ICS 65.020.99
CCS C 23

T/GDICST

团　　体　　标　　准

T/GDICSTXXXX—2024

天山雪莲愈伤组织细胞种源

Seed source of callus cells from Saussurea Involucrata

（征求意见稿）

内部讨论资料，严禁非授权使用

XXXX-XX-XX 发布　　XXXX-XX-XX 实施

广东省化妆品科学技术研究会　　发 布

内部讨论资料，严禁非授权使用

目　　次

前言 II
引言 III
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　原料要求 1
5　形态学鉴定 2
6　物质含量测定 3
7　基因检测 3
附录 A（规范性）　天山雪莲细胞培养物的种属鉴定 9
参考文献 12

内部讨论资料，严禁非授权使用

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海交通大学提出。

本文件由广东省化妆品科学技术研究会归口。

本文件起草单位：上海交通大学、安赛搏（重庆）生物技术有限公司、石河子大学、重庆医科大学、中国农业大学、上海自然堂集团有限公司、中国医学科学院药用植物研究所、北京工商大学、杭州花凝香生物科技有限公司、重庆大学、西北农林科技大学、广州梵之容化妆品有限公司、诺斯贝尔化妆品股份有限公司。

本文件主要起草人：郭劲宏、严家圣、祝建波、李健、李孙华、李正国、许文涛、李厚华、李丽、李安章、侯森、邱晓锋。

内部讨论资料，严禁非授权使用

引　言

利用植物细胞工程技术生产药用活性成分或补充药物资源已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。当前市面上销售的中药材存在外观相近、同名异物或同物异名等问题，给消费者选择带来了困扰和误导，同时也加剧了某些高贵药材被冒用的情况，导致药效无法可控。虽然可以利用形态学方法对药材植物进行区分鉴别，但是对于已经培养成植物愈伤组织的植物细胞而言，其已经失去了其原本植株体的外形特征，无法通过明确的形貌来源证明将植物细胞与原始植物建立起联系，传统的鉴定方法不再适用。因此急需开发更有效的鉴定技术来鉴定物种来源以保证销售供给产品的可靠品质和真实成分。

通过分子生物学技术分析植物基因组与质体基因组的高度保守的序列片段来确定物种的种源信息，从而快速地对植物样品进行物种鉴定。对于植物细胞而言，叶绿体是细胞内的重要细胞器，具有高度保守的遗传序列，且在进化过程中具有功能的一致性，容易在不同物种间形成差异化的保守区，是很好的物种鉴定方法。

本文件以天山雪莲细胞培养物为材料，提出了一种新型可靠的天山雪莲植物细胞物种溯源鉴定方法，对叶绿体的质体基因组测序外加 rDNA 保守序列测序，并与数据库已有序列进行比对或是用原始植株的同序列片段进行比较来认定其物种来源。同时，本文件还提供一份从物质含量和形态学方面来规范化天山雪莲细胞种源的筛选和生产标准。本文件将为植物细胞培养物的标准鉴定、质量控制、种源筛选等提供科学、具体的指导，以确保其作为保健品、化妆品和生产原料使用时的优质、安全和可靠性。

内部讨论资料，严禁未经授权使用

内部讨论资料，严禁非授权使用

天山雪莲愈伤组织细胞种源

1 范围

本文件规定了天山雪莲愈伤组织细胞种源鉴定的原料要求、形态学鉴定、物质含量测定、基因检测。

本文件适用于天山雪莲植物细胞相关培养物的种源溯源鉴定、特征物检测和形态学特征鉴别。

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 43733 植物中绿原酸类物质的测定 高效液相色谱法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外植体 explant

植物组织培养中作为离体培养材料的器官或组织的片段。

3.2

愈伤组织 callus

原植物体的局部受到创伤刺激后，在伤口表面新生的组织。

3.3

细胞培养 cell cultures

在体外模拟体内环境（无菌、适宜温度、酸碱度和一定营养条件等），使之生存、生长、繁殖并维持主要结构和功能的一种方法。

3.4

引物 primer

人工合成的两段寡核苷酸序列，一段与目的基因一端的一条 DNA 模板链互补，另一段与目的基因另一端的另一条 DNA 模板链互补。

[来源：GB/T 34797—2017，3.2]

