

# 參加「植物遺傳資源體外與超低溫冷凍保存技術」國際訓練心得分享

## Brief report on the 8th in vitro and cryopreservation approaches for conservation of plant genetic resources training course

林如玲<sup>1</sup>

### 一、前言

氣候變遷及人類活動改變了土地的使用方式，自然棲地的過度開發與破壞，使物種的多樣性正急遽消失中。種原多樣性是作物遺傳改良的基礎，因此植物遺傳資源保存對於確保糧食安全，影響至關重大。在過往的經驗中有許多先例，提醒我們種原多樣性對人類作物安全所能提供的裨益。在 1930 年代美國加州甜瓜遭受白粉病嚴重危害，後自印度加爾各答 (Calcutta) 引進具有抗性的野生甜瓜種原，育成了第一個甜瓜抗白粉病品種 PMR45；印尼在 1970 年代因水稻皺縮矮化病造成西爪哇地區水稻大規模減產歉收，後自印度奧迪沙邦 (odisha) 的野生稻 *Oryza nivara* 中將褐飛蝨抗性基因導入栽培品種，提高了水稻對病毒的抗性。近期水稻抗淹水 (SUB1A) 和提高磷利用率 (PSTOL1) 的性狀導入，則源自印度傳統栽培品種水稻 FR13A 和 Kasalath。因此未來當面對環境可能的衝擊時，或許解答就仰賴在今日我們所保護的種原中。

### 二、植物遺傳資源體外保存

植物遺傳資源體外保存是指利用種子、營養繁殖體、組織、細胞、花粉、DNA 等植物來源進行長期保存，是極耗費空間、人力、能源的工作。傳統種原保存是將種子儲藏於低溫低濕的種子庫，但根據 FAOSTAT 統計，每年有超過 1,000 億美元產值的無性繁殖及不耐貯型種子作物，無法以此方式進行保存。近年來許多植物組織培養體外保存 (in vitro conservation) 及超低溫冷凍保存 (cryopreservation) 方法已被開發，除了可克服無性繁殖作物於田間種原圃保存，因氣候變遷所造成的產量不穩定及病蟲害等問題，超低溫冷凍保存更可減少種原保存的使用空間、耗費人力及降低組織培養繼代所產生的遺傳變異。因此許多國際組織提倡，希望能加快作物冷凍保存的發展和實施。

<sup>1</sup> 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

### 三、研習紀要

本次研習地點為印度新德里的國家植物遺傳資源局 (National Bureau of Plant Genetic Resources, NBPGR)，隸屬於印度農業研究委員會 (Indian Council of Agricultural Research, ICAR)，是植物遺傳資源專責機構，負責種原蒐集、交換、特性調查、種原檢疫等工作，配置有國家種子庫、國家植物組織培養保存庫、超低溫保存庫和 10 個氣候區的棲地保存站，目前也是世界第 2 大的作物種原保存中心。本次「第 8 屆植物遺傳資源體外和冷凍保存方法」國際訓練，由 NBPGR 與亞太農業研究機構聯盟 (Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, APAARI) 及生物多樣性國際中心 (Biodiversity International) 等共同合作，於 2019 年 11 月 5 至 19 日舉辦。訓練課程涵蓋授課及實作，希望增進學員對組織培養及冷凍保存技術於植物遺傳資源的運用，同時提供實務指導及經驗傳授。此次共有 22 位學員參與，分別來自 13 個國家，包括：阿爾及利亞、孟加拉國、臺灣、斐濟、印度、哈薩克斯坦、馬達加斯加、薩摩亞、塞內加爾、巴布亞新幾內亞、菲律賓、烏克蘭、烏茲別克斯坦。而講師主要為 NBPGR 的研究人員，並邀請植物遺傳資源保存領域多位著名學者，包括泰國瑪希敦大學的蘭花種原保存專家 Dr Kanchit Thammassiri、英國皇家植物園邱園的 Prof. Hugu Pritchard、比利時魯汶大學 Bioversity International 的 Dr Bart Panis、及 D-cryoplate 技術研發學者 Dr Takao Niino 等進行講課與實作指導。

### 四、超低溫冷凍保存技術介紹

超低溫冷凍保存是指將植物材料在超低溫冷凍庫 (-150°C) 或液態氮 (-196°C) 中保存，在超低溫下，植物組織的生理代謝停止，細胞維持在穩定狀態，減少遺傳變異的發生，但仍具備活力和形態發生潛能，因此被視為植物種原長期保存的安全、有效途徑。此技術的重要關鍵在於如何有效降低植物組織的含水量，以避免細胞脫水所造成的高溶質毒性及減少降溫過程形成冰晶而對細胞膜產生傷害。傳統方法使用慢速冷凍 (slow freezing)，逐步降低細胞含水量，降溫速度需控制在每分鐘 0.1-2°C，直到降至 -40°C 再保存於液態氮桶中。因需要使用特殊冷凍設備，費用昂貴，大部分機構無法負擔。目前新方法使用玻璃質化技術 (vitrification)，利用蔗糖、甘油、乙二醇、DMSO 等冷凍保護劑配方如 PVS2 及 PVS3 等，造成細胞適度脫水，並在瞬間降溫過程使細胞內液體轉成高黏稠的不定型玻璃狀化，避免了冰晶形成對細胞產生的傷害。體胚、不定芽及莖頂等組織是常被選用的低溫冷凍保存材料。

