

# 中国作物种质资源安全保存理论与实践

卢新雄, 辛霞, 尹广鹏, 张金梅, 陈晓玲, 王述民, 方 涛, 何娟娟  
(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

**摘要:** 我国是作物种质资源大国, 目前已经收集保存了 340 种作物, 保存资源总量达 50 万份, 如何确保安全保存是种质资源管理的首要课题。自“九五”以来, 系统地开展了作物种质资源安全保存理论与技术的研究, 揭示了种质活力丧失存在关键节点及其生物学机制; 明确了发芽率低于关键节点后进行更新, 会导致群体遗传完整性降低; 提出了种质安全保存寿命的概念, 以及延长安全保存寿命的关键因素。研发了种质活力监测预警、繁殖更新与离体保存等关键技术, 制定了种质资源入库圃保存、监测预警、繁殖更新、离体保存和设施建设等技术规程, 创建了中国作物种质资源安全保存技术体系。该体系应用于全国作物种质资源的保存实践, 最大程度延长种质安全保存寿命, 并监测预警出需更新的种质, 避免因活力和遗传完整性丧失而导致种质资源得而复失, 为实现我国作物种质资源长久安全保存提供了有力保障。

**关键词:** 作物种质资源; 安全保存; 遗传完整性; 监测预警技术; 繁殖更新; 超低温保存

## Theory and Practice of the Safe Conservation of Crop Germplasm Resources in China

LU Xin-xiong, XIN Xia, YIN Guang-kun, ZHANG Jin-mei, CHEN Xiao-ling,  
WANG Shu-min, FANG Wei, HE Juan-juan  
(*Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

**Abstract:** China has abundant crop germplasm resources, and has preserved over 500000 accessions of 340 crops. Ensuring the safe conservation of germplasm resources is therefore of high priority for genebank managers. Since the 9th Five-Year Plan, the National Crop Genebank of China has systematically studied the theories and technologies of the safe conservation of germplasm. For the first time, we proposed a theory for germplasm resources conservation, including both safety backup and the biological mechanism of conservation. The transition from platform (high viability) to the rapid reduction phase of the seed survival curve was defined as the critical node (CN). It was revealed that oxidative damage and mitochondrial damage disordered the metabolism during the CN. In addition, germplasm would loss genetic integrity, if regenerated when its germination rate was lower than the CN. Taking loss of viability and genetic integrity together, germplasm longevity is defined as the time taking by seed viability declined to the CN. We have made breakthroughs on the key techniques for seed viability monitoring, early warning of viability decline, regeneration, *in vitro* conservation and cryopreservation. Based on the above research, we have created systematic technologies for the safe conservation of crop germplasm resources, which have been applied national-widely. To avoid the loss of viability and genetic integrity in genebank, the systematic technologies would prolong the germplasm longevity, monitor and forecast seed viability, recognize the germplasm which needs regeneration. Therefore, the systematic technologies provide reliable guarantee for the safe conservation of crop germplasm resources.

收稿日期: 2018-09-05 修回日期: 2018-09-12 网络出版日期: 2018-09-12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.s.20180910.1427.001.html>

第一作者研究方向为作物种质资源保存, E-mail: luxinxiong@caas.cn

基金项目: 国家科技支撑计划 (2013BAD01B01); 农业部作物种质资源保护与利用项目 (2130135); 国家自然科学基金 (31371713)

**Foundation project:** National Key Technology Support Program (2013BAD01B01), MOA Conservation and utilization of Crop Germplasm Resources Program (2130135), National Natural Science Foundation of China Program (31371713)

**Key words:** crop germplasm resources; safe conservation; critical node; genetic integrity; monitor and early warning technique; cryopreservation

作物种质资源是农业科技原始创新、现代种业持续发展的物质基础,是保障国家粮食安全、生态安全和能源安全的战略性资源。世界各国及国际组织均十分重视种质资源的收集和保存。据联合国粮农组织统计<sup>[1]</sup>,全球建成 1750 余个种质库(圃),收集保存种质资源 740 万余份,其中 90% 是以种子形式保存于种质库中,其余 10% 是以植株形式保存于种质圃,或以离体形式保存于试管苗库或超低温库中。美国收集保存资源 59 万份,印度 42 万份,国际农业磋商组织(CGIAR, Consultative Group on International Agricultural Research)下属的 11 个种质库保存总量近 76 万份。我国 20 世纪 50 年代起开展了两次全国性作物种质资源征集,抢救收集了 40 万份种质资源。但由于缺乏现代化低温库保存设施,约有 10 万份资源因保存不当而导致得而复失。我国于 1986 年在北京建成了国家作物种质库(以下简称国家库),其保存容量 40 万份、保存温度  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度低于 50%。之后相继建成了青海复份库、10 个国家中期库(温度为  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  或  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 和 43 个国家种质圃。截至 2018 年底,收集保存 340 种作物 50 万份,其中国家库 43.5 万份,种质圃 6.5 万份,保存作物种质资源总量居世界第 2 位。

随着种质资源保存作物种类和数量剧增,以及保存时间的延长,种质安全保存问题日益突出。一是库存种子的活力下降不可避免,由于缺乏对其丧失机制的了解和有效的监测预警技术,导致无法及时发现活力过低的种质材料。例如美国国家库监测了其保存 16~81 年的 4.2 万份种子活力,发现平均发芽率从初始的 91% 降低到 58%,其中 3635 份大豆(保存 36 年)平均发芽率已从初始 92% 降至 21%,780 份花生(保存 34 年)平均发芽率从初始 89% 降至 6%<sup>[2]</sup>。国家库种子活力监测结果表明,保存 10~12 年后种子发芽率降至 70% 以下占比 0.51%,而保存 20~23 年该比例增加到 1.1%<sup>[3-4]</sup>。二是由于缺乏适宜的繁殖更新技术标准,导致部分作物种质繁殖更新后遗传完整性丧失。特别是地方品种或异花授粉等异质群体的种质材料,种质发芽率过低、群体量过小、授粉方式不恰当等原因,均可引起繁殖更新后群体遗传完整性改变<sup>[5-7]</sup>。甚至有报道指出个别种质库,多达 50% 的原始种质样品已丧失活力或更新后发生了遗传漂变<sup>[8]</sup>。三是种质圃

保存的无性繁殖作物种质资源,因是野外田间植株保存,易遭受到极端天气、病虫害等不可控因素的危害。例如,在 2008 年初的冻害中,陕西眉县国家柿种质资源圃保存的 690 份资源中,63.4% 的资源遭受不同程度冻害,其中有 37 份资源被冻死<sup>[9]</sup>。

综上所述,作物种质资源的安全保存已成为资源管理者所面临的首要课题<sup>[1]</sup>。20 世纪 90 年代以来,国家相关部委高度重视国家种质资源库圃保存的安全性,并立项支持种质安全保存的理论和技术研究。本文系统总结了 20 多年来,我国在作物种质资源安全保存的理论、关键技术和技术体系方面所取得的重要进展,并展望了下一阶段的研究重点。