3.5

天山雪莲 saussureae involucrate

菊科、风毛菊属、雪莲亚属多年生草本植物。

注：天山雪莲学名雪莲花，又称雪莲、高山雪莲、荷莲。

4 原料要求

内部讨论资料，严禁非授权使用

4.1 外植体选择

4.1.1 挑选野生天山雪莲颗粒饱满、色泽一致的成熟的种子置于小烧杯中，体积不超过烧杯容积的 1/3，用脱脂纱布覆盖杯口，置于水中冲洗 20 min，洗去种子上的泥土灰尘。

4.1.2 将种子放入无菌空瓶中，使用 75% 乙醇浸泡、无菌水清洗和次氯酸钠溶液漂洗，然后置于无菌培养皿滤纸上吸干水分，接种到含蔗糖 3%、琼脂 0.45% 的 MS 培养基中。

4.1.3 经过 7 d～10 d，种子萌发，长出无菌苗，将长至 2 cm 左右的无菌苗作为诱导愈伤的外植体。

4.2 细胞系挑选

4.2.1 宜选择株高的无菌幼苗的胚轴、胚芽、子叶、根、茎等为外植体，剪成 0.5 cm^2～1 cm^2 的碎片，放入培养基中诱导获得愈伤组织。

4.2.2 以含有植物生长调节剂的 MS 培养基作为筛选培养基对愈伤组织细胞进行逐代筛选，在 18 ℃～25 ℃ 温度下无光照培养。

4.2.3 对愈伤组织细胞进行逐代筛选和扩增，得到疏松、高增长量的愈伤组织细胞，将该细胞作为细胞种源鉴定的遗传信息的提供者。

5 形态学鉴定

抽取定量细胞液稀释后放置在显微镜下进行观察，细胞在显微镜观察下呈现圆形、椭圆形、杆状或葡萄球形细胞团，细胞颜色为透明或紫红色。具体形态见图 1、图 2。



图 1 天山雪莲细胞（透明色）在 40 倍物镜下的形态

内部讨论资料，严禁非授权使用

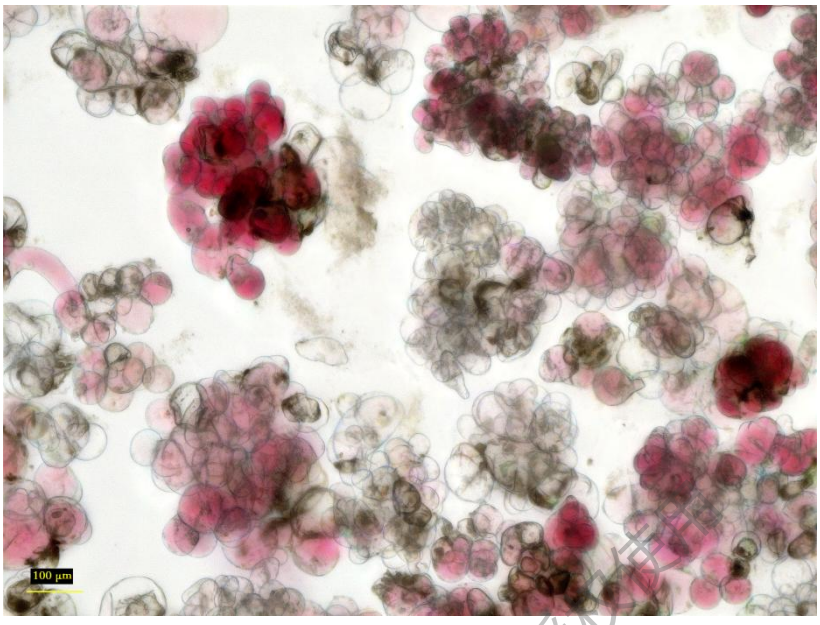


图 2　天山雪莲细胞（紫红色）在 40 倍物镜下的形态

6　物质含量测定

抽取天山雪莲细胞样品经 50% 甲醇水溶液超声提取，经反相色谱柱分离，在波长 327 nm 处用高效液相色谱仪紫外检测器或二极管阵列检测器检测，相对保留时间定性，具体操作参考 GB/T 43733。通过高效液相色谱外标法定量检测细胞干燥后的成分，应符合表 1 的要求。

