

赴日本參訪及研習作物種原 超低溫冷凍保存技術

心得報告

農試所種原組 蕭翌柱

一、前言

世界各國作物種原中心採用的種原保存制度可概分三種類型：(一)原生地現地保存(*in situ* conservation)；(二)將種原移植至適當處所集中管理的離場保存(*ex situ* conservation)；(三)利用植物組織培養等技術進行種原無性繁殖和離體保存(*in vitro* conservation)。其中以非種子型態保存且應用液態氮超低溫冷凍保存(cryopreservation)培植體的方法，則歸屬於第三類型，若能建立組織培養繁殖體系並開發如香蕉、甘藷、山藥或百合等無性繁殖作物分生組織之超低溫冷凍保存技術，不但能大幅減少儲存種原耗用的土地空間和人力成本，也能避免外在環境如溫度、降雨、日照、病害或蟲害等因子的干擾，故為目前較安全且有效率的中、長期保存方法。日本國內許多專家學者在此一領域已累積有近20年的經驗，為配合本所作物種原組嘗試建立自有超低溫冷凍保存技術之需求，因此，在民國99年11月22日至28日期間，筆者奉派赴日本農業生物資源研究所(National Institute of

Agrobiological Sciences, NIAS)及島根大學(Shimane University)參訪並研習相關技術。本文旨在概述參訪及研習液態氮超低溫冷藏保存技術過程及實務操作，包含抗凍劑溶液與預處理培養基的製備、以玻璃質化法(vitrification)、裹膠脫水法(encapsulation-dehydration)或液滴玻璃質化法(droplet vitrification)等進行甘藷及山藥等作物莖頂培植體之冷凍保存。

二、赴日本農業生物資源研究所之參訪與研習

民國99年11月22日上午搭乘中華航空班機，於下午13:20抵達日本成田國際機場。再換乘Limjin 高速巴士前往筑波中心，抵達後與Dr. Takao Niino取得連繫。翌日參訪農業生物資源研究所，惟當天適逢日本「勞動感恩節」(旨在向勞工表示敬意的國定假日)全國放假一天，因此，是日並無拜會NIAS 種原庫主管-河瀨 真琴博士(Dr. Makoto Kawase)的行程，不過，仍由Dr. Takao Niino帶領及簡要解說NIAS 植物遺傳資源部門種原庫的辦公環境和研究概況，並由其準備有關植物超低溫冷藏保存研究資料及文件進行教導。待筆者具備超低溫冷藏保存技術的初步概念後，即前往實驗室進行實習操作。

作者：蕭翌柱助理研究員
連絡電話：04-23317802

在無菌操作台內擺放一些實習所需的基本設備，包括解剖顯微鏡、攜帶式液態氮桶和小型恆溫水槽等（圖一），此外，尚有試驗用抗凍液及供試培養基。實驗室層架上同時放置供試用瓶苗，其中，食用甘藷種原（圖二）為實習的重要材料。先由Dr. Takao Niino示範及講解甘藷以鋁板玻璃質化法(aluminum plate vitrification)進行植物莖頂超低溫冷藏保存技術操作後（圖三），再由筆者親自操作。開始在無菌操作台實習前，需先學習配製試驗用LS (loading solution)培養液和PVS2 (plant vitrification solution 2)抗凍劑，上述二種溶液皆使用含MS (Murashige and Skoog, 1962)基本鹽類培養基，其主成分包括

大量元素(macronutrients)、微量元素(micronutrients)、鐵源(iron source)、有機酸及維生素。此外，並依配方所需分別在培養基中添加2M Glycerol、15% EG、15% DMSO和0.4M 蔗糖。培養基調配完成後，先以0.5-1N NaOH或0.5N HCl調整酸鹼值(pH)，液體培養基之pH值為5.2。培養液調配完成後，以1L血清瓶盛裝，置於殺菌釜內以溫度121℃、壓力1.05 kg/cm²滅菌15分鐘。

完成LS和PVS2抗凍劑的配製後，開始操作甘藷莖頂培植體材料的準備。首先透過解剖顯微鏡放大輔助，先切取大小約0.2 mm的甘藷莖頂分生組織（圖四）並預培養於含MS基本鹽類的固態培養基中，其次挑起供試培植體置於小鋁



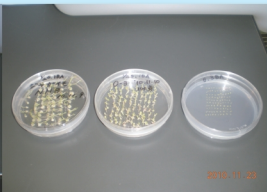
圖一、無菌操作台內的儀器設備。



圖三、Dr. Takao Niino示範甘藷超低溫冷藏保存操作方法。



圖二、試驗用甘藷瓶苗。



圖四、甘藷莖頂及分生組織。

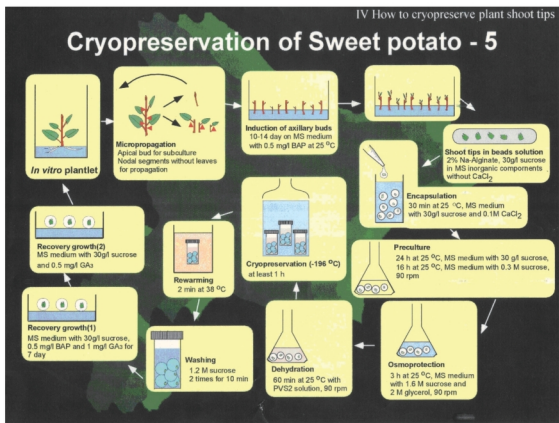
片再加上含2%藻膠與3%蔗糖但無添加CaCl₂的溶液，最後以微量吸管滴入含有3%蔗糖與0.1 M CaCl₂之MS溶液進行藻膠包埋。包埋處理後之藻膠球以LS溶液進行滲壓保護(osmoprotection)處理後，再置放於再以PVS2進行脫水1小時，最後，依程序（圖五）進一步將含有莖頂之藻膠球置於2 mL冷凍管，並加入1 mL PVS2進入液態氮保存。