目前最常被使用的玻璃質化保存方法為液滴冷凍法 (droplet freezing)，及藻膠包埋玻璃質化法 (encapsulation-vitrification)，其基本操作包括將植物組織先預培養、進行滲透脫水調節、以 PVS2/PVS3 抗凍保護、快速液態氮保存、回溫及回復誘導產生植株。不同的是液滴冷凍法以鋁箔紙片取代冷凍瓶，使樣品的冷傳導速度更快，具有操作簡單、所需工具少且處理時間短之優點，但操作上須避免傷害到植物組織。藻膠包埋法以藻膠 (Na-Alginat) 將植物材料

包埋，可減少操作時對植物材料的機械傷害，但處理較為繁複。因這兩種方法在處理大量樣品時，相當費時且浸入液態氮過程常會造成樣本漂浮遺失，為克服此問題，Yamamoto 等人於 2011 年開發了玻璃質化冷凍鋁片法 (V-cryoplate)，將植物材料放置於特製的鋁片小孔中，再以藻膠固定進行後續處理 (圖 1)，操作更友善，並能減少樣品傷害及流失，且可對體積較大的材料進行保存，成功地應用在草莓、康乃馨、桑科作物等。此外由於冷凍保護劑會對部分植物組織造成細胞毒性，因此 2014 年 Niino 等人，延伸了冷凍鋁片的應用，開發了脫水冷凍鋁片法 (D-cryoplate)，利用在無菌操作台進行風乾取代 PVS2，達到含水量控制並維持植株良好的再生率。

## 五、超低溫冷凍保存的現況

Acker 等人曾在 2017 年對 15 個具有超低溫保存庫的國際機構進行調查，盤點 ITPGRFA 所匡列 64 種重要作物中不耐貯型種子及無性繁殖作物的保存方式，發現 66% 以田間種原圃保存，46% 以組織培養，而超低溫冷凍保存僅占 16%，且種類侷限在少數作物品項，又以馬鈴薯、樹薯、桑科作物及香蕉樣品數較多，顯示在實務上仍有很大的突破空間。分析這些機構在運作上面臨的困難包括了缺乏預算、有經驗的操作人員及可重現性的適用方法等。雖然現在已有約 200 個物種的冷凍保存方法發表，但實務上缺乏真正的標準方法，因此即使是同種作物間的樣品保存，不同樣品標的方法仍需進一步調整，需花費許多時間並有賴具有經驗的技術人員執行。幾個重要種原保存機構，其主要冷凍保存的作物種類及所使用的保存方法詳列如表一。



圖 1. 液滴冷凍法和玻璃質化冷凍鋁片法部分流程示意圖。

表一、國際重要種原保存機構的冷凍保存作物種類及所使用方法

機構名稱	國家	作物種類	冷凍保存方法
Bioversity International, Leuven	Belgium	Banana	Droplet vitrification
Crop Research Institute, Prague	Czech Republic	Potato, garlic, hops, mint	Droplet vitrification
International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali	Colombia	cassava	Droplet vitrification Encapsulation/dehydration
International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan	Nigeria	Yam, banana, cassava	Droplet vitrification
International Potato Center (CIP), Lima	Peru	Potato	Straw vitrification Droplet vitrification
Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an Obst, Dresden	Germany	Strawberry, Fruit trees	Vitrification Dormant bud freezing
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Genebank Department, Gatersleben	Germany	Potato, garlic, mint	Droplet freezing Droplet vitrification
National Agrobiodiversity Center (NAAS), RDA, Suwon	South Korea	Garlic	Droplet vitrification
Tissue Culture and Cryopreservation Unit, NBPGR, Delhi	India	Banana, chives, medicinal plants, berries, fruit	Vitrification Droplet vitrification Slow freezing Dormant bud freezing
USDA-ARS, Fort Collins and Corvallis	USA	Citrus species, grape, garlic, mint, fruit trees.	Vitrification Droplet vitrification Slow freezing Dormant bud freezing

## 六、結語

早年臺灣曾因氣候及宿根採收等因素損失大量珍貴甘蔗種原，近年極端氣候加劇，使田間種原保存因氣候不穩定及病蟲害問題面臨更多挑戰。因此，種原保存方式也須與時俱進。超低溫冷凍保存雖具有節省空間、人力、能源等優點，但後續的

種原庫維持，需要有長程的經費規劃及液態氮的持續供應，才能達到永續經營。經由其他機構的經驗發現，目前仍需建立更多物種保存的標準方法，而許多熱帶及亞熱帶作物，其本質不耐低溫和乾燥，超低溫保存方法亟待開發，未來應加強相關技術研究，並培養有經驗的操作人員，才能在實務運作上更加順利。