表 1　细胞干燥后的成分

成分	要求
异绿原酸 B	存在
绿原酸	存在

7　基因检测

7.1　原理

叶绿体是细胞内的重要细胞器，具有高度保守的基因序列，可用于种间亲缘关系的研究。此外，叶绿体基因组比核基因组更小，容易测序和注释。通过对细胞叶绿体的质体片段基因组测序，和有较高的保守性 rDNA 核糖体 ITS 序列，形成对应植物的特定标准条形码，与基因数据库上的已有序列进行比对或用原始植株的同序列片段进行比较，通过所制定的判定原则认定其物种来源。

7.2　试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂，所用水符合 GB/T 6682 的规定。

7.2.1　PCR 扩增

7.2.1.1　*Taq* Plus DNA 聚合酶。

内部讨论资料，严禁非授权传播

7.2.1.2 10X PCR Buffer（含 Mg^{2+}）。
7.2.1.3 dNTP（10mM）。
7.2.1.4 灭菌去离子水。
7.2.1.5 引物 DNA。

7.2.2 **电泳**

7.2.2.1 6X DNA Loading Dye。
7.2.2.2 DNA Ladder Mix（100 bp～10 000 bp）。
7.2.2.3 DNA Ladder Mix（100 bp～3 000 bp）。
7.2.2.4 50X TAE。
7.2.2.5 琼脂糖。
7.2.2.6 柱式 DNA 胶回收试剂盒。
7.2.2.7 无水乙醇。
7.2.2.8 异丙醇。
7.2.2.9 1X TE。

7.2.3 **DNA 测序**

7.2.3.1 BigDye Terminator v1.1。
7.2.3.2 POP～7™ Polymer。
7.2.3.3 HiDi Formamide。
7.2.3.4 EDTA。
7.2.3.5 NaAc。
7.2.3.6 NaOH。

7.2.4 **DNA 提取**

Ezup 柱式植物组织基因组 DNA 抽提试剂盒。

7.3 **仪器**

7.3.1 PCR 仪：进行 PCR 扩增。
7.3.2 凝胶成像仪：用于电泳结束对凝胶谱带的观察、拍摄和分析。
7.3.3 测序仪：用于 DNA 片段测序分析。
7.3.4 冷冻离心机：在制定温度范围内对含细胞的液体进行离心分离。
7.3.5 电泳仪：用于鉴定、分离、制备 DNA 和测定分子量。
7.3.6 微型旋涡混合仪：混合频率 f=2 800 次/min。
7.3.7 数显恒温水浴锅：
——温度范围：常温～99.9 ℃；
——温控精度：≤±0.5 ℃。
7.3.8 精密单道可调移液器：
——量程 0.5 μL～10 μL；
——步进量 0.02 μL，定量量取液体。
7.3.9 微量紫外分光光度计：检测波长范围宽：200 nm～850 nm。

内部讨论资料，严禁非授权使用

7.4 试样制备

称取 10 g 的样本鲜细胞，分别加入浓度为 0%～70% 的丁二醇、0%～70% 的丙二醇、20%～90% 的水多元溶剂进行提取，提取温度为 70 ℃～100 ℃，提取时间 1 h～3 h 或常温浸提放置 24 h，然后 6 500 rpm 离心 10 min～15 min，保留上清液，即为植物细胞提取物。

7.5 基因提取

7.5.1 将 50 mg～100 mg 的新鲜植物组织在液氮中充分研磨成粉末，并转移至 1.5 mL 的离心管中。

7.5.2 加入 600 μL、65 ℃ 预热的 Buffer PCB 和 12 μL β-巯基乙醇，震荡混匀，置于 65 ℃ 水浴 25 min，混匀。

7.5.3 加入 600 μL 的氯仿，充分混匀，12 000 rpm 离心 5 min。吸取上层水相至干净的 1.5 mL 离心管中。

7.5.4 加入与上层水相等体积的 Buffer BD，颠倒混匀 3～5 次，再加入与上层水相等体积的无水乙醇，充分混匀后用移液器将其全部加入吸附柱中，室温静置 2 min。10 000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液。