## 1 作物种质资源安全保存理论

### 1.1 提出了作物种质资源安全保存理论与内涵

系统总结了自国家库建库以来的种子入库保存、活力监测预警、繁殖更新等系列研究成果,于 2000 年首次提出了种质安全保存理论<sup>[10]</sup>。之后经过近 20 年的深入研究,不断完善种质安全保存理论的主要内涵:一是具备物理空间或保存方式上的复份保存,以避免种质资源意外损失。如通过长期库与复份库备份保存种子类种质资源,采用离体方式复份保存种质圃的无性繁殖作物种质资源;二是基于生物学机制的安全保存,包括:(1)保存过程中维持种质高活力的生物学原理,即延长种质安全保存寿命的生物学机制及其影响因素,并建立维持种质高活力的保存技术和标准,关键技术环节是田间种植、收获、干燥包装等,标准主要是高初始发芽率、适宜含水量等;(2)维持种质遗传完整性的生物学机制,并建立维持资源种质遗传完整的技术和标准,关键技术环节是繁殖更新、保存前处理等,标准主要是繁殖更新临界值等;(3)库圃保存种质活力丧失的生物学机制,并建立种质活力监测预警技术和标准,其关键是库存种子活力丧失特性、关键节点、预警指标、安全保存寿命等。该理论的创建,对于作物种质资源安全保存具有重要指导意义。

### 1.2 明确了库存种子活力丧失特性及关键节点

种子活力丧失存在骤降期和关键节点。小麦种子在中期库( $5\sim 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ )保存 2~12 年的平均发芽率均高于 83%,而保存 15 年的平均发芽率已降至 20%<sup>[11]</sup>。首次明确了在低温保存条件下,种子活力

存活曲线也呈反 S 型,即在保存初始阶段,种子处于高活力的平台期,但保存一定时间后种子活力出现骤降。种子活力由平台期转向骤降期的过渡区是种子活力丧失关键节点(拐点),同一作物在不同保存条件下的关键节点基本相近,其发芽率范围为 70%~85%(图 1)<sup>[11-15]</sup>。种子活力丧失特性和关键节点的揭示,对于制定库存种质活力监测和预警方案具有非常重要的指导意义。一是指导优化监测周期。按国际上的标准<sup>[16]</sup>,种质库活力监测间期为 5 年或 10 年。当库存种质活力处于关键节点时,若仍按 5 年或 10 年安排活力监测,则到下次监测时种子活力有可能已经很低甚至完全丧失。因此,应根据种子活力丧失特性,优化活力监测周期,即在平台期可适当延长监测周期,而在临近关键节点则缩短监测周期;二是指导筛选可预示种子即将转向骤降期的监测预警指标,并建立有效的监测预警方法,以确保能够及时发现活力过低的种质材料。传统的库存种子活力监测仅记载发芽率,缺乏预警能力。通过将监测指标拓展到发芽速率、发芽时间、幼苗生长状况等可提升预警能力,如萌发起始日、根苗健壮度、发芽率变异系数和相邻测定一致性比率等指标,均可作为库存种质监测预警指标<sup>[12]</sup>。

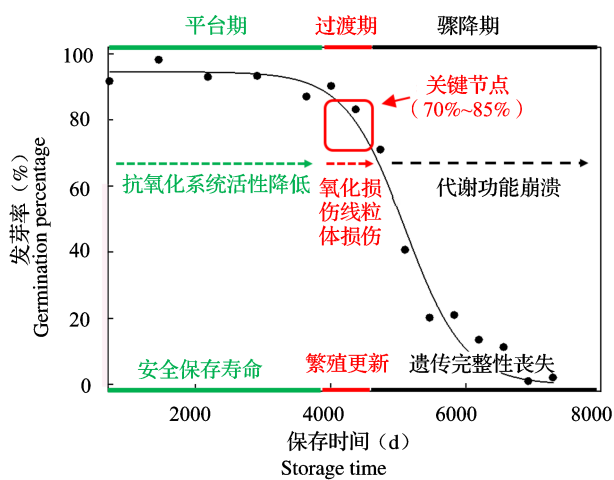


图 1 中期库保存小麦的活力丧失特性及其关键节点

Fig.1 The viability loss characteristic and critical node of wheat seeds stored in a medium-term genebank

### 1.3 阐明了种质活力丧失关键节点的生物学机制

明确了种子活力关键节点发生代谢功能崩溃是种子活力转向骤降期的核心机制(图 1)。当种子处于关键节点时,与种子活力密切相关的生理生化活动变化剧烈,主要体现在两方面:一方面发生氧化损伤和线粒体损伤。氧化损伤主要是由于非酶促抗氧化剂(抗坏血酸和谷胱甘肽)水平降低,抗氧化

酶蛋白和基因表达受到抑制,导致抗氧化酶活性显著下降,造成  $O_2$  和  $H_2O_2$  等活性氧(ROS, reactive oxygen species)积累,引起脂质过氧化损伤,导致膜系统完整性降低,同时生成活性羰基小分子物质(RCS, reactive carbonyl species)或挥发性物质,而 RCS 攻击蛋白,导致参与逆境防御(MnSOD、HSP70、APX 等)、能量代谢(糖酵解、戊糖磷酸途径和 TCA 循环)相关的关键蛋白羰基化修饰水平上调,即发生蛋白氧化损伤<sup>[15, 17-20]</sup>,影响正常生理代谢活动。线粒体损伤主要体现为线粒体的结构和功能发生损伤。在平台期种子吸胀时,线粒体能够修复和发育成完整的结构,包括外膜、内膜、嵴和基质,为萌发生长提供能量;在活力关键节点阶段,线粒体数量明显减少,膜结构不完整,很难区分内膜和外膜,嵴数量较少;低于关键节点,则较难观察到线粒体,无法纯化出完整的线粒体。线粒体结构的损伤也显著影响了其呼吸活性、电子传递链活性等生理代谢,抑制了 ATP 和中间物质的生成<sup>[14, 21]</sup>。另一方面,诱导了线粒体损伤反馈机制,通过调控线粒体电子传递途径及其复合体组成,诱导交替氧化酶、非偶联蛋白和交替 NADH 脱氢酶的表达,以弥补细胞色素途径活性降低而抑制的电子和质子传递效率,以维持 ATP 合成,同时避免 ROS 过量积累和氧化损伤<sup>[22]</sup>。当种子活力低于关键节点时,氧化损伤进一步加剧,反馈机能丧失,导致线粒体等细胞器结构瓦解,代谢功能崩溃,促使种子活力由平台期转向骤降期<sup>[14]</sup>。进一步研究表明,氧化损伤和线粒体损伤的产物可作为活力关键节点预警指标。氧化损伤产物,主要包括醇醛酮等挥发性物质组成成份、抗氧化酶的蛋白表达量(APX 和 CAT)、羰基小分子含量(4-HEN 和丁烯醛)、关键蛋白羰基化修饰水平(MnSOD 和 HSP70);线粒体损伤指标主要包括线粒体膜系统结构、耗氧呼吸水平、电子传递途径关键蛋白表达量(Cyt c 和 AOX)等。关键节点的生物学机制及其特征指标的揭示,为研发种子活力监测预警技术提供了重要理论依据。

