

未經冷馴化之草莓腋芽超低溫冷凍保存研究

蕭翌柱^{1,*} 陳冠文²

摘要

蕭翌柱、陳冠文。2015。未經冷馴化之草莓腋芽超低溫冷凍保存。台灣農業研究 64(3):228–238。

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 在全世界已有超過 70 個以上的國家進行栽培與量產，其為薔薇科 (Rosaceae) 多年生高經濟作物之一，因此進行種原的長期保存益顯重要，本試驗主要目的即在建立未經冷馴化草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽最適宜的超低溫冷凍保存方法。腋芽培植體 (芽體尺寸 1–2 mm) 在尚未浸入 -196°C 液態氮前之預處理結果顯示：(1) 預培養於添加 0.3 M 蔗糖之 MS 基本鹽類培養基 14 d 後，平均存活率為 $96.7\% \pm 5.8\%$ ；(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，腋芽的平均存活率仍可達到 100%；以及 (3) 腋芽使用植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 脫水處理 60 min 後，平均存活率達到 $86.7\% \pm 4.7\%$ ，此百分比顯著高於脫水處理 180 min ($46.7\% \pm 4.7\%$) 和 240 min ($46.7\% \pm 17.0\%$) 的處理組。含有腋芽的藻膠球繼代培養 14 d 後的存活率可達到 66.7–80%。經比較後各處理之間並無顯著差異，故本研究各項結果有助於簡化草莓腋芽超低溫冷凍保存的方法。

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.) 原產於歐洲及南美洲等地區，為一種具有匍匐莖之多年生薔薇科 (Rosaceae) 草莓屬 (*Fragaria*) 植物，現代常見的栽培種多是由 *F. chiloensis* L. P. Mill. 及 *F. virginiana* Duch. 2 個原始品種自然雜交而來。由於果實富有香氣、色澤討喜且口感酸甜適中，不但可用於鮮食，也能進行冷凍及加工處理；另外，草莓富含維生素 C、水楊酸、檸檬酸及具有美白效用的鞣花酸 (Ellagic acid) 等成分，故自古以來即廣受人們的喜愛。目前，全世界約有 71 個國家進行草莓的商業栽培，換算總栽培面積約有 204,771 ha (Sakila *et al.* 2007)。根據行政院農業委員會 2013 年《農業統計年報》記載，台灣草莓的總收穫面積約有 535 ha，其中又以苗栗縣所占

的栽培面積最大 (484 ha)，其次是南投縣 (16 ha) 和新竹縣 (13 ha)，而苗栗縣的草莓種植面積約有 78% 集中於大湖地區，且仍是以「豐香」為主要商業品種。農糧署在 2013 年的調查資料顯示，苗栗縣草莓的生產費用 (包括種苗、肥料、農藥及工資等) 約為新台幣 985,515 元 ha^{-1} ，若以平均產量 17,548 kg ha^{-1} 估算粗收益為 1,958,802 元 ha^{-1} ，亦即每年的淨收益約可達到 973,287 元 ha^{-1} 。由於國內生產的新鮮草莓是以供應本地市場需求為主，加上深受一般消費大眾的喜愛，使其成為一種具有高經濟價值的作物 (Shih *et al.* 2009; Tsai *et al.* 2009)，因此積極研究草莓健康種苗繁殖及種原保存技術也益顯重要。

世界各國設立的作物種原中心所採用的種原保存方式可區分為 3 種：(1) 在原生地進行現地保存；(2) 將種原移植後配合集約管理之

投稿日期：2014 年 11 月 6 日；接受日期：2015 年 3 月 10 日。

* 通訊作者：yjshiau@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所作物種原組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所作物種原組研究助理。台灣 台中市。