7.5.5 将吸附柱放回收集管中，加入 500 μL PW Solution，10 000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液。

7.5.6 将吸附柱放回收集管中，加入 500 μL Wash Solution，10 000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中废液。

7.5.7 将吸附柱放回收集管中，12 000 rpm 离心 2 min。

7.5.8 取出吸附柱，放入新的 1.5 mL 离心管中，在吸附膜中央加入 50 μL TE Buffer，静置 3 min，12 000 rpm 离心 2 min，将得到的 DNA 溶液置于 -20 ℃ 保存或直接用于后续试验。

7.6 质量检测

7.6.1 取 5 μL DNA 溶液 1% 琼脂糖、1X TAE 缓冲溶液电泳（电压 120 V～180 V）检测，单一条带说明 DNA 完整无降解，有明显的条带说明浓度可以满足 PCR 要求。

7.6.2 分光光度计检测浓度和纯度，取 1 μL 检 OD 值，OD 260/280 在 1.8～2.0，说明 DNA 质量较好，小于 1.8 说明有蛋白污染，大于 2.0 说明有 RNA 污染。一般有少量的蛋白与 RNA 污染不影响普通 PCR。

7.7 引物设计

使用引物设计软件设定以下参数：

a) 引物长度 18 bp～30 bp；
b) Tm 值 55 ℃～65 ℃，退火温度 60 ℃ 左右；
c) GC 含量 40%～70%；
d) 避免引物二聚体和非特异性扩增的存在；
e) 避免连续 4 个碱基，G 和 C，3’ 端最后 5 个碱基内不宜有多于 3 个的 G 或 C；
f) PCR 扩增产物长度：位点测序引物 150 bp～300 bp，离位点 80 bp～150 bp，外显检测引物离外显子上下游 150 bp 左右；目的基因测序的 PCR 产物条带一般不超过 1 200 bp。

7.8 试样测定

内部讨论资料，严禁非授权使用

7.8.1 PCR 反应

7.8.1.1 基因组 DNA 提取后，以待测植物样品基因组 DNA 为模板，用针对基因序列设计的引物进行 PCR 扩增，用 PCR 扩增目的基因片段。利用引物、单核苷酸、核酸聚合酶等为原料，实现聚合酶链反应的热循环，将微量的植物细胞靶基因特异地、高效快速扩增上百万倍，以满足后续实验检测的要求。

7.8.1.2 PCR 扩增的总反应体系 20 μL，包含 10 μL 的 Premix Ex *Taq*（Probe qPCR），7 μL 的无酶水，上下游引物各 1 μL 和 1 μL 的 DNA 模板。

7.8.1.3 使用 PCR 仪进行扩增，程序设置为 95 ℃ 预变性 5 min，40 个循环的 95 ℃ 变性 30 s、63 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s，72 ℃ 修复延伸 10 min。PCR 扩增产物使用浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行验证，具体反应体系和反应条件见表 2、表 3。

表 2 PCR 反应体系

组分	浓度	体积
模板 DNA	—	1 μL
引物 F	10 μM	1 μL
引物 R	10 μM	1 μL
Dntp（mix）	10 μM	1 μL
Taq Buffer（with $MgCl_2$）	10X	2.5 μL
Taq 聚合酶	5 u/μL	0.2 μL
ddH_2O	—	25 μL

表 3 PCR 反应条件

序号	程序	温度	时间
1	预变性	95 ℃	5 min
2	变性	95 ℃	30 s
3	退火	63 ℃（每循环降 0.5 ℃）	30 s
4	延伸	72 ℃	30 s
5	循环 2～4	10 cycles	30 s
6	变性	95 ℃	30 s
7	退火	58 ℃	30 s
8	延伸	72 ℃	30 s
9	循环 6～8	30 cycles	30 s
10	修复延伸	72 ℃	10 min
11	保温	4 ℃	—

