

# 未經冷馴化之草莓莖頂超低溫冷凍保存研究

蕭翌柱<sup>1,\*</sup> 陳冠文<sup>2</sup>

## 摘要

蕭翌柱、陳冠文。2014。未經冷馴化之草莓莖頂超低溫冷凍保存研究。台灣農業研究 63(1):57-67。

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 屬於薔薇科 (Rosaceae) 多年生高價值經濟作物，並且有超過 70 個以上的國家進行栽培與量產，因此進行種原的長期保存益顯重要。本試驗的主要目的，在於建立未經冷馴化草莓 (「桃園 1 號」) 最適宜的超低溫冷凍保存處理方法。培植體在尚未浸入液態氮前的預處理結果如下：(1) 莖頂培植體 (1-2 mm<sup>3</sup>) 預培養於添加 0.3 M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養基 14 d 後的平均存活率為 100%；(2) 將填充溶液 (LS) 中的蔗糖濃度自 0.6 M 提升至 1.6 M 並且滲透壓保護 90 min，莖頂的平均存活率仍可達到 100%；以及 (3) 使用植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 脫水 60 min 後之莖頂平均存活率達到 96.7% ± 4.7%，此百分比顯著高於 PVS2 脫水 180 min (60.0% ± 14.1%) 和 240 min (46.7% ± 17.0%) 的處理組。經 PVS2 脫水後，每 10 顆含莖頂的藻膠球及 0.3 mL 新鮮的 PVS2 被置入 1 個 2 mL 容量的抗凍管中，然後直接投進 -196°C 的液態氮至少保存 1 h，經液態氮凍存後的抗凍管，在 38°C 恆溫水槽中迅速回溫 60 s，此種含有莖頂的藻膠球繼代培養 14 d 後的再生率可達到 80%。本研究各項試驗結果，將有助於建立及簡化草莓超低溫冷凍保存的程序。

**關鍵詞：**草莓、超低溫冷凍保存、填充溶液、滲透壓保護、植物玻璃質化溶液 2。

## 前言

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 為薔薇科 (Rosaceae) 草莓屬 (*Fragaria*) 多年生草本作物，原產於歐洲及南美洲等地區。其果實由花托發育而成，外觀多呈心形或扇形，有淡紅、鮮紅及桃紅等色澤，味道酸甜可口，富含維生素 C、水楊酸、檸檬酸及具有美白效用的鞣花酸 (ellagic acid) 等成分，因一些商業品種的果實具有獨特香氣，故深受世界各國人們的喜愛。目前，市場上較常見到的栽培種草莓係由 *Fragaria chiloensis* L. P. Mill. 和 *Fragaria virginiana* Duch. 2 個原生種自然雜交育成，每年約有超過 70 個以上的國家進行量產栽培，且全世界的田間總種植面積已達到 50,600 ha (Sakila *et al.* 2007)。根據 2012 年行政院農業委員會農糧署統計指出，國內包含

台北、新竹、苗栗、台中及南投等縣市的草莓總栽培面積合計約有 576.9 ha，其中苗栗縣即佔了 465.3 ha。若以單一鄉鎮進行比較時，又以大湖鄉的 374.3 ha 為最大栽種區域，栽培的品種係以「豐香」為主，估算大湖鄉的採收量可達 15,000 kg ha<sup>-1</sup>。若以 1 kg 市價新台幣 500 元計算，則其產值高達每公頃 7,500,000 元。由此可知，草莓在我國可歸類為高經濟價值作物，故研究無病毒健康種苗繁殖及種原保存技術也益顯重要。

近代由於自然環境遭受人為的濫墾破壞，加上全球氣候持續暖化，年均溫逐年升高，致使區域原生物種面臨極嚴峻的生存考驗，惟有積極進行環境保護及作物遺傳資源保存與利用，方能永續生產安全的糧食。以作物種原保存而言，世界各作物種原中心採用的保存制

投稿日期：2013 年 11 月 15 日；接受日期：2014 年 1 月 22 日。

\* 通訊作者：yjshiau@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所作物種原組研究助理。台灣 台中市。

度概可分為 3 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*)；以及 (三) 利用組織培養等技術進行種原無性繁殖之離體保存 (*in vitro conservation*) (Engelmann 1991)。對於大多數田間作物而言，篩選優良種子並在低溫與低濕下貯藏是保存大量種原並使其能進行分贈或交換的最較佳方式，不耐低溫貯藏的植物種子則可藉由收集花藥或花粉進行保存 (Bajaj 1978)，或定期將營養繁殖的子代移植於田間進行種原更新。若以非種子型態保存且應用液態氮進行超低溫冷凍保存 (*cryopreservation*) 培植體的方法，則歸屬於前述第三種類型，國外學者曾撰文介紹草莓超低溫冷凍保存相關技術 (Reed & Hummer 1995)。植物超低溫冷凍保存技術多將培植體先經過預培養、低溫冷馴化 (*cold hardening*)、應用滲透壓保護 (*osmoprotection*) 填充溶液 (*loading solution*; LS) 以及浸漬於植物玻璃質化溶液 2 (*plant vitrification solution 2*; PVS2) 進行脫水 (*dehydration*) 等程序，再將莖頂、體胚或芽體置入  $-196^{\circ}\text{C}$  的液態氮中長期保存。在此極度低溫下，植物器官或組織的生理代謝已接近停止狀態，但仍舊保有生命的活力，待將其取出並迅速回溫及再生培養後，即可誘導發育成爲完整的植株 (Engelmann 2004)。前述方法具有減少保存種原耗用的土地空間和人力成本的優點，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 (Keller *et al.* 2006)。