### 1.4 揭示了繁殖更新临界值的科学依据

种质安全保存需要维持种质的遗传完整性,即一份种质材料内遗传变异的总和。收集保存的种质中,尤其多数地方品种和野生资源均是混合群体,当发芽率降至很低时进行繁殖更新,导致后代群体遗传完整性丧失<sup>[5, 16, 23]</sup>。因此,为维持种质遗传完整性,需要确定适宜的更新临界值。然而,由于缺乏实验依据,国际上主要种质库采用的繁殖更新临界

值各不相同,例如,CGIAR采用发芽率降低至初始值的85%,俄罗斯、北欧和美国分别是50%、60%和65%发芽率,英国和波兰是80%~85%发芽率<sup>[5,16]</sup>。本团队研究发现更新发芽率低于70%时,水稻地方品种香谷群体中RAC6基因型的比率由5%降至1%以下,玉米地方品种条花糯群体中浅紫芽鞘色比例由31%降至9%;大豆、蚕豆更新发芽率低于85%时,群体稀有等位基因频率等遗传完整性指标显著改变<sup>[24-27]</sup>。以上研究表明种质发芽率低于关键节点繁殖更新,导致群体遗传完整性丧失(图1),其主要原因可能是由于一份种质内不同基因型材料的耐老化能力不同。这一发现首次为种质更新临界值提供了科学依据。

### 1.5 明确了库存种质安全保存寿命及其关键因素

基于低于活力关键节点繁殖更新导致种质遗传完整性丧失,提出了种质安全保存寿命,即从保存起始到种子活力降至关键节点的保存时间,因此种质安全保存寿命不同于种子寿命(图1)。在适宜含水量和密封包装条件下,水稻和小麦安全保存寿命:长期库20年以上,中期库约17年,北方(西宁、哈尔滨)常温条件下约12年<sup>[28]</sup>。引入种质安全保存寿命概念是非常重要的,一方面强调了需考虑活力降低对种质遗传完整性的影响。另一方面各种作物在不同保存条件下的安全保存寿命,对于基层单位资源保存者和育种工作者进行种质保存,以及种质库管理者制定更加合理的监测计划,具有重要的参考价值。对于种质库,因保存条件(温度和湿度)是恒定的,种质安全保存寿命主要受以下因素影响,(1)种子初始发芽率:对库存水稻、大豆、高粱等作物种子跟踪监测研究发现,与较低初始发芽率种子相比,发芽率高于90%种子的安全保存寿命相对更长<sup>[29-30]</sup>;(2)种子含水量:存在一个适宜含水量范围,既可减缓高含水量条件下种子代谢造成的氧化损伤,亦可避免过度脱水造成的干燥损伤,从而使种子的安全保存寿命得到最大程度的延长。种子适宜含水量范围随着保存温度升高而变窄,例如水稻在低温库或温带地区室温保存条件下,适宜含水量范围为4%~9%,而在三亚、南昌室温条件下适宜含水量为5.0%~6.5%<sup>[31]</sup>。适宜含水量也与种子贮藏物质类型有关,例如在低温保存条件下,淀粉类和蛋白类种子适宜含水量为4%~9%,油脂类为2%~8%,其中5%~8%含水量具有普适性<sup>[28,31-34]</sup>;(3)包装方式:密封的包装方式可以避免含水量波动并抑制呼吸活性,从而显著延长种子安全保存寿命<sup>[28,31-34]</sup>;

(4)适宜繁殖地点和保存前环境条件:适宜繁殖地点对种子保存寿命有重要影响,例如监测了在国家库保存27年的1998份小麦种质发芽率,其中来自国外的977份种子发芽率从初始的94.0%降至86.8%,下降了7.2%;而来自国内的1021份种子,则从96.4%降至94.1%,下降值仅为2.3%。表明国外引进小麦种子尽管能在国内相近生态区进行繁殖,仍未能达到最佳的繁殖质量。此外,监测也发现有一批74份水稻种子,10年后其发芽率均值从入库初始的93.30%降至88.47%,下降值4.83%,明显高于同一年份其他批次繁殖种子,其原因是该批种子在收获时遇到高温下雨天气,且没有晾干处理<sup>[12]</sup>。种子安全保存寿命及其影响关键因素(种子初始发芽率、适宜含水量、包装方式、保存前环境条件、繁殖地点等)的揭示,对改进和完善库存种质资源入库处理、保存监测和繁殖更新技术提供了重要依据。

## 2 作物种质资源安全保存技术

### 2.1 研发了库存种质监测预警和安全更新技术

基于活力关键节点的预警指标,研发了一批种子活力快速无损检测关键技术。一是分析了氧化损伤终产物,检测到600余种化合物,筛选获得与种子活力关键节点密切相关的醇、醛类等挥发性物质。利用电子鼻设备检测种子挥发气体信号,建立了BP-人工神经网络模型(BP-ANN),研发了小麦、大豆、油菜3种作物种子活力快速无损检测技术,利用该技术对种子活力的区分准确率达到95%以上,预测准确率(检测准确率)达到98%以上<sup>[35-37]</sup>。二是分析了线粒体损伤,筛选出Cyt c、AOX、呼吸耗氧等预警指标,采用光纤氧电极技术(MOT)检测种子呼吸耗氧( $J_{O_2}$ ),获得了种子活力预测方程式(大豆 $G=5.22 \times J_{O_2}-61.16$ 、小麦 $G=5.24 \times J_{O_2}-52.73$ 、油菜 $G=4.78 \times J_{O_2}-4.56$ ),可实现这3种作物种子活力快速检测<sup>[38]</sup>。

在揭示了种质繁殖更新临界值的科学依据的基础上,开展了水稻、小麦、玉米、大豆等作物的遗传完整性检测技术、更新临界值和群体量的研究。一是确定了评价种质遗传完整性的关键指标,包括醇溶蛋白特异带型频率、稀有等位基因频率、群体遗传多样性指数等。二是提出了繁殖更新临界值的标准,由于低于关键节点时进入活力骤降期,导致遗传完整性丧失,且田间出苗率显著低于室内发芽率<sup>[24-27]</sup>,并结合国内外研究结果,推荐地方品种和

