@ro.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5667-1335>

Contribution

The author has the sole responsibility for writing the manuscript and is responsible for plagiarism.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.