

蘭花種原長期保存

超低溫冷凍保存技術

農試所花卉中心 吳容儀

一、蘭花種原保存的重要性

蘭花的「種原保存」工作很容易被忽略，但是它卻與蘭花育種家有著密不可分的關係。首先，從事育種研究者之首要工作為廣泛地收集並評估適合作雜交親本的物種，當選定優良親本或部分取得不易甚至是已瀕臨絕跡的物種，一般多採取溫室或網室栽培加以保存。如何能讓重要親本及雜交後代完好地永續保存，不受病蟲害侵襲、栽培管理疏忽以及人為管理不當造成的生理障礙，實屬不易；再者，當欲選用開花期不同的兩親本進行雜交時，如何有效地保存父本花粉，使花粉能維持較高活力以利雜交授粉；雜交成功後，當果莢(蒴果)成熟時因人為因素無法立刻進行播種，或因時間空間的考量必須進行種子貯藏；育種者辛苦選育出優良單株或育成新品種時，如何進行長期保存不使其消失等等，均與種原保存工作密切相關，因此種原保存實為育種之根本。

二、蘭花種原保存材料及方式

(一) 保存材料的選擇

一般有性繁殖作物最常使用的保存材料為種子，因為種子含水量低，較容易貯藏，只要掌握種原保存的原則：低溫度及低相對濕度，可利用於中短期貯藏。以蘭花而言，如果以保存重要物種(species)或瀕臨滅絕物種為目的，則以花粉或種子為主要保存材料。花粉保存之主要目的在於使花期差距大之雙親得以順利進行雜交工作；若以保存新品種、優良個體、優良單株為目的，則以擬原球體(PLB)、癒合組織、芽體等分生組織為保存材料。

(二) 保存方式

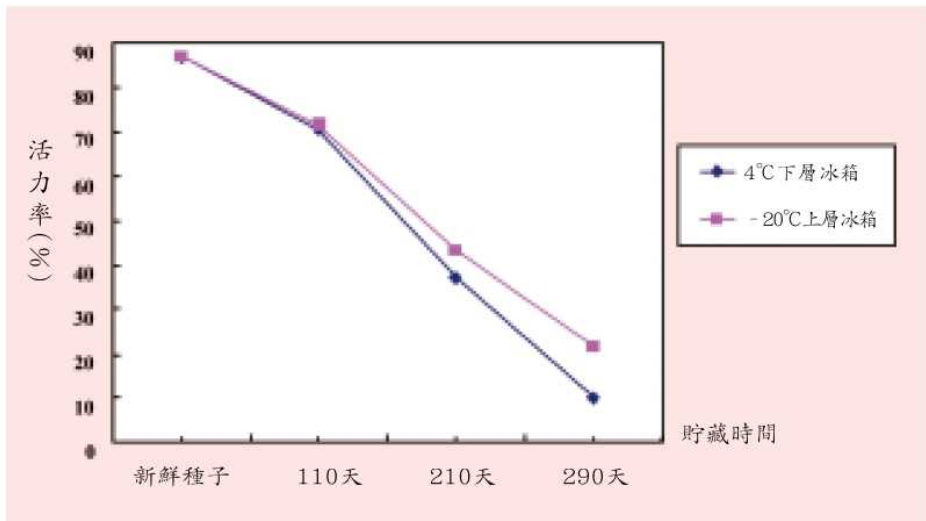
商業生產上常使用的保存方式為4℃環境下冰存，-20℃次之。台灣原生蘭種子在不同貯藏環境下(4℃與-20℃)進行保存，以紅花鶴頂蘭及白鳳蘭為例，兩物種所測得新鮮種子活力最高，當貯藏110天後，種子活力已受影響，兩者種子活力率均隨著貯存時間延長而有活力逐漸衰退情形(圖一，圖二)，因此以上兩種貯藏條件僅適用短期貯藏，並不適合作為種原長期保存。

作者：吳容儀助理研究員
連絡電話：05-5828307

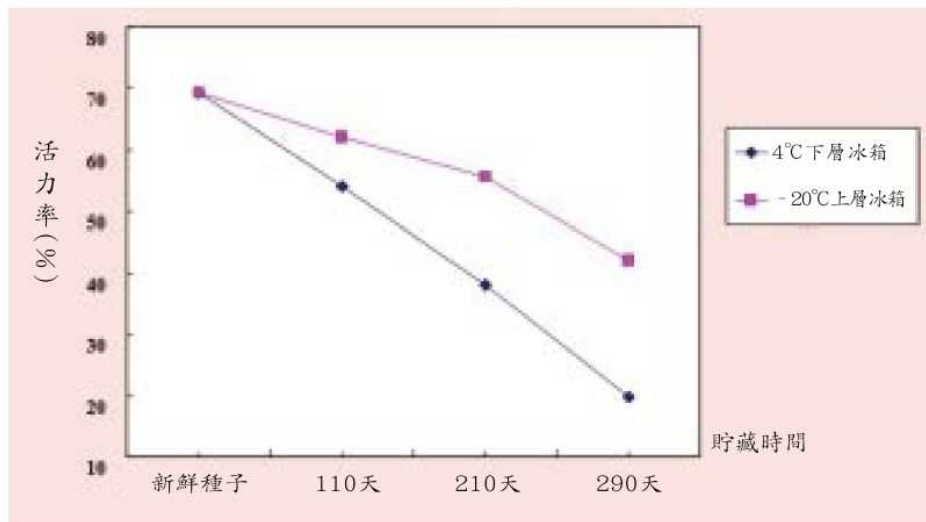
三、超低溫保存技術介紹及應用

超低溫保存係指將植物組織或器官置入超低溫-196°C液態氮環境中保存 (Cryopreservation)，在如此低的溫度環境下幾乎所有細胞生理代謝活動都已停止，不會發生退化或體細胞變異的現象，但是仍能維持生命活力，適合中長期貯藏；早在20多年前已有利用液態氮進行植物種原保存的研究，早期是以次遞降溫方式進行，利用溫度控制促使細

