作物種質體外保存系統

國立台灣大學園藝系
許 圳 塗

一、種質及遺傳資源

種質（germplasm）爲指構成一物種基因組遺傳歧異（genetic diversity）之總和。遺傳歧異爲演化事件之累積，其內含試就縮小以單一基因小族（genefamily）爲例來說明，高等植物其基因組（genome）所含有相同構造及作用的基因常重複有多拷貝，可能爲連鎖或分散於不同染色體。基因小族之歧異化可分爲兩方向，從拷貝數放大或縮小，及基因間變異與差異性表現，此歸之爲垂直歧異化（vertical diversification）。一物種其垂直歧異經演化及自然壓力選拔後，大體上呈保留性，但組成員基因內仍持續發生歧異化。各別重複基因微突變爲許多交替型，呈多態型之等位基因分佈於種內族群，其雖同具相同作用機能，但在質與量性表現會有所差異，造成多態表現型，基因內多態型變異歸之爲平行歧異化（parallel diversification）。垂直與平行兩方向的交錯歧異化，加上有性生殖之重組作用是爲造成生物遺傳變異主要原動力，並由時空的隔絕效應而持存於物種不同族群內，此就是所謂的遺傳資源（genetic resource）。

栽培作物種質（cultigen）仍衍自於野生種，經人類引栽爲馴化種及地方種，相對地其族群非均一性，此作物種較富遺傳變異。而後分離品系經選拔改良爲高級栽培種(cultivar)，再經特定性狀改良而成爲新近栽培種（advanced cultivar）。由馴化種至進階栽培種，其遺傳歧異度爲呈倒金字塔型，此一系列的種源是爲狹意的遺傳資源。植物遺傳資源從原始種、相關種、亞種及變種等，是爲廣義的植物遺傳資源，其歧異豐富度爲呈金字塔型。從可利用屬性遺傳資源概括有三層次；初級基因園（primary gene pool），種內及近緣種之種質，可藉由傳統育種方法，有性生殖途徑交配組合引用，並能由有性生殖重組與持存，此可利用遺傳資源歸爲初級基因園。但種內種質利用並非就無障礙，如菜豆（*Phaseolus vulgaris*），帶有 DL_1 及 DL_2 之生態型群，若交配會產生雜交一代弱勢（F_1 - weakness），因兩基因互補效應，植株矮小無後裔，甚至致死性。此只是兩基因座的歧異化，但可藉由溫度調控及嫁接技術矯正遺傳失序（genetic disorder），而得續重組與持存。反之，從形態上及細胞學上差異很大的不同種，如拔蕉（*Musa balbisiana*）n = 11 與馬尼拉蕉（*M. textilis*）n = 10，另例爲金花石蒜（Lycoris aurea）n = 7 與紅花石蒜（*L. radiata*）n = 11。基因組之染色體由於重排而造成數目變化，基因組可容性或親緣性（genome affinity）佳，種間可交性及後裔可稔性仍然强，故此細胞遺傳歧異的種質仍可列之爲近緣種原。

次級基因園（secondary gene pool），相關之遠緣種（distant species）或相關屬的種源，遺傳距離大，遺傳分歧早，或種化後歧異化强，需經由特殊技術克服其雜交受精前後之生殖障礙，得以組合利用。經組合之兩基因組其相容性較弱，並需以無性繁殖維持之，但其稔性需以大量授粉及多世代回交，或基因組加倍處理而得提高或恢復。相對地，此利用困難度增高之種源歸之爲二級基因園。以目前初級基因園資源利用程度相當全，加以育種技術的提昇，次級基因園第二層次材料在育種上更顯得重要。例百合屬受人喜愛的卷瓣亞節（Archelirion）或 Sinomartagon，但其不耐熱及晚熟性，經由體外受精或子房培養可與鐵炮型亞節（Leucolirion）雜交，兩方之優良性狀幾全可顯性表現於一體。同科不同屬間資源許多仍具可利用潛力，此在石蒜科，百合科或禾本科有許多成功事例。無性繁殖作物其次級基因園之資源有特殊用途，不經有性生殖直接取用於嫁接繁殖，藉由穗砧交感作用之嫁接效應，改善多重栽培性狀，提昇生產及管理效率。

生物歧異基因園（biodiversity gene pool），無親緣關係種源，不具基因組相容性，無法以有性生殖途徑達成組合之生物資源。但高度歧異化生物種間往往具特有之優良性狀基因，個別基因可藉遺傳工程而加以引用至作物種，此無親緣關係種質可歸爲第三層次遺傳資源。由於體外細胞育種（*in vitro* cell breeding）之生物技術，如體細胞融合或胞器融合，打破親緣之藩籬，得到融合株（fusoplant）或胞質雜種（cybrid）。生物歧異基因園，爲指無親緣關係種質，泛括原核微生物或其它動植物。對高階栽培種改善並非調動其整個基因組，整個異源基因組更換或組合在實用上價值性並不高，只需改良或選擇性引入少數性狀基因。遺傳工程基因技術可分離出其基因完整 DNA 段節，再經基因重構築或點突變修正之基因，導入細胞並嵌接至受體基因組內，再由此遺傳轉型細胞再生爲基因轉殖植物（transgenic plant）。

