

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(上)

農試所嘉義分所 陸柏憲 賴永昌

一、前言

全球氣候變遷的影響日益加劇，極端氣候如強烈颱風、超大豪雨、熱浪等天然災害頻仍，對全球農糧產業發展造成嚴重衝擊。近年台灣面臨罕見霸王寒流、最暖冬季，及夏季無颱所致的嚴重旱災，使全台農業生產連年遭受重創。因此，發展農業調適技術解決氣候變遷之危機已是當務之急。氣候變遷對於植物多樣性的影響特別嚴重，若不積極進行植物種原收集與保存恐使珍貴種原流失。超低溫冷凍保存(cryopreservation)係指將材料保存於冷凍狀態，為進行種原長期保存的理想方法。目前植物種原超低溫保存技術逐漸成熟，國際間各種原保存機構已開始實際應用於保種任務上。為因應氣候變遷造成物種滅絕之危機，建立超低溫冷凍保存技術有其發展潛力。本文分上篇簡介氣候變遷下種原保存之重要性、超低溫冷凍保存的基本原理；下篇簡介超低溫冷凍保存的研究歷程及各國機構應用情形，期有助於台灣在植物遺傳資源保存領域的發展，及實務應用上之參考。

二、種原保存之重要性及慣行方式簡介

氣候變遷會影響原有地理環境的氣候變化，使物種分布發生改變，增加病蟲害風險，以及外來種入侵危機，進而導致原有物種消失與滅絕，因此，加強物種的收集與保存，維護生物多樣性，已是全球生態保育和農業永續發展的重要課題。農業試驗所於1993年落成啟用國家作物種原中心，結合嘉義與鳳山兩分所，迄今已保存超過24萬份的作物種原收集系(accessions)(表一)。

植物種原(plant germplasm)係指活體植物之遺傳資源(genetic resources)，其形態小至花粉、種子、組織，乃至完整植株。凡帶有植物遺傳訊息(基因)的活體材料皆可收集做為種原。此外，從自然環境收集的植物種原往往帶有適應逆境的優良基因，可供作為耐逆境育種研發的重要材料。

由於作物育種技術日益精進，持續選育新品種而大面積推廣，加之企業化的耕作型態，致使作物栽培品種之選擇趨於一致。單一化的品種栽培模式導致具優良適

作者：陸柏憲助理研究員
連絡電話：05-2753182

應性及耐逆境的地方品種(landraces)、野生近緣種(wild relatives)、雜草型種(weed races)等種原不斷流失。在物種內遺傳多樣性的急遽減少之下，使主要栽培品種對於氣候變遷之威脅產生遺傳脆弱性(genetic vulnerability)，一旦面臨災害性的逆境，將造成作物產量損失，嚴重乃至植株死亡。

現階段國內、外慣行的種原保存方式眾多，而依材料保存的型態可區分成體內保存(*in vivo* conservation)與體外(離體)保存(*in vitro* conservation)：

(一)體內保存：指遺傳訊息保存於完整且存活的植株個體內。如維護原有的生態環境，設立自然保護區或國家公園，讓物種在原生地自然生長繁衍，可稱為原地保存(*in situ* conservation)；當種

原滅絕機率高，原地保存難以施行時，則可將種原帶離原生育地，遷移至另一環境集中管理，如設立植物園或保種中心，稱為異地保存(*ex situ* conservation)。原地和異地保存主要於野外、田間進行保存作業，需利用大面積的土地及大量人力資源，且所保存之種原易受外界環境影響，若遭逢災害性之極端氣候，極易使種原滅絕流失。

(二)體外保存：指透過植物組織培養(tissue culture)技術進行種原保存，可克服體內保存之缺點。利用種原細胞、分生組織或器官，以無菌培養方式保存於密封試管中，隔絕外界不利環境；由於植物細胞具細胞全能性(totipotency)，在適當光照、溫溼度及培養基的調節下，遺傳資源可持續繁殖保存於試管

中，特別適合無性繁殖作物(圖一)。雖然體外保存所需材料體積較小，具節省空間、利於運輸交換等優勢，且於無病原體的環境中免受自然環境危害；然其需花費人力、物力進行週期性的繼代培養為其缺點，無法進行長期保存，且繼代過程中可能發生種原突變(mutation)、褐化(browning)或汙染之風險。

值得注意的是，超低溫冷凍保存係指將材料保存於極端低溫下，是一種

表一、國家作物種原中心種原保存量統計

地點	收集系 (Accessions) 數量/份	備註
1. 農試所低海拔種原保存園	340	果樹
2. 農試所中海拔種原保存園	127	果樹
3. 農試所高海拔種原保存園	25	果樹
4. 農試所無性繁殖作物田間保存園	634	觀賞及木本植物
5. 鳳山分所熱帶果樹保存園	416	熱帶果樹
6. 嘉義分所熱帶及亞熱帶果樹保存園	833	熱帶及亞熱帶果樹
7. 關西工作站	192	柑橘
8. 花卉研究中心	423	花卉
9. 種子中期庫	71,985	種子
10. 組織培養庫(農試所)	412	植物組織
11. 組織培養庫(嘉義分所)	1,713	植物組織
12. T-DNA T1 種子庫	85,899	水稻種子
13. T-DNA T2 種子庫	84,503	水稻種子
合計	247,502	

資料來源：國家作物種原中心種原保存及種子與種苗國際交換年報。

製表日期：2019 年01 月

進階體外保存種原的技術(圖二)，可克服目前慣行種原保存的缺點，國際上視為植物種原長期保存的理想方法。目前各國種原保存機構在根莖類、蔬菜、果樹、花卉等作物種原中皆有實際應用，且正積極研發不同作物之凍存技術，可謂未來種原保存技術的發展趨勢。