育成品种繁殖更新临界值的上限为 85%、下限为 70%。三是确定了地方品种繁殖更新适宜群体量及其判断依据。适宜群体量是维持群体遗传完整性的最小样本量,基于统计学考虑,其评价依据为特异多态性单株频率取样误差控制在 5% 以内或稀有等位基因频率取样误差控制在 1% 以内。根据此评价依据,确定了水稻等地方品种群体量不低于 150 株<sup>[39]</sup>。更新临界值和群体量等安全更新技术标准的确立,为维持库存种质遗传完整性提供了有力技术保障。

建立了库存种子的监测预警和更新方案。常规的库存种质活力监测方案,是采用传统发芽方法,监测间期为 5 年或 10 年,缺乏预警能力,易导致不能及时发现低于更新临界值的种质。结合种子活力丧失预警指标和快速无损检测技术,构建了库存种子监测预警与更新方案:以“批”(同一作物在同一地点同一季节繁殖种子为一“批”)为基本单元,监测方法采用发芽实验结合无损检测技术、遗传完整性检测技术,监测数据评价以发芽率、活力预警指标、遗传完整性指标为核心,以作物基因型、繁殖地点及气候条件等数据信息为辅,建立了活力监测、遗传完整性监测和繁殖更新等数据库,构建了低温种质库活力监测与更新预警系统和“更新指数 85% 判断法”,预测库存种质活力和遗传完整性变化趋势,调整监测间期、判断或预测更新时间,从而实现对库存种质活力的有效监测预警和安全更新。已对国家库中被评价为“需更新”的莴苣、苦瓜、菠菜等作物 83 批近 9500 份种质进行了更新。

## 2.2 国家库超低温保存技术的建立和实践

超低温保存(-150~-196 ℃)是无性繁殖作物种质资源离体长期保存最有效的途径<sup>[40-42]</sup>。国际马铃薯研究中心(CIP, International Potato Center)收集保存的 10516 份马铃薯资源中,已有 2480 份采用超低温保存<sup>[43]</sup>;美国国家植物种质系统(NPGS, National Plant Germplasm System)收集保存 31072 份无性繁殖作物种质资源,其中 3903 份已采用超低温保存<sup>[44]</sup>。我国种质圃保存无性繁殖作物种质资源 6.5 万份,但超低温保存实践几乎空白,其技术原因是超低温保存技术获得困难、普适性差、研发周期长等。国家库经过近 20 年的努力,初步构建了超低温保存技术体系。研发了 17 种作物超低温保存技术,明确了适宜的保存载体、关键技术环节和参数<sup>[45-58]</sup>。百合、菊芋等 11 种作物适宜载体为茎尖,桑、苹果 2 种作物为休眠芽,柚、橙等 4 种作物可采用花粉。其中有 6 项超低温保存技术属国际首创,

包括百合、矮牵牛和白术茎尖小滴玻璃化法<sup>[50, 52-53]</sup>,其关键技术环节和参数为采用含 0.2~0.3 mol/L 蔗糖的预培养液处理 2~3 d, PVS2 渗透脱水处理,经恢复培养后再生率最高可达 62%~80%,且未检测到遗传变异;山葵茎尖包埋干燥法<sup>[57]</sup>,其关键技术环节和参数为采用含 0.3 mol/L 蔗糖的预培养液处理 1~2 d,用海藻酸钙包埋成球,在无菌空气流中干燥 3~5 h,经恢复培养后再生率最高可达 86%;橙和柚等花粉干燥法<sup>[55]</sup>,其关键技术参数为适宜含水量 5%~14%,存活率最高可达 84%。开展了超低温关键处理胁迫响应机制研究<sup>[59-60]</sup>,明确了胁迫条件下不同组织的存活具有特异性,建立了基于 TTC 和 FDA 方法的茎尖活力快速检测技术。应用此技术,茎尖活力检测时间可以从 7~14 d 缩短至 1~2 h,显著缩短了研发周期<sup>[46, 61]</sup>。在此基础上,开启了我国无性繁殖作物超低温保存实践<sup>[62-63]</sup>,成功保存 17 种作物种质资源 166 份资源,活力监测表明其中保存时间最长(4 年)的 10 份桃花粉的萌发率无显著降低<sup>[56]</sup>。

## 2.3 建立了种子常温节能中期保存技术

由于低温库建设投资大、技术要求高,运行维护成本昂贵,因此对于欠发达地区和一般种质资源保存,希望寻找到一种在常温条件下也能得到中期保存效果的新技术。自 1995 年起国家库选用水稻、小麦、大豆、绿豆等 8 种作物,每种作物种子含水量干燥至 10 个左右水平(范围为 1.2%~13.1%),在哈尔滨、乌鲁木齐、西宁、北京、南昌和三亚等不同气候区室内常温保存。通过近 20 年研究,明确了常温中期保存技术要点,包括种子初始发芽率 90% 以上、含水量 5.0%~6.5%、密封包装,在我国北方地区(哈尔滨和西宁)室温条件下可达到中期保存效果,安全保存寿命可达 10 年以上<sup>[28, 34]</sup>,绿豆保存寿命可达 20 年。对于南方地区则可采用近似常温的节能库保存技术(保存温度 15~20 ℃和相对湿度 $\leq$ 45%),水稻、小麦等 8 种作物 18 个品种种子保存 5 年后,其发芽率没有出现显著下降。该技术通过智能温湿度联合控制程序,充分利用自然环境温度的变化调节库房内的温度湿度综合条件,可大幅缩短设备的运行时间,从而达到种子既能安全保存又能节能的目的,经测算其能耗相比 0~2 ℃的中期库节能近 50%<sup>[64]</sup>。种子常温节能中期保存技术的构建,为不具备低温保存设施的科研院所、育种单位、种子公司等提供了安全节能的中期保存技术,经济效益十分显著。

### 3 中国作物种质资源安全保存技术体系的创建与应用

#### 3.1 创建了中国作物种质资源安全保存技术体系

基于作物种质资源安全保存理论,创建了较为完善的、规范的作物种质资源安全保存技术体系(图2),包括规程/技术合计194项,每项规程/技术规定了技术的处理程序、要求与标准,其中制定了库圃综合性保存和监测技术规程4项<sup>[65]</sup>;研制了43种作物的离体保存技术52项,包括试管苗保存技术35项、超低温保存技术17项;研制了124种作物繁殖更新技术规程<sup>[39]</sup>,包括库存作物66种、圃存作物56种、试管苗库作物2种;研制了库存种质活力监测与风险预警技术8项<sup>[28, 34-38, 61]</sup>;制定

了保存设施设计与建设技术4项,规定了种质库、种质圃、试管苗库和超低温库的功能、技术指标、规范及要求<sup>[65-68]</sup>;制定了保存描述规范1项,规定了保存数据的描述符、描述规范、分级标准<sup>[65]</sup>;研制了室温中期保存技术1项,规定了不同气候区室温保存的技术标准<sup>[34, 64]</sup>。至2018年底,我国已建成55个国家级作物种质资源保存设施,包括长期库1个(即国家库)、复份库1个、中期库10个、种质圃43个,此外还建立有国家农业野生植物原生境保护点(区)199个,以及省级中期库30余座,实现了种质资源在不同保存方式或物理空间距离上的复份安全保存。该技术体系的创建,为我国作物种质资源安全保存提供了强有力的技术支撑。

