

蘭花種原超低溫保存技術之最新進展

農試所花卉中心 吳容儀 張韶珏 謝廷芳 張育森

一、前言

因為全球環境變遷、極度的氣候變化、原生地受到破壞及人為濫採等因素，許多蘭花野生族群數量逐年驟減，更甚者，許多原生蘭花目前已瀕臨絕種。在台灣這塊土地上，多樣的環境條件孕育豐富的植物資源，據調查每12種維管束植物中，就有一種蘭科植物，其種類繁多，其中不乏具觀賞價值或特殊用途(如藥用或香料用)之原生蘭，亟待保護。然而，無論基於生態保育立場，或者是蘭花產業永續經營而言，種原的保存絕不容忽視，開發蘭花種原的長期保存技術，是維繫台灣蘭花產業永續發展與維護生物多樣性生態極重要的盤石。

二、超低溫保存技術之演進

超低溫保存技術乃是將植物組織或器官置入超低溫-196℃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，具有幾項優點：因為保存體積小，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、貯藏期間，保存體不需繁複的繼代培養，可避免遺傳變異產生、人為操作污染與減少體細胞營養系變異的機會、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、細胞可維持活力與再生能力、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。因此，超低溫保存技術是目前國際公認可作為植物種原長期保存的技術之一。

國內早在20多年前已有學者以液態氮進行植物種原保存的研究，多數研究報告指出，組織如果未經任何前處理便置入液態氮保存，活力將會急遽降低，甚至完全喪失活力。因此，組織在超低溫保存前進行一連串的前處理已成為必然步驟，而避免細胞內結冰可提高細胞存活率，故各種不同的前處理技術係攸關組織活力高低之關鍵點。

早期前處理方式有二階段降溫法，後續發展玻璃質化法、藻膠包埋脫水

作者：吳容儀助理研究員
連絡電話：05-5828307

法、藻膠包埋脫水法結合玻璃質化法、一直至近幾年的液滴玻璃質化法，相關內容如下說明：

(一)二階段降溫法(Two-step cooling)

以細胞、體胚等材料保存。利用遞降溫設備進行緩慢降溫，使細胞間隙的水結冰，而促使細胞內水往細胞外移動，達到脫水目的。降溫速度快，細胞容易失水過多；降溫速度慢，容易產生傷害細胞的大冰晶而致死，因此控制降溫速率為此法關鍵。

(二)玻璃質化法(Vitrification)

利用大分子高濃度溶液（冷凍保護劑），使細胞脫水，進而於組織外部形成零星的小冰晶，同時在液態氮-196℃下，冷凍保護劑由液相變成固相，使細胞內部凝固點下降，因零星小冰晶散布組織內部，呈現似玻璃質化的狀態，故名玻璃質化法。一旦形成玻璃質化狀態後，保存體內微細構造則不易產生劇烈變化，細胞功能也能被完整保存，並且保存在液態氮中，超低溫的環境會讓細胞的生理機能近乎完全停止。

(三)藻膠包埋脫水法 (Encapsulation)

適用對冷凍保護劑敏感的植物，將細胞或生長點包埋藻膠進行冷凍保存。利用藻膠將保存體包覆，使保存體不會受到劇烈的逆境，並承受長時間的脫水處理而達到適當脫水程度。

(四)藻膠包埋脫水法結合玻璃質化法 (Encapsulation- Vitrification)

1998年由Harai等人研究，以滲透壓與蒸散脫水除去細胞水分，再以藻膠包埋保存體，加入冷凍保護劑處理，並浸入液態氮後迅速降溫。藻膠包埋搭配玻

璃質化法，其優點是可減少冷凍保存組織再生時引起組織遺傳變異機會，適用不同作物種原長期保存。

(五)液滴玻璃質化法(Droplet vitrification)