參閱目前已發表的草莓種原超低溫冷凍保存研究論文，其幼嫩苗株在試驗過程，多先在  $25^{\circ}\text{C}$ 、光照周期 16 h 的環境培養 14 d，再於溫度  $5^{\circ}\text{C}$ 、光照周期 8 h 的環境下低溫冷馴化處理 20 d (Niino 2006)；或是先在室溫、光照周期 14 h 的環境預培養 25–30 d，再移至  $10^{\circ}\text{C}$ 、光照周期 8 h 的環境下冷馴化處理 30 d，再執行後續的滲透壓保護及脫處理 (Hwang 2007)，亦即完成整個研究的期程需時較長。因此，本研究之主要目的，係有系統地探討未經冷馴化草莓（「桃園 1 號」）莖頂的超低溫冷凍保存技術，在幼嫩苗株未經低溫馴化培養且

尚未置入液態氮的情形下，先運用含不同蔗糖濃度的培養基進行預培養，再依序使用含不同蔗糖濃度的 LS 和 PVS2 進行前處理，以檢測對於莖頂培植體存活率之影響。最終，則是將經過前處理的莖頂培植體置入液態氮中，且至少保存 1 h 後取出，再進行最佳回溫時間之探討。彙整本研究各項的試驗結果及累積相關實務經驗，以期有助於簡化草莓超低溫冷凍保存的程序，以及建立國家種原中心自有之作物超低溫冷凍保存技術。

## 材料與方法

### 供試材料來源

本試驗所使用的草莓「桃園 1 號」(*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') 種原係取自農業試驗所作物種原組。草莓新生芽體先以 75% 的乙醇溶液浸漬 30 s，再使用 0.5% 次氯酸鈉水溶液消毒處理 10 min，最後在無菌操作台內以無菌水清洗 3 次後切取莖頂部位，並接種培養於含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類、 $0.2\text{ mg L}^{-1}$  6-benzylaminopurine (BAP)、 $0.1\text{ M}$  蔗糖及 0.8% 洋菜粉之培養基中 2 mo.，此後每隔 3–4 mo. 繼代培養 1 次。

### 不同蔗糖濃度預培養對莖頂存活率之影響

在無菌操作台內將草莓組織培養苗從試管中取出，並藉由解剖顯微鏡輔助切取  $1\text{--}2\text{ mm}^3$  莖頂作爲供試培植體，培植體分別接種於添加不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) 的 MS 固體培養基中，並置於恆溫  $21^{\circ}\text{C}$ 、 $38\text{--}40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  光合成光子流量密度 (*photosynthetic photon flux density*; PPFD) 及光週期 14 h 的培養室預培養 14 d 後，調查莖頂培植體之存活率。

### LS 和 PVS2 前處理對莖頂培植體存活率之影響

包埋：選取預培養於 MS 固體培養基 (含  $0.3\text{ M}$  蔗糖) 中 14 d 的小苗株，藉由解剖顯微鏡輔助，切取莖頂作爲供試培植體，在使用 LS 和 PVS2 浸漬之前，每個培植體皆先進行包埋處理。包埋溶液配方分成 A、B 兩種，A

溶液包含已去除  $\text{CaCl}_2$  的 MS 基本鹽類、2% 藻膠與 0.4 M 蔗糖等成分；B 溶液則含有 MS 基本鹽類、0.4 M 蔗糖和 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  等成分。包埋程序係以微量吸管吸取 A 溶液後，再以 1 個莖頂培植體定量使用 0.18 mL 的方式，將其一併滴入 B 溶液中進行滴定包埋，在 25°C 下靜置 5 min 後，即可凝固形成直徑約 4 mm 且包埋單一莖頂培植體的藻膠球。

**不同 LS 滲透壓處理對莖頂培植體存活率之影響：**將包埋有單一培植體的藻膠球分別自 B 溶液中取出，並放入鋪有濾紙的玻璃培養皿吸除多餘的溶液，再將其置入 2 mL 容量之抗凍管中，每 1 支抗凍管置入 10 個藻膠球，且依不同處理試驗需求，分別在抗凍管中個別加入含不同蔗糖濃度的 LS 進行滲透壓保護 90 min，LS 配方含有 MS 基本鹽類、2 M 甘油及不同濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 M) 的蔗糖。各處理組在浸漬後，先以微量吸管將 LS 吸出，再依序使用含 1.0、0.4 和 0.2 M 蔗糖濃度的 MS 培養液各浸漬清洗 10 min，以逐步降低藻膠球中的蔗糖含量。最後，利用濾紙將藻膠球上殘留之溶液吸乾，置於 MS 固體培養基中培養 14 d，觀察及比較各處理組培植體的存活率。

**不同 PVS2 脫水處理時間對莖頂培植體存活率之影響：**取包埋單一莖頂培植體且經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 的藻膠球作為供試材料，分別將其置入 2 mL 容量之抗凍管中，每 1 支抗凍管置入 10 個藻膠球，且在抗凍管中個別加入 PVS2 浸漬及脫水處理，PVS2 溶液主要含有 MS 基本鹽類、0.4 M 蔗糖、30% 甘油、15% 乙二醇 (ethylene glycol) 和 15% 二甲基亞砜 (dimethyl-sulfoxide; DMSO)，pH 值為 5.8；進行浸漬脫水時間分為 60、120、180 及 240 min，脫水處理完成後，先以微量吸管將 PVS2 吸出，再依序使用含 1.2、1.0、0.4 和 0.2 M 蔗糖濃度的 MS 培養液各浸漬清洗 10 min。最後，利用濾紙將藻膠球上殘留之溶液吸乾，置於 MS 固體培養基中培養 14 d，觀察及比較各處理組培植體的存活率。

