



团 体 标 准

T/CACM 1326.39—2019

金凤花种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.
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） 试剂的配置和保存方法.....	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，李榕涛，郑希龙，王秋玲，何明军，金钺，顾雅坤，符丽。

金凤花种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了金凤花[*Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.]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。

本标准适用于金凤花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 3543.4 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

金凤花 *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.

为豆科 (Leguminosae) 云实属 (*Caesalpinia* Linn.) 常绿小乔木，是一种观赏性药用植物，别称洋金凤、黄蝴蝶。以根、茎皮入药，有解表、出汗之功效。此外，其花冠橙红色，边缘金黄色，如火焰蝴蝶般常年于枝头盛开，常用作园林栽培。收载于《中国中药资源志要（1994）》。

3.2

金凤花果实 *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. fruits

荚果扁长圆形，基部稍弯，长 6 cm~10 cm，宽 1.5 cm~2 cm，果荚木质，花果期几乎全年，成熟时为浅褐色至黑褐色。内含 6~9 颗种子。

3.3

金凤花种子 *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. seeds

金凤花的播种材料为完整种子，贮藏特性判断为顽拗性种子。种子黄绿色，倒卵形或三角状倒卵形，扁平；表面具水纹状横向网纹，种脐位于种子基部顶端，为灰白色长卵形小点，周围具黑褐色晕圈。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的金凤花种子置于液氮（-196℃）中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

花果期几乎全年，当果荚为浅褐色至黑褐色时，即可采收，去除果荚，取出种子。

4.2 种子选择

挑选发育饱满、完整、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

金凤花种子活力以种子发芽率为判别标准。清洗干净发芽盒，内铺一层滤纸，纯净水浸湿。随机选取 50 粒种子，清水洗净，整齐安放于发芽盒内，种粒之间保持一定距离以减少霉菌蔓延感染，定期观察发芽情况并记录。

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。

待保存的金凤花种子发芽率应 $\geq 80\%$ 。

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

用尼龙网袋包裹金凤花种子，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 1 h~35 h，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 15%~20%。

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

金凤花种子保存量不少于 300 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

金凤花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 5 mL 冻存管（每管 25 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 的配置方法见附录 A 的 A.1。

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 2 个冻存管，立即放入 40 ℃ 水浴中快速解冻 2 min，然后用洗涤液 DS 浸泡 5 min，并用无菌水洗涤 3 次。

DS 的配置方法见附录 A 的 A.2。

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 $\geq 75\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 25 粒解冻后的金凤花种子，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)
试剂的配置和保存方法

A.1 PVS2的配置及保存方法

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，定容至 100 mL，调 pH 值至 5.8，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.2 DS 的配置及保存方法

精密称取蔗糖 41.1 g 溶于 MS 溶液中，定容至 100 mL，调 pH 值至 5.8，高温高压灭菌，4 °C 冷藏。

参 考 文 献

- [1] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京, 科学出版社, 1994
- [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), 39: 107.
- [3] Xu Langran. Chen Dezhaoh. Zhu Xiangyun et al. Fabaceae (Leguminosae) [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2010. 10:121-130.
- [4] 郭巧生等. 中国药用植物种子原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2008:135
- [5] 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
- [6] Reed BM. Plant Cryopreservation-A Practical Guide[M]. Springer, 2010:3
-