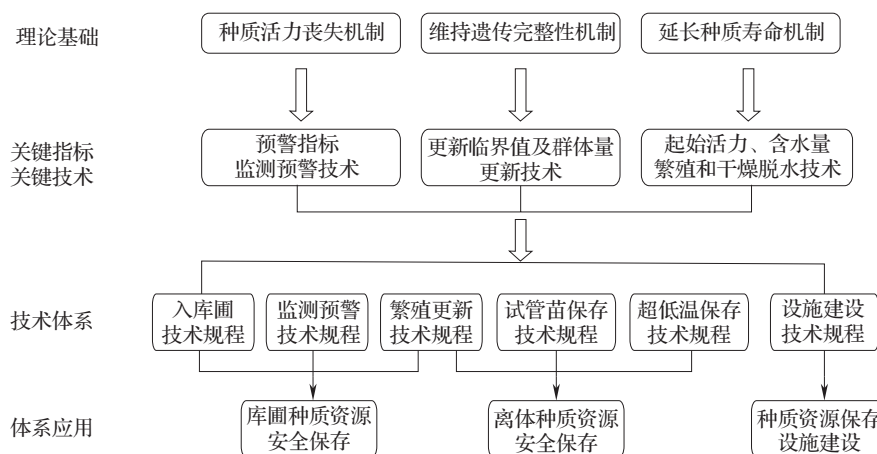


图2 作物种质资源安全保存技术体系

Fig.2 The systematic technologies for the safe conservation of crop germplasm resources

#### 3.2 安全保存技术体系的应用和社会经济效益

中国作物种质资源安全保存技术体系,支撑了全国作物种质资源的安全保存和库圃建设:(1)2000-2018年期间新增12.8万份资源入国家库圃保存,其中长期库新增9.5万份,总量达43.5万份;种质圃新增3.3万份,总量达6.5万份。同时完成了国家农作物新品种、审定品种和登记品种标准样品的入库保存5.3万份。(2)通过监测预警,准确判断出“需要更新”的83批次9500余份;指导了43个种质圃、23个中期库(含13个省级库)资源的监测,确保国家种质资源的长期和中期安全保存。(3)指导库圃保存种质繁殖更新,获得高起始活力的种子,既延长了种子保存寿命,也为资源共享分发提供了高质量的种子。(4)研发的室温中期保存技术,可实现水稻、小麦和大豆等作物种子在我国北方地区常温下达到中期保存效果(10年以上),其节能

效果显著、应用前景广阔。(5)指导了新建和改扩建种质库圃,尤其为建设世界一流水平的、现代化的国家作物种质新库提供技术和标准,为到2030年我国作物种质资源战略储备总量达到80万份的目标提供设施保障<sup>[68]</sup>。技术体系的应用为我国粮食安全、生态安全、种业市场的健康发展提供了雄厚的物质基础和重要保障。

## 4 展望

#### 4.1 进一步深入研究安全保存生物学机制,不断完善安全保存理论基础

生物学机制是种质资源安全保存的核心。揭示了种子活力丧失特性及关键节点、遗传完整性的丧失机制及繁殖更新临界值等生物学机制,但是仍需进一步深入研究,从分子水平上解析种子活力和遗传完整性丧失及其调控机制,获得预示种质从高活

力平台期转向骤降期的分子指标; 同时也需进一步研究群体中不同基因型种子的活力丧失特性, 以及在分子水平上解析不同基因型种子耐贮性, 从而揭示在活力降至关键节点导致遗传完整性丧失的遗传基础, 为种质活力监测预警与维持遗传完整性提供坚实的理论依据。

#### 4.2 进一步加强库存种质监测预警、繁殖更新和离体保存等关键技术研究

种质活力在降至更新临界值时, 能否被监测出或提前预测出, 这是种质库管理者面临的重大技术难题。需重点研究基于预警指标的无损快速活力检测新技术及应用, 以便能准确监测或提前预测出活力降至更新值的种质材料, 并采用合适的繁殖群体量、授粉方式等关键技术进行安全更新。无性繁殖作物的超低温保存研究, 仍需继续攻克技术普适性差、研发周期长等技术瓶颈, 并解析种质存活再生和遗传稳定性的生物学机制, 以加快实现我国无性繁殖作物规模化的超低温保存。

#### 4.3 进一步完善我国整体安全保存技术体系

需从国家层面上进一步完善我国整体安全保存技术体系, 主要包括: 一是设施体系建设。根据保存种质类型建设多维的、完整的、互为备份的保存设施体系, 对于种子类型作物, 建立长期库、复份库、中期库互为备份的保存体系; 对于无性繁殖作物, 建立种质圃与试管苗、超低温库互为备份的保存体系; 二是在物种和遗传多样性水平上, 全方位保存各作物的基因源。例如对于水稻作物种质资源, 通过种质库、种质圃和原生境保护点来整体保存水稻这一作物的基因源, 包括栽培种、野生种及其野生近缘种; 三是进一步加强种质资源安全保存技术体系的建设, 以支撑我国作物种质资源的长久安全保存。

