

植物遺傳資源

體外超低溫冷凍保存技術 研習心得

農試所鳳山分所 邱金春

一、前言

植物遺傳資源的妥善保存與有效利用，可以永續生產安全及足夠的糧食避免飢餓和貧窮，並在農業生產過程友善我們居住的生態環境。近年來氣候環境變遷加劇，許多現有作物有瀕臨絕種或被取代、退化的疑慮，更突顯種原保存技術的重要性。將種子儲藏於種子庫是傳統的種原保存方式，然而無性繁殖作物及很多熱帶、亞熱帶植物無法以種子保存遺傳資源。目前已知利用組織培養技術進行植物體外保存 (*in vitro* conservation) 及超低溫冷凍保存 (cryopreservation)，不但能減少保存種原耗用的土地空間和人力成本，也能避免外在環境如溫度、降雨、日照、病害或蟲害等因子的干擾，在分子生物檢測技術輔助下，為安全且有效的中、長期保存方法。

二、印度NBPGR舉辦「植物遺傳資源體外超低溫冷凍保存技術」研習

印度國家植物遺傳資源署(National Bureau of Plant Genetic Resources, NBPGR)為全球作物保存中心之一，配

置有國家種子庫、國家植物組織培養保存庫和超低溫庫，專責辦理及研發種原在基因庫內之長期保存(圖一)。NBPGR與亞太農業研究機構聯盟(Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, APAARI)、生物多樣性國際中心(Biodiversity International)等於西元2011年11月14-26日在新德里合辦第六屆「植物遺傳資源體外超低溫冷凍保存技術」研習會，以當前應用於中長期保存無性繁殖作物及非傳統種子型態保存作物的試管體外保存技術與超低溫冷凍保存技術，設計實際操作練習的研習課程(圖二)。學員來自伊朗、南非、迦納、斯里蘭卡、台灣、奈及利亞及印度共計13名，有種原庫經理、大學教授及農業研究人員。講師除了NBPGR的研究員擔任外，並聘請Prof. Hugu Pritchard、Dr. Ir. Bart Panis、Dr. Haeng-Hoon Kim、Dr. Barbara M. Reed、Dr. J. L. karihaloo等英、美、韓及比利時專家共同擔任講師。講師們都有多年的工作經驗，因此能提供詳盡的上課講義並適時的解答學員們的疑惑，實習過程每位學員都有機會親自操作練習加深印象。

三、超低溫冷凍保存種原

水分在細胞內扮演重要角色維持植物各種生理機能，植物細胞含水量約85-95%，種子含水量約8-15%。水低於0°C

作者：邱金春助理研究員
連絡電話：07-7310191-707

開始形成冰晶，破壞細胞膜導致細胞失去膨壓、崩解而死亡。超低溫保存是指在 -80°C 以下的超低溫保存種原的技術，因此植物必須有克服冰凍逆境的保護措施，包括避免冰晶形成或冷馴化加強耐低溫能力(圖三)。材料冷凍前的適度脫水可除去細胞內的自由水避免冰晶形成，配合玻璃質化(vitrification)或藻膠包埋(encapsulation)等技術，可以提高材料回溫後的存活率。茲將技術研習心得介紹如下：

