因應氣候變遷發展之農業技術–植物種原超低溫冷凍保存技術簡介(下)

農試所嘉義分所 陸柏憲 賴永昌

(接續上篇)

四、超低溫冷凍保存方法與研發歷程

植物超低溫冷凍保存的研究發展，最早可追溯至Sakai(1960)的研究，其利用程序冷凍器(programmable freezer)控制降溫速率，將耐寒木本植物枝條預冷凍至-30° C，再浸入液態氮中，並於0° C下緩慢解凍，結果成功保持枝條活性。於接下來的30年間，傳統超低溫冷凍保存技術如Slow freezing、Two–step freezing的研發進展，可成功應用於癒傷組織、懸浮細胞及耐寒物種的保存。植物低溫生物學的研究於1990年代發展迅速，推動以材料脫水(dehydrated)、玻璃質化(vitrified)為基礎的超低溫冷凍保存技術興起，如玻璃質化法(vitrification)、包埋脫水法(encapsulation–dehydration)及藻膠包埋玻璃質化法(encapsulation–vitrification)等。其優點在於材料經冷凍保護處理後可直接浸入液態氮中，無需控制降溫速率，適用於懸浮細胞、莖頂組織等材料，三種常見方法簡介如下：

(一)玻璃質化法：材料首先加入高濃度冷凍保護劑，使細胞水分於低溫下固化成玻璃態(glass state)，避免冰晶產生。冷凍保護劑以高滲透性的PVS2(plant vitrification solution 2)使用最為廣泛。由於冷凍保護劑的滲透濃度高，長時間處理將毒害細胞，因此調控處理濃度及時間為提高材料存活率之關鍵。

(二)包埋脫水法：材料先以藻膠(海藻酸鈉, sodium alginate)包覆，並以蔗糖填充(loading)處理，置於無菌操作台脫水風乾，再以液態氮凍存。此法優點為僅用蔗糖做冷凍保護劑，不經PVS2處理，可避免玻璃化液對材料造成傷害，然而處理步驟繁瑣、風乾時間較長為其缺點。

(三)藻膠包埋玻璃質化法：結合上述兩法而衍生，材料以藻膠包埋後加入PVS2，再置入液態氮凍存。此法較包埋脫水法有較高存活率，且可節省風乾脫水之時間，但處理步驟較為繁複；而因材料不直接觸及抗凍劑，可減輕材料所受傷害。嘉義分所亦利用此法成功進行馬鈴薯超低溫冷凍保存(圖四)，試驗結果顯示凍存後存活率可達