## 抗凍管內不同 PVS2 體積與凍存後回溫時間對莖頂培植體再生率的影響

取包埋單一莖頂培植體且依序經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 的藻膠球作為供試材料，將其置入 2 mL 容量之抗凍管中，每 1 支抗凍管置入 10 個藻膠球，再分別於不同的抗凍管內加入不同體積 (0.3、0.5 及 1.0 mL) 的 PVS2 抗凍液。最後，直接浸入液態氮中超低溫冷凍保存 1 h，再將上述三種不同 PVS2 體積之處理組迅速置入 38°C 恆溫水槽中，個別進行不同回溫時間 (60、90 及 120 s) 對於草莓 (「台農 1 號」) 莖頂培植體再生率的影響試驗。各處理組回溫完成後，先以微量吸管將 PVS2 吸出，再依序使用含 1.2、1.0、0.4 和 0.2 M 蔗糖濃度的 MS 培養液各浸漬清洗 10 min，最後，利用濾紙將藻膠球上殘留之溶液吸乾，置於含有 MS 基本鹽類、0.2  $\text{mg L}^{-1}$  BA、0.1 M 蔗糖及 0.8% 洋菜粉之再生培養基中培養 14 d，調查和比較各處理組莖頂培植體的再生率。

## 試驗統計分析

以上試驗每一處理皆重複 3 次，每 1 重複使用 10 個培植體，獲得的數據資料計算其算術平均值及標準差 (standard error; SE)，並以 SAS 統計軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，在 5% 顯著性水準下以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD test) 檢定各處理間差異的顯著性。

## 結果

### 不同蔗糖濃度預培養對莖頂存活率之影響

草莓組織培養苗從試管中取出並切取莖頂作為供試材料，分別預培養於含 0.1、0.2、0.3 和 0.4 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基 14 d，經統計分析結果顯示，培養於前三項處理組的莖頂培植體存活率皆達到 100% (圖 1)，顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度之處理組 ( $86.7\% \pm 9.4\%$ )。

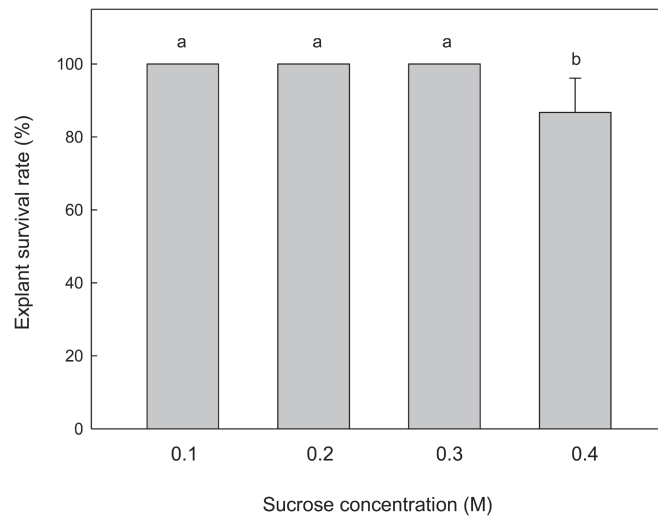


圖 1. 不同 MS 培養基 (蔗糖濃度: 0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) 預培養 14 d 之草莓 (「桃園 1 號」) 莖頂培植體存活率。

**Fig. 1.** The survival rates of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') shoot tip explants precultured on different MS media (sucrose concentrations: 0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 M) for 14 d. Vertical bars indicate standard error (n = 3).

### 不同 LS 滲壓處理對莖頂培植體存活率之影響

將包埋有單一莖頂培植體的藻膠球分別置入 2 mL 容量之抗凍管，並在各抗凍管中個別加入含不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 及 1.6 M) 的 LS 溶液進行滲透壓保護處理 90 min，再置於 MS 固體培養基培養 14 d。試驗結果顯示，莖頂培植體不論是使用含有 0.6 M 蔗糖濃度的處理組 (代號 LS 0.6 M) 或是添加量達到 1.6 M 的處理組 (代號 LS 1.6 M)，調查其試驗後之存活率皆為 100% (圖 2)。

### PVS2 脫水處理對莖頂培植體存活率之影響

將包埋有單一莖頂培植體且經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 的藻膠球置入 2 mL 容量抗凍管中，再加入 PVS2 進行浸漬脫水 60 min 的處理組，其培養於 MS 固體培養基 14 d 後之存活率最佳為 96.7% ± 4.7% (圖 3)，高於浸漬脫水 120 min 者 (73.3% ± 4.7%)，也顯著優於浸漬脫水時間達 180 min (60.0% ± 14.1%) 及 240 min (46.7% ± 17.0%) 的處理組。

