

作物超低溫冷凍保存方法 之原理及應用

作物
種原

農試所嘉義分所 羅淑芳 ▲ 嘉義大學園藝系 游佩蓁 洪進雄

一、前言

自人類開始發展品種的選育後，即造成植物種原快速的消逝，近年來如何維持種原多樣性的議題，已成為全球關注的焦點。以植物物種保存而言，目前所使用的方法可分為現場保存 (*in situ* conservation)、離場保存 (*ex situ* conservation)、體外保存 (*in vitro* conservation) 及超低溫冷凍保存法 (*cryopreservation*) 等，其優缺點如表一所列。相較於前三種傳統保存方式，超低溫冷凍保存法可減少空間、勞力、金錢及能源的消耗，並且能長期貯存，且不影響植物組織的活性及其性狀。近數十年來興起植物種原的超低溫冷凍保存技術，最早由 Sakai (1960) 發表銀樺樹成功地進行超低溫冷凍保存，至今超過 160 個品種或栽培種成功地進行超低溫冷凍保存。植物的種子、體胚、癒傷組織及莖頂等，皆可作為超低溫冷凍保存的材料，而如何提升植物組織的耐凍性，降低細胞內水分的含量，避免冰晶傷害細胞膜，減少組織細胞死亡，皆是影響超低溫冷凍保存成功與否的關鍵因素(許，1995)。

作者：羅淑芳助理研究員
連絡電話：05-2771341-339

二、作物超低溫冷凍保存處理之流程

目前常使用的超低溫冷凍保存技術有三種方式：即玻璃質化法 (*Vitrification*)、藻膠包埋乾燥法 (*Encapsulation dehydration*) 及藻膠包埋玻璃質化法 (*Encapsulation vitrification*)，此三種方法各有優缺點，如下所述：

(一)玻璃質化法

Sakai *et al* (2008) 發表玻璃質化法為將植物組織先進行冷馴化或高濃度蔗糖處理後，配合抗凍劑如 Loading solution (LS) 及 Plant vitrification solution 2 (PVS2) 溶液處理，快速冷凍及回溫，最後於回復培養基中誘導植株產生。具操作簡單、所需工具少及處理耗費時間短等優點，但操作時須避免傷害植物組織(圖一)。

(二)藻膠包埋乾燥法

植物組織在進行藻膠(Na-Alginat)包埋前，先經冷馴化或高濃度蔗糖處理，藻膠包埋後經LS溶液處理後，置於無菌操作台風乾或矽膠乾燥劑乾燥，再快速置入液態氮保存及回溫，最後於回復培養基誘導植株產生。此法操作上較簡單，不需擔心植物組織受到操作時的機械傷害，且不經過 PVS2 溶液處理，可

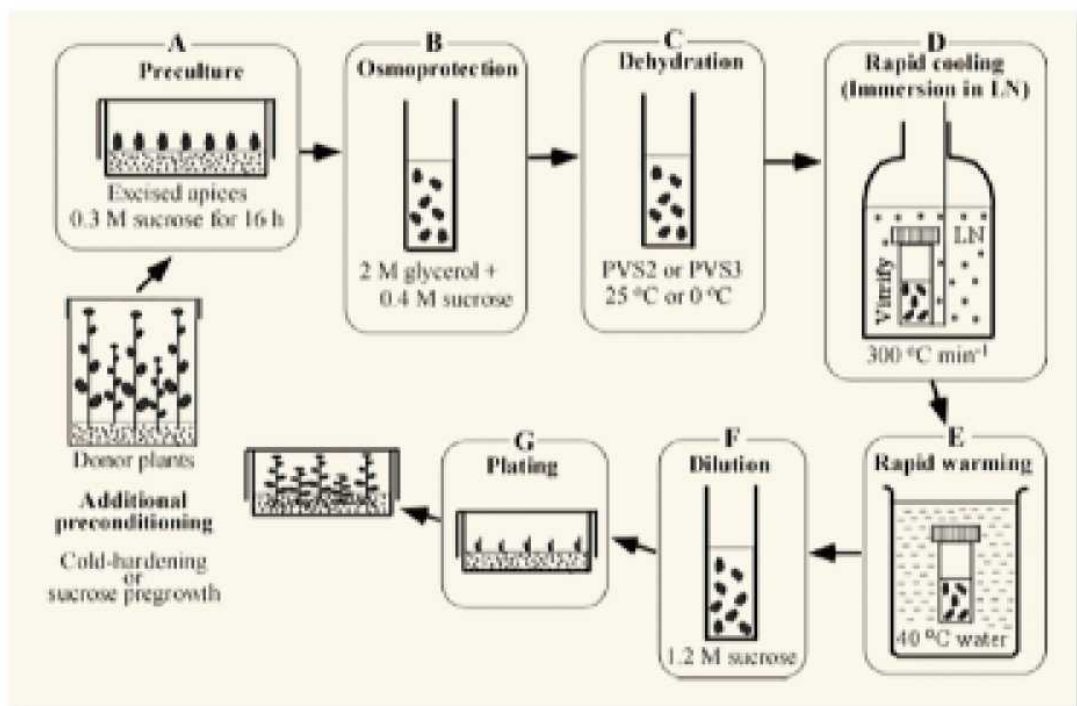
減低 PVS2 溶液對植物組織造成傷害等優點，但此法步驟較繁複，且乾燥時間較長，一般需4-6小時的處理。Suzuki 等學者(2005)以龍膽腋芽進行藻膠包埋乾燥法進行超低溫冷凍保存後，成功地誘導植株產生。