二、無性繁殖作物種質及體外保存系統

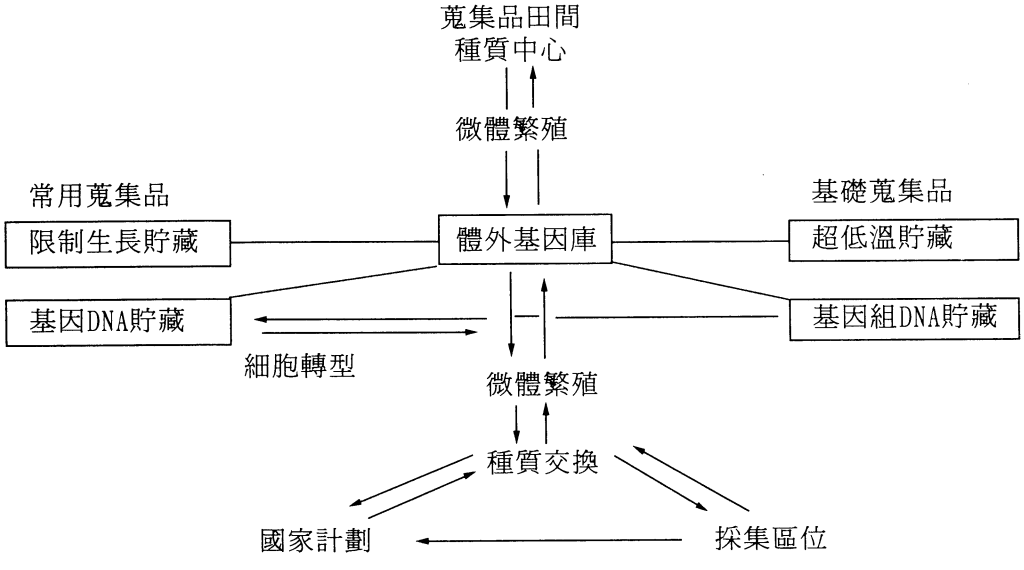
遺傳資源歧異的形成與累積是爲難予複製及珍貴的演化事件，但由於人類生活空間及產業之拓展，對生育地的剝奪，迅速造成遺傳侵蝕。而人爲偏向之選拔與利用及栽培系統改變等之衝擊，亦造成作物遺傳背景偏窄，因此遺傳資源維持與保存是爲急迫性之義務與權利。經濟作物相關種質保存策略需依循植物與育種目標，能達成經濟、穩定及高保存效率爲原則。種質保存法依作物類型及保存制度性質可分爲三大系統：㈠現場保存（*in situ* conservation），優先考慮種源爲危險種、稀有種及固有種或母樹種，保護留存於原生育地，若爲歧異中心則宜規劃保留大面積爲自然保育區。㈡離場保存（*ex situ* conservation），探索蒐集的種質離場保存，可分爲種子基因庫（seed genebank）、花粉基因庫（pollen genebank）及營養系種質庫（clonal germplasm repository）。前兩者爲取種子或花粉爲保存體，藉休眠或休止作用，室內乾燥低溫貯藏保存，後者在農業生態下田間或溫室生長保存。㈢體外保存（in vitro conservation），以組織培養技術，取小植株、器官、組織、細胞或 DNA 爲保存體，無菌保存於試管內，限制生長或超低溫貯藏，維持其活力及再生潛力或複製能力。

種子或花粉基因庫爲最經濟有效遺傳資傳保存方法，並適合中長程貯藏。但無性繁殖作

物如多年生作物或宿根性之球根作物，其遺傳組成高度異質化，且幼年期性長，利用種子保存易失去原有生長屬性。另短壽命種子如熱帶果樹、堅果類（nuts）及椰果類（palms）,種子對脫水及低溫敏感，種子壽命常短於一年，故難貯藏性種子（recalcitrant seed）或大型種子無法供當種質保存。另有生殖障礙或不稔性作物，如重瓣花或三倍體香蕉欠缺種子生產。是故無性繁殖作物需採行田間營養系種源保存，但就單一作物相關之種質包括初級及次級基因園歧異之規模，平均所需培育面積超過一公頃。多樣化歧異種源無法在同一農業生態環境下生長適應，常需用低海拔及中高海拔種源圃。美國則以作物區及緯度，則分設十處營養系保存中心。另田間保存易受天然逆境災害及病虫害之侵襲，造成遺傳侵蝕嚴重。因此無性繁殖作物種質需有交替維持及保存系統，以確保遺傳資源保育之完整性，及發揮種質育種及栽培利用機能。

利用植物營養器官、組織、細胞或基因組 DNA 及基因 DNA 順序爲保存體，存於無菌容器內，添加培養基或保存劑，或控制條件限制生長，但仍維持活力、複製及再生能力。體外保存爲建立在組織培養技術基礎上，故需先熟悉基本培養操作，各參試作物及品系形態發生能力及再生途徑，確定遺傳穩定性。體外保存的優點；所需空間小、人力及物力節省，如葡萄保存 800 個栽培體，田間營養保存庫需二公頃，而體外保存則只需數平方公尺。木薯每一批蒐集品 5 試管重複需 5×14 cm，保存6000蒐集品依估算只要 5×6×3m 保存室。控制其環境適合各歧異化種質保存，沒有農業區生能適應之限制。少有天然災害及病虫害之遺傳侵蝕問題。試管內保存很適合運輸及種質國際交換，其爲健康繁殖無病株在檢疫及利用甚爲方便。

