



团 体 标 准

T/CACM 1326.13—2019

马钱子种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Strychnos nux-vomica* Linn. 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）TTC/磷酸盐缓冲液的配制和保存方法..... | 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。

马钱子种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了马钱子 (*Strychnos nux-vomica* Linn.) 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。

本标准适用于马钱子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

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

马钱子 *Strychnos nux-vomica* Linn.

为马钱科 (Loganiaceae) 马钱属 (*Strychnos* Linn.) 常绿乔木，别称番木鳖。其干燥成熟种子为《中华人民共和国药典》(2015 版) 收载药材，中医学上以种子泡制后入药，性寒，味苦，有通络散结，消肿止痛之效。西医学上用种子提取物，作中枢神经兴奋剂。此外，木材灰白色，结构坚硬致密，可供车辆及农具用料。

3.2

马钱子果实 *Strychnos nux-vomica* Linn. fruits

浆果圆球状，直径 2 cm~4 cm，成熟时桔黄色，内有种子 1~4 颗。

3.3

马钱子种子 *Strychnos nux-vomica* Linn. seeds

马钱子的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子表面灰黄色，密被银色绒毛，有丝样光泽。扁圆盘状，一面隆起，一面凹下，宽 2 cm~4 cm。质坚硬，平行剥开可见淡黄色胚乳，角质状，子叶心形。种子有毒。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的马钱子种子置于液氮（-196 ℃）中保存。

4 种子采收及选择**4.1 种子采收**

8 月~翌年 1 月，当果皮颜色由绿色转为黄色时，即可采收，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 10 ℃ 冰箱中保存备用（存放时间不超过 1 个月）。

5 种子前处理**5.1 活力****5.1.1 检测**

马钱子种子活力以种子生活力为判别标准。按照 GB/T 3543.7 中的 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 法检测种子生活力。随机抽取 30 粒种子，剥去外层种皮，沿种脊小心将种子分成 2 片后放培养皿内，内侧面面向下，滴入 TTC 溶液浸没种子，室温（25 ℃）避光放置 4 h 后观察染色结果。

TTC 溶液的配制和保存方法见附录 A。

5.1.2 鉴定及要求

直接用肉眼对染色结果进行观察鉴定。凡胚及胚乳全部染成有光泽的鲜红色，且组织状态正常的，为有活力的种子，否则为无生活力的种子。

待保存的马钱子种子生活力应 $\geq 90\%$ 。

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

用尼龙网袋包裹马钱子种子，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 0 h~100 h，在干燥过程中定期测定种子含水量，将种子含水量由 32%~38% 降至 25%~32%。

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

马钱子种子保存量不少于 400 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

马钱子种子超低温保存的冷冻方式为直接冷冻法，即将待保存的马钱子种子放入 15 mL 冻存管（每管 8 粒种子）中，迅速投入液氮中保存。

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 6 个冻存管，立即放入 40 ℃ 水浴中快速解冻 2 min。

8.2 冻后种子活力检测

取出 3 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 $\geq 50\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 3 管解冻后的马钱子种子，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)

TTC/磷酸盐缓冲液的配制和保存方法

A.1 三苯基氯化四氮唑 (TTC) 溶液配置和保存方法

精密称取 TTC 1.00 g，溶于 100 mL 磷酸盐缓冲溶液中，制成浓度为 1% 的 TTC 溶液，调 pH 至 6.5~7.5，放于棕色瓶内，置于 4 °C 冰箱中备用。

A.2 磷酸盐缓冲液配置方法

溶液 I：9.08 g 磷酸二氢钾溶于 1 L 无菌水中；

溶液 II：35.81 g 磷酸二氢钠溶于 1 L 无菌水中；

按 I : II = 2 : 3 的比例混合制成磷酸盐缓冲溶液。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京, 中国医药科技出版社, 2015:50-51
- [2] 中国科学院中国植物志委员会. 中国植物志. 第 61 卷[M]. 科学出版社, 2004(1992): 230
- [3] Li Ping-tao; Antony J. M. Leeuwenberg. Loganiaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 1996. 15: 320-338.
- [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
-

全国团体标准信息平台