

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5213—2020

土沉香鉴定方法

Identification of *Aquilaria sinensis* (Loureiro) Sprengel

以正式出版文本为准

2020-12-30 发布

2021-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

以正式出版文本为准

前 言

本文件按照 GB/T1.1—2020 给出的规则起草。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国杭州海关、中华人民共和国合肥海关。

本文件主要起草人：张明哲、吴姗、宗凯、张晓峰、尹文秀、周浩、虞惠贞、陈吴健、吴志毅、林晓佳。

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

土沉香鉴定方法

1 范围

本文件规定了土沉香的鉴定方法。
本文件适用于土沉香的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB/T 14072 林木种质资源保存原则与方法
SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

花序 inflorescence

花在总花柄上的排列方式，花序最简单的形式是单生花，如有多朵花在花序轴上排列，则花序的类型可分为无限花序和有限花序。

3.1.2

蒴果 capsule

由合生心皮的复雌蕊发育成的果实，子房 1 室或多室，每室有多粒种子。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（base pair）

CTAB：十六烷基三甲基溴化铵（cetyltrimethylammonium bromide）

dNTP：脱氧核苷酸三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphate）

DNA：脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid）

OD：光密度值（optical density）

Taq 酶：栖热水生菌 DNA 聚合酶。

4 基本信息

土沉香的基本信息如下：

学名：*Aquilaria sinensis* (Loureiro) Sprengel

异名：香材、白木香、牙香树、女儿香、栈香、青桂香、崖香、莞香

英文名：Agarwood

中文名：土沉香

分类地位：被子植物门 (Angiospermae)，双子叶植物纲 (Dicotyledoneae)，桃金娘目 (Myrtiliflorae)，瑞香科 (Thymelaeaceae)，沉香属 (*Aquilaria*)。

地理分布：主要分布于广东、海南、广西、福建。喜生于低海拔的山地、丘陵以及路边阳处疏林中。

土沉香为《国家重点保护野生植物名录 (第一批)》中的Ⅱ级重点保护野生植物。

5 方法原理

土沉香可能以种子、幼苗、植株、木材等形式出入境，本标准将土沉香的种子、叶片等形态特征以及分子特征作为鉴定依据。其中种子和叶片等形态特征完整时以形态特征作为鉴定依据，种子或叶片等形态特征不完整以及木材等不具备植物形态特征的样品以分子特征作为鉴定的主要依据。

6 仪器用具和试剂

6.1 仪器用具

体视显微镜、电子天平、高压灭菌器、pH计、恒温水浴锅、研钵、纯水仪、涡旋振荡器、液氮罐、高速冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、荧光定量PCR扩增仪、可调移液器 (1 000 μL, 200 μL, 20 μL, 10 μL, 2.5 μL) 等。

6.2 主要试剂

CTAB 缓冲液、酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙醇、RNase A、液氮、实时荧光PCR预混液、引物和探针 (见附录A中表A.1)，除另有规定外，均为分析纯或生化纯，水为按照GB/T 6682规定的执行。

7 鉴定方法

7.1 形态学方法

7.1.1 瑞香科植株形态特征

7.1.1.1 落叶或常绿灌木或小乔木，稀草本；茎通常具韧皮纤维。

7.1.1.2 叶：单叶互生或对生，革质或纸质，稀草质，边缘全缘，基部具关节，羽状叶脉，具短叶柄，无托叶。

7.1.1.3 花：花辐射对称，两性或单性，雌雄同株或异株，头状、穗状、总状、圆锥或伞形花序，有时单生或簇生，顶生或腋生；花萼通常为花冠状，白色、黄色或淡绿色，稀红色或紫色，常连合成钟状、漏斗状、筒状的萼筒，外面被毛或无毛，裂片4片~5片，在芽中覆瓦状排列；花瓣缺，或鳞片状，与萼裂片同数；雄蕊通常为萼裂片的2倍或同数，稀退化为2，多与裂片对生，或另一轮与裂片互生，花药卵形、长圆形或线形，2室，向内直裂，稀侧裂；花盘环状、杯状或鳞片状，稀不存；子房上位，心皮2个~5个合生，稀1个，1室，稀2室，每室有悬垂胚珠1颗，稀2颗~3颗，近