體外保存系統大體上可分爲，㈠限制生長貯藏，常用材料 (active collection) 短、中程度種質保存。㈡超低溫貯藏，全套收集材料長程種質保存。㈢DNA 基因庫 (DNA genebank)，基因組或 DNA 片段長期保存。如圖一所示，初級基因園及部份次級基因園利用頻度高，適



圖一、無性繁殖作物種質體外保存與利用系統

合採用慢速生長貯藏，隨時可配合研究、評估及育種使用需要。而全套蒐集材料 (base collection），確保種質遺傳歧異之持存，則雙重進行超低溫貯藏。第三系統爲針對生物歧異有利之 DNA 基因順序貯藏，可供當常用材料品，隨時可供當研究細胞遺傳轉型利用。而生物歧異基因組 DNA，則爲長程貯藏，並供研究之需。

三、短中程種質體外貯藏

種質體外短中程體外保存，大部份採用小植株（plantlet）或營養器官限制生長保存於簡單培養基，一生長周期能維持一年左右，繼代培養（subculture）保存多世代，常用材料（active culture）此保存方式稱之限制生長貯藏（slow，minimal growth storage）。此適合大部份無性繁殖作物，國際間已建立保存系統者如大宗球根作物、馬鈴薯、百合、甘薯、木薯及甜菜等。草質性果樹有香蕉、草莓及鳳梨等，溫帶果樹如蘋果屬、桃李屬及葡萄等，特用作物如咖啡、可可及油椰子等。

1. 微體繁殖及莖頂培養

體外綠株種質保存，首先需建立其再生系統及適合不同品種培養基。起始培殖體大多選用具形態單極之莖頂或單芽節等，莖頂培養其特色；爲增生能力强，再生途徑可分爲預生芽再生、側芽增生法、直接不定芽發生或間接不定芽再生等，爲確保遺傳穩定性，宜避免採用逆分化間接再生。莖頂分生組織（0.3 ㎜ 左右）之再生株，可供健康繁殖達脫毒作用。莖頂培養不易再生成活者，如柑桔則可選擇微嫁接方式來達成之。莖頂培養發根困難者如蘋果可藉白化處理改善其發根能力。因成年期性難再生者，亦可採用體外復幼（in vitro rej uvenation）方法，培殖體或再生體生理逆轉爲幼年期性改善其再生能力。復幼再生與實用保存是有衝突性，儘可能保持有成年期性，例如莖芽節貯藏，保存後培養萌芽枝梢，直接嫁接法利用。培養基常用 MS 或 WPM 配方，對鹽鹼度敏感者如石楠科或茶科植物，可將主要物鹽類濃度減半。增殖之配方需較高濃度 cytokinin 如 BA，kinetin（0.5-5.0 mg/l），及補充中强性生長素如 IAA 或 NAA（0.5 - 2.0 mg/l）。保存體利用莖頂培養，使用之生長調節劑宜以最低有效濃度爲準。貯藏前組織培養微體繁殖利於建立營養系，每一批材料或營養系重複株數至少 10 小植株。保存後微體繁殖增生株群，可供種質交換，育種改良及相關研究利用。若參試之樣品之再生能力及方法皆已確立，起始培植體營養系莖頂最好直接貯存培養，但每一品系保存體重之重複數需加倍至 20 個左右，剔除污染或壞死者，最後至少保留 5 至 10 重複。

2. 綠株限制生長保存

小植株本身是爲獨立個體，保存時提供成活條件，但限制其生長，不影響其離瓶後正常生長與發育。限制生長保存方法，其與微體期之加速生長與增生目標正好相反，加速繁殖如莖梢培養叢生枝增生，約每三個月需繼代培養，細胞培養甚至 10－14 天就需要繼代培養一次。繼代培養操作對大批種質保存而言是爲一大負擔，如何延遲繼代培養周期，成爲短中程保存可行性之關鍵因素。遺傳性緩慢生長者，在體外同樣可遲滯生長。咖啡由莖

頂所誘長出的小植株，貯存於不含蔗糖之 1/2 MS 培養基，26 ℃ 及 4000 lux 光照，其一保存世代可達兩年半。而一般試管內生長旺盛者，阻緩生長不外乎爲施加生長逆境條件，控制培養基營養、水份、氣體及化學成份等因子。可對常用材料，控制最低生長，延長繼代培養週期，可供種質中程貯藏。限制生長貯藏常用方法如下；

