



# 团 体 标 准

T/CACM 1326.20—2019

## 三桠苦种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Evodia lepta* 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 种子的采收及选择 .....	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）BTB 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。

# 三桠苦种子超低温保存技术规程

## 1 范围

本标准规定了三桠苦 (*Evodia lepta*) 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。

本标准适用于三桠苦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

**三桠苦** *Evodia lepta*

为芸香科 (Rutaceae) 吴茱萸属 (*Evodia* J. R. et G. Forst.) 乔木，其根、叶、果都可用作草药。在我国及越南、老挝、柬埔寨等地均用作清热解毒剂。广东“凉茶”制作中，多有此料，用其根、茎枝，作消暑清热剂。收载于《广东省中药材标准第一册（2004）》、《广西壮族自治区壮药质量标准第一卷（2008）》和《湖南省中药材标准（2009）》。

### 3.2

**三桠苦果实** *Evodia lepta* fruits

其分果瓣淡黄或茶褐色，散生肉眼可见的透明油点，每分果瓣有 1 颗种子。

### 3.3

**三桠苦种子** *Evodia lepta* seeds

三桠苦的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子蓝黑色，长 3 mm~4 mm，厚 2 mm~3 mm，有光泽。

### 3.4

**种子超低温保存** seed of cryopreservation

将经过前处理的三桠苦种子置于液氮（-196℃）中保存。

#### 4 种子的采收及选择

##### 4.1 种子采收

7月~10月间，果皮呈紫黑色时，即可采收，去除种子果皮，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10℃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

三桠苦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）法检测三桠苦种子生活力。

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4h后观察结果。

BTB的配制和保存方法见附录A。

###### 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。

待保存的三桠苦种子生活力应 $\geq 60\%$ 。

###### 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

用尼龙网袋包裹三桠苦种子，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0h~1h，在干燥过程中定期测定种子含水量，将种子含水量由20%~25%降至18%~21%。

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（%），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

三桠苦种子保存量不少于 500 粒，以便后期的生活力检测使用。

## 7 种子冷冻方式

三桠苦种子超低温保存的冷冻方式为直接冷冻法，即将待保存的三桠苦种子放入 2 mL 冻存管（每管 50 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 1 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 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  $\geq 50\%$  时视为保存成功。

### 8.3 萌芽成苗

将剩下 25 粒解冻后的三桠苦种子，播种到带有无菌滤纸的发芽盒中，温度 25 ℃~30 ℃，湿度 70%~85% 条件下培养。三桠苦种子出芽周期大概 10 d~40 d。

附 录 A  
(规范性附录)  
BTB 的配制和保存方法

A.1 BTB 的保存方法

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。

A.2 1.5% BTB 琼脂凝胶配置方法

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，使之成一均匀的薄层，完全冷却后备用。

### 参 考 文 献

- [1] 中国植物志委员会. 《中国植物志》第 43(2) 卷[M]. 科学出版社. 2004(1997): 059
- [2] Zhang Dianxiang, Thomas G. Hartley, David J. Mabberley. Rutaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2008. 11: 70-73.
- [3] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[M]. 湖南科学技术出版社, 2009
- [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