### 抗凍管內不同 PVS2 體積與凍存後回溫時間對莖頂培植體再生率的影響

將包埋有單一莖頂培植體且經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 後的藻膠球置入 2 mL 容量之抗凍管中，以 -196°C 液態氮進行凍存之前，於抗凍管內先加入 PVS2 抗凍液 0.3 mL 且凍存後迅速回溫 60 s (代號 RW60s) 的處理組，其培養 14 d 後之平均再生率最高達到 80% (表 1)，顯著高於加入 0.5 mL (63.3% ± 4.7%) 或 1.0 mL (60.0% ± 0.0%) PVS2 之處理組，且此種培植體經培養 6 mo. 後，已發育成爲根系強健的苗株 (圖 4)；若比較回溫時間 90 s (代號 RW90s) 或 120 s (代號 RW120s) 的各個處理組，則抗凍管內不論是加入 0.3、0.5 或 1.0 mL 新鮮的 PVS2 抗凍液，其莖頂培植體平均再生率僅分別為 53.3–70.0% 及 46.7–60.0% (表 1)。

## 討論

自從 1976 年 Seibert 首度將康乃馨莖頂組織應用超低溫技術予以保存迄今，此一技術已被廣泛應用於更多的植物種類 (Bajaj 1991)。在日本學者編撰有關其國內植物細胞和器官超

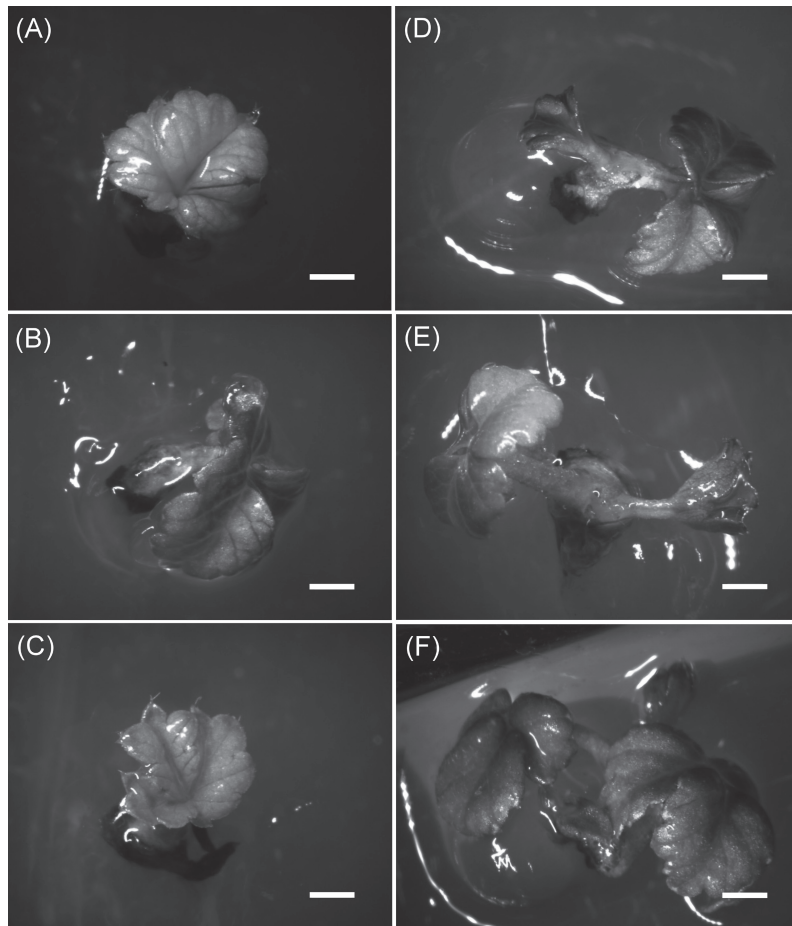


圖 2. 不同填充溶液 (LS) 浸漬 90 min 再培養 14 d 後之草莓 (「桃園 1 號」) 莖頂培植體。(A) LS 0.6 M ; (B) LS 0.8 M ; (C) LS 1.0 M ; (D) LS 1.2 M ; (E) LS 1.4 M ; (F) LS 1.6 M。(比例尺 = 1 mm)

Fig. 2. The shoot tip explants of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after immersed in different loading solutions (LS) for 90 min and then cultured for 14 d. (A) LS 0.6 M; (B) LS 0.8 M; (C) LS 1.0 M; (D) LS 1.2 M; (E) LS 1.4 M; (F) LS 1.6 M. (Scale bar = 1 mm)

低溫冷凍保存進展的研究專書中，也列舉了包含草莓、甘藷、龍膽、百合、星辰花、柿子、梨、櫻桃、柑桔和櫻花等多種草本及木本類植物 (Niino *et al.* 2006)。植物種原之莖頂、器官或組織運用超低溫冷凍技術進行保存所需的空間較之田間保存小，故為無性繁殖作物長期貯存以維持種原和基因性狀穩定的適當選擇。但在培植體玻璃質化且浸入液態氮前，必須先藉助較高濃度的含糖溶液、LS 和 PVS2 等預處理，以達到滲透壓保護和脫水的效果；另在解凍回溫過程中，也需盡量縮短時間並設法降低細胞間隙產生冰晶造成傷害，或是避免嚴

重脫水導致原生質膜遭到破壞，以致於喪失正常的生理機能。上述各項處理程序，被認為是影響玻璃化冷凍保存技術成功與否的主要因子 (Thomashow 1999; Ashworth & Pearce 2002; Hirai & Sakai 2003)。

此外，利用適度的低溫環境進行苗株之冷馴化培養，則有助於提高超低溫冷凍保存後培植體的存活率與植株再生率 (Chang & Reed 2000)。Hwang (2007) 研究以玻璃化法超低溫冷凍保存草莓種原時，即先將瓶苗置於 10°C 低溫冷馴化 30 d，再切取莖頂分生組織進行試驗，最終得到 85% 以上的培植體存活率。