#### 参考文献

- [1] FAO. Second report on the state of the world's plants genetic resources for food and agriculture. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, 2010, 47
- [2] Walters C, Wheeler L M, Grotenhuis J M. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 2005, 15: 1-20
- [3] 卢新雄, 崔聪淑, 陈晓玲, 陈贞, 陈叔平. 国家种质库部分作物种子生活力监测结果与分析. *植物遗传资源科学*, 2001, 2(2): 1-5  
Lu X X, Cui C S, Chen X L, Chen Z, Chen S P. Survey of seed germinability after 10~12 years storage in the National Genebank of China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2001, 2(2): 1-5
- [4] 辛霞, 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄. 国家库贮藏 20 年以上种子生活力与田间出苗率监测. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(6): 934-940  
Xin X, Chen X L, Zhang J M, Lu X X. Germinability and seedling emergence of seeds after 20 years of storage in the National Genebank of China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(6): 934-940
- [5] Stoyanova S D. Effect of seed ageing and regeneration on the genetic composition of wheat. *Seed Science Technology*, 1992, 20: 489-496
- [6] Chwedorzewska K J, Bednarek P T, Puchalski J, Krajewski P. AFLP-profiling of long-term stored and regenerated rye genebank samples. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2002, 7: 457-463
- [7] Soengas P, Cartea E, Lema M, Velasco P. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. *Molecular Breeding*, 2009, 23: 389-395
- [8] Dulloo M E, Hanson J, Jorge M A, Thormann I. *Regeneration guidelines: general guiding principles*, 2008
- [9] 杨勇, 赵红星, 李高潮, 阮小凤, 王仁梓. 柿种质资源田间耐寒性调查分析. *北方园艺*, 2010(1): 63-65  
Yang Y, Zhao H X, Li G C, Ruan X F, Wang R Z. Field investigation of cold tolerance in persimmon (*Diospyros L.*) germplasm. *Northern Horticulture*, 2010(1): 63-65
- [10] 卢新雄, 陈晓玲, 陈叔平. 低温库种质安全保存理论的研究进展. *植物遗传资源科学*, 2000, 1(2): 54-58  
Lu X X, Chen X L, Chen S P. Advances on theory of the safe conservaton for germplasm in seed Genebank. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2000, 1(2): 54-58
- [11] 卢新雄, 崔聪淑, 陈晓玲, 张晗, 李秀全, 李高原, 陈丽华. 小麦种质贮藏过程中生活力丧失特性及田间出苗率表现. *植物遗传资源学报*, 2003, 4(3): 220-224  
Lu X X, Cui C S, Chen X L, Zhang H, Li X Q, Li G Y, Chen L H. Characteristics of wheat seed viability loss during storage and emergence rate of seedlings. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(3): 220-224
- [12] 卢新雄, 陈晓玲. 水稻种子贮藏过程中生活力丧失特性及预警指标的研究. *中国农业科学*, 2002, 35(8): 975-979  
Lu X X, Chen X L. Characteristics and warning indices of rice seeds viability loss during storage at 45 °C constant temperature. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(8): 975-979
- [13] 辛霞, 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄. 小麦种子在不同保存条件下的生活力丧失特性研究. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 588-593  
Xin X, Chen X L, Zhang J M, Lu X X. Viability loss of wheat seeds under different storage conditions. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(4): 588-593
- [14] Yin G K, Whelan J, Wu S H, Zhou J, Chen B Y, Chen X L, Zhang J M, He J J, Xin X, Lu X X. Comprehensive mitochondrial metabolic shift during the critical node of seed ageing in rice. *PLoS ONE*, 2016, 11(4): e0148013
- [15] Yin G K, Xin X, Fu S Z, An M N, Wu S H, Chen X L, Zhang J M, He J J, Whelan J, Lu X X. Proteomic and carbonylation profile analysis at the critical node of seed ageing in *Oryza sativa*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-12
- [16] FAO. Genebank Standards. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, 2014, 36

- [ 17 ] Xin X, Lin X H, Zhou Y C, Chen X L, Liu X, Lu X X. Proteome analysis of maize seeds: the effect of artificial ageing. *Physiologia Plantarum*, 2011, 143 ( 2 ): 126-138
- [ 18 ] Yin G K, Xin X, Song C, Chen X L, Zhang J M, Wu S H, Li R F, Liu X, Lu X X. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 80: 1-9
- [ 19 ] Chen X L, Yin G K, Börner A, Xin X, He J J, Nagel M, Liu X, Lu X X. Comparative physiology and proteomics of two wheat genotypes differing in seed storage tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 455-463
- [ 20 ] Fu S Z, Yin G K, Xin X, Wu S H, Wei X H, Lu X X. The levels of crotonaldehyde and 4-hydroxy-( E )-2-nonenal and carbonyl-scavenging enzyme gene expression at the critical node during rice seed aging. *Rice Science*, 2018, 25 ( 3 ): 152-160
- [ 21 ] Xin X, Tian Q, Yin G K, Chen X L, Zhang J M, Ng S, Lu X X. Reduced mitochondrial and ascorbate-glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171 ( 2 ): 140-147
- [ 22 ] Kühn K, Yin G K, Duncan O, Law S R, Kubiszewski-Jakubiak S, Kaur P, Meyer E, Wang Y, des Francs Small C C, Giraud E, Narsai R, Whelan J. Decreasing electron flux through the cytochrome and/or alternative respiratory pathways triggers common and distinct cellular responses dependent on growth conditions. *Plant Physiology*, 2015, 167 ( 1 ): 228-250
- [ 23 ] Van Hintum T J Th, van de Wiel C C M, visser D L, van Treuren R, Vosman B. The distribution of genetic diversity in a *Brassica oleracea* gene bank collection related to the effects on diversity of regeneration, as measured with AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 777-786
- [ 24 ] 张晗, 卢新雄, 张志娥, 陈晓玲, 任守杰, 辛萍萍. 种子老化对玉米种质资源遗传完整性变化的影响. *植物遗传资源学报*, 2005, 6 ( 3 ): 271-275  
Zhang H, Lu X X, Zhang Z E, Chen X L, Ren S J, Xin P P. Effect of seed aging on changes of genetic integrity in maize germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6 ( 3 ): 271-275
- [ 25 ] 王栋, 卢新雄, 张志娥, 陈晓玲, 辛霞, 辛萍萍, 耿立格. SSR标记分析种子老化及繁殖世代对大豆种质遗传完整性的影响. *植物遗传资源学报*, 2010, 11 ( 2 ): 192-199  
Wang D, Lu X X, Zhang Z E, Chen X L, Xin X, Xin P P, Geng L G. Effect of seed aging and regeneration on genetic integrity in soybean by SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11 ( 2 ): 192-199
- [ 26 ] 王栋, 张志娥, 陈晓玲, 辛霞, 辛萍萍, 卢新雄. AFLP标记分析生活力影响大豆中黄18种质遗传完整性. *作物学报*, 2010, 36 ( 4 ): 555-564  
Wang D, Zhang Z E, Chen X L, Xin X, Xin P P, Lu X X. Analysis of viability affecting on genetic integrity in soybean germplasm Zhonghuang 18 by AFLP markers. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36 ( 4 ): 555-564
- [ 27 ] 刘敏, 辛霞, 张志娥, 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄. 繁殖群体量及隔离对蚕豆种质遗传完整性的影响. *植物遗传资源学报*, 2012, 13 ( 2 ): 175-181  
Liu M, Xin X, Zhang Z E, Chen X L, Zhang J M, Lu X X. Effect of sample sizes and isolation methods on genetic integrity of faba bean (*Vicia faba* L.) Germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13 ( 2 ): 175-181
- [ 28 ] 宋超, 辛霞, 陈晓玲, 张金梅, 尹广鹏, 何娟娟, 覃初贤, 卢新雄. 三种保存条件下水稻和小麦种质资源安全保存期的分析. *植物遗传资源学报*, 2014, 15 ( 4 ): 685-691  
Song C, Xin X, Chen X L, Zhang J M, Yin G K, He J J, Qin C X, Lu X X. Safety storage life of rice and wheat germplasm resources at three storage conditions. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15 ( 4 ): 685-691
- [ 29 ] 陈贞. 大豆种子生活力跟踪监测研究. *种子*, 1999, 4: 46-48  
Chen Z. Study on tracking and monitoring of soybean seed viability. *Seed*, 1999, 4: 46-48
- [ 30 ] 卢新雄, 崔聪淑, 陈晓玲, 陈贞, 陈叔平. 国家种质库部分作物种子生活力监测结果与分析. *植物遗传资源科学*, 2001, 2 ( 2 ): 1-5  
Lu X X, Cui C S, Chen X L, Chen Z, Chen S P. Survey of seed germinability after 10~12 years storage in the National Genebank of China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2001, 2 ( 2 ): 1-5
- [ 31 ] 胡群文, 卢新雄, 辛萍萍, 陈晓玲, 张志娥, 辛霞, 刘旭. 水稻在不同气候区室温贮藏的适宜含水量及存活特性. *中国水稻科学*, 2009, 23 ( 6 ): 621-627  
Hu Q W, Lu X X, Xin P P, Chen X L, Zhang Z E, Xin X, Liu X. The optimal moisture content and survival characteristics of rice seeds stored at six climatic zones under room temperature. *Chinese Journal of Rice Science*, 2009, 23 ( 6 ): 621-627
- [ 32 ] 卢新雄, 张云兰. 国家种质库种子干燥处理技术的建立与应用. *植物遗传资源学报*, 2003, 4 ( 4 ): 365-368  
Lu X X, Zhang Y L. Establishment and use of seed drying technology in the National Crop Genebank of China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4 ( 4 ): 365-368
- [ 33 ] 吴晓亮, 辛萍萍, 张志娥, 陈晓玲, 陶澜, 卢新雄. 水稻种子室温贮藏最适含水量及其热稳定蛋白的研究. *中国农业科学*, 2006, 39 ( 11 ): 2214-2219  
Wu X L, Xin P P, Zhang Z E, Chen X L, Tao L, Lu X X. Studies on optimum moisture content and heat-stable protein of rice seeds stored at room temperature. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39 ( 11 ): 2214-2219
- [ 34 ] 周静, 辛霞, 尹广鹏, 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄. 大豆种子在不同气候区室温贮藏的适宜含水量与寿命关系研究. *大豆科学*, 2014, 33 ( 5 ): 687-690  
Zhou J, Xin X, Yin G K, Chen X L, Zhang J M, Lu X X. Optimal moisture content and longevity of soybean seeds stored at different climatic zones under ambient condition. *Soybean Science*, 2014, 33 ( 5 ): 687-690
- [ 35 ] 辛霞, 张金梅, 尹广鹏, 赵婧, 陈晓玲, 卢新雄. 快速无损检测种子生活力的方法. ZL201510847974.8.2018-03-23  
Xin X, Zhang J M, Yin G K, Zhao J, Chen X L, Lu X X. A fast, non-invasive technique for seed viability testing. ZL201510847974.8.2018-03-23
- [ 36 ] 辛霞, 赵婧, 陈晓玲, 尹广鹏, 张金梅, 卢新雄. 快速无损检测大豆种子生活力的方法. ZL201510849232.9.2018-02-02  
Xin X, Zhao J, Chen X L, Yin G K, Zhang J M, Lu X X. A fast, non-invasive technique for soybean seed viability testing. ZL201510849232.9.2018-02-02
- [ 37 ] 辛霞, 尹广鹏, 陈晓玲, 张金梅, 赵婧, 卢新雄. 快速无损检测小麦种子生活力的方法. ZL201510849640.4.2018-08-17  
Xin X, Yin G K, Chen X L, Zhang J M, Zhao J, Lu X X. A fast, non-invasive technique for wheat seed viability testing. ZL201510849640.4.2018-08-17