㈠溫度：大部份小植株生長速率與溫度呈正比關係，降低貯存溫度爲最有效阻緩生長因子。溫帶型或冷季型作物如蘋果，葡萄及草莓以 2 - 10 ℃，可貯存一年以上。熱帶型無性繁殖作物在 10 ℃ 以下低溫易發生寒害，如香蕉、咖啡及木薯常保存於 14 - 20 ℃，一個貯存世代亦可維持一年左右。百合種源在亞熱帶許多地方無法以田間保存，但以體外慢速生長貯藏於 18 ℃，參試 33 種，每一保存代可延長 12 - 14 個月，經五年的繼代培養，保存效率非常良好。

㈡滲透壓調控：提早培養基滲透壓逆境，常參試低毒性滲透壓劑有蔗糖 (3 - 9 %)、mannitol 或 sorbitol（ 0.025 - 0.25 M ）及一些五碳醣等。香蕉不定芽誘導於半固態培養基，在含較高膠化物洋菜 10 克 / 1 升，誘使不定芽朝向芽球肥大生長而不抽葉，水份境生長之芽球活力可維持 10 個月以上。另報告指出香蕉莖頂經健化培養後，在含 3 % ribose 溶液，17 ℃ 條件，第一代保存培養 3 年出仍具 50 % 活力。

㈢光源控制：小植株或芽體是可在黑暗完全異營白化生長，如草莓貯藏於 4 ℃ 及暗處貯存週期可達六年仍具活力，但每三個月需補充營養液。綠株限制生長提供最低生長條件，保持半自營性生長，則需補充光源，低溫貯藏者照光强度在 200 lux 以下。而涼溫（ 14 - 20 ℃ ）貯藏者，如咖啡及香蕉則調控光源爲 2000 至 4000 lux。有關光質及光週對延長貯藏期限效應則尙待探討之。

㈣生長調節劑：限制莖梢體外生長，不中止其莖節形態發生，但抑制其節間及葉片伸長，是有助延長保存週期。莖頂增生所使用含 cytokinin 及低量生長素之配方亦常用於保存利用，配合其它物化限制因子，降低增生速率，但仍維持短縮莖之生長。唯需注意不當生長調節劑用量，往往會有形態生理殘留效應，如玻璃質化或定植後之叢生習性。外加賀爾蒙 ABA 0.5 - 3.0 mg/l ，亦可延緩生長或達誘導性休眠。

㈤生長抑制劑：抑制小植株生長之合成化合物可分爲兩類型，其一作用如 GA 抗阻劑，限制節間伸長、葉片伸長，但不干擾葉原體發生，在香蕉以 ancymidol、palcobutrazol 及 uniconzole（ 1 - 5 mg/l ）最有效，唯後者毒性較强。第二類類似 ABA 作用之抑制劑，減少葉原體發生，但對限制伸長作用不明顯，如 CCC 及 PCIB（ 5 - 50 mg/l ）等。

3. 體外保存管理與檢測

體外保存沒有田間自然災害及病虫害問題，但仍需注意保健問題。培植體選擇莖頂爲比單節芽易表面消毒，攜帶內生病原菌或病毒機會亦減少，母株或小植株最好須經病原檢定測試，確保爲健康繁殖。切取培殖體培養並直接提供保存時，起始保存體數目重複加倍，培養後確定成活並無內外污染，最後保存數目再減半。另爲長時間保存培養仍有可能二次感染，如黴菌或蟎類（ mites ）侵擊，需定期巡檢，移除銷毀污染瓶。培養室保健亦很重

要，安全溫調控制，溫度控制，空氣過濾無塵，並定期消毒。

保存期間培養基會耗盡，或會蒸散乾縮嚴重，則需再加補充。一般在低溫下限制生長條件，培養基是可持存一年左右仍不需補充。有些因乙烯或根分泌累積而自毒化，會落葉及梢枝漸壞死。，需定期檢查，保存的小植株需生長正常無失去活力，小植株若有玻璃質化生長，此表示培養物化條件不適當，需加修正改善。

貯存之蒐集材料需有代表性，建檔有形態特性資料，並需確証保存之遺傳穩定性。無性繁殖作物是有可能帶有預存嵌鑲變異細胞，細胞學嵌鑲體是較易檢定出，有些突變則有賴生化標誌及 DNA 指紋法偵測之。另後生性之突變，除跳動因子遺傳因素造成變異外，培養化學因素亦可能引起後生性之變異。再生途徑與體細胞變異頻率往往有相關性，莖頂預生芽體爲保存體是最可靠，逆分化再分化途徑其發生頻率則會增加，直接不定芽再生則宜減少繼代增生之代數。保存用培養基基本養水份及碳源外，其他化學成份儘可能降低濃度，或避免使用之。

四、種質超低溫長程保存

基礎蒐集材料（base collection），以其器官、組織、細胞或原生質體爲保存體，經前處理及加抗凍保護劑，貯藏於超低溫 (-196℃) 之液態氮，促使生理代謝完全中止，但仍能維持活力狀態，是謂超低溫保存 (caryopreservation)。超低溫貯藏在建立種質基因庫之特色，種質繁殖體貯存不需繼代培養，遺傳穩定性較高。保存體可縮小爲小器官，組織或細胞，節省空間及人力。一但保存體在超低溫下能成功存活，理論上其活力就夠延續相當長的時間，因此可供種質長期保存之用，尤其適合大量基本材料種質之保育。本法除需克服凍藏活力之維持，並需具備再生潛力，在操作技術上比限制生長保存複雜些。