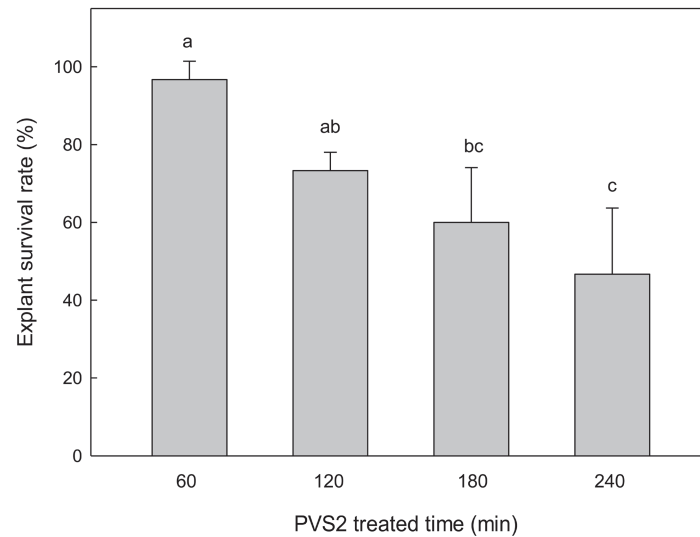


圖 3. 植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 處理不同時間 (60、120、180 及 240 min) 後的草莓 (「桃園 1 號」) 莖頂培植體存活率。

**Fig. 3.** The survival rates of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') shoot tip explants after treated with Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) for different time period (60, 120, 180, and 240 min). Vertical bars indicate standard error (n = 3).

表 1. 凍存管中不同植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 體積與液態氮凍存 1 h 後之回溫時間對於草莓 (「桃園 1 號」) 莖頂培植體再生率的影響。

**Table 1.** Effects of different volumes of Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) on cryotube and rewarming time on the regeneration rate of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') shoot tip explants after immersed into liquid nitrogen for 1 h<sup>z</sup>.

PVS2 volume/ Cryotube (mL)	Shoot tip explants regeneration rate (%)		
	RW60s <sup>y</sup>	RW90s	RW120s
0.3	80.0 ± 0.0 a <sup>x</sup>	70.0 ± 21.6 a	60.0 ± 14.1 a
0.5	63.3 ± 4.7 b	56.7 ± 4.7 a	56.7 ± 9.4 a
1.0	60.0 ± 0.0 b	53.3 ± 9.4 a	46.7 ± 12.5 a

<sup>z</sup> The shoot tip explants were precultured on MS medium for 14 d, and then pretreated with LS 1.6 M for 90 min and PVS2 for 60 min before immersed into LN (-196°C). MS medium: MS basal salts + 102.6 g L<sup>-1</sup> sucrose + 0.8% Difco agar, pH = 5.8. LS 1.6 M: MS basal salts + 184.18 g L<sup>-1</sup> glycerol + 547.2 g L<sup>-1</sup> sucrose, pH = 5.8. PVS2: MS basal salts + 136.8 g L<sup>-1</sup> sucrose + 30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl-sulfoxide, pH = 5.8.

<sup>y</sup> RW60s: cryotubes with shoot tip explants were rapidly rewarming in a water bath at 38°C for 60 s.

<sup>x</sup> Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% level by Fisher's protected least significance difference (LSD) test (n = 3).

Hirai *et al.* (1998) 則是先將草莓苗株置於 23°C 的環境培育 28 d, 再移至 4°C 環境冷馴化培養 7–14 d, 最後切取 1 mm<sup>3</sup> 的莖頂組織, 預培養於含 1/2 MS 基本鹽類和 0.3 M 蔗糖的固體培養基 16 h 後, 才開始作為供試之材料。本試驗則是將未經冷馴化培養的草莓苗株自試管取出, 在解剖顯微鏡輔助下, 直接切取莖頂作

為供試材料, 經預培養於含 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基 14 d 後的存活率達到 100% (圖 1), 顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度處理組之存活率 (86.7% ± 9.4%)。顯示草莓苗株在適應高張溶液培養時, 培養基中添加的蔗糖濃度可適度提高到 0.3 M, 此也與 Hirai *et al.* (1998) 以及 Niino *et al.* (2003) 所發表的處理程序相符合。



圖 4. 莖頂以液態氮超低溫冷凍保存 1 h，再回復生長及繼代培養 6 mo. 後的草莓 (「桃園 1 號」) 苗株。(比例尺 = 1 cm)

**Fig. 4.** The plantlet of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. ‘Taoyuan No.1’) after shoot tip cryopreserved in liquid nitrogen for 1 h and then recovered by growth and subculture for 6 mo. (Scale bar = 1 cm)

另在本項試驗過程中，同時觀察到莖頂培植體預培養於含 0.1 M 較低蔗糖濃度的 MS 固體培養基 7 d 後，培植體第 1 片新葉已完全展開且第 2 片葉也開始生長，至於其他處理組 (含蔗糖濃度 0.2、0.3 和 0.4 M) 之第 1 片新葉此時才開始生長，顯示含較高蔗糖濃度的培養基可能會延緩草莓莖頂的生長速率 (資料未列出)。