- [ 38 ] Xin X, Wan Y L, Wang W J, Yin G K, ES M L, Lu X X. A real-time, non-invasive, micro-optrode technique for detecting seed viability by using oxygen influx. *Scientific Reports*, 2013, 3 ( 10 ): 3507
- [ 39 ] 王述民, 卢新雄, 李立会. 作物种质资源繁殖更新技术规程. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014  
Wang S M, Lu X X, Li L H. The technical regulation on regeneration of crop germplasm resources. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2014
- [ 40 ] Benson E.E. Cryopreservation of phytodiversity: A critical appraisal of theory practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2008, 27 ( 3 ): 141-219
- [ 41 ] Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2011, 47 ( 1 ): 5-16
- [ 42 ] Panis B, Swennen R, Rhee J, Roux N. Securing plant genetic resources for perpetuity through cryopreservation. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 29 ( 3 ): 300-302
- [ 43 ] International Potato Center. Number of accessions in the CIP Cryobank. ( 2018-08-12 ) [www.cipotato.org/genebankcip/process/cryopreservation-2](http://www.cipotato.org/genebankcip/process/cryopreservation-2)
- [ 44 ] Jenderek M M, Reed B M. Cryopreserved storage of clonal germplasm in the USDA National Plant Germplasm System. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2017, 53 ( 4 ): 299-308
- [ 45 ] 陈辉, 陈晓玲, 陈龙清, 卢新雄. 切花百合离体茎尖玻璃化法超低温保存研究. *植物遗传资源学报*, 2007, 8 ( 2 ): 170-173  
Chen H, Chen X L, Chen L Q, Lu X X. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of cut flower of lily ( *Lilium* L. ) by vitrification method. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8 ( 2 ): 170-173
- [ 46 ] 赵艳华, 吴雅琴, 程和禾, 李春敏, 陈晓玲, 卢新雄. 李离体茎尖的超低温保存. *园艺学报*, 2008, 35 ( 3 ): 423-426  
Zhao Y H, Wu Y Q, Cheng H M, Li C M, Chen X L, Lu X X. Cryopreservation of shoot tips from *prunus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35 ( 3 ): 423-426
- [ 47 ] 刘丽芳. 甘薯种质遗传稳定性及超低温保存研究. 重庆: 西南大学, 2009  
Liu L F. Studies on Genetic Stability and Cryopreservation of Sweet Potato Germplasm. Chongqing: Southwest University, 2009
- [ 48 ] 白建明, 陈晓玲, 卢新雄, 郭华春, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍. 马铃薯茎尖小滴玻璃化法超低温保存及其再生植株的遗传稳定性. *园艺学报*, 2010, 37 ( 9 ): 1431-1438  
Bai J M, Chen X L, Lu X X, Guo H C, Xin X, Zhang Z E, Xin P P. Cryopreservation of *in vitro* shoot tips of potato by droplet vitrification and genetic stability of regenerated plantlets. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37 ( 9 ): 1431-1438
- [ 49 ] 李俊慧, 何平, 陈晓玲, 卢新雄, 辛霞, 张志娥, 辛萍萍. 香蕉离体茎尖超低温保存研究. *植物遗传资源学报*, 2010, 11 ( 1 ): 34-39  
Li J H, He P, Chen X L, Lu X X, Xin X, Zhang Z E, Xin P P. Cryopreservation of *in vitro* shoot-tips of banana ( *Musa* spp. ). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11 ( 1 ): 34-39
- [ 50 ] Chen X L, Li J H, Xin X, Zhang Z E, Xin P P, Lu X X. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *South African Journal of Botany*, 2011, 77 ( 2 ): 397-403
- [ 51 ] Zhang J M, Zhang X N, Lu X X, Xin X, Yin G K, He J J, Xu Y M, Chen X L. Optimization of droplet-vitrification protocol for carnation genotypes and ultra-structural studies on shoot tips during cryopreservation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, 36 ( 12 ): 3189-3198
- [ 52 ] Zhang J M, Huang B, Zhang X N, Volk G M, Zhou Y C, Chen X L. Identification of a highly successful cryopreservation method ( droplet-vitrification ) for petunia. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2015, 51 ( 4 ): 445-451
- [ 53 ] Zhang J M, Huang B, Lu X X, Volk G M, Xin X, Yin G K, He J J, Chen X L. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of Chinese medicinal plant *Atractylodes macrocephala* Koidz. using a droplet-vitrification method. *CryoLetters*, 2015, 36 ( 3 ): 195-204
- [ 54 ] Zhang J M, Han L, Lu X X, Volk G M, Xin X, Yin G K, He J J, Wang L, Chen X L. Cryopreservation of Jerusalem artichoke cultivars using an improved droplet-vitrification method. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*, 2017, 128 ( 3 ): 577-587
- [ 55 ] Zhang J M, Lu X X, Xin X, Yin G K, He J J, Huang B, Jiang D, Chen X L. Cryopreservation of *Citrus* anthers in the National Crop Genebank of China. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 2017, 51 ( 4 ): 445-451
- [ 56 ] 张金梅, 闫文君, 李雪, 黄斌, 张海晶, 赵剑波, 姜全, 陈晓玲. 桃花粉低温和超低温保存方法比较研究. *植物遗传资源学报*, 2017, 18 ( 4 ): 670-675  
Zhang J M, Yan W J, Li X, Huang B, Zhang H J, Zhao J B, Jiang Q, Chen X L. Study on low temperature storage and cryopreservation of pollen for peach germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18 ( 4 ): 670-675
- [ 57 ] 陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 卢新雄. 山葵试管苗离体茎尖包埋干燥超低温保存及再生培养方法, ZL201210211725.6.2014-04-02  
Chen X L, Zhang J M, Xin X, Lu X X. Methods of cryopreservation and regeneration for *in vitro*-grown shoot tips of wasabi. ZL201210211725.6.2014-04-02
- [ 58 ] 陈晓玲, 张金梅, 卢新雄, 辛霞, 尹广鹏, 何娟娟. 桑树休眠芽段的超低温保存及嫁接复活方法, ZL201410366753.4.2016-06-11  
Chen X L, Zhang J M, Lu X X, Xin X, Yin G K, He J J. Methods of cryopreservation and grafting regeneration for mulberry dormant bud. ZL201410366753.4.2016-06-11
- [ 59 ] Huang B, Zhang J M, Chen X L, Xin X, Yin G K, He J J, Lu X X, Zhou Y C. Oxidative damage and antioxidative indicators in 48 h germinated rice embryos during the vitrification-cryopreservation procedure. *Plant Cell Reports*, 2018, 37: 1325-1342
- [ 60 ] 李运合, 李玉生, 张金梅, 陈晓玲, 赵艳华, 吴永杰. 芒果细胞超低温保存存活机理. *植物生理学报*, 2016, 52 ( 10 ): 1474-1480  
Li Y H, Li Y S, Zhang J M, Chen X L, Zhao Y H, Wu Y J. The survival mechanism of mango cells during cryopreservation. *Plant Physiology Journal*, 2016, 52 ( 10 ): 1474-1480
- [ 61 ] 张海晶, 张金梅, 辛霞, 尹广鹏, 何娟娟, 卢新雄, 周元昌, 陈晓玲. 马铃薯茎尖超低温保存流程 TTC 活力响应. *植物遗传资源学报*, 2015, 16 ( 3 ): 555-560  
Zhang H J, Zhang J M, Xin X, Yin G K, He J J, Lu X X, Zhou Y C, Chen X L. Study on potato shoot tips vitality responses during cryopreservation by TTC staining method. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16 ( 3 ): 555-560