一般生物材料只有很少例子，能在冰點下溫度細胞活力不受影響。而熱帶性植物組織或細胞在 10 ℃以下，或冰點上溫度便會受到傷害。但自從發現抗凍保護劑（Cryoprotectant），如 PEG 及 DMSO 對動植物細胞皆有防凍害效果，使之在 -196 ℃ 超低溫仍具活力，成爲組織細胞貯藏技術上一大突破。超低溫貯藏操作三大基本要則，爲增强繁殖體在降溫過程之抗耐性，消減於冰點溫度下冰核及冰晶形成，及減少除凍時冰晶再生（recrystallization）。細胞內外之冰晶化（crystallization）程度直接造成細胞機械傷害，同時會使細胞嚴重脫水與變形傷害。但此物理傷害是可預先馴化調整，如緩和細胞內外之冰晶發生，增强原生質膜穩定性，並降低胞質冰核化（nucleation）溫度至 -42 ℃。因此超低溫貯藏之前生長處理、抗陳劑處理、冷凍及解凍速率、及回收處理等條件，皆可能影響其貯藏活力及再生能力。

1. 影響超低溫貯藏活力因子

㈠保存體特性

蒐集材料在超低溫貯藏之前先要建立微體繁殖系統，即可靠的再生技術及選用適當的培植體。保存體選擇的要則，爲組成細胞爲均質性、胞質稠及形小之分生細胞，要比多液泡細胞或異質非均一組織爲耐貯藏。分生能力高之培植體，如有性胚體、體胚、莖

頂，胚性細胞或原生質體等，皆可成功達成超低溫貯藏。保存體之決擇視作物類型，及研究與應用目的而定。保存體體積小，故可增加保存體數，另因受活力或再生力之限制，每一樣品重複數需增加。

㈡預先生長（pregrowth）

培植體預先生長包括有冷馴化培養，或培養基添加物ABA、proline及trechalose等生理健化數天，可增强取用之保存體對冷凍逆境抗耐性。另有添加滲透壓劑(osmoticum），如mannitol、sucrose、sorbitol或glucose（0.3 - 0.5 M），促使細胞組織局部生理脫水，或在培養期間添加低量DMSO 1 - 5 %，皆顯示有助莖頂超低溫貯藏活力及回收效果。

㈢抗凍保護劑

增强組織在冷凍時之抗凍性作用，可分爲非滲透性抗凍劑，及滲透性抗凍劑，調整細胞內外的冰晶化，避免因冷凍所誘引溶質濃度劇烈變化而造成的潛在毒性。另類抗凍劑爲兼具改變膜的生化及構造特性，增强對冰凍之抗耐性。常用抗凍劑Glycerol、DMSO及PEG 等對組織亦具胞質毒性，直接傷害細胞、或降低再生能力。此視所用濃度及前處理時間而定，木薯及甘薯莖頂上限濃度DMSO 3 - 5 %，PEG 2 %，Glycerol 5 - 10 %。這些保護劑之混合使用，其抗凍效果比單獨用者爲佳。不同保存體其常用之抗凍保護劑配方參考表一。

㈣脫水作用

細胞給予夠足脫水，減少提供冰晶形成之有效含水量，高胞質濃度，即使不再加抗凍劑亦有助浸漬於液態氮之抗耐性。脫水作用可從多方面達成之；如前生長培養基補充高效滲透壓劑如蔗糖及酒精糖等。種衣脫水法，將組織或莖頂先培養於高蔗糖之液體培養基，然後以藻酸鈣包埋培殖體呈膠粒（bead），此即一般所謂膠粒種衣（encapsulation），再置於滲透壓劑培養液生理脫水，然後在無菌台風乾脫水。此法適合於胚體或莖頂脫水用，但要注意膠粒包埋可能會降低其再生能力。玻璃質化（vitrification）脫水法，使用高濃度冷凍保護劑PVS2配方（Sakai 1990），便用濃度爲30 %（w / v）glycerol + 15 % ethylene glycol + 15 % DMSO。主濃度之液體培養基含0.15 M sucrose，而60 %（v / v）PVS2 爲含0.4 M sucrose。胞質高度脫水後，快速冷凍，使細胞內的溶液在超低溫下直接穩定固化，或玻璃化狀，不會產生冰晶。玻璃質化法操作簡易，但毒性强，在貯藏前後之處理要很小心，浸漬脫水時間要短於3 - 20分，解凍後要迅速洗滌移除。

㈤降溫速率

培植體經前處理及混加保存液後，在投入液態氮之前需經一關鍵期降溫冷凍。漸次降溫冷凍步驟，兼具胞外冰晶形成及胞內脫水作用。降溫速率會影響脫水及冰晶發生特性，直接關係到保存體之活力。連續降溫以溫控箱，一般以0.5 - 1.0 ℃ / min爲理想。程式階梯式降溫，爲在0至-40 ℃間以-5 ℃梯度單位降溫，直到 - 30 ℃或