(三)藻膠包埋玻璃質化法

此法為結合前兩種技術之優點的處理流程，即植物組織先經冷馴化或高濃度蔗糖處理，藻膠包埋後使用LS溶液處理，再以PVS2溶液進行乾燥，快速置入液態氮保存一段時間後，再快速回溫，最後於回復培養基誘導植株產生。此法較藻膠包埋乾燥法有較高的存活率，且

表一、四種種原保存方法的優缺點

種原保存方法	優點	缺點
現場保存	即規劃保護區，直接就地保存物種，可適用於多數物種，使植物在原生地能保持原有的生長習性，且保護區也可為其餘物種的棲息地。	需要耗費大量的空間、人力及物力，無法預防天然災害、病蟲害或其它人為災害，且植物也可能因自身的雜交進化，使原種消失。
離場保存	將蒐集之種原進行保存，如種子基因庫，此法較為經濟，所需空間及人力較現場保存方法少。	無性繁殖作物不適用於種子保存，部分難貯型或大型種子也不易保存。
體外保存	適用於許多植物組織，利用試管內保存，無病蟲害及季節的限制，適合運輸及種原的交換。	需要空間及大量勞力，進行保存及繼代培養，需消耗大量能源及物力，且植物組織經多次繼代培養後，較易產生變異。
超低溫冷凍保存	將欲保存之植物種原，先經一系列的預處理，再把植物長期保存於液態氮中的保存技術，適用於許多植物組織，所需空間、人力及物力資源最少，長期保存較不易產生變異，也無病蟲害之問題。	需要對每種物種進行試驗，以找出最適當之處理流程。



圖一、玻璃質化法流程圖。(Sakai et al., 2008)

所需時間較短，但步驟較玻璃質化法為繁複。Hirai and Sakai (2003)以甘藷節間為材料，先置於含 0.5 mg L^{-1} BA(6-苻氨基嘌呤)的MS培養基中，培養14天之後，取其莖頂組織進行藻膠包埋後，經LS及PVS2 溶液處理，再置入液態氮中保存，經回溫後，置於回復生長培養基，待其再生成完整植株(圖二)。此外嘉義分所以甘藷台農 71 號為材料，利用此方法進行超低溫冷凍保存亦獲得再生植株(圖三)。