2005年Panis等人提出，莖頂經冷凍保護劑處理後，滴管吸取移至裝有冷凍保護劑的鋁箔條上，再放進冷凍管後，置入液態氮內長期保存，此法更能提高組織解凍後存活率。

三、蘭花種原超低溫保存技術之最新進展

目前多數作物包括蘭花的超低溫保存，所採用之玻璃質化法處理步驟繁雜且所採用的藥劑對植物細胞具有毒性，容易對保存材料造成傷害。花卉研究中心研發以乾燥方式進行超低溫保存之前處理，可以有效提高蝴蝶蘭、台灣白及與紅花鶴頂蘭（圖一）之種子或花粉活力，所採用之乾燥方式分為室內自然乾燥及密閉容器內以矽膠乾燥。在表一中，蝴蝶蘭(*Phal. schilleriana*)種子以矽膠乾燥法乾燥後再置入液態氮保存，則種子活力會隨種子成熟度提高而增加。表二以台灣白及(*Bletilla formosana*)3個月成熟果莢的種子作為保存材料，進行不同乾燥處理方式(矽膠乾燥、室內陰乾)，結果新鮮種子採收時之活力為89.9% (發芽率76.8%)，未經乾燥處理而直接將種子置於液態氮中，則種子活力驟降至2.3% (發芽率1.8%)，若以矽膠乾燥法進行前處理24小時，則種子活力與新鮮者無差異，為86.8%，發芽活力僅次於新鮮者，達68.5%；將種子置於室溫陰乾24小時後再置入液態氮中，則種子活力亦能維持84.9%，與新鮮及矽膠乾燥者無顯著差異 ($p > 0.05$)，發芽率 (68.6%) 僅次於

新鮮採收者，而近似矽膠乾燥者，兩者之間無顯著差異 ($p > 0.05$)。表三中，紅花鶴頂蘭(*Phaius tankervilleae*)花粉以矽膠乾燥法乾燥後再置入液態氮保存，經保存回溫後，花粉發芽率與新鮮花粉相近，兩者無顯著性差異。



圖一、紅花鶴頂蘭。

表一、乾燥處理對蝴蝶蘭(*Phal. schilleriana*)種子超低溫保存後活力之影響²

Treatment	Seed Maturity (Days)		
	70	80	90
Fresh seed	96.0 a ^w	94.9 a	97.9 a
LN ^y	13.3 b	33.7 b	69.8 b
Dry + LN ^x	22.3 b	45.3 b	85.1 a

²Seed viability was evaluated by TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) staining method.

^yFresh seeds without drying treatment directly plunged into liquid nitrogen (LN, -196°C) .

^xFresh seeds dried with silica gel, then plunged into liquid nitrogen.

^wMeans with each column followed by the same letters indicate no significant difference at 5% level by LSD test.

本技術以簡易的方法降低組織含水量，並簡化操作流程與時間，同時減少前處理藥劑對植物組織的傷害，經證實保存效果更甚於慣用的方法，而且經保存後的種子可順利於人工培養基上長成健康的植株。本項技術具有幾項優點：

- 1.操作簡易、實用性高，推廣容易。
- 2.成本低、無毒，不會對植物材料造成傷害。
- 3.本項技術涵括二種乾燥方式，適合實驗室及業界應用。
- 4.適合國家作物種原庫進行蘭花種子長期保存。
- 5.作為蘭花長期保存平台，可提供其它蘭花種子保存參考。

預期本項技術對於有效解決未來長期、大量貯存蘭科植物種原問題極有貢獻，更有利於台灣蘭花產業永續發展之維繫。

四、結語

本項研究初衷為建立蘭花種原(種子或花粉)長期保存平台，冀藉由本技術之研發，進一步推展擴及其它蘭花作物，同時依據保存方式將蘭花分成不同類別，

期盼能簡化種原長期保存操作流程，以更簡易、實用性高、容易操作、低成本的方式進行，以俾能應用於種原庫與民間企業公司。

五、致謝

感謝本所作物組呂椿棠博士於試驗設計方面之解惑、屏東科技大學陳福旗教授於種原保存方面之經驗分享等，謹致謝忱。

表二、乾燥處理對台灣白及(*Bletilla formosana*)種子超低溫保存後活力之影響

Desiccation (h)	Seed viability (%) ^z	Seed germination (%) ^y
Fresh seed	89.90 a ^u	76.80 a
LN ^x	2.30 b	1.80 c
Dry + LN ^w	86.80 a	68.50 b
Air dry + LN ^v	84.90 a	68.60 b

^z Seed viability was evaluated by TTC staining method.

^y Germination rate was calculated after one month culture.

^x Fresh seeds without drying plunged into liquid nitrogen (LN, -196 °C).

^w Fresh seeds were dried for 24 h with silica gel prior to LN.

^v Fresh seeds were dried for 24 h with air-drying in laboratory conditions prior to LN.

^u Values are mean $\pm$ standard error. Means with each column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by LSD test.

表三、乾燥處理對紅花鶴頂蘭(*Phaius tankervilleae*)花粉超低溫保存後活力之影響

Treatment	Pollen Germination (%) ^z
Fresh pollen	81.4 a ^w
LN ^y	25.4 b
Dry + LN ^x	81.0 a

^z Fresh pollinia were cultured in vitro on BK medium(1963). The germination percentage of pollen observed under microscope.

^y Fresh pollinia without drying treatment directly plunged into liquid nitrogen (LN, -196°C) .

^x Fresh pollinia dried with silica gel, then plunged into liquid nitrogen.

^w Means with each column followed by the same letters indicate no significant difference at 5% level by LSD test.