



团 体 标 准

T/CACM 1326.21—2019

山牡荆种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Vitex quinata* (Lour.) Wall. seeds

2019 - 10 - 17 发布

2019 - 10 - 17 实施

中 华 中 医 药 学 会 发 布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 种子采收及选择	1
4.1 种子采收	1
4.2 种子选择	2
5 种子前处理	2
5.1 活力	2
5.2 含水量范围	2
6 种子保存量	3
7 种子冷冻方式	3
8 恢复培养	3
8.1 种子解冻处理	3
8.2 冻后种子活力检测	3
8.3 萌芽成苗	3
附录 A（规范性附录） 试剂的配制和保存方法	4
参考文献	5

前 言

本标准是药用植物顽拗性种子超低温保存系列标准之一，该系列标准结构和名称如下：

- T/CACM 1326. 1 药用植物顽拗性种子超低温保存技术通则；
- T/CACM 1326. 2 白木香种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 3 降香种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 4 益智种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 5 高良姜种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 6 朱砂根种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 7 草豆蔻种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 8 化州柚种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 9 樟种子超低温保存技术规程；
- T/CACM 1326. 10 两面针种子超低温保存技术规程；
-。

本标准按照 GB/T 1. 1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由中国医学科学院药用植物研究所海南分所提出。

本标准由中华中医药学会归口。

本标准起草单位：中国医学科学院药用植物研究所海南分所，中国医学科学院药用植物研究所。

本标准主要起草人：曾琳，魏建和，郑希龙，李榕涛，王秋玲，何明军，金钺，顾雅坤，符丽。

山牡荆种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了山牡荆 [*Vitex quinata* (Lour.) Wall.] 种子超低温保存过程中的术语和定义、种子的选择、种子前处理、种子保存量、种子冷冻方式、恢复培养等内容。

本标准适用于山牡荆种子的超低温长期贮藏。

2 规范性引用文件

下列文件对本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 3543.6 农作物种子检验规程 水分测定

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

山牡荆 *Vitex quinata* (Lour.) Wall.

为马鞭草科 (Verbenaceae) 牡荆属 (*Vitex* Linn.) 常绿乔木，别称莺歌公、山布荆。是一种珍贵用材和景观绿化的多用途树种，根及树干心材均可入药，瑶医认为，山牡荆具有清热解毒、活血消肿、疏风通络等功效。收载于《广西壮族自治区药材质量标准 (2014)》。

3.2

山牡荆果实 *Vitex quinata* (Lour.) Wall. fruits

核果球形或倒卵形，幼时绿色，成熟后呈黑色，宿萼呈圆盘状，顶端近截形。

3.3

山牡荆种子 *Vitex quinata* (Lour.) Wall. seeds

山牡荆的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子土黄色，倒卵形，质坚硬。表面具纵皱纹，胚乳白色。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的山牡荆种子置于液氮 (-196 ℃) 中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

9 月份开始果实成熟，果皮由青绿色变成暗绿色时即可采收。果实成熟后极易脱落，应立即采收种子，否则易被鸟类取食，去除果皮和果肉，取出种子。

4.2 种子选择

挑选发育饱满、均匀、健康的种子，置于 4 ℃ 冰箱中保存备用（存放时间不超过 30 d）。

5 种子前处理

5.1 活力

5.1.1 检测

山牡荆种子活力以种子生活力为判别标准。按照《植物生理学实验指导》中的溴麝香草酚蓝（BTB）法测定山牡荆种子生活力。待测种子在 30 ℃~35 ℃ 温水中浸种 2 h，随后取吸胀种子 20 粒，整齐地埋于备好的 1.5% BTB 琼脂凝胶中，注意要将胚埋入凝胶中。将培养皿置于 35 ℃ 温箱中 5 h 后观察结果。

BTB 的配制和保存方法见附录 A 的 A.1。

5.1.2 鉴定及要求

在光下用放大镜对染色结果进行观察鉴定。凡种胚周围出现黄色晕圈种子为有活力的种子，否则为无活力的种子。

待保存的山牡荆种子生活力应 $\geq 85\%$ 。

5.1.3 计算

生活力按照公式（1）进行计算：

$$A = \frac{y}{x} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

式中：

A——生活力；

y——有活力的种子数；

x——总的种子数。

5.2 含水量范围

用尼龙网袋包裹山牡荆种子，置于盛有变色硅胶的干燥器内，硅胶与种子的体积比为 45:1，室温条件下干燥处理 5 h~10 h，在干燥过程可定期测定种子含水量，将种子含水量由 18%~20% 降至 10%~15%。