三、影響作物超低溫冷凍保存存活率的因子

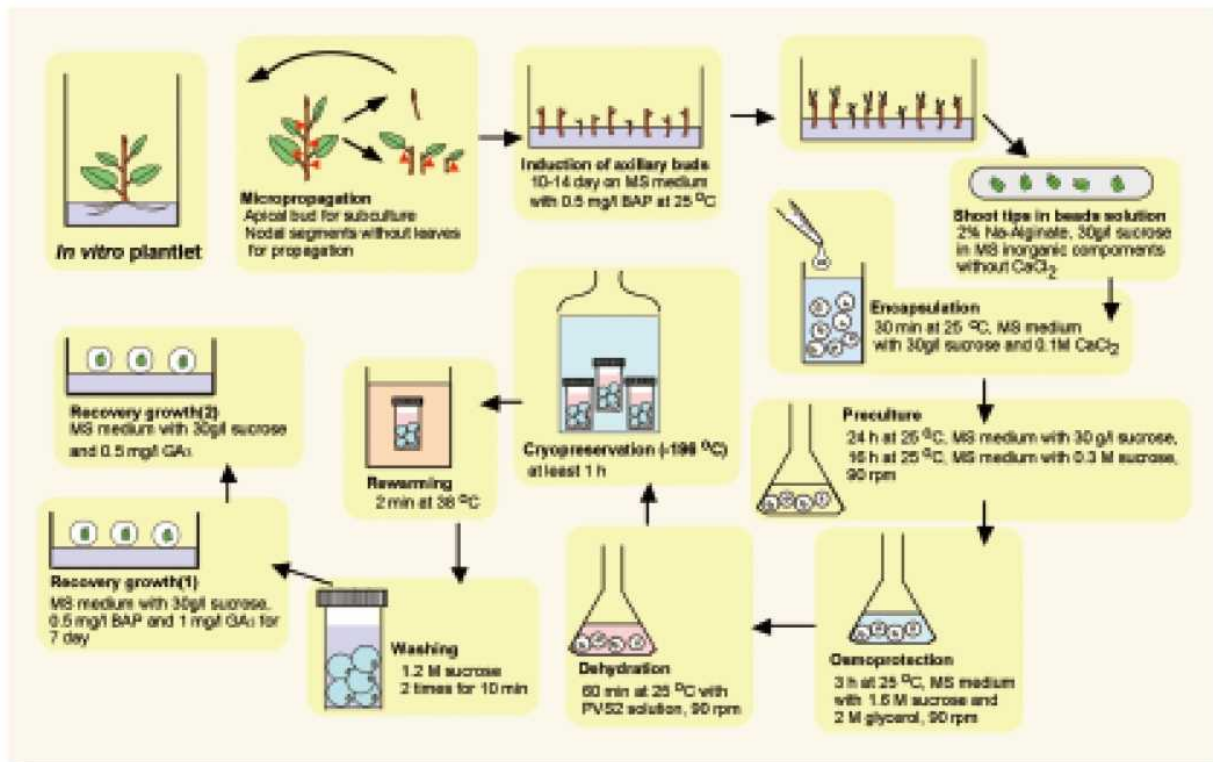
(一)預培養

預培養即植物組織進行超低溫冷凍保存前，進行各種處理，以提升植物組織的耐凍性，如培養基中添加 ABA(離層酸)、冷馴化處理或高濃度蔗糖培養基進行預培養。Pennycooke and Towill (2000)指出甘藷置於低於 14°C 的環境中，數天

後即呈現老化的現象，故熱帶作物不適用冷馴化方式進行預培養，但使用高濃度蔗糖培養基，可提升甘藷莖頂的耐凍性。以高濃度蔗糖培養基進行預培養，在許多品種已獲得成功的結果，如葡萄及康乃馨；但蔗糖濃度仍不可過高，以免造成植物組織死亡。



圖三、冷凍保存技術，經液態氮保存後，誘導再生植株產生的情形。



圖二、甘藷藻膠包埋玻璃質化法流程圖(Hirai, 2009)

(二)抗凍劑處理

目前常使用的抗凍劑有PVS2溶液及LS溶液。PVS2溶液為Sakai 等人(1990)所發表的抗凍劑，該溶液可降低細胞水分含量，減少細胞內冰晶的形成，降低細胞受傷的機率，以提升細胞經超低溫冷凍保存後的存活率。目前PVS2溶液在許多植物組織的超低溫冷凍保存技術中經常被使用，此溶液雖為有效的抗凍劑，但具毒性因此易造成植物組織死亡。有許多研究報告指出，進行PVS2溶液處理前，先使用LS溶液處理，可有效提升植物組織經超低溫冷凍保存後之存活率。以甘油加蔗糖所配置而成之LS溶液，為目前最廣泛使用的配方，如星辰花莖頂使用LS溶液，有效地提升植物存活率，因LS溶液能引起質壁分離的現象，可減少植物組織發生機械性的傷害；表二所列為三種不同抗凍劑的成分及優缺點，因此不同的作物可選擇不同的抗凍劑處理。

而抗凍劑處理的時間，亦為影響超低溫冷凍保存成功的關鍵因素之一。Matsumoto 等人(1998)指出星辰花莖頂以玻璃質化法，進行超低溫冷凍保存，其最適當之處理時間，為LS溶液30分鐘，PVS2溶液15分鐘，使植株存活率達最高。而以藻膠包埋玻璃質化法進行超低溫冷凍保存，其最適當之處理時間，為LS溶液30分鐘，PVS2溶液50分鐘，有最高之存活率。Hirai and