室顶端倒生，花柱长或短，顶生或近顶生，有时侧生，柱头通常头状。

7.1.1.4 果：浆果、核果或坚果，稀为 2 瓣开裂的蒴果，果皮膜质、革质、木质或肉质。

7.1.1.5 种子：种子下垂或倒生；胚乳丰富或无胚乳，胚直立，子叶厚而扁平，稍隆起。

7.1.2 沉香属植株形态特征

7.1.2.1 乔木或小乔木。

7.1.2.2 叶：叶互生，具纤细闭锁的平行脉。

7.1.2.3 花：花两性，腋生或顶生，通常组成无梗或具梗的伞形花序，无苞片；萼筒钟状，宿存，裂片 5 枚，伸张，花瓣退化成鳞片状，10 枚，基部联合成环，着生于花萼喉部，密被绒毛；雄蕊 2 倍于萼裂片，与鳞片状花瓣间生，花丝极短，花药长圆形，背着，药隔宽；下位花盘不存；子房近无柄，被毛，完全或不完整的 2 室，柱头头状，花柱极短。

7.1.2.4 果：蒴果具梗，两侧压扁，倒卵形，室背开裂；果皮革质或木质，基部为宿存萼筒所包被。

7.1.2.5 种子：种子卵形或椭圆形，基部具尾状附属物，种皮坚韧，无胚乳，胚具厚而平凹的子叶。

7.1.3 土沉香形态特征

7.1.3.1 乔木，树皮暗灰色，几平滑，纤维坚韧；小枝圆柱形，具纵纹，幼时被疏柔毛，后逐渐脱落，无毛或近无毛（参见附录 B 和附录 C）。

7.1.3.2 叶：叶革质，圆形、椭圆形至长圆形，有时近倒卵形，长 5 cm~9 cm，宽 2.8 cm~6 cm，先端锐尖或急尖而具短尖头，基部宽楔形，上面暗绿色或紫绿色，光亮，下面淡绿色，两面均无毛，侧脉每边 15~20，在下面更明显，小脉纤细，近平行，不明显，边缘有时被稀疏的柔毛；叶柄长约 5 mm~7 mm，被毛。

7.1.3.3 花：花芳香，黄绿色，多朵，组成伞形花序；花梗长 5 mm~6 mm，密被黄灰色短柔毛；萼筒浅钟状，长 5 mm~6 mm，两面均密被短柔毛，5 裂，裂片卵形，长 4 mm~5 mm，先端圆钝或急尖，两面被短柔毛；花瓣 10，鳞片状，着生于花萼筒喉部，密被毛；雄蕊 10，排成 1 轮，花丝长约 1 mm，花药长圆形，长约 4 mm；子房卵形，密被灰白色毛，2 室，每室 1 胚珠，花柱极短或无，柱头头状。

7.1.3.4 果：蒴果果梗短，卵球形，幼时绿色，长 2 cm~3 cm，直径约 2 cm，顶端具短尖头，基部渐狭，密被黄色短柔毛，2 瓣裂，2 室，每室具有 1 种子。

7.1.3.5 种子：种子褐色，卵球形，长约 1 cm，宽约 5.5 mm，疏被柔毛，基部具有附属体，附属体长约 1.5 cm，上端宽扁，宽约 4 mm，下端成柄状。

7.2 分子生物学方法

7.2.1 DNA 提取

按 CTAB 方法提取 DNA 见附录 A，或采用商品化 DNA 提取试剂盒。

7.2.2 实时荧光 PCR 鉴定方法

土沉香的实时荧光 PCR 检测方法见附录 A，防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。

7.2.3 质量控制

阳性对照：Ct 值小于或等于 35；

阴性对照：Ct 值大于或等于 40；

空白对照：Ct 值大于或等于 40；

上述指标有一项不符合者，应重做实时荧光 PCR 扩增。

8 结果判定

样品叶和种子等形态学特征与 7.1.3 的描述相符，则判定该样品为土沉香。

实时荧光 PCR 鉴定时，样品 Ct 值小于或等于 35，阳性对照、阴性对照和空白对照结果正常者，则判定为土沉香。

9 样品保存与复核

9.1 样品保存

物种资源的样品保存方法见 GB/T 14072。

9.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括：样品的名称与编号、来源、种类、时间，实验的时间、地点、方法和结果等，并要有经手人和实验人员的签字。生物学测定需有分类鉴别的特征照片，分子生物学检测需有最终的实验数据。原始数据应归档，妥善保管，以备复验、谈判和仲裁。