按照 GB/T 3543.6 中的高恒温烘干法（130 ℃ 烘干 1 h）测定种子含水量（ W_0 ），并按照公式（2）进行计算：

$$W_0 = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100\% \dots \dots \dots (2)$$

式中：

W_0 ——种子含水量，用百分数表示（%）；

M_1 ——种子鲜重，单位为克（g）；

M_2 ——种子烘后重量，单位为克（g）。

6 种子保存量

山牡荆种子保存量不少于 400 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

山牡荆种子超低温保存的冷冻方式为玻璃化冷冻法，即将装有种子的 15 mL 冻存管（每管 60 粒种子）置于装载液（LS）中并于 25 °C 处理种子 20 min，再用玻璃化保护溶液（PVS2）冰浴处理种子 30 min，换上预冷新鲜的 PVS2 后迅速投入液氮中进行超低温保存。

LS 和 PVS2 的配制及保存方法见附录 A 的 A.2 和 A.3。

8 恢复培养

8.1 种子解冻处理

液氮中至少冻存 24 h 后，取出 1 个冻存管，立即放入 40 °C 水浴中快速解冻 2 min，而后用洗涤液（DS）浸泡 15 min，并用纯净水洗涤 3 次。

DS 的配制及保存方法见附录 A 的 A.4。

8.2 冻后种子活力检测

取出 30 粒解冻后的种子，按照 5.1 活力检测方法，进行超低温保存后的初始生活力检测。当种子生活力 $\geq 50\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 30 粒解冻后的山牡荆种子，50 °C 温水浸泡至冷却后加 0.5% 高锰酸钾溶液浸泡 2 h 后，播种到带有无菌滤纸的带盖发芽盒中，温度 25 °C~30 °C，湿度 70%~85% 条件下培养。

附录 A
(规范性附录)
试剂的配制和保存方法

A.1 BTB 的配制和保存方法

精密称取 BTB 0.1 g，溶解于煮沸过的 100 mL 纯水中，然后用滤纸去残渣。滤液若呈黄色，可加数滴氢氧化钠溶液，使之变为蓝色或蓝绿色，置于棕色瓶中长期贮存。

1.5% BTB 琼脂凝胶：称量 0.1% BTB 溶液 40 mL 置于烧杯中，称取 0.5 g 琼脂，将其剪碎后加入杯中，加热并不断搅拌使之完全溶解。待溶液稍稍冷却即可趁热倒入 9 cm 培养皿中，使之成均匀的薄层，完全冷却后备用。

A.2 装载液 (LS) 的配制及保存方法

精密称取蔗糖 13.7 g，称量甘油 11.9 mL，溶于液体 MS 培养基中，调 pH 至 5.8，并定容至 100 mL，高温高压灭菌，4 °C 冷藏。

A.3 玻璃化溶液 (PVS2) 的配制及保存方法

精密量取甘油 23.8 mL、乙二醇 13.6 mL、二甲亚砜 13.6 mL，称取蔗糖 13.7 g，溶于 MS 溶液中，调 pH 至 5.8 后，定容至 100 mL，高温高压灭菌，4 °C 冷藏。

注：配置时需戴手套，并在通风厨内操作。

A.4 洗涤液 (DS) 的配制及保存方法

精密称取蔗糖 41.1 g 溶于 MS 溶液中，调 pH 至 5.8 后，定容至 100 mL，高温高压灭菌，4 °C 冷藏。

参 考 文 献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区区域药材质量标准(第一卷)[S]. 南宁, 广西科学技术出版社, 2014, 27-28
- [2] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第 65(1) 卷[M]. 科学出版社, 1982: 135
- [3] Chen Shou-liang; Michael G. Gilbert. Verbenaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 1994. 17: 1-49.
- [4] 傅家瑞, 宋松泉. 顽拗性种子生物学[M]. 中国科学文化出版社, 2004:1
- [5] Reed BM. Plant Cryopreservation-A Practical Guide[M]. Springer, 2010:3
- [6] 蔡益航. 山牡荆实生苗培育技术[J]. 现代农业科技, 2019, 2:107-109

全国团体标准 T/CACM