三、超低溫冷凍保存基本原理及流程

超低溫冷凍保存可利用之材料，包含植物花粉、莖頂和根尖分生組織、懸浮細胞、種子、休眠芽及枝條等，其優點為材料體積較小，可節省保存空間，且不受環境因子如氣候、病原菌干擾。此外，進行超低溫冷凍保存時植物細胞停止生長，可省略週期性繼代培養，降低人力成本，減少種原突變、人為汙染之疑慮。然其缺點在於電力或冷源供應一旦中斷(如戰爭或天災)，則可能致使保存材料一夕之間全毀。

一般進行超低溫冷凍保存所使用之冷源包含：固態二氧化碳(-79°C)、超低溫冷凍櫃(-80°C)、液態氮蒸氣相($-140\sim-180^{\circ}\text{C}$)及液態氮(-196°C)，而又以液態氮使用最為廣泛。當植物細胞經適當處理程序後，置於極端低溫環境，細胞分裂和生理代謝反應受到抑制，生命現象幾近靜止狀態，但仍能保持穩定不至死亡；當外界環境恢復時，植物細胞又可復原，保持正常生理活性、型態發生(morphogenesis)潛能及維持遺傳穩定性。

不同學者研發的步驟稍有不同，至今已發表數種超低溫冷凍保存方法(圖三)，各有其特色及優缺點，然其基本流程可統整如圖三所示。首先需建立種原離體材料，材料型態因不同物種特性而異，如禾本科利用花粉，無性繁殖作物利用莖頂、根尖組織，果樹作物則多以休眠芽或枝條。在多數溫帶作物中，由於其耐寒性、休眠性與低溫適應性較佳，比起熱帶或亞熱帶作物，溫帶作物



圖一、甘藷種原離體保存。



圖二、種原進行超低溫冷凍保存。

的超低溫冷凍保存較容易成功。

此外，欲進行超低溫冷凍保存之材料，其年齡及尺寸選擇亦為重要因素，因其關係至凍存後存活率與再生能力之表現。以莖頂組織為例，材料年齡範圍多為繼代培養1週至3個月間，其中又以2至8週之材料較常使用；材料尺寸範圍則多介於0.5–3 mm之間，而以1–2 mm之尺寸應用較廣。值得注意的是，即使為保存相同物種，最佳的材料年齡及尺寸仍會因不同品種(基因型)而異，因此建立適當離體材料為超低溫冷凍保存的初步要點。

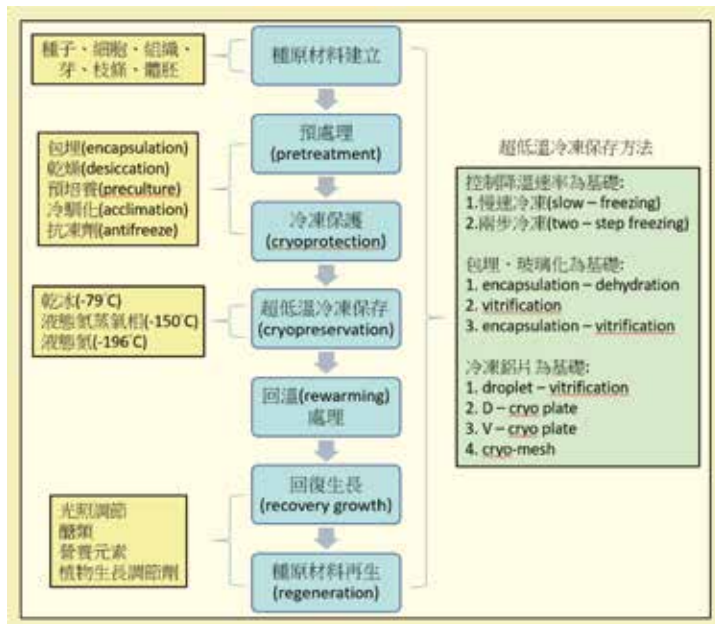
為使材料進行抗凍保護，需將材料進行預處理，如冷馴化(cold acclimation)、預培養(pretreatment)、添加抗凍劑(antifreeze)等，避免冷凍過程中細胞內水分結冰造成機械傷害，以提高凍

存後存活率。甘油、乙二醇與二甲基亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)為較常使用的抗凍劑，惟DMSO對細胞具有毒性及高滲透濃度，添加時需控制濃度及處理時間，以免毒害細胞。

材料完成抗凍處理後，即置入冷源中進行保存。當有繁殖或試驗需求時再將種原取出，經過回溫、回復生長後，即可再生成完整植株。根據Tanaka *et al.* (2018)研究報告指出，降溫及升溫處理速率因不同凍存方法而異，傳統慢速冷凍之降溫速率約0.1–4°C/min；隨凍存技術發展，降溫速率可達100–200°C/min、回溫速率達80–140°C/min；而新興研發之凍存技術效率更佳，降溫速率可達4000–5000°C/min、回溫速率可達3000–4500°C/min。

最重要的關鍵點是，材料於凍存後

是否可恢復活性及再生能力，才能發育成完整植株供後續種原利用。為提高存活率和再生率，材料於回復生長階段需先行暗(或低照度)處理數日，再移至正常光照環境(16 hr光–8 hr暗)；並於回復培養基中添加醣類(蔗糖)、營養元素及植物生長調節劑(IAA、BA、GA₃等)，以利種原恢復正常生長發育。最終，可用多種分子標誌檢測凍存後之再生植株，以確保種原材料的遺傳穩定性。(待續)



圖三、超低溫冷凍保存基本流程圖。圖片來源：修改自 Normah *et al.* (2019)。