11月24日（星期三）上午8:30仍由Dr. Takao Niino講授有關液滴玻璃質化法(droplet vitrification)並實際進行操作，此後也帶領本人正式拜會農業生物資源研究所種原庫Dr. Makoto Kawase主管及參觀植物遺傳資源部其他組室和研究簡報，在黃昏實習即將結束時，把握

難得的機會與Dr. Takao Niino及其研究室成員一同合照（圖六），由於幾天後Dr. Takao Niino需準備前往墨西哥參與學術研討會，故著者筑波之行此時已近尾聲，隔日將啟程前往日本西部島根縣松江市參訪國立島根大學。

三、赴日本島根大學之參訪與研習

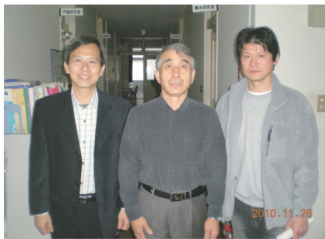
民國99年11月25日由筑波中心搭乘關東鐵道高速巴士前往東京羽田機場，約11:30抵達機場且稍事休息後，改乘坐14:00日本國內線全日空JL 1667班機（麥道MD-90）飛往島根縣出雲機場，再轉乘巴士並於下午16:05到達JR松江車站，此時Dr. Toshikazu Matsumoto已在該處等候。翌日上午由Dr. Toshikazu Matsumoto



圖五、甘藷超低溫冷藏保存技術圖說。(摘錄自Dr. Niino的資料)



圖六、著者與Dr. Niino(左)及其研究室成員合照。



圖七、Dr. Noriaki Aoki (中)及Dr. Toshikazu Matsumoto (右)。



圖八、供試山葵組織培養苗。

陪同參訪其任職單位—島根大學生物資源科學部生物資源教育研究中心(Education and Research Center for Biological Resources)，並拜會其單位主管—青木 宣明博士(Dr. Noriaki Aoki) (圖七)，由於生物資源教育研究中心位於松江市郊山區，距離島根大學校本部約有20分鐘車程，因此，當天先由Dr. Toshikazu Matsumoto帶領參觀中心研究環境，再準備柿、草莓及山葵(圖八)等植物種原收集和超低温冷凍保存相關資料進行指導，講授內容包括玻璃質化法和包埋脫水法等技術，待完成授課內容和流程解說後，仍由Dr. Toshikazu Matsumoto先行示範(圖九)，再由本人實習及操作，該日係以山葵瓶苗作為供試材料，同樣先切取莖頂之後，進行包埋、滲壓保護及PVS2溶液處理，再置入液態氮桶內迅速凍結，因時程緊迫，故只得縮短其超低温冷藏時間為1小時即取出，並以39℃恆溫水槽快速回溫。另一技術則是在完成培植體包埋和LS溶液滲壓保護處理後進行脫水乾燥，最後再置入液態氮桶內迅速凍結。

11月27日(星期六)上午8:30再由Dr. Toshikazu Matsumoto陪同參訪生物資源科學部生物資源教育研究中心的葡萄、蘋果及柿子等果樹品種保存園，並由其解說利用休眠芽體進行種原低温冷藏保存之研究現況；此外，也參觀農村利用溫室在秋冬季栽培番茄等作物的耕作制度和位於出雲市與松江市交界處之宍道湖畔

人參栽培場（圖十）。由於當日天候不佳並且下雨的關係，故遲至下午才造訪島根大學校本部（圖十一）及各教學大樓，並收集多篇有關植物種原保存及開發利用之研究報告及資料。隔日則在松江市JR松江車站搭乘巴士前往島根縣出雲機場，再經東京羽田機場返回國門。

四、結語

在參訪日本農業生物資源研究所並由Dr. Takao Niino指導植物超低溫冷凍保存技術（包括液滴玻璃質化法及鋁板玻璃質化法等技術）和參訪島根大學並由Dr. Toshikazu Matsumoto指導玻璃質化法和裹膠脫水法等技術後，將有助於建立本所自有液態氮超低溫冷藏保存種原的技術，此亦能廣泛應用於無性繁殖作物之長期保存，我國在這方面之技術發展仍需持續與日本研究單位保持密切聯繫並進行學術交流。已知植物種原試驗材料經LS和PVS2等溶液前處理後，再置入液態氮（ -196°C ）迅速降低溫度，可以降低冰晶的形成及減少低溫對於植物細胞的傷害，待回溫處理後仍可維持其活力和存活率，另外，細胞對玻璃化抗凍液（PVS2）的滲透容忍性（osmotolerance）是冷凍保存法中很重要的一環，經由日本學者悉心指導，本所業已具備最新的鋁板超低溫包埋技術，故99年度計畫之執行成果應有助於未來保存我國各種重要的植物種原。



圖九、Dr. Matsumoto示範山葵超低溫冷藏保存技術。



圖十、島根縣宍道湖畔在竹編矮房內之人參栽培場。



圖十一、島根大學校本部。