



# 团 体 标 准

T/CACM 1326.37—2019

## 黑嘴蒲桃种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Syzygium bullockii* (Hance) Merr.  
& L.M. Perry 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.....	2
4.1 种子采收.....	2
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） 试剂的配置和保存方法.....	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，顾雅坤，符丽，李榕涛，郑希龙，王秋玲，何明军，金钺。

# 黑嘴蒲桃种子超低温保存技术规程

## 1 范围

本标准规定了黑嘴蒲桃 [*Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M. Perry] 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。

本标准适用于黑嘴蒲桃种子的液氮超低温长期贮藏。

## 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

**黑嘴蒲桃** *Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M. Perry

为桃金娘科 (Myrtaceae) 蒲桃属 (*Syzygium* Gaertn.) 常绿灌木至小乔木，圆锥花序顶生，多花，植株和番石榴一样带有桃金娘科特有的桉油味。以果实、根入药，用于治疗瘀伤咳血、风火牙痛、湿热腹泻、肝炎、风湿痛、胃痛等。收载于《中国中药资源志要 (1994)》。

### 3.2

**黑嘴蒲桃果实** *Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M. Perry fruits

大型果序，浆果或核果状，椭圆形，紫黑色，长约 1 cm，宽 8 mm。

### 3.3

**黑嘴蒲桃种子** *Syzygium bullockii* (Hance) Merr. & L.M. Perry seeds

黑嘴蒲桃的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子黑褐色，椭圆状卵形，表面光滑。

### 3.4

**种子超低温保存** seed of cryopreservation

将经过前处理的黑嘴蒲桃种子置于液氮 (-196 °C) 中保存。

## 4 种子采收及选择

### 4.1 种子采收

9月~11月,当果皮颜色由绿转为紫黑色时,即可采收,成熟的黑嘴蒲桃成一串串的,口味酸甜,汁多。去除果皮,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3个月)。

## 5 种子前处理

### 5.1 活力

#### 5.1.1 检测

黑嘴蒲桃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)法测定黑嘴蒲桃种子生活力。待测种子在30℃~35℃温水中浸种2h,随后取吸胀种子50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6h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。

待保存的黑嘴蒲桃种子生活力应 $\geq 60\%$ 。

#### 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

用尼龙网袋包裹黑嘴蒲桃种子,置于盛有变色硅胶的干燥器内,硅胶与种子的体积比为40:1,室温条件下干燥处理0h~80h,在干燥过程中定期测定种子含水量,将种子含水量由45%~55%降至38%~45%。

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：

$W_0$ ——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

黑嘴蒲桃种子保存量不少于 360 粒，以便后期的活力检测使用。

## 7 种子冷冻方式

黑嘴蒲桃种子超低温保存的冷冻方式为分步冷冻法，即将装有种子和玻璃化保护溶液（PVS2）的 15 mL 冻存管（每管 30 粒种子）置于 4 ℃ 冰箱中 0.5 h，取出立即放入 -20 ℃ 冰柜中 1 h，之后迅速投入液氮中保存。

PVS2 的配置方法见附录 A 的 A.2。

## 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 2 个冻存管，立即放入 40 ℃ 水浴中快速解冻 3 min，而后用洗涤液（DS）浸泡 3 次，每次 5 min，并用纯净水冲洗干净。

DS 的配置方法见附录 A 的 A.3。

### 8.2 冻后种子活力检测

取出 1 管解冻后的种子，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  $\geq 75\%$  时视为保存成功。

### 8.3 萌芽成苗

将剩下 1 管解冻后的黑嘴蒲桃种子，播种到带有无菌滤纸的带盖发芽盒中，温度 25 ℃~30 ℃，湿度 70%~85% 条件下培养。

附 录 A  
(规范性附录)  
试剂的配置和保存方法

### 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 PVS2的配置及保存方法

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，定容至 100 mL，调 pH 值至 5.8，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.3 DS 的配置及保存方法

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

参 考 文 献

- [1] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京, 科学出版社, 1994
- [2] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第 53(1) 卷[M]. 科学出版社, 2004(1984): 097
- [3] Chen Cheih, Lyn A. Craven. Myrtaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2007. 13: 335-359.
- [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
-