- 40 ℃ 放置 20 - 40 分，再放入液態氮貯存。另一交替方法如前所提玻璃質法，混合高濃度保護劑預先脫水後，直接放入液態氮，操作簡單，不需溫控設備，適用低溫敏感作物，如香蕉體胚採用此法貯藏，可維持活力及胚苗轉換能力。

(六)解凍回溫

貯藏後解凍回溫的速度要快，以便快速跨過解凍再冰晶化期，以免冰晶再生及擴大，造成對細胞的二次傷害。解凍的溫度爲採用水浴式加溫，控制在 35 - 40 ℃。

(七)解凍後處理

解凍後仍未脫離危險期，需將具毒性之抗凍保護劑移除，並調整其滲壓。大的保存體於無菌操作台，倒在濾紙上移去冷凍劑，再以培養液及緩衝液稀釋洗滌。香蕉玻璃質化脫水貯藏的體胚，解凍後置於含 0.4 M sucrose 之 MS 培養液，配合微震盪培養洗滌一天，其效果甚佳（表二）。培養條件改善，亦有助提昇成活再生回收率，棗椰莖頂在復健後培養基加活性碳 1 g / l，暗處理培養十天，可提昇成活力。

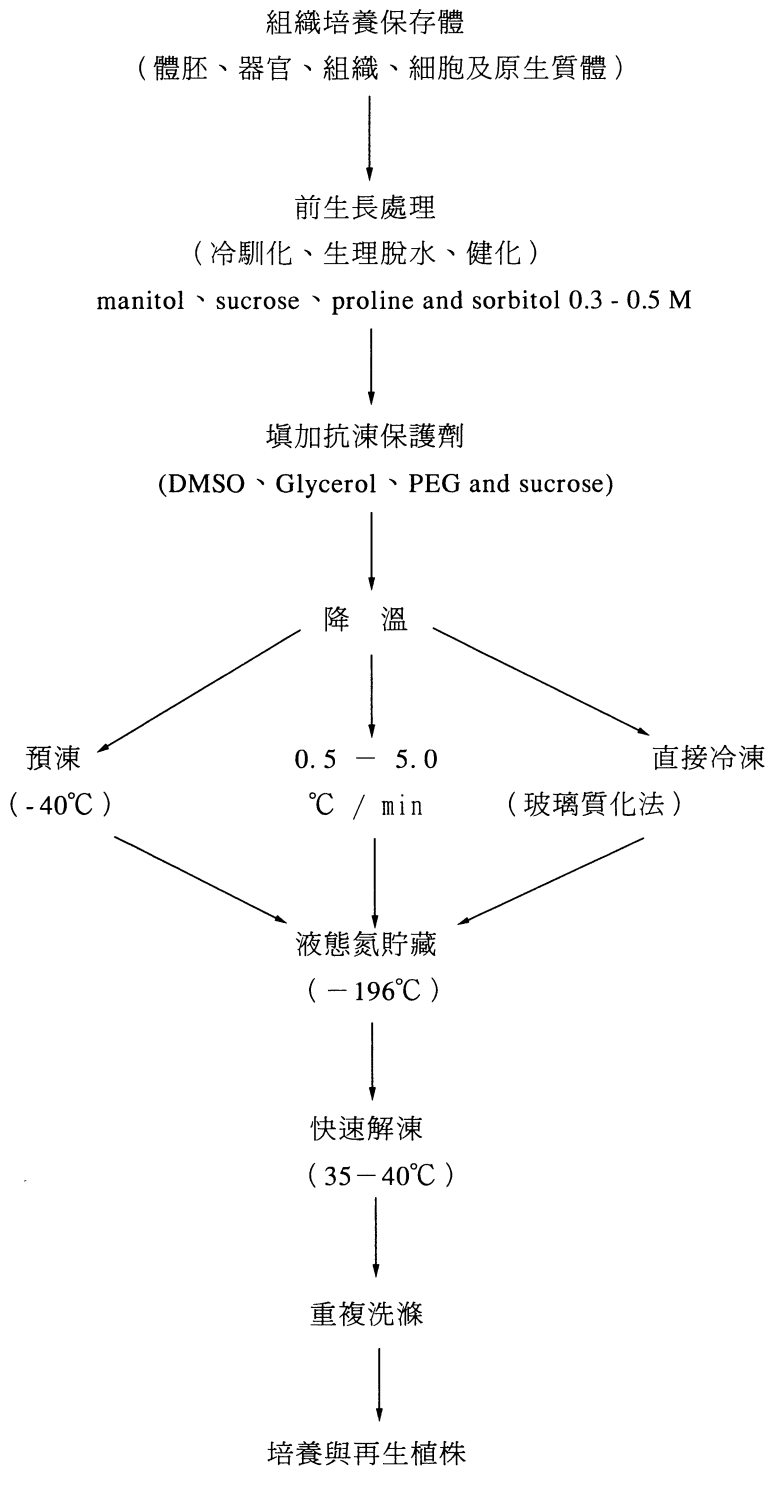
2. 超低溫貯藏策略與方法

影響超低溫貯藏成活因素，主要在脫水及冰晶形成，另要考慮的爲作物種及選用保存體之類型。若考量遺傳穩定性則選用莖頂或體胚爲最佳，但難貯藏型種子，如椰子類剝取有性胚超低溫保存效果甚佳，其它大種子者亦可試用裸胚或胚芽軸超低溫貯藏。胚性細胞或原生質體，需 10 - 14 天就繼代培養，不但費力，同時隨繼代培養次數增加，其胚性潛力（embryogenic competency）降低，同時變異機率亦會增加，超低溫保存則可有助克服此等問題。