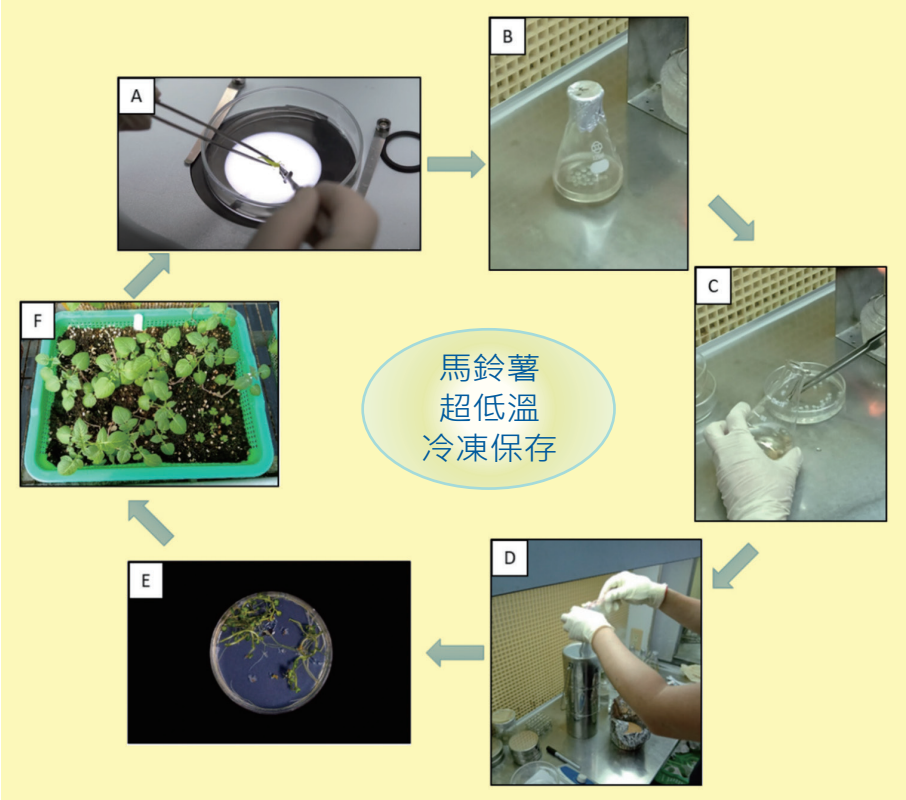
作　　者：陸柏憲助理研究員
連絡電話：05-2753182

70%以上，且存活培植體可再生成完整植株。

Panis等學者(2005)發表液滴玻璃質化法(droplet–vitrification)，於超低溫冷凍保存的研究歷程中立下新的里程碑。材料處理同於前述玻璃質化法，但操作過程中材料置於鋁箔條(aluminum foil strips, 5 × 20 mm)(圖五A)上，且僅使用一滴冷凍保護劑(約15 μl)，再將鋁箔條放入液態氮中保存。此法由於冷凍保護劑的體積小，且直接浸入液態氮中，材料於鋁箔條上達極高之冷凍速率，可顯著提高材料凍存後之存活率，目前各種原保存機構多採用此法進行種原長期保存。

玻璃質化法操作中材料需不停反覆移動，易造成材損傷和遺失，Yamamoto等學者(2011)設計帶有凹槽的冷凍鋁片(aluminum cryo–plates, 7 × 37 × 0.5 mm)以固定材料(圖五B)，衍生以冷凍鋁片為基礎的凍存技術，分別為V cryo–plates法及D cryo–plates法。兩法操作流程相近，材料置於鋁片上凹槽再以藻膠包覆材料。於脫水階段，V cryo–plates法利用PVS2；D cryo–plates法利用風乾方式，最後保存於液態氮中。此技術優點在於材料固定於冷凍鋁片上，減少材料受傷或損失的比率，且降溫和回溫速率極高，可增加材料凍存後存活率。

另外，由Funnekotter等學者(2017)發表以不鏽鋼網條(stainless steel mesh strip) (圖五C)為基礎的cryo–mesh法，為近年超低溫冷凍保存研究取得新進展。材料固定於不鏽鋼網條(25 × 7 mm, 孔距0.4 mm, 線徑0.224 mm)上進行操作。



圖四、應用藻膠包埋玻璃質化法進行馬鈴薯超低溫冷凍保存。A:建立馬鈴薯離體材料。B:進行藻膠包埋。C:進行抗凍保護處理。D:超低溫冷凍保存。E:材料進行回復培養。F:成功再生成完整植株。