日本學者 Matsumoto *et al.* (1998) 研究指出，植物組織在 PVS2 脫水及浸入液態氮冷凍保存前，若先以 LS 浸漬處理，可使細胞質壁分離 (plasmolysis) 並避免冰晶形成破壞細胞膜結構。此外，含有高濃度蔗糖的 LS 也能滲透填充於細胞膜間隙及穩定組織結構，從而提高超低溫冷凍保存後之培植體存活率。Hiral & Sakai (2003) 也曾報導使用含不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 及 1.8 M) 的 LS 進行甘藷藻膠球滲透壓保護處理 3 h，結果 LS 添加 1.6 M 蔗糖濃度的處理組，其萌生新芽的比率最高達到 80% 以上。Hiral & Sakai (1999) 在未經 4°C 冷馴化培養的馬鈴薯腋芽滲透壓保護試驗中，使用含 0.6 M 蔗糖濃度的 LS 浸漬處理 90 min，調查其存活及萌芽比率也達到

70% 以上。本試驗則是將包埋有單一莖頂培植體的藻膠球置入抗凍管，並個別加入含不同蔗糖濃度的 LS 溶液進行滲透壓保護處理 90 min 後，即置於 MS 固體培養基培養 14 d，各處理組之莖頂培植體存活率皆為 100% 且發育良好 (圖 2)，顯示上述供試培植體對於 LS 中添加蔗糖的耐受濃度也可以高達 1.6 M。此一結果雖然與 Hwang (2007) 及 Niino (2006) 僅使用含 0.4 M 蔗糖濃度的 LS 溶液浸漬草莓培植體 20 min 或 60 min 之處理方法與時間不盡相同，不過，本試驗獲得的滲透壓保護條件，可作為後續 PVS2 脫水處理及提高培植體存活率之參考。

植物幼嫩分生組織在尚未直接置入 -196°C 液態氮冷凍保存前，除上述先以 LS 滲透壓保護外，尚需經適度的脫水處理以提高未來使用 38–40°C 溫水回溫後之存活率和植株再生率，一般常用的方法有藻膠包埋脫水法 (encapsulation-dehydration) (Scott *et al.* 1992) 或是藻膠包埋玻璃質化法 (encapsulation-vitrification) (Wang *et al.* 2005)。以藻膠包埋玻璃質化法為例，在脫水及冷凍過程中，為保

護植物細胞活力並避免冰晶產生，學者會使用 PVS2 作為冷凍保護劑進行浸漬處理。由於其組成成分中除了 1/2 MS 基本鹽類、0.4 M 蔗糖、30% (w/v) glycerol 和 15% (w/v) ethylene glycerol 外，還添加有 15% (w/v) DMSO，故為一種具有高滲透壓及輕微細胞毒性的溶液 (Sakai *et al.* 1990)。因此，依據冷馴化培養時間、植物的種類以及組織部位之不同，適當調整浸漬脫水處理的時間，方能增加培植體本身的抗凍能力且不致於過度傷害細胞活力 (Volk *et al.* 2006)。例如，將人參不定根先在 21°C 暗培養 12 d 後，切取 3–4 mm 長度的培植體並以 LS 處理 15 min，再以 PVS2 脫水處理 15 min，可獲得 90% 以上的存活率；但 PVS2 脫水處理時間如超過 15 min，則不利於新根系之生成 (Oh *et al.* 2009)。百合莖頂分生組織經 0°C 環境下冷馴化培養 30 d，再使用含有 0.3 M 蔗糖濃度的 LS 滲壓處理 20 min 後，不論是以 PVS2 在 0°C 下浸漬 130 min 或是在 25°C 下浸漬脫水 20 min，其新芽萌生比率皆可達到 90% (Matsumoto *et al.* 1995)。Hwang (2007) 在進行草莓玻璃質化試驗時，先以 10°C 低溫冷馴化 30 d，續以含 0.4 M 蔗糖濃度之 LS 處理 20 min 後，再將莖頂培植體浸漬於 PVS2 脫水 150 min，結果仍有 97% 存活率。本試驗則是將未經冷馴化的草莓莖頂包埋形成藻膠球，再經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 後，置入 PVS2 中浸漬脫水 60 min，此種培植體經培養於 MS 固體培養基 14 d 後之存活率，最高達到 96.7% ± 4.7% (圖 3)。若浸漬脫水超過 120 min，則莖頂培植體之存活率急速降低，此與前述 Hwang (2007) 的試驗結果不盡相同，其原因可能是本試驗之供試材料未經低溫冷馴化培養且使用之 LS 蔗糖含量較高，當滲透壓保護處理時間較長時，部份培植體已顯現過度脫水的現象。

經查閱數篇有關草莓超低溫冷凍保存的國內、外研究論文，尚未有探討培植體以液態氮超低溫冷凍保存前，抗凍管內加入 PVS2 抗凍劑的體積及凍存後回溫時間對於培植體再生率的影響。例如，Hwang (2007) 在其研究論文中僅提到草莓頂芽在浸入液態氮前，於抗凍管

內加入 0.5 mL 的新鮮 PVS2 抗凍劑，當凍存 1 wk 後取出，在 40°C 恆溫水槽中迅速回溫 30 s。Niino *et al.* (2003) 的研究也僅敘述其在抗凍管內加入的 PVS2 抗凍劑體積為 0.5 mL，凍存 1 d 後在 35°C 恆溫水槽中迅速回溫，但未提及回溫設定的時間。Hirai *et al.* (1998) 則是以草莓走莖莖頂作為試驗材料，其在抗凍管內加入的 PVS2 抗凍劑體積為 1 mL，凍存後在 38°C 恆溫水槽中迅速回溫。本試驗的結果顯示，未經冷馴化的草莓莖頂包埋成藻膠球且經前處理後，置入 2 mL 容量之抗凍管中，在以 -196°C 液態氮凍存前，只需於抗凍管內加入 0.3 mL 體積的 PVS2 抗凍劑且在凍存後回溫 60–90 s，其培養 14 d 後之平均再生率可達到 70–80% (表 1)，也優於其他用量的處理組。且此種培植體經繼代培養 6 mo. 後，可以發育成強健的苗株 (圖 4)。因此，本研究應可提供試驗過程中減少 PVS2 抗凍液用量之參考。