液態氮貯藏之前需要有前生長處理，或貯藏前處理，及掌握降溫速率。種質超低溫或保存操作的基本程序如圖二所示，保存體備製培養 → 前生長處理 → 抗凍保護劑 → 降溫 → 液態氮貯藏。保存期間液態氮揮發，宜注意補充。當需要利用種質，基本上採用溫水浴 35 - 40 ℃ 快速解凍，重複洗滌去保存液。用培養液洗滌，宜漸次調整其滲透壓，如表二香蕉體胚以振盪洗滌 24 小時，貯存後轉換率仍可達 14 % 。

表一、超低溫貯藏常用抗凍保護劑組成。

保存體	保存液
莖頂	a. 5 - 10 % DMSO 25 ℃, 1 hr b. 5 - 10 % DMSO + 10 % glycerol
細胞	a. 1.0 M DMSO, 1.0 M glycerol, 2.0 M proline b. 1.0 M DMSO, 1.0 M glycerol, 2.0 M sucrose c. DMSO - glucose - PEG（ 10 - 8 - 10 % ）
玻璃質化	A. 60 % PVS2 → 100 % PVS2 25 ℃, 5 - 20 min 3 - 10 min b. PVS2, 25 ℃, 5 min → 0 ℃, 15 min



圖二、作物種質超低溫保存之流程

表二、清洗培養基及振盪清洗裝置對香蕉 'Robusta' 體胚玻璃質化保存後存活力的影響

洗液	時間（hr）	存活力（%） 發芽	胚苗高(cm)	肥大生長	休止
MS	0	0	0	22.8	69.4
A	0.5	0.6	0.2	42.9	42.8
	12	0	0	27.3	61.0
	24	0.4	0.2	24.0	49.9
	0	6.6	0.7	34.5	30.8
B	0.5	8.0	0.5	26.1	23.1
	12	10.8	1.3	12.9	34.9
	24	14.5	1.4	27.6	30.2

A. 洗液爲 MS 配方含 1.2 M sucrose。

B. MS 配方含 0.4 M sucrose，30 分，更換爲 SH3 培養基。

爲偵測其解凍後之活力，可交替選用化學速測法，如 FDA（0.1 %）活力偵測，使用螢光顯微鏡藍 / 靛濾光片，調查螢光染色反應。TTC 檢測法，測定組抽出液 490 nm 光譜，與對照組細胞比較其還原酵素類活性。其他遺傳穩定檢定方法，較精細 DNA 指紋法，可採用 rDNA 及其它探針之 RFLP，或 flow cytometry 檢測倍數體之穩定性。

五、DNA 基因庫體外保存

植物基因組主要保存於細胞核，另有葉綠體及粒腺體胞器基因組。核基因組大小以單倍體細胞 DNA 含量表達，大豆爲 8.69×10^8 base pair。小麥單倍體其實帶有三種基因組，其 DNA 含量爲大約 1.5×10^{10} b. p.。基因組 DNA 含量以重量表達，可說微不足道，前兩者分別爲 0.9 及 16.5 pg。胞器基因組更小，只有 2×10^5 b. p.左右，大約爲大腸菌 15 分之一。所有遺傳訊息爲載負於染色體 DNA 長鏈上，雖然 DNA 並非都代表具有作用的順序，但一作物種有其特定的位序及含量。一物種的遺傳歧異度，可以 DNA 位序特性或基因產物的同系性表達之。因此建立基因組DNA 基因庫，可代表遺傳資源的保育。由於其微量及易貯藏，純化 DNA 不含核酶（nuclease），只要存放於酒精溶液在室溫或凍藏，理論上可無限期保存。地球上所有生物遺傳資源，以 DNA 濃縮保存只要一房間便夠。即使乾燥或死體標本，亦可抽取純化其 DNA，此對稀有種或滅絕種之基因組 DNA 至少可回收，並備未來之需。

植物 DNA 分離及純化慣行方法很容易操作達成，以葉片組織可得高產量 14-19 μ g/ g。一樣品大約只要 55 mg 組織，便可抽得 2.9 μ g DNA，足夠供單一基因偵測利用。即使分離