(一)種子、胚、休眠芽及花粉的快速冷凍保存

對於難以種子儲藏類型如含水量高、脂質多、對低溫敏感或體積大的種



圖一、NBPGR設置的超低溫冷凍庫，種原記錄須詳細並建檔，方便管理。



圖二、研習會提供的講義詳述冷凍原理及操作程序，值得參考。

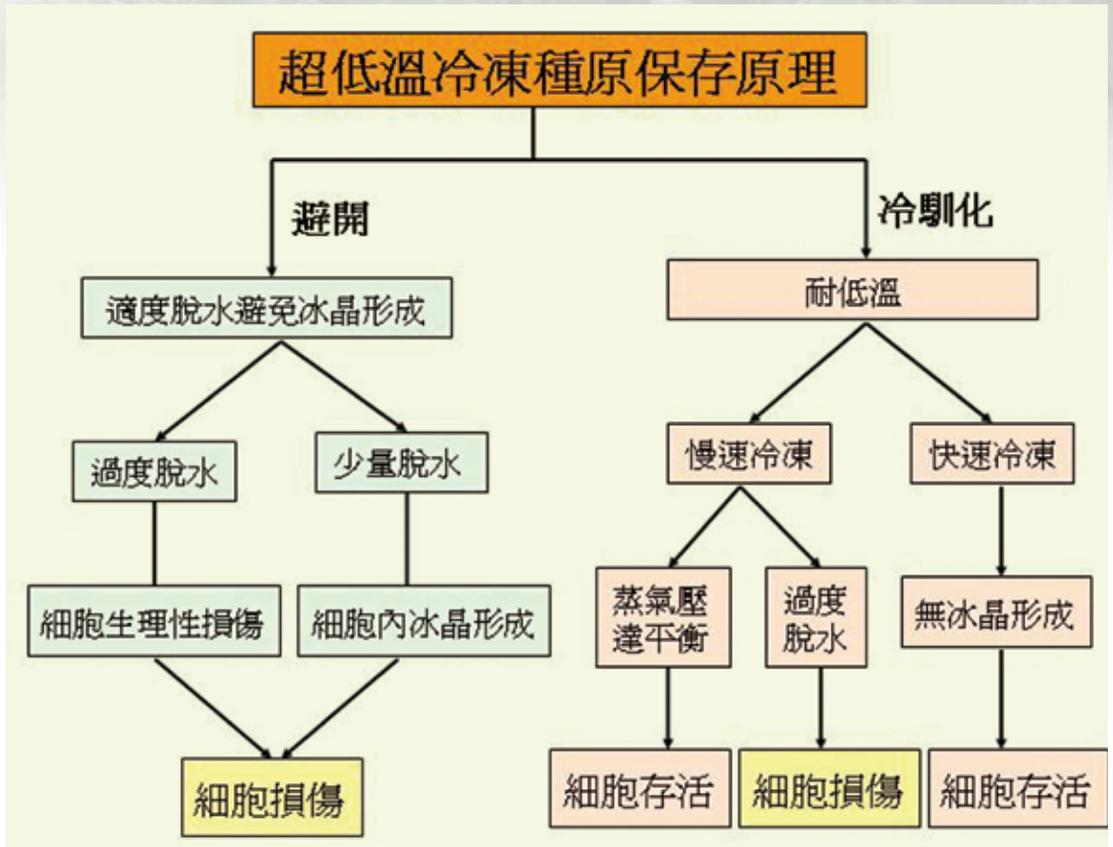
子，可以只切取胚作為保存體，唯材料必需先進行含水量與發芽率的評估。一般而言，種子以含水量10-14%為宜，胚則以10-25%含水量為底線；材料在適當含水量下即可放入冷凍瓶(cryovial)後再放入液態氮快速冷凍；回溫時，以 $37-40^{\circ}\text{C}$ 水浴法進行即可。若材料回溫後發芽率差，可考慮改變材料脫水速率或以不同成熟期的材料作為保存體。

果樹作物多以無性繁殖保存品種特性，溫帶果樹耐寒、具休眠性，可在冬季摘取深度休眠後的休眠芽作為保存體，材料乾燥脫水至含水量20-30%後即可放入液態氮中保存，方法簡單易行，且回復生長後經嫁接多有提早開花的優點；目前蘋果屬(*Malus*)、桑屬(*Morus*)及梅屬(*Prunus*)等都成功地以此法進行種原保存，但是此法不適用於缺乏休眠性的熱帶性果樹種原保存。

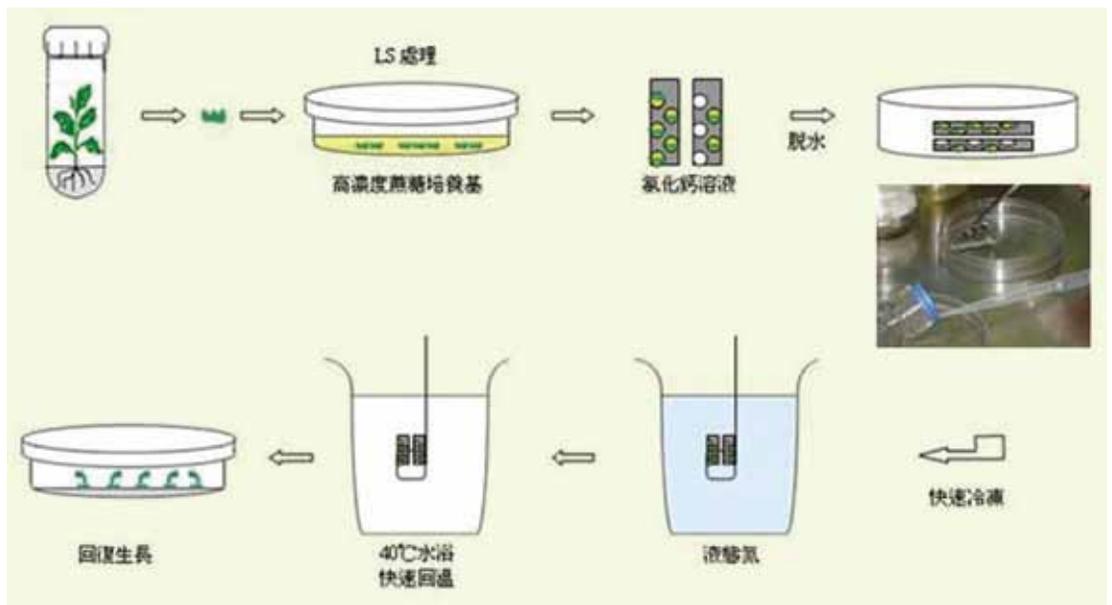
花粉保存主要是基於雜交育種的需要，對於花粉壽命短的禾本科、十字花科、菊科等作物，或是栽植於不同地區、甚至不同開花期的作物，可以增加雜交機會。惟受限於成熟花粉培養目前無法再生植株，因此花粉保存只可作為種子及營養系保存的補充。如同種子冷凍保存過程，花粉應先進行含水量與萌芽率的評估，再快速冷凍。一些短命花粉如小麥、玉米、水稻、甘蔗等應用此技術已成功延長花粉壽命。