9.3 复核

复核工作由海关总署指定的单位或人员负责，主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性，必要时由专家对检测结果进行复核。

以正式出版文本为准

附 录 A
(规范性附录)
实时荧光 PCR 鉴定方法

A.1 DNA 提取

A.1.1 将样品用球磨仪或研钵液氮冷冻后磨碎，称取 50 mg~100 mg 于 1.5 mL 的灭菌离心管中，加入 700 μ L CTAB 缓冲液，振荡混匀，置于 65 $^{\circ}$ C 温浴 60 min~90 min，期间不断混匀；冷却后加入 5 μ L RNA 酶溶液，置 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min。

A.1.2 加入等体积的酚：三氯甲烷：异戊醇（25：24：1），振荡均匀，12000 r/min，离心 15 min。

A.1.3 取上清液放入另一 1.5 mL 新管中，加入等体积的异丙醇，轻轻颠倒 3 次~5 次，置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 40 min。

A.1.4 12000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。

A.1.5 加入 400 μ L 70 %乙醇溶液洗涤，12 000 r/min 离心 1 min，弃上清液，将离心管室温下干燥 15 min。

A.1.6 加入 50 μ L~100 μ L TE 或无菌去离子水，置 65 $^{\circ}$ C 水浴 40 min 充分溶解 DNA，测量 DNA 的浓度和纯度后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

注：也可使用试剂盒进行 DNA 提取，具体方法按照试剂盒说明书操作。

A.2 DNA 纯度与浓度的测定

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度，分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值，计算核酸的纯度和浓度，见式 (C.1) 和式 (C.2)：

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} \dots\dots\dots (C.1)$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} \mu\text{g/mL} \dots\dots\dots (C.2)$$

PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 比值应为 1.7~2.0。

A.3 实时荧光 PCR 检测

A.3.1 引物探针序列

土沉香实时荧光 PCR 方法鉴定引物探针序列见表 A.1。

表 A.1 引物序列

AS-F	5'-GATGCGCGCTATGATTGAAC-3'
AS-R	5'-CGGTGTATGCCATGATGCA-3'
AS-P	5'-AGGGCATGATGCCATGATGCT-3'
注：探针 5' 端标记 FAM 报告荧光染料，3' 端标记 BHQ1 淬灭荧光染料。	

A.3.2 检测体系

检测体系见表 A.2。

表 A.2 检测体系

试剂名称	加入 PCR 反应体系的体积 / μL
实时荧光 PCR 预混液 (2 \times)	10
正向引物 (20 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
反向引物 (20 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.8
DNA 模板 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}\sim 40 \text{ng}/\mu\text{L}$)	2
灭菌双蒸水	6.4
总计	20

依次将上述试剂按照表 A.2 体系浓度要求加入 PCR 反应管，混合均匀后放入定量 PCR 仪，每个反应体系设置两个平行反应。以土沉香叶片 DNA 为阳性对照，非土沉香叶片 DNA 为阴性对照，灭菌双蒸水为空白对照。

A.3.3 反应条件

95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，65.5 $^{\circ}\text{C}$ 34 s，共 40 个循环。