綜合上述各項試驗結果，可以繪製未經冷馴化之草莓莖頂超低溫冷凍保存之簡易操作流程 (圖 5)。亦即自田間採得草莓材料後，先建立無菌組織培養苗，在未經 4–10°C 低溫冷馴化情形下，可直接將已去除葉片的短縮莖段接種於含 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基，並置於溫度 21°C、38–40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD 和光週期為 14 h 的環境預培養 14 d，再切取 1–2  $\text{mm}^3$  之莖頂分生組織作為超低溫冷凍保存的材料。經過包埋程序成為含有單一莖頂培植體的藻膠球，在尚未置入液態氮之前，先使用含 1.6 M 蔗糖濃度的 LS 滲透壓保護 90 min，再以 PVS2 浸漬脫水 60 min，最後才浸漬於 -196°C 液態氮中長期冷凍保存。上述簡化操作流程的完成，不但省卻以低溫冷馴化所需的時間及節省空調電力等能源損耗，試驗過程也減少了 PVS2 抗凍液的用量，故本研究應有助於建構國家種原中心自有作物超低溫冷凍保存技術並簡化草莓超低溫冷凍保存的程序。

## 誌謝

本試驗承行政院農業委員會科技計畫經費補助 (101 農科 -9.2.3- 農 -C5)，植物超低溫冷凍保存技術則承蒙日本農業生物資源研究所

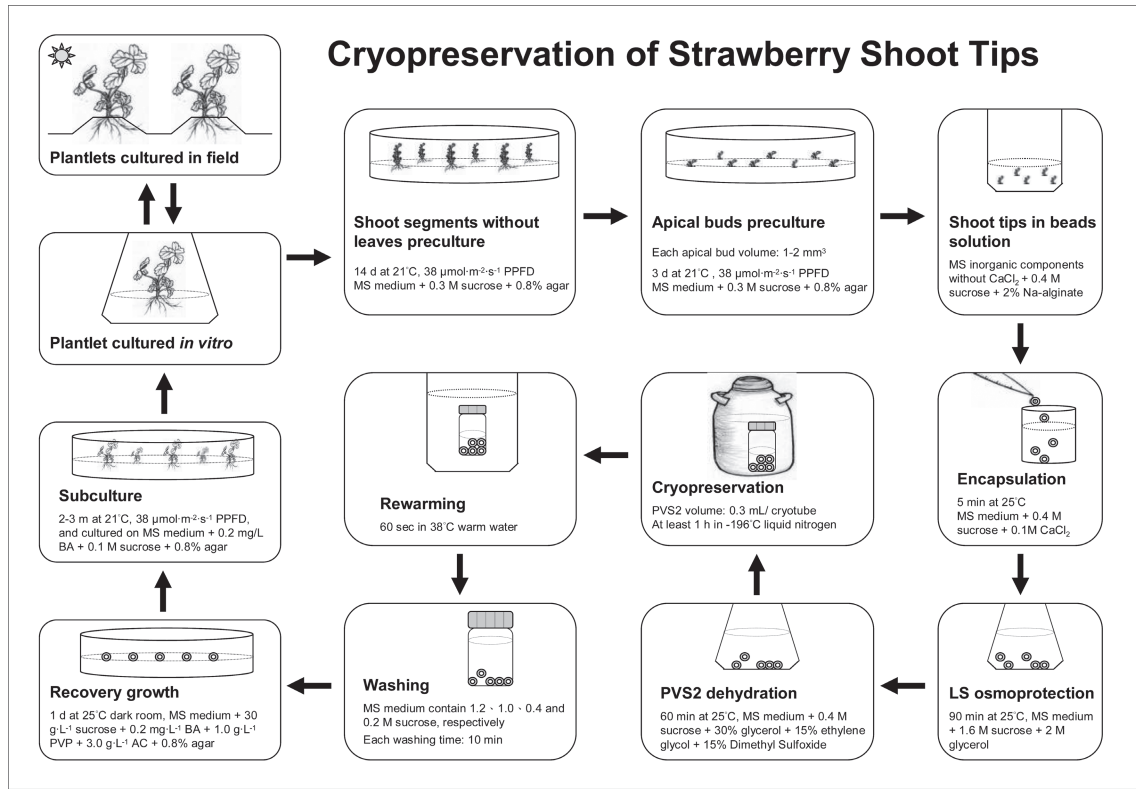


圖 5. 草莓(「桃園 1 號」) 莖頂培植體超低温冷凍保存之流程圖。

Fig. 5. Flow chart of the cryopreservation method of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') shoot tip explants.

Takao Niino 博士及島根大學 Toshikazu Matsumoto 博士指導，特此一併申謝。

### 引用文獻

Ashworth, E. N. and R. S. Pearce. 2002. Extracellular freezing in leaves of freezing-sensitive species. *Planta* 214:798–805.