(二)玻璃質化與液滴冷凍保存

玻璃質化是指以不形成冰晶的方式使細胞內的液體轉為無定型的固體呈玻璃般凍結固化的生理變化，冷凍保護劑主要保護細胞於 0°C 以下避免冰晶形成，蔗糖、甘露醇、甘油、乙二醇等都可作為植物組織的護凍劑，通常以兩種以上化合物配製成高濃度(15-30%)溶液進行



圖三、植物細胞於超低溫冷凍逆境保存原理。



圖四、香蕉等多種作物成功以液滴冷凍技術保存種原。

玻璃質化誘導，提高冷凍耐受性。玻璃質化法簡單易行，但大部份護凍劑具有毒性，處理時間太長對培植體有毒害作用，放置時間不足則沒有防護效果，提供適當護凍劑前處理才是此技術的成功關鍵。PVS2與PVS3都常作為護凍劑，已知PVS3溶液對植物細胞的毒害較輕，材料玻璃質化時應優先考慮使用。目前大蒜、波蘿蜜、荔枝、柑橘及多種藥用植物都成功以此技術保存種原，且獲得高存活率。

由玻璃質化法衍生的液滴冷凍(droplet freezing)技術則是以鋁箔薄片取代冷凍瓶，將材料放在鋁箔片上直接置入液態氮中，可確保材料有較快的冷凍



圖五、香蕉莖頂組織經超低溫冷凍保存後仍保持生命力。



圖六、藻膠包埋西洋梨(*Pyrus communis*)莖頂組織進行超低溫冷凍保存。

速率及回溫速率，目前應用此技術已成功保存馬鈴薯、蘆筍、香蕉等多種作物莖頂(圖四與圖五)。

(三)包埋脫水法

包埋脫水法是對低溫敏感種原如蘋果等營養芽，在乾燥及冷凍保存過程需保護莖頂分生組織避免凍傷，通常以5%藻膠包埋莖頂，逐步提高培養基中蔗糖濃度預培養，再以含氯化鈣溶液進行藻膠包埋，包埋處理後的藻膠球粒以loading solution調整滲透壓，放入PVS2脫水乾燥，有助於提高對低溫的耐受性而提高冷凍保存的存活率，此方法一次能處理較多材料且對植物的毒害較小，因此廣泛被應用於種原的保存(圖六)。目前應用此技術已成功保存多種溫帶及熱帶作物莖頂及體胚，包括蘋果、梨、黑莓、覆盆子、桑葚、薄荷、楊桃、枳殼、巴西橡膠樹和甜橙等，以及甘蔗、山藥、百合、香蕉等單子葉植物。

四、結語

超低溫冷凍保存植物種原技術逐漸成熟，在印度、美國、韓國、日本等國家都應用於實際種原保存工作上，唯現階段仍以溫帶性作物有較多成功的案例，熱帶或亞熱帶作物因本質上不耐低溫及乾燥，目前僅香蕉、柑橘、甜橙、桑葚、楊桃、荔枝、波蘿蜜等有成功案例。台灣因地理氣候條件多為熱帶或亞熱帶作物育種，應可以就此領域尋求技術上的突破讓台灣在植物遺傳資源保存研究上異軍突起。因應「基因農場」時代的來臨，除了種子、胚、胚芽、莖頂等材料外，特定性狀基因片段、突變體、雙單倍體(double haploid)、遠緣雜交種等都是值得重視與保存的新植物遺傳資源。