7.8.2 电泳检测

7.8.2.1 扩增后使用电泳对目的基因是否存在非特异性结果进行检测，根据所使用的标记方法、电泳的毛细管长度、电泳胶的种类等，在数据采集软件中选择正确的运行模块和分析模块。

7.8.2.2 PCR 产物取 5 μL 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，确认 PCR 扩增片段，电泳参数为 150 V、100 mA、10 min～20 min 电泳观察。

内部讨论资料，严禁非授权使用

7.8.2.3 用“电进样”的方法将带电的样品分子加到灌好电泳胶的毛细管的进样端（负极），然后在毛细管两端加上直流电压，样品中不同大小的 DNA 片段开始从负极向正极移动，移动的速度受到片段自身大小影响，片段越短移动越快。

7.8.3 序列测序

回收 PCR 扩增产物，获得目的 DNA，利用基于 Sanger 双脱氧链终止法的技术进行一代测序，将测序结果与公共数据库中的序列进行比对，根据同源性将待测植物鉴定到属或种。方法详见附录 A。

7.9 基因参考序列

7.9.1 天山雪莲叶绿体 *psbA-trnH* 基因参考序列（MW194194.1，471bp）

天山雪莲叶绿体 *psbA-trnH* 基因参考序列如下：

ATGCTCATAATTTCCCTCTAGACTTAGCTGCTATCGAAGCTCCATCTACAAATGGATAAGACTTTGGTCTGATTGTATAGGAGTT
TTTGAACTAAAAAAGGAGCAATAGCTTCCCTCTTGTTTTATCAAGAGGGCGTTATTGCTCCTTTTTTTATTTAGTAGTATTTACCTTAC
ATAGTTTCTTTAAAAATAACAAGGGGGTTTTATAGTTTGGTTCGATTAGCGTGTTTTATCTTTGTATTAATTTATATTATAGGTTTATA
TATCCTTTTCCCAATCGTTTATGAAGTTTTATTTCCAACTCAATTTCAATCTAAAATAGATAAAAATTATAATTTTGATTATTTATTGC
TTTTATTTCAGAAATAAGAAATAAATTATATGCTTTTTTTTTATGTTAATGGAAAAATAAAATATAGTAGATAATACTAGATAATAGGG
GCGGATGTAGCCAAGTGGATCAAGGCAGTG

7.9.2 天山雪莲叶绿体 *matK* 基因参考序列（ON409953.1，777bp）

天山雪莲叶绿体 *matK* 基因参考序列如下：

TACTTTACTCGATACAAACTCTTTTTTTTTGAAGGATCCACTATGATAATGAGAAAGGTTTCTGTATATACGCCCAAAGCGATCA
ATAATATCAGAATCTGATAAATTGGCCCAAATCACCTTACCAATAGGATGCCCCAATGTGTTACAAAATTTAGATTTAGCCAAGGATCC
AATCAGAGGCATAATTGGAACAATAGTATCAAATTTCTTAATAGCATTATCGATTATAAATGCATTTTCTAGCATTTGACTGCGGACCA
TTGAACGCTTTAGCCGCACACTTGAACGATAACCCAGAAAGTCAAGGGAATGATTGGATAATTGGTTTATATAAATCCTTCCTGGTTCA
GACCACAGGTAAAAATAAGATTTCCAGAAATTGACAAAGTAATATTTCCATTTATTCATCAAAAGAAACGTCCCTTTTGAAGCAAGAAT
TGATTTTCCTTGATACCTAACATAATGCATGAAAGGATCTTTGAACAACCATAAATTAGCTTGAAAAGCCCTGGCAAAGACTTCTGCAA
GATGCTCCATTTTTCCATAGAAATATATTCGTTCAAGAAGGGCTCCAGAAGATGTTGATCGTAAGTGAGAAGATTGGTTACGGAGAAAG
ATGAAGCCAGATTCATATTCACATACATGAGAAGTATATAGGAAAAAGAATAGTCTGTGATTTCTTTTTGAAAAAGAAGAACTGGCTTT
CTTTGAATTTGAAGTAATAAGACTATCCCAATTATGACACTCATGGAGAAAGAATCTTAATAAATGCAA

