



团 体 标 准

T/CACM 1326.7—2019

草豆蔻种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Alpinia katsumadai* Hayata 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 种子量保存	2
7 种子冷冻方式	2
8 恢复培养	3
8.1 种子解冻处理	3
8.2 冻后种子生活力检测	3
8.3 萌芽成苗	3
附录 A（规范性附录） BTB 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。

草豆蔻种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了草豆蔻 (*Alpinia katsumadai* Hayata) 种子超低温保存过程中的术语和定义、种子采收及选择、种子前处理、种子保存量、种子冷冻方式、恢复培养等内容。

本标准适用于草豆蔻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
植物生理学实验指导(第三版),2005

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata

为姜科(Zingiberaceae)山姜属(*Alpinia* Roxb)植物,株高3 m,叶片线状披针形,总状花序顶生。其干燥近成熟种子性辛、温,归脾、胃经,具有燥湿行气,温中止呕的功效。常用于治疗寒湿内阻,脘腹胀满冷痛。收载于《中华人民共和国药典》(2015版)。

3.2

草豆蔻果实 *Alpinia katsumadai* Hayata fruits

果实为蒴果,圆球形,直径约3.5 cm~4 cm,外面密生粗毛。内有类球形的种子团,直径1.5 cm~2.7 cm,表面灰褐色,中间有黄白色的隔膜,将种子团分成3瓣,每瓣有种子多数,粘连紧密,种子团略光滑。

3.3

草豆蔻种子 *Alpinia katsumadai* Hayata seeds

草豆蔻的繁殖材料为完整种子,贮藏特性判断为顽拗性种子。种子表面灰棕色或浅褐色,卵圆状多面体,长3 mm~5 mm,直径约3 mm,外被一层白色透明膜质假种皮,种脊为一条纵沟,一端有种脐;质硬,将种子沿种脊纵剖两瓣,纵断面观呈斜心形,种皮沿种脊向内伸入部分约占整个表面积的1/2;胚乳灰白色。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的草豆蔻种子置于液氮（-196 ℃）中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

5 月~8 月，果皮呈金黄色时，即可采收，去除果肉，取出种子洗净。

4.2 种子选择

挑选发育饱满、完整、健康的种子为保存材料，置于 10 ℃ 种子低温低湿储藏柜中保存备用（存放时间不超过 6 个月）。

5 种子前处理

5.1 活力

5.1.1 检测

草豆蔻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）法测定草豆蔻种子生活力。待测种子在 30 ℃~35 ℃ 温水中浸种 2 h，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，应将胚部分埋入凝胶中。将培养皿置于 35 ℃ 温箱中 12 h 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的种子为有活力的种子，否则为无活力的种子。

待保存的草豆蔻种子生活力应 $\geq 70\%$ 。

5.1.3 计算

生活力按照公式（1）计算：

$$A = \frac{y}{x} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

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

用尼龙网袋包裹草豆蔻种子，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 4 h~18 h, 在干燥过程中定期测定种子含水量, 将种子含水量降至 12%~16%。

按照 GB/T 3543.6 中的高恒温烘干法 (130 °C 烘干 1 h) 测定种子含水量, 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

草豆蔻种子保存量不少于 500 粒。

7 种子冷冻方式

草豆蔻种子超低温保存的冷冻方式为直接冷冻法, 即将待保存的草豆蔻种子放入 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 °C 水浴中快速解冻 2 min。

8.2 冻后种子活力检测

取出 20 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

将剩余的 30 粒解冻后的草豆蔻种子, 播种到带有无菌滤纸的带盖发芽盒中, 在温度 25 °C~30 °C、湿度 70%~85% 条件下培养。草豆蔻种子出芽周期大约 10 d~40 d。

附 录 A
(规范性附录)
BTB 的配置和保存方法

A.1 0.1% BTB 溶液配置和保存方法

精密称取 BTB 0.1 g，溶解于煮沸过的 100 mL 纯水中，之后用滤纸去残渣。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。待溶液稍微冷却即可趁热倒入 9 cm 培养皿中，使之形成一均匀的薄层，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 16(2) 卷[M]. 科学出版社. 2004(1991): 091
- [2] Wu Te-lin. Kai Larsen. Zingiberaceae [M] //Flora of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2000. 24: 322-377
- [3] 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, 238-239
- [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