



团 体 标 准

T/CACM 1326.47—2019

洋苏木种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Haematoxylum campechianum* L.
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	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。

洋苏木种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了洋苏木 (*Haematoxylum campechianum* L.) 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。

本标准适用于洋苏木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

GB/T 3543.7 农作物种子检验规程 其他项目检验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

洋苏木 *Haematoxylum campechianum* L.

为豆科 (Leguminosae) 采木属 (*Haematoxylon* Linn.) 常绿小乔木，别称采木。原产中美洲、南美洲和印度群岛等热带地区。木材的边材黄白色，心材鲜红色，为珍贵用材树种；木材和花可提取苏木精。采木又供药用，为收敛剂，用于治疗痢疾和腹泻。收载于《世界药用植物速查辞典（2015）》。

3.2

洋苏木果实 *Haematoxylum campechianum* L. fruits

荚果披针状长圆形，长 2 cm~5 cm，宽 8 mm~12 mm，果片薄，具细脉纹。

3.3

洋苏木种子 *Haematoxylum campechianum* L. seeds

洋苏木的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子黄褐色，长圆状肾形，扁平，表面平滑，种脐位于种腹侧凹陷处，种皮硬而脆。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的洋苏木种子置于液氮 (-196 °C) 中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

3月下旬~4月下旬，种子呈橘黄色时，即可采收，去除荚果，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2个月）。

5 种子前处理

5.1 活力

5.1.1 检测

洋苏木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）法测定洋苏木种子生活力。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8h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的种子为有活力的种子，否则为无活力的种子。

待保存的洋苏木种子生活力应 $\geq 50\%$ 。

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

用尼龙网袋包裹洋苏木种子，置于盛有变色硅胶的干燥器内，硅胶与种子的体积比为60:1，室温条件下干燥处理8h~16h，在干燥过程可定期测定种子含水量，将种子含水量由15%~20%降至10%~12%。

按照GB/T 3543.6中的高恒温烘干法（130℃烘干1h）测定种子含水量（%），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

洋苏木种子保存量不少于 350 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

洋苏木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 5 mL 冻存管（每管 50 粒种子）置于装载液（LS）中并于 25 ℃ 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 ℃ 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 25 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 $\geq 70\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 25 粒解冻后的洋苏木种子，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] 肖培根, 刘昌孝, 江纪武等. 世界药用植物速查辞典[M]. 中国医药科技出版社. 2015
- [2] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第 39 卷[M]. 科学出版社, 2004(1988): 116
- [3] Xu Langran. Chen Dezhao. Zhu Xiangyun et al. Fabaceae(Leguminosae) [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2010. 10: 48.
- [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

全国团体标准 CACM