7.9.3 天山雪莲叶绿体 *rbcL* 基因参考序列（AB039789.1，569bp）

天山雪莲叶绿体 *rbcL* 基因参考序列如下：

AGAGACTAAAGCAAGTGTTGGATTCAAAGCTGGTGTTAAAGATTATAAATTGACTTATTATACTCCTGACTATAAAACCAAGGAT
ACTGATATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCCGCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCAGTAGCTGCCGAATCTTCTAC
TGGTACATGGACAACTGTGTGGACCGATGGACTTACGAGCCTTGATCGTTACAAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCTGTTCCTGGAG
AAGAAAGTCAATTTATTGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTAGGT
AATGTATTTGGGTTCAAAGCCCTGCGTGCTCTACGTCTGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACTTTCCAAGGTCCGCC
TCACGGCATCCAAGTTGAGAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTGTTGGGATGTACTATTAAACCTAAATTGGGGTTATCCG
CTAAAAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTTCGCG

7.9.4 天山雪莲 *ITS* 基因参考序列（FJ980351.1，700bp）

内部讨论资料，严禁非授权使用

天山雪莲 *ITS* 基因参考序列如下：

ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAGCCTGCACAGCAGAACGACCCGTGAACACGTAATCACAACAGGGCGTCTAGGGGATCGGGT
GCGAGCCCGAGCCCCTCGATGCTCCGCCGGCATGCGTGTATGGTGTCCCTTTTGAGGCATCATGGACGTCGTGTCGGCACGAAAACAAA
CCCCCGGCACGGCATGTGCCAAGGAAAACCAAACTTAAGAAGGGCGCGGCTCGTGTTGCCCCGTTTGCGGTGTGCACATGGGTCGTGGT
CTCTCATTAACCATAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAA
TTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTCGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCA
TCGCGTCGCCCCCAACCACGCCTCCCTCATGGGGATGTGTTTTGTTTGGGGCGGAGAATGGTCTCCCGTGCTCATGGTGCGGTTGGCCT
AAAAAGGAGTCCCCTTCGACGGACGCACGGCTAGTGGTGGTTTTCAAGGCCTTCGTATCGAGCTGTGCATACGTGACGGAATCGCTCTC
CAAAGACCCCAACGTGTCGTCTTGCGACGACGCTTCGACCGCGACCCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCA

7.10 判定准则与结果

用 NCBI Blast 程序（DNA/RNA 序列相似性搜索软件）将多序列文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，然后计算遗传距离，得到与待测植物序列相似性最大的植株物种信息，该未知样品应为具有最小平均遗传距离的物种或者具有最小遗传距离的物种。

内部讨论资料，严禁非授权使用

附 录 A
（规范性）
天山雪莲细胞培养物的种属鉴定

A.1 方法提要

利用一代（Sanger）测序的方法，以天山雪莲细胞培养物的样品为案例进行样本叶绿体 DNA、rDNA 保守序列提取，接着针对所抽取的序列，通过 PCR 扩增、琼脂糖电泳检测、胶回收等步骤，对扩增的 PCR 产物进行检测及纯化，使用测序仪对 PCR 产物进行测序比对。