附 录 B
(资料性附录)
我国瑞香科分属检索表

- (1) 乔木；萼筒喉部有鳞片状退化花瓣，子房 2 室；蒴果室背开裂。……沉香属 *Aquilaria* Lam.
- (1) 灌木或亚灌木，稀草本；萼筒喉部无鳞片状退化花瓣，子房 1 室；浆果、核果或坚果，不开裂。
..... (2)
- (2) 花萼宿存或脱落，在子房上面无关节，果时不横断。..... (3)
- (2) 花萼筒在子房上面具关节或缢缩，果时横断（周裂）。..... (8)
- (3) 子房下面无花盘或退化，花单生或簇生于叶腋和枝顶。……欧瑞香属 *Thymelaea* Mill.
- (3) 子房下面具花盘，花序头状、总状、穗状或圆锥状。..... (4)
- (4) 下位花盘鳞片状或狭舌状，花序总状、圆锥或穗状，稀头状；叶多为对生，少互生。
..... 堇花属 *Wikstroemia* Endl.
- (4) 下位花盘环状偏斜或杯状，边缘全缘或浅裂至深裂，或一侧发达，花序为头状花序或数花簇生，稀穗状或总状花序；叶多为互生，稀对生。..... (5)
- (5) 花柱长，柱头圆柱状线形，其上密被疣状突起。..... 结香属 *Edgeworthia* Meisn.
- (5) 花柱及花丝极短或近于无，柱头头状，较大。..... (6)
- (6) 花萼裂片在开花时开展，头状花序或短穗状花序，无萼状总苞围绕，无或具短总花梗。
..... 瑞香属 *Daphne* Linn.
- (6) 花萼裂片在开花时直立，花序为头状花序或组成圆锥花序，早落的萼状苞片在花芽时完全围绕或包被着花芽，具长总花梗。..... (7)
- (7) 头状花序通常具 5~10 花，花萼内面白色。..... 毛花瑞香属 *Eriosolena* Bl.
- (7) 圆锥花序由许多具 4 花的头状花序组成（稀 3 花~7 花），花萼内面红色。
..... 鼠皮树属 *Rhamnoneuron* Gilg
- (8) 穗状花序疏散，伸长，花细小而不显著，花盘细小，盘状；一年生草本，茎多分枝，根不肥大。
..... 草瑞香属 *Diarthron* Turcz.
- (8) 头状花序紧密或短穗状花序，花显著，花盘裂片状或盘状；多年生草本、亚灌木至灌木，茎不分枝或极少分枝，具肥大的木质根状茎。..... (9)
- (9) 下位花盘裂片状，偏向一侧。..... 狼毒属 *Stellera* Linn.
- (9) 下位花盘盘状或杯状。..... 假狼毒属 *Stelleropsis* Pobed.

我国沉香属分种检索表

- (1) 蒴果质地稍薄，果皮干时不皱缩；种子被白色绢毛或无毛，先端具长喙，基部附属体较长，约 1.5 cm，比种子长，叶较宽，先端急尖。..... 土沉香 *A. sinensis* (Lour.) Spreng.
- (1) 蒴果质地稍厚，果皮在干时缢缩；种子密被黄色绢毛，先端钝，基部附属体较短，约长 0.8 cm~1 cm，几与种子等长；叶较窄，先端尾状渐尖。..... 云南沉香 *A. yunnanensis* S. C. Huang

附录 C
(资料性附录)
土沉香形态特征图



图 C.1 树冠

(引自 <http://www.plantphoto.cn/tu/678986>)



图 C.2 树皮

(引自 <http://www.plantphoto.cn/tu/2935655>)



图 C.3 花序

(引自 <http://www.plantphoto.cn/tu/1728542>)



图 C.4 花

(引自 <http://www.plantphoto.cn/tu/1324302>)



图 B.5 果

(引自 <http://www.plantphoto.cn/tu/556372>)

