



团 体 标 准

T/CACM 1326.27—2019

猪屎豆种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Crotalaria pallida* Ait. 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） 种子发芽测试方法及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。

猪屎豆种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了猪屎豆 (*Crotalaria pallida* Ait.) 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。

本标准适用于猪屎豆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 3543.4 农作物种子检验规程 发芽试验
- 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

猪屎豆 *Crotalaria pallida* Ait.

为豆科 (Leguminosae) 猪屎豆属 (*Crotalaria* Linn.) 多年生草本或直立矮小灌木，全草和根可供药用，具有散结、清湿热等作用，现代临床试用于抗肿瘤效果较好，主要对鳞状上皮癌，基底细胞癌有疗效。收载于《全国中草药汇编（卷二）（2014）》。

3.2

猪屎豆果实 *Crotalaria pallida* Ait. fruits

果实为荚果，其荚果长圆形，幼时被毛，成熟后脱落，果瓣开裂后扭转，内有种子 20~30 颗。

3.3

猪屎豆种子 *Crotalaria pallida* Ait. seeds

猪屎豆的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子棕红色或紫黑色，肾形或马蹄形。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的猪屎豆种子置于液氮 (-196 ℃) 中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

9月~12月，果荚颜色由灰绿色变为棕色或黑棕色时，即可采收，去除果荚，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

猪屎豆种子活力以种子发芽率为判别标准。

种子发芽测试方法见附录A的A.1。

5.1.2 鉴定及要求

按照GB/T 3543.4的规定，确定正常幼苗数。计算出种子的发芽率。

待保存的猪屎豆种子发芽率应 $\geq 65\%$ 。

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

用尼龙网袋包裹猪屎豆种子，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2h~10h，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12%~14%。

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(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 ——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

猪屎豆种子保存量不少于 500 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

猪屎豆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 1 mL 冻存管（每管 60 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 的配制及保存方法见附录 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 1 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 的配制及保存方法见附录 A 的 A.3。

8.2 冻后种子活力检测

取出 30 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 30 粒解冻后的猪屎豆种子，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。猪屎豆种子出芽周期大概 3 d~10 d。

附录 A (规范性附录)

种子发芽测试方法及试剂的配制和保存方法

A.1 猪屎豆种子发芽测试方法

猪屎豆种子确实率较高，不能直接播种。发芽测试前应用 75 °C 的恒温水浴箱中热水浸泡种子 5 min，取一定量的种子放入 25 mL 试管中，加水淹过种子，加热过程中同时用玻璃棒不断搅动。5 min 后取出试管，自然冷却至室温后取出种子，置于带有无菌滤纸的发芽盒中，温度 25 °C~28 °C，湿度 70%~85% 条件下培养。

各测试 4 个重复，每重复 30 粒种子。。

A.2 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.3 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
-

全国团体标准信息平台