Bajaj, Y. P. S. 1978. Effect of super-low temperatures on excised anthers and pollen embryos of *Atropa*, *Nicotiana* and *Petunia*. *Phytomorphology* 28:171–176.

Bajaj, Y. P. S. 1991. Storage and cryopreservation of *in vitro* cultures. p.361–381. in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17. High-tech and micro-propagation I. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer. Berlin, Heidelberg, New York. 555 pp.

Chang, Y. and B. M. Reed. 2000. Extended alternating-temperature cold acclimation and duration improve pear shoot cryopreservation. *Cryobiology* 40:311–322.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm—A review. *Euphytica* 57:227–243.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40:427–433.

Hirai, D. and A. Sakai. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Res.* 42:153–160.

Hirai, D. and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by optimizing conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep.* 21:961–966.

Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai, and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101:109–115.

Hwang, K. Y. 2007. Investigation of the Protocol on the Cryopreservation of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) Treated by Vitrification. Master thesis, Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 55 pp. (in Chinese with English abstract)

- Keller, E. R., A. Senula, S. Leunufna, and M. Grube. 2006. Slow growth storage and cryopreservation—tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Intl. J. Refrig.* 29:411–417.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41:237–241.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and Y. Nako. 1998. A novel pre-culturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Cryo. Lett.* 19:27–36.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Niino, T. 2006. Strawberry shoot tips culture (vitrification). p.53–54. *in: Cryopreservation of Plant Cell and Organs.* (Niino, T., H. Dai, M. Toshikazu, and T. Daisuke, eds.). National Institute of Agrobiological Sciences. Ibaraki. 208 pp. (in Japanese)
- Niino, T., D. Tanaka, S. Ichikawa, J. Takano, S. Ivette, K. Shirata, and M. Uemura. 2003. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification. *Plant Biotech.* 20:75–80.
- Niino, T., H. Dai, M. Toshikazu, and T. Daisuke. 2006. Cryopreservation of Plant Cell and Organs. National Institute of Agrobiological Sciences. Ibaraki. 208 pp. (in Japanese)
- Oh, S. Y., C. H. Wu, E. Popova, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2009. Cryopreservation of *Panax ginseng* adventitious roots. *J. Plant Biol.* 52:348–354.
- Reed, B. M. and K. E. Hummer. 1995. Conservation of germplasm of strawberry (*Fragaria* species). p.354–370. *in: Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Vol. 32. Cryopreservation of Plant Germplasm. I. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer. Berlin, Heidelberg, New York. 514 pp.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9:30–33.
- Sakila, S., M. B. Ahmed, U. K. Roy, M. K. Biswas, R. Karim, M. A. Razvy, M. Hossain, R. Islam, and A. Hoque. 2007. Micropropagation of strawberry (*Fragaria*  $\times$  *ananassa* Duch.): A newly introduced crop in Bangladesh. *American-Eurasian J. Sci. Res.* 2:151–154.
- Scottez, C., E. Chevreau, N. Godard, Y. Arnaud, M. Duron, and J. Dereuddre. 1992. Cryopreservation of cold-acclimated shoot tips of pear *in vitro* cultures after encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 29:691–700.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:571–599.
- Volk, G. M., J. L. Harris, and K. E. Rotindo. 2006. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology* 52:305–308.
- Wang, Q. C., J. Laamanen, M. Uosukainen, and J. P. T. Valkonen. 2005. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell Rep.* 24:280–288.

## Study on the Cryopreservation of Non-cold Hardening *Fragaria × ananassa* Duch. Shoot Tips

Yih-Juh Shiau<sup>1,\*</sup> and Guan-Wen Chen<sup>2</sup>

### Abstract

Shiau, Y. J. and G. W. Chen. 2014. Study on the cryopreservation of non-cold hardening *Fragaria × ananassa* Duch. shoot tips. J. Taiwan Agric. Res. 63(1):57–67.

Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) is a high economic value perennial crop. It belongs to the Rosaceae family and is distributed in more than 70 countries. Therefore, the research on long-term storage of germplasm is important. The major objective of this study was to establish an optimum cryopreservation method of non-cold hardening *Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1'. The results obtained on pretreatment of explants prior to plunge into liquid nitrogen (LN) were as follows: (1) The survival rate of shoot tips (1–2 mm<sup>3</sup>) was 100% when explants precultured on MS basal medium supplemented with 0.3 M sucrose for 14 d. (2) To increase sucrose levels from 0.6 M to 1.6 M in loading solution (LS) and then osmoprotected for 90 min, the survival rate of shoot tips remained 100%. (3) Survival rate of shoot tips achieved 96.7% ± 4.7% when treated with Plant Vitrification Solution 2 (PVS2) dehydration for 60 min. This percentage was significantly higher than treatments of PVS2 dehydration for 180 min (60.0% ± 14.1%) and 240 min (46.7% ± 17.0%). After PVS2 dehydration treatment, 10 shoot tip beads with 0.3 mL fresh PVS2 were transferred to a 2 mL cryotube and then plunged directly into LN for at least 1 h. After storage in LN, cryotubes were rapidly rewarmed in a water bath at 38°C for 30 s. The final average regeneration rate of shoot tip beads (80%) was achieved after subcultured for 14 d. These research results appear promising for establishing and simplifying cryopreservation procedure of strawberry.

**Key words:** *Fragaria × ananassa* Duch., Cryopreservation, Loading solution, Osmoprotection, Plant Vitrification Solution 2.

---

Received: November 15, 2013; Accepted: January 22, 2014.

\* Corresponding author, email: yjshiau@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.