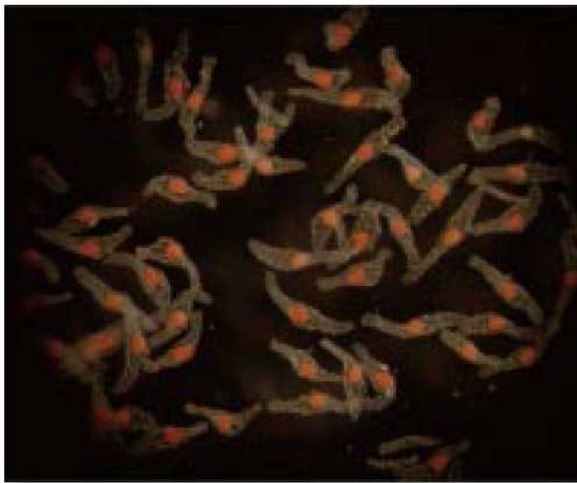
胞內水分往細胞外移動，達到脫水目的，一些較為敏感的組織因無法適應溫度劇烈的變化而影響存活率，後來隨著冷凍保護劑之研發，許多較敏感的組織經保存後的存活率因此得到提升。近幾年新研發之藻膠包埋脫水法與液滴玻璃質化法，均是針對植物材料置入液態氮前之預處理進行改善，提高保存材料對低溫之耐受性而使存活率提高。超低溫冷凍保存的優點包括：



圖一、不同貯藏環境對紅花鶴頂蘭種子活力表現之影響。



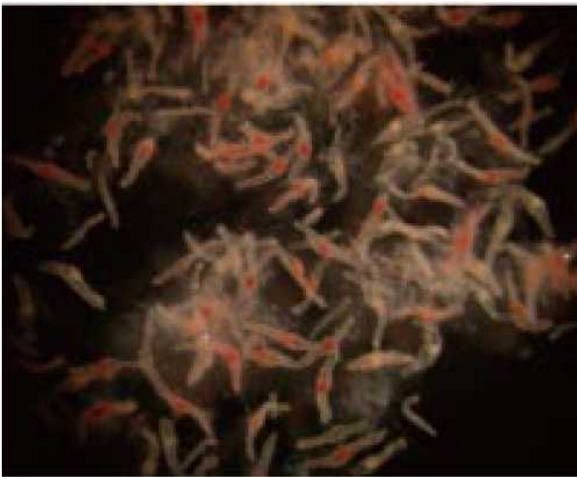
圖二、不同貯藏環境對白鳳蘭種子活力表現之影響。



圖三、紅花鶴頂蘭新鮮種子活力表現。



圖四、紅花鶴頂蘭新鮮種子置入液態氮貯藏前未經任何前處理，種子完全無活力。



圖五、紅花鶴頂蘭新鮮種子經前處理及冷凍保護劑處理後，再置入液態氮中貯藏，種子活力提高。

1. 保存體積小，多為種子、花粉、細胞、組織及器官，可節省貯藏空間及人力資源。
2. 在貯藏期間，保存體不需繁複的繼代培養，可避免因繼代培養所造成的遺傳變異、人為操作污染與減少體細胞營養系變異的機會。
3. 保存體貯存於液態氮中，可避免受到天然災害影響及病蟲害的侵襲。
4. 保存體在超低溫保存過程中，可維持細胞的活力與再生能力。

因此，此技術適合應用在無性繁殖植物、非種子繁殖植物以及基因轉殖植物的長期保存上，亦可應用於種原庫之長期保存使用。

四、台灣原生蘭花種子超低溫冷凍保存試驗

以紅花鶴頂蘭為例，所取得之新鮮種子活力百分率為84%（圖三），如果種子未經任何前處理，立刻置入液態氮中保存，經回溫後所測得之種子活力率為0（圖四）。因此，紅花鶴頂蘭種子勢必需要經過前處理步驟，才能置於液態氮中保存。進一步將種子經前處理及冷凍保護劑處理後，再貯存於-196°C液態氮環境，經回溫後所測得種子活力可提高至75%（圖五）。

五、結論

筆者進行數種原生蘭花種子測試，結果各種蘭花進行超低溫冷凍保存所需前處理條件稍有不同，品種間亦存在差異性，此保存技術正進一步應用於測試重要經濟蘭花（蝴蝶蘭、文心蘭等）之種子與花粉保存工作上。本技術所需之設備少，操作簡易，相關技術建置完成時，將可應用於民間種原及種原庫之中長期保存。