出少數拷貝，可在試管內藉 PCR 技術加以體外複製放大之。或活體貯存放大，基因 DN A 順序御接至質體內，藉原核微生物之快速增殖作用，而大量活體內複製放大。由於體內體外基因放大（gene amplification），助使優良性狀基因保存來源無匱乏之虞。DNA 基因庫如圖一可分爲遺傳歧異生物種基因組 DNA 保存庫，及特定基因 DNA 保存庫兩類型，特別是後者對優良性狀基因保存，遺傳資源之可利用性可擴展至生物歧異化基因園（biodiversity genepool），此基因庫對高級作物栽培種之育種改良深具意義及價值性。DNA 基因庫的利用，可藉由遺傳工程技術來達成，打破親緣性之限制。目前可經由電穿孔法、基因槍法、共培養法、花粉管傳導法及其他吸取法，將外來基因 DNA 導入至受體細胞，並嵌接至受體細胞之基因組，遺傳轉型細胞經培養後，誘導體胚發生或器官再生，而得基因轉型植物。由原核生物分離出某些抗病、抗虫、抗殺草劑或耐逆境等基因，轉殖至作物皆有正常穩定表現之例。另發育調節性之基因，如貯藏蛋白、色素及稔性等性狀亦可藉分子育種技術，引入作物種。DNA 基因庫對無性繁殖作物或不稔性栽培種改良，或開創新的有利性狀尤具價值與發展潛力。

DNA 基因庫是爲保育完整遺傳歧異性最有效方法，貯藏及維持亦最爲經濟。DNA 分離技術進步迅速及具多重性應用潛力。唯貯藏前之備製操作如分離、定序及複製等成本較高，實際上仍遠低於實用效益。至目前有些農業性狀之微效基因仍未完全瞭解，同時轉型利用之基因規模仍有其套數限制。但此等問題更托顯出基因組DNA 基因庫之任務角色及未來應用之發展性。

六、結　論

植物遺傳資源是爲演化珍貴事件，目前遺傳侵蝕的嚴重性是爲不可忽略的嚴肅問題，加上人類偏差選拔應用及栽培系統走向，造成遺傳背景偏窄，此對永續性作物產業勢必造成新的衝擊。作物種質除初級及次基因園的保育外，另生物歧異園有利性狀基因利用亦可提供實際效益，因此廣義的遺傳資源保育直接關係到產業的發展。無性繁殖作物資源保育較爲欠缺，但可從多重的保育系統除田間營養系種保存庫外，近年來發展的體外保存系統如限制生長保存、超低溫保存及 DNA 基因庫，有助提昇歧異化資源保存效率及發揮應用效果。積極保育生物種質積亦可生生不息，此不只農業問題，並關係到人類福祉，因此釐定完整保存策略與執行是爲國家級計劃。

七、參考文獻

1.金石文. 1995. 百合屬之種源保存、遺傳歧異性分析及種源利用與評估. 國立台灣大學園藝研究所博士論文.

2.薛玉玨. 1994. 香蕉體胚玻璃質化超低溫保存影響因子之探討. 國立台灣大學園藝研究所碩士論文.

3. Adams, R. P. 1992. DNA bank-net to use DNA technology to save endanger germplasm.

Diversity 8 : 23.

4. Akihama, T. and K. Nakajima. 1978. Long term preservation of favourable germplasm in arboreal crops. Kohusai Service, Tokyo.

5. Bajaj, Y. Y. S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. Euphytica 28 : 267 - 285.

6. Benson, E. F. 1994. Cryopreservation. In : Plant Cell Culture. Dixon and Gazales (Eds). 2 nd Edition. Oxford Univ. Press. N. Y.

7. Banerjee, N. and E. Delanghe. 1985. A tissue culture technigue for rapid clonal propagation and storage under minimal growth condition of Musa. Plant Cell Rept.. 4 : 351 - 354.

8. Engelmman, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. Euphytica 57 : 227 - 243.

9. Ford-Lloyd, B. V. 1990. The conservation of horticultural plant genetic resources. 23 rd I. H. C. Plenary Lectures, p 31 - 38, Frenze, Italy.

10. Iida, Y. et al. 1992. Effects of abscisis acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embyos. J. Plant Physiol. 140 : 356 - 360.

11. Katha, K. K. 1985. Cryopreservation of plant cell and organs. CRC Press. Florida.

12. Ko, W. H., S. C. Hwang and F. M. Ku. 1993. Storage of tissue culture of banana. Intl. Sym. Recent Develop. Banana Cult. Tech. p 193 - 200. TBRI.

13. Reed, B. M. 1990. Survival of *in vitro* growth apical meristem of *Pyrus* following cryopreservation. HortScience 25 : 111 - 173.

14. Sakai, S. Kobayashi and I. Oiyama. 1990. Crypopreservation of nucellar cells of naval orange (*Citrus sinensis* Dsh. var. *brasiliensis*) by vitrification. Plant Cell Rept.. 9 : 30 - 33.

15. Shii, C. T., S. S. Ma, P. L. Huang, S. W. Chin. 1994. Current and future development in clonal germplasm conservation of vegetatively propagated crops. Plant Germplasm Conservation :

16. Prespectives for the 2000 s. p 83 - 89. Taiwan Agri. Res. Institute.

17. Vuylsteke, D. R. 1989. Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. IBPGR, Rome.

18. Withers, L. A. 1984. Cryopreservation. In : Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. Vasil (ed.). Acad. Press. N. Y.

19. Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Higuchi. 1991. Cryopreservation of apical meristem of white clover (*Trifolium, repens* L.) by vitrification. Plant Science 78 : 81 - 87.