Sakai (2003)指出三種甘藷品種，使用藻膠包埋玻璃質化法進行超低溫冷凍保存處理，最適當的抗凍劑處理時間，為LS溶液3小時，PVS2溶液1小時，因植物品種或處理流程的不同而改變。此外在0℃下處理PVS2溶液，可減緩該溶液對植物組織的毒性，使操作者較易掌控整體流程，並可處理較多材料。除了PVS2溶液之外，尚有PVS3溶液，此為Nishizawa 等人(1993)所發表之抗凍劑，其成分為50% w/v甘油及50% w/v蔗糖，但目前仍以PVS2溶液較為普遍。

(三)降溫速率

降溫速率有階梯式降溫及快速降溫等2種方式，前者為逐步降溫後，再置入液態氮貯存，此法須有特殊設備，且對低溫敏感作物不適用。而後者則是直接將處理過之植物組織，置於液態氮中保存，此法不需特殊設備、方便且快速(許，1995)。故現今多使用快速降溫方式進行保存。

(四)回溫及回復生長

經液態氮保存後之植物組織，回溫速度需迅速，以防止冰晶的發生，避免傷害植物組織細胞，造成其存活率不佳。一般以25℃-45℃，處理2-3分鐘的溫水浴最適當，回溫後以1.2M蔗糖培養基處理洗去抗凍劑。經上述處理後，

表二、三種不同抗凍劑的成分及優缺點

抗凍劑種類	成分	優點	缺點
LS	2 M甘油 + 0.4 M 蔗糖 + MS 培養基	對植物組織不易造成傷害。	單獨使用效果不理想，仍需搭配 PVS2、PVS3，或使用操作台風乾或乾燥劑乾燥。
PVS2	30 % w/v 甘油 + 15 % w/v EG (乙二醇)+ 15 % w/v DMSO(二甲基亞砷)+ 0.4 M 蔗糖 + MS 培養基	已成功保存許多物種，易於操作。	對植物組織具有毒性，且配製較為繁複。
PVS3	50 % w/v 甘油 + 50 % w/v 蔗糖 + MS 培養基	配製簡單。	溶液濃稠，使用上較不易。

最後將植物組織再移至回復培養基中，待其再生植株。而植物生長調節劑的含量，亦為一影響存活率的重要因子(Reed, 2008)。Pennycooke and Towill (2000)以甘藷進行超低溫冷凍保存，於回復培養基中含 $1 \mu\text{M}$ NAA(奈乙酸), $0.5 \mu\text{M}$ BA 及 $0.1 \mu\text{M}$ kinetin(激動素)，可成功地誘導植株再生。Wang 等人(2000)指出回復培養基中含 1mg/L BA及 0.1mg/L NAA，使葡萄莖頂有最佳之再生率。顯示回復生長培養基的成分，因品種不同而有所差異。

四、結語

目前已有許多種作物成功地使用超低溫冷凍保存法進行種原的保存，如星辰花、康乃馨及甘藷等。因此超低溫冷凍保存為有效且可進行種原長期保存的一種保存方法，其中以藻膠包埋玻璃質化法較具潛力，雖然此法過程較複雜，但操作上可避免一些機械傷害，且植物組織不直接接觸抗凍劑，也減低抗凍劑對植物組織的傷害。但由於熱帶物種本身含有不耐寒之生理特性，故至今利用超低溫冷凍保存成功的例子仍非常少數，大多數仍為溫帶或寒帶物種，未來如何開發熱帶植物的超低溫冷凍保存技術，仍為值得研究之課題。

五、參考文獻

- 許圳塗. 1995. 作物種質體外保存系統. 作物種源保育技術研習會專刊. p. 69 – 80. 台灣省農業試驗所特刊第 55 號.
- Hirai, D. 2009. Cryopreservation by PVS2 solution. In: Seminar was on 4th, December 2009 at Taiwan Agricultural Research Institute.
- Matsumoto, T., C. Takahashi, A. Sakai, and Y. Nako. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of hybrid static by three different procedures. *Sci. Hort.* 76:105-114.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, and T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryonic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.* 91: 67-73.
- Pennycooke, J.C. and L.E. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. *Plant Cell Rep.* 19:733-737.
- Sakai, A. 1960. Survival of the twig of woody plants at -196°C . *Nature.* 185:393–394.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I.Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30-33.
- Sakai, A., D. Hirai, and T. Niino. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols, p. 35-47. In: Reed B.M. (ed.). *Plant cryopreservation : A practical guide.* Springer. New York.
- Suzuki, M., T. Akihama, and M. Ishikawa. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step - preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 83: 115–121.
- Wang, Q., E. Tanne, A. Arav, and R. Gafny. 2000. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 63:41-46.