



团 体 标 准

T/CACM 1326.43—2019

黄斑姜种子超低温保存技术规程

Technical code of practice for cryopreservation of *Zingiber flavomaculosum*
S.Q.Tong 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）TTC/磷酸盐缓冲液的配制和保存方法.....	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。

黄斑姜种子超低温保存技术规程

1 范围

本标准规定了黄斑姜 (*Zingiber flavomaculosum* S. Q. Tong) 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。

本标准适用于黄斑姜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 3543.6 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

黄斑姜 *Zingiber flavomaculosum* S. Q. Tong

为姜科 (Zingiberaceae) 姜属 (*Zingiber* Boehm.) 多年生草本植物，植株具香气。用途广泛，是中国特有的重要的中药材和食材，具有消肿、解毒等功效。收载于《世界药用植物速查辞典(2015)》。

3.2

黄斑姜果实 *Zingiber flavomaculosum* S. Q. Tong fruits

果实为蒴果，椭圆形，红色，成熟时间为 9~12 月。

3.3

黄斑姜种子 *Zingiber flavomaculosum* S. Q. Tong seeds

黄斑姜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，卵圆型，具红色假种皮，种皮薄。表面光滑，质地较软。

3.4

种子超低温保存 seed of cryopreservation

将经过前处理的黄斑姜种子置于液氮 (-196 ℃) 中保存。

4 种子采收及选择

4.1 种子采收

9月~12月，果皮颜色变为红色时，即可采收，去除外果皮，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4℃冰箱中保存备用（存放时间不超过1个月）。

5 种子前处理

5.1 活力

5.1.1 检测

黄斑姜种子活力以种子生活力为判别标准。按照GB/T 3543.7中的2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)法检测种子生活力。随机抽取30粒种子，沿种脊小心将种子分成2片后放培养皿内，内侧面向下，滴入TTC溶液浸没种子，室温(25℃)避光放置4h后观察染色结果。

TTC溶液的配制和保存方法见附录A。

5.1.2 鉴定及要求

直接用肉眼对染色结果进行观察鉴定。凡胚及胚乳全部染成有光泽的鲜红色，且组织状态正常的，为有活力的种子，否则为无生活力的种子。

待保存的黄斑姜种子生活力应≥90%。

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

用尼龙网袋包裹黄斑姜种子，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~12h，在干燥过程中定期测定种子含水量，将种子含水量由15%~20%降至11%~13%。

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 ——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

黄斑姜种子保存量不少于 200 粒，以便后期的活力检测使用。

7 种子冷冻方式

黄斑姜种子超低温保存的冷冻方式为直接冷冻法，即将待保存的黄斑姜种子放入 1 mL 冻存管（每管 30 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 15 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 $\geq 85\%$ 时视为保存成功。

8.3 萌芽成苗

将剩下 15 粒解冻后的黄斑姜种子，播种到带有无菌滤纸的带盖发芽盒中，温度 25 °C~30 °C，湿度 70%~85% 条件下培养。

附录 A

(规范性附录)

TTC/磷酸盐缓冲液的配制和保存方法

A.1 三苯基氯化四氮唑 (TTC) 溶液配置和保存方法

精密称取 TTC 1.00 g，溶于 100 mL 磷酸盐缓冲溶液中，制成浓度为 1% 的 TTC 溶液，调 pH 至 6.5~7.5，放于棕色瓶内，置于 4 °C 冰箱中备用。

A.2 磷酸盐缓冲液配置方法

溶液 I：9.08 g 磷酸二氢钾溶于 1 L 无菌水中；

溶液 II：35.81 g 磷酸二氢钠溶于 1 L 无菌水中；

按 I : II = 2 : 3 的比例混合制成磷酸盐缓冲溶液。

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 16(2) 卷[M]. 科学出版社, 1981: 139
- [3] Wu Te-lin, Kai Larsen. Zingiberaceae [M] //Flora Of China Beijing: Science Press/St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2000. 24: 322-377.
- [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