



团 体 标 准

T/CACM 1326.24—2019

倒地铃种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Cardiospermum halicacabum* 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。

倒地铃种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了倒地铃 (*Cardiospermum halicacabum* 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。

本标准适用于倒地铃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

倒地铃 *Cardiospermum halicacabum* L.

为无患子科 (Sapindaceae) 倒地铃属 (*Cardiospermum*) 草质攀援藤本，全株可做药，味苦、辛，性寒，具有清热、利尿、凉血、去瘀、解毒等功效。收载于《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂·第九册》。

3.2

倒地铃果实 *Cardiospermum halicacabum* L. fruits

果实为蒴果，梨形、陀螺状倒三角形或有时近长球形，高 1.5 cm~3 cm，宽 2 cm~4 cm，褐色，被短柔毛。

3.3

倒地铃种子 *Cardiospermum halicacabum* L. seeds

倒地铃的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子黑色，有光泽，直径约 5 mm，种脐心形，鲜时绿色，干时白色。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的倒地铃种子置于液氮 (-196 °C) 中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

8月~12月，果皮由绿色变褐色时，即可采收，去除果皮，取出种子。

4.2 种子选择

去除果皮，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

倒地铃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）法测定倒地铃种子生活力。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12h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。

待保存的倒地铃种子生活力应 $\geq 70\%$ 。

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

用尼龙网袋包裹倒地铃种子，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~18h，在干燥过程可定期测定种子含水量，将种子含水量由25%~30%降至20%~25%。

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（ M_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

倒地铃种子保存量不少于 500 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

倒地铃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 90 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 5 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 45 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 $\geq 60\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 45 粒解冻后的倒地铃种子，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。倒地铃种子出芽周期大概 15 d~35 d。

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] 中国植物志委员会. 《中国植物志》第 47(1) 卷 [M]. 科学出版社. 1985: 004
- [2] Xia Nianhe, Paul A. Gadek. Sapindaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2007. 12: 24.
- [3] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第九册[S]. 1994
- [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 T/CACM