A.2 引物设计

A.2.1 叶绿体

A.2.1.1 *psbA-trnH* 引物如下：

psbA3_f-F(5’-3’)：GTTATGCATGAACGTAATGCTC

trnHf_05-R(3’-5’)：CGCGCATGGTGGATTCACAATCC

A.2.1.2 *matK* 引物如下：

3F_KIM-F(5’-3’)：CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG

1R_KIM-R(3’-5’)：ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC

A.2.1.3 *rbcL* 引物如下：

rbcLa-F：ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC

rbcLa-R(3’-5’)：GTAAAATCAAGTCCACCRCG

A.2.2 rDNA 保守序列

ITS 引物如下：

ITS1-F(5’-3’)：TCCGTAGGTGAACCTGCGG

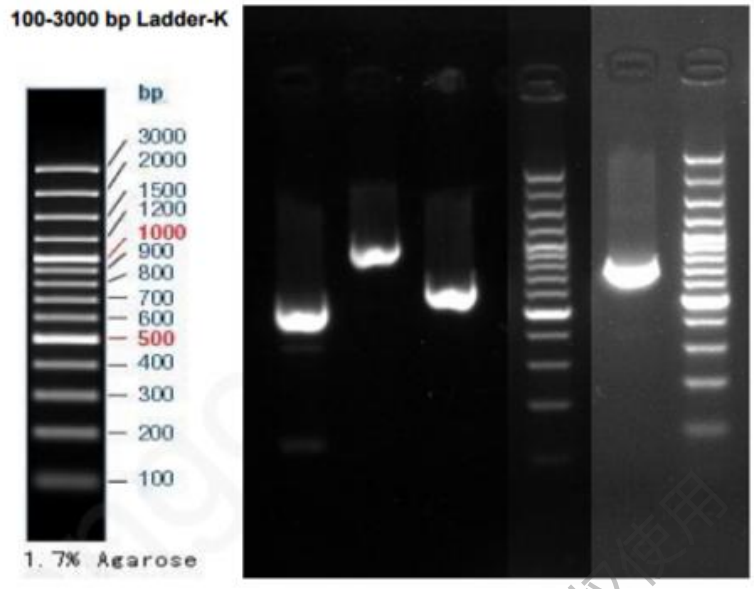
ITS4-R(3’-5’)：TCCTCCGCTTATTGATATGC

注：F(5’-3’)是正向引物，R(3’-5’)是反向引物。

A.3 PCR 结果

抽取部分样品进行跑胶检测，电泳检测 PCR 产物大小，见图 A.1。

内部讨论资料，严禁非授权使用



说明：

1——引物 *psbA-trnH* 的 PCR 产物；

2——引物 *matK* 的 PCR 产物；

3——引物 *rbcL* 的 PCR 产物；

4——引物 *ITS* 的 PCR 产物；

M——引物 marker。

图 A.1 PCR 产物琼脂糖电泳检测图

A.4 种属鉴定结果

A.4.1 待测物种的 *psbA-trnH* 序列（1，对应胶图中条带序号）比对

用 NCBI Blast 程序将以 *psbA-trnH* 序列为模板进行扩增后的文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，得到与待测植物序列 Query Cover 最大为 100%、Max Score 和 Total Score 最高为 865、Per Ident 最大为 99.79% 的植株物种信息，为 *Saussurea involucrata*（雪莲花）物种。

A.4.2 待测物种的 *matK* 序列（2，对应胶图中条带序号）比对

用 NCBI Blast 程序将 *matK* 序列为模板进行扩增后的文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，得到与待测植物序列 Query Cover 最大为 100%、Max Score 和 Total Score 最高为 1428、Per Ident 最大为 99.87%，为 *Saussurea orgaadayi*（阿尔泰雪莲）等 7 个物种。

A.4.3 待测物种的 *rbcL* 序列（3，对应胶图中条带序号）比对

用 NCBI Blast 程序将 *rbcL* 序列为模板进行扩增后的文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，得到与待测植物序列 Query Cover 最大为 100%、Max Score 和 Total Score 最高为 1051、Per Ident 最大为 100%，为 *Saussurea mongolica*（蒙古风毛菊）等 3 个物种。

A.4.4 待测物种的 *ITS* 序列（4，对应胶图中条带序号）比对

内部讨论资料，严禁非授权使用

用 NCBI Blast 程序将 *ITS* 序列为模板进行扩增后的文件与 NCBI 核酸数据库中的数据进行比对，得到与待测植物序列 Query Cover 最大为 99%、Max Score 和 Total Score 最高为 1288、Per Ident 最大为 100%，为 *Saussurea involucrata*（雪莲花）物种。

内部讨论资料，严禁非授权使用

参 考 文 献

[1] GB/T 30989 高通量基因测序技术规程
[2] GB/T 34797—2017 核酸引物探针质量技术要求
[3] GB/T 42751 信息技术 生物特征识别 高通量测序基因分型系统规范
[4] GB/T 43733 植物中绿原酸类物质的测定 高效液相色谱法

内部讨论资料，严禁非授权使用