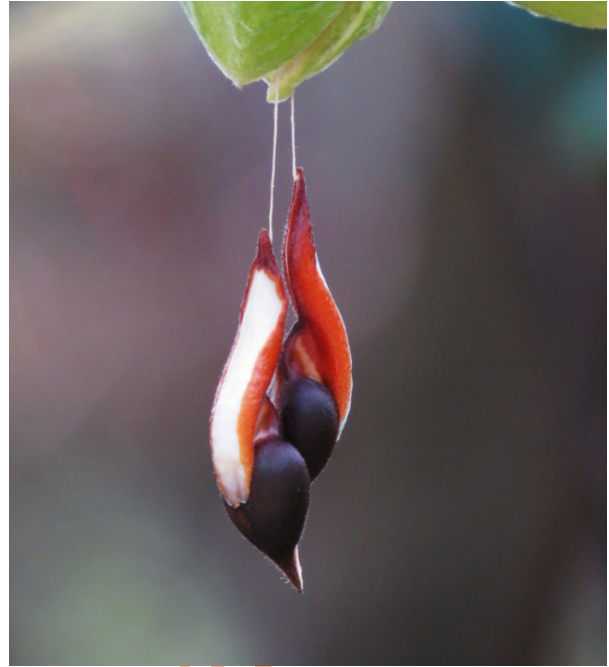
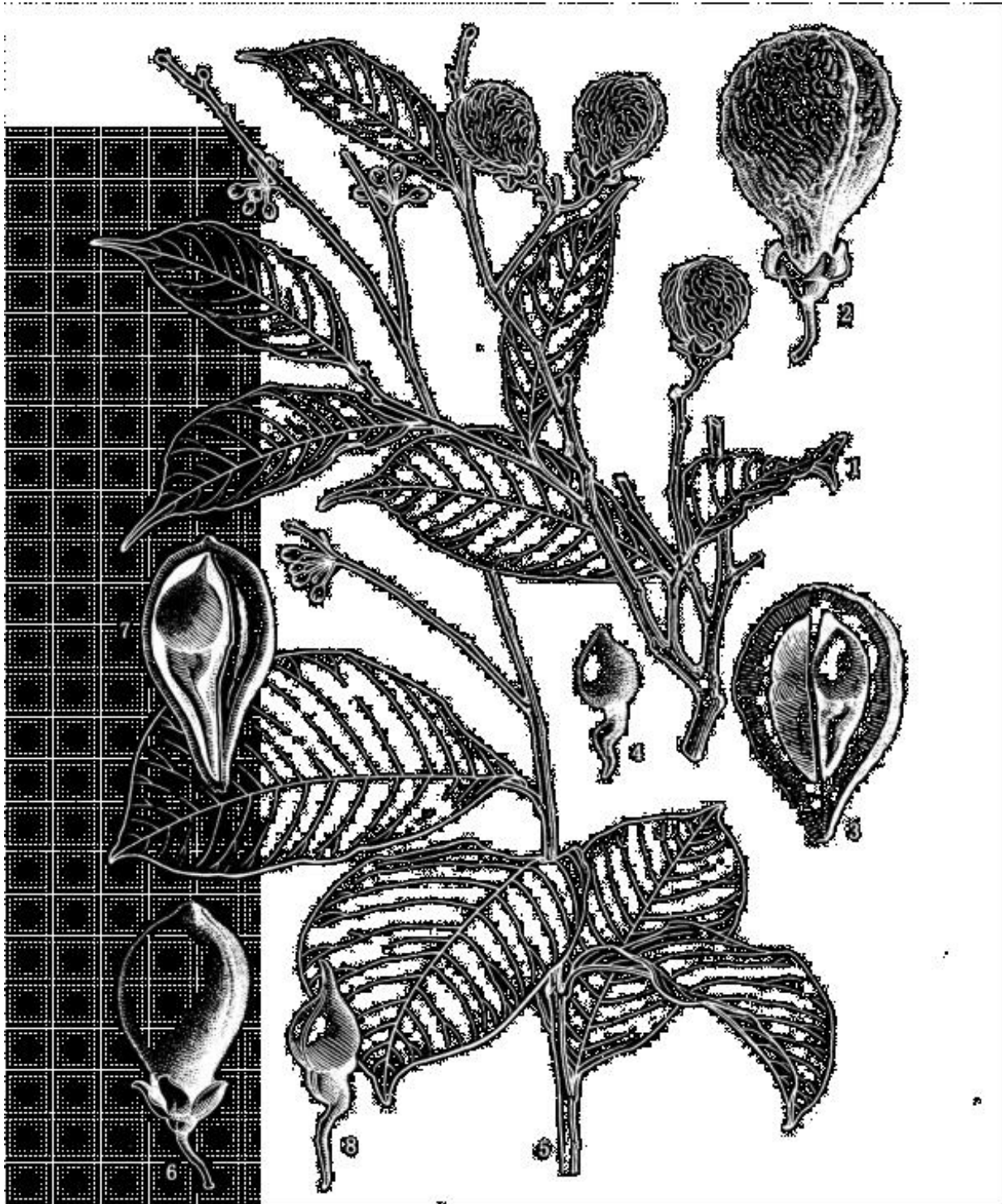


图 B.6 种子

以正式出版文本为准



说明：

1~4. 云南沉香 *Aquilaria yunnanensis*: 1. 果枝; 2. 果; 3. 果剖开; 4. 种子。5~8. 土沉香 *Aquilaria sinensis*: 5. 花枝; 6. 果; 7. 果剖开; 8. 种子。(图片来自《中国植物志》第52(1)卷291页图版45)

图 C.7 土沉香及其近似种形态特征绘图

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
土沉香鉴定方法
SN/T 5213—2020

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲1号(100023)
编辑部: (010) 65194242-7509
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 28 千字
2021年6月第一版 2021年6月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155175·24 定价 18.00 元



SN/T 5213-2020