學者成功利用cryo–mesh法進行袋鼠爪草(*Anigozanthos viridis*)的超低溫冷凍保存，為未來作物種原長期保存的利用提供新方向。

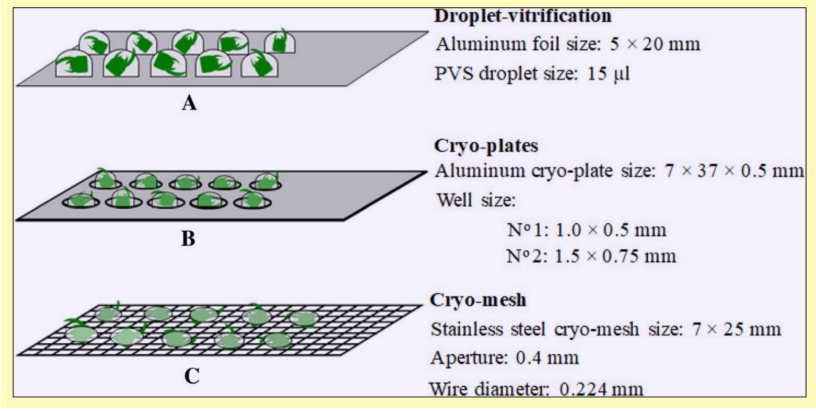
五、全球種原保存機構應用情形簡介

全球各大洲皆設有種原保存機構，除進行原地及異地保存外，尚建立體外保存基因庫(*in vitro* gene bank)做為安全備份，避免不利因子影響，維持遺傳資源穩定性。然而，實際應用超低溫冷凍技術進行長期保存的機構不多，僅少數國家擁有超低溫基因庫(cryogene bank)。根據Acker等學者(2017)報告，全球15個種原保存機構中，田間保存方式占比最高(66%)，離體保存次之(46%)，而超低溫冷凍保存僅占16%。就作物別而言，應用超低溫冷凍保存佔比最高之前三項作物分別為馬鈴薯(38%)、樹薯(22%)及桑樹(12%)，可見國際間對於超低溫冷凍保存之應用仍有大幅發展空間。以下簡介全球各機構種原收集之作物類別及超低溫基因庫應用情形(表二)：

(一) 國際馬鈴薯中心(International Potato Center, CIP)，主要負責收集保存甘藷、馬鈴薯及安地斯根莖類(Andean roots and tubers)等種原。CIP保存超過11,000份種原收集系，其中約4,500份以離體方式進行保存。自2013年起，CIP開始應用液滴玻璃質化法進行超低溫冷凍保存，且預計逐年增加400份馬鈴薯種原，CIP的超低溫基因庫迄今已保存4,068份馬鈴薯與324份甘藷種原。

(二) 國際熱帶農業研究所(International Institute for Tropical Agriculture, IITA)，收集保存非洲主要糧食作物種原，包含豇豆、樹薯、香蕉、山藥、大豆、玉米及班巴拉花生等，總計超過35,000份種原收集系。自2017年開始，IITA已應用液滴玻璃質化法進行樹薯種原保存。IITA的超低溫基因庫預計於2022年保存1000份樹薯及500份山藥種原。

(三) 國際運傳中心(International Transit Centre, ITC)，收集保存超過1500種可食用及野生種芭蕉屬(*Musa* spp.)種原，為全球香蕉遺傳多樣性最豐富的機構之一。ITC主要利用田間、體外保存方式進行芭蕉屬的種原保存，其中約有1100種已利用液滴玻璃質化法進行超低溫冷凍保存。



圖五、不同種類的冷凍鋁片。A：鋁箔條。B：冷凍鋁片。C：不鏽鋼網條。圖片來源：Wang *et al.* (2020)。

(四) 國際熱帶農業中心(International Center for Tropical Agriculture, CIAT)，迄今保存37,938份菜豆屬(*Phaseolus*)、22,694份熱帶飼料作物(豆科、牧草)及6,155份樹薯等種原，其中樹薯以田間及體外保存為主。CIAT已凍存超過480份樹薯核心種原(core collection)，主要以液滴玻璃質化法及包埋脫水法為主，而近期朝樹薯野生近緣種之凍存技術發展。

(五) 國家植物種原系統(National Plant Germplasm System, NPGS)，為美國農業部–農業研究局(United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service, USDA–ARS)所屬系統，負責美國重要農業植物遺傳多樣性之保存及利用。NPGS迄今已保存244科，2,554屬，16,163種，總計近60萬份作物種原。於超低溫基因庫方面，NPGS保存近4,000份種原包含大蒜、草莓、甘藷、馬鈴薯、薄荷、櫻桃、梨及蘋果等，凍存方法則以液滴玻璃質化法(莖頂組織)及緩慢冷凍法(果樹休眠芽)為主。

(六) 萊布尼茨植物遺傳與作物研究所(Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, IPK)，已保存776屬，2,933種，總計近15萬份種原。IPK之種原皆以乾燥種子型態保存於-18℃，而無性繁殖作物以離體保存為主。目前IPK的超低溫基因庫已保存超過2100份種原，包含1818份馬鈴薯、157份薄荷、及213份蔥屬(Allium)等