- [ 62 ] Zhang J M, Xin X, Yin G K, Lu X X, Chen X L. *In vitro* conservation and cryopreservation in National Genebank of China. *Acta Horticulturae*, 2014, 1039 ( 1039 ): 309-317
- [ 63 ] 陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 黄斌, 卢新雄. 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 ( 3 ): 414-427  
Chen X L, Zhang J M, Xin X, Huang B, Lu X X. Progress on cryopreservation state and research of plant germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 ( 3 ): 414-427
- [ 64 ] 何娟娟, 卢新雄, 栗钊, 辛霞. 8种粮食和蔬菜作物种子短期节能储藏研究. *中国种业*, 2016 ( 9 ): 57-60  
He J J, Lu X X, Li Z, Xin X. Short-term storage of 8 crop and vegetable seeds with an energy-saving method. *China Seed Industry*, 2016 ( 9 ): 57-60
- [ 65 ] 卢新雄, 陈叔平, 刘旭. 农作物种质资源保存技术规程. 北京: 中国农业出版社, 2008  
Lu X X, Chen S P, Liu X. *The technical regulation on conservation of crop germplasm resources*, Beijing: China Agriculture Press, 2008
- [ 66 ] 卢新雄. 农业种质库的设计与建设要求探讨. *农业工程学报*, 2003, 19 ( 6 ): 252-255  
Lu X X. Design and construction of agricultural germplasm genebank. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2003, 19 ( 6 ): 252-255
- [ 67 ] 郭颖荷, 卢新雄, 彭高军. 中国低温种质库建造技术调查分析. *农业工程学报*, 2005, 21 ( 4 ): 186-190  
Guo Y H, Lu X X, Peng G J. Investigation and analysis of the building technology of low temperature germplasm genebanks of China. *Transactions of The Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2005, 21 ( 4 ): 186-190
- [ 68 ] 中华人民共和国农业农村部, 中华人民共和国国家发展和改革委员会, 中华人民共和国科学技术部. 全国农作物种质资源保护与利用中长期发展规划 ( 2015—2030 年 ). ( 2015-04-29 ) [ 2018-08-15 ] [http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/si/201711/t20171129\\_6134098.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/si/201711/t20171129_6134098.htm)  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, National Development and Reform Commission of the People's Republic of China, People's Republic of China Ministry of Science and Technology. *National Medium-and Long-term Development Plan for the Protection and Utilization of Crop Germplasm Resources ( 2015-2030 )*. ( 2015-04-29 ) [ 2018-08-15 ] [http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/si/201711/t20171129\\_6134098.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/si/201711/t20171129_6134098.htm)