表二、國際種原保存機構應用超低溫冷凍保存之主要作物、保存數量及方法

國家	機構名稱	主要作物	保存數量(accession)[z]	方法
祕魯	國際馬鈴薯中心(CIP)	馬鈴薯	4,068	液滴玻璃質化法
		甘藷	324	液滴玻璃質化法
奈及利亞	國際熱帶農業研究所(IITA)	樹薯、山藥	(試驗中)	液滴玻璃質化法
比利時	國際運傳中心(ITC)	芭蕉屬	~1,100	液滴玻璃質化法
哥倫比亞	國際熱帶農業中心(CIAT)	樹薯	~480	液滴玻璃質化法
美國	國家植物種原系統(NPGS)	大蒜、草莓、甘藷、馬鈴薯、薄荷、櫻桃、梨及蘋果	~4,000	液滴玻璃質化法、緩慢冷凍法
德國	萊布尼茨植物遺傳與作物研究所(IPK)	馬鈴薯	1,818	液滴玻璃質化法
		薄荷	157	
		蔥屬	213	玻璃質化法
南韓	國家農業生物多樣性中心(NAC)	蔥屬、馬鈴薯、百合屬、蘋果屬、甘藷、菊屬、草莓	1,558	液滴玻璃質化法、緩慢冷凍法
日本	遺傳資源中心(NGRC)	桑樹	1,283	緩慢冷凍法
		馬鈴薯	310	
		蘭草	181	V cryo–plates法
印度	國家植物遺傳資源局(NBPGR)	桑屬、芭蕉屬、蔥屬	~10,000	液滴玻璃質化法、緩慢冷凍法

資料來源:各機構發表之研究報告、年報、數據庫及官網公告內容，筆者統整製表(製表日期:2022年2月)。

[z]保存數量為製表日期當月數據，惟即時保存數量可能因各機構研發進展而變動。

作物，主要凍存方法為液滴玻璃質化法及玻璃質化法。

(七) 國家農業生物多樣性中心(National Agrobiodiversity Center, NAC)，為韓國農村振興廳(Rural Development Administration, RDA)所屬單位。NAC目前保存農園藝、特用及飼料作物種原之種子24萬份、無性繁殖作物達26,000份。NAC的超低溫基因庫自2006年起陸續保存7種作物種原，目前已達1,558份(包含1,104份蔥屬、68份馬鈴薯、196份百合屬、48份蘋果屬、36份甘藷、86份菊屬及20份草莓)。

(八) 日本國家農業與食品研究機構(National Agriculture and Food Research Organization, NARO)所屬遺傳資源中心(NARO's Genetic Resources Center, NGRC)，迄今保存近23萬份種原，包含禾本科、豆科、根莖類、飼料、蔬菜、果樹、花卉等，主要透過種子儲藏；其中近3萬份種原為無性繁殖作物，主要利用田間及離體保存。目前NGRC的超低溫基因庫中保存1283份桑樹種原(休眠芽)、310份馬鈴薯、181份藺草(mat rush)等作物，主要利用緩慢冷凍法及V cryo–plates法。

(九) 國家植物遺傳資源局(National Bureau of Plant Genetic Resources, NBPGR)，為印度農業研究委員會(Indian Council of Agricultural Research, ICAR)所屬單位。NBPGR為全球種原保存數量最豐富的機構之一，僅次於美國NPGS。目前已收集種原涵蓋812屬，2,020種，包含禾穀類、豆科、蔬菜、果樹、纖維料、飼料、藥用及辛香料作物等，總計近40萬份種原；而目前NBPGR的超低溫基因庫中已保存近1萬份種原收集系，主要為桑屬(休眠芽)、芭蕉屬及蔥屬(液滴玻璃質化法)作物。

六、結語

種原收集與保存是農業調適技術中關鍵的一環，現行方法多以田間、離體保存為主，僅可作短(中)期保存。而超低溫冷凍技術可保存小體積材料，節省人力及空間，避免外界環境危害，並保持高度遺傳資源穩定性，為種原長期保存的理想方法。目前國際間種原保存機構皆有應用實例，且凍存種類及數量將逐年增加，積極開發不同作物的凍存技術為未來發展趨勢。就現階段之進展而言，多以溫帶作物有較多成功案例，而熱帶或亞熱帶作物因植物本質較不耐低溫，存活率普遍偏低，仍有待進一步突破。台灣因氣候及地理環境特殊，擁有豐富的熱帶及亞熱帶作物種原，可針對此項優勢加強相關作物凍存技術的研究。參閱目前國內有關超低溫冷凍保存的文獻，台灣在林木、藥用、蘭花、無性繁殖等作物上已有諸多成果，顯示台灣在此領域的研發上已奠定穩固基礎，未來如何參考各國經驗，實際建立超低溫基因庫，應用於種原保存的任務上，為台灣下一階段需努力的目標。