離場保存；以及 (3) 利用組織培養等技術進行種原離體保存 (Engelmann 1991)。例如，日本北海道農業試驗機關即在網、溫室等設施內，以盆栽栽培保存 105 個草莓品種，但此種保存方式仍需定期進行補種和移植，以防止帶菌母株或走莖引發病害造成種原的損失 (Hirai *et al.* 1998)。近年來，隨著生物技術日新月異的發展，已與傳統的種原保護措施相結合，不但可以維持生物的多樣性並且能夠有效保存重要的物種資源，採用組織培養技術建立無菌培植體和繼代培養，也可以避免植物種原遭受病、蟲危害，導致遺傳資源喪失的風險 (Bajaj 1991; Reed *et al.* 2001)；另外，美國國家作物種原中心也利用組織培養或超低溫冷凍保存等方法，在低溫的環境中保存超過 350 個草莓品種 (Niino *et al.* 2003)。一般應用植物超低溫冷凍保存技術時，需先將培植體進行預培養和低溫冷馴化 (cold hardening)，再依序經過填充溶液 (loading solution; LS) 滲透壓保護 (osmoprotection) 和浸漬於植物玻璃質化溶液 2 (plant vitrification solution 2; PVS2) 脫水處理 (dehydration treatment) 等程序，最後才將植物莖頂、體胚或芽體等置入 -196°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 (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)。

本研究係繼先前發表有關未經冷馴化草莓莖頂超低溫冷凍保存技術的論文後 (Shiau & Chen 2014)，持續探討未經冷馴化草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽的超低溫冷凍保存方法。由於預備試驗結果顯示，腋芽的體積大小會影響培植體置入 PVS2 脫水處理後之存活率，因此本研究主要目的是探討未經低溫冷馴化之草莓腋芽在冷凍保存前的預培養程序。另外，取不同體積的腋芽進行不同時間的 PVS2 脫水處理，以檢測其對於培植體存活率之影響，最終則是將經過前處理的腋芽培植體置入液態氮中，經不同保存日數後取出進行培植體再生率比較以及最佳回溫時間之探討。彙整本研究各項試驗結

果，將有助於簡化草莓腋芽超低溫冷凍保存的方法。

材料與方法

供試材料

本試驗所使用的草莓「桃園 1 號」品種係取自行政院農業委員會農業試驗所種原組，應用組織培養無性繁殖之草莓無菌苗則置於恆溫 21°C 、 $38\text{--}40\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ 光合成光子流量密度 (photosynthetic photon flux density; PPFD) 及光週期 14 h 的培養室，使用含有 MS (Murashige & Skoog 1962) 基本鹽類、 $0.2\ \text{mg L}^{-1}$ 6-benzylaminopurine (BA)、 $0.1\ \text{M}$ 蔗糖及 0.8% Difco 洋菜粉，pH 5.8 的固體培養基培養 2 mo。

預培養程序、腋芽之取得方法及培植體存活率之調查標準

將已去除葉片和葉柄並預培養 14 d 的草莓莖節自試管中取出，在解剖顯微鏡下切除莖頂分生組織後，再次預培養 7 d 以打破頂芽優勢促進腋芽萌生。預培養 7 d 後，切取莖節上已萌生的腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm)，並接種於固體培養基培養 3 d 後，即可作為試驗材料，前述預培養用之培養基含有 MS 基本鹽類、 $0.3\ \text{M}$ 蔗糖及 0.8% Difco 洋菜粉，pH 5.8。另外，因先前的預備試驗顯示，供試培植體經高濃度蔗糖溶液或超低溫處理後再培養 14 d，即能明顯判斷培植體是否褐化死亡或維持翠綠色並回復生長，可據此作為下述各項試驗之腋芽培植體存活率調查標準。

不同蔗糖濃度預培養對腋芽存活率之影響

為檢測腋芽培植體在預培養時，對於培養基中蔗糖含量的耐受濃度，故先於無菌操作台內藉由解剖顯微鏡輔助切取腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm)，再分別接種於含有不同蔗糖濃度 (0.1 、 0.2 、 0.3 及 $0.4\ \text{M}$) 的 MS 固體培養基上，且以添加 $0.1\ \text{M}$ 蔗糖濃度的 MS 固體培養基作為對照組，置於組織培養室培養 14 d 後，再調查各處理組之培植體存活率。

滲透保護及脫水處理對腋芽存活率之影響

包埋：供試培植體在進行滲透壓保護前需進行包埋處理；包埋溶液分為 A、B 兩種，其配方及包埋方法皆與作者前一篇文章 (Shiau & Chen 2014) 所述相同。

不同 LS 滲透壓處理對腋芽培植體存活率之影響：將包埋有腋芽培植體之藻膠球移至鋪有濾紙的培養皿上吸取殘餘的 B 溶液，再將藻膠球移至 2 mL 容量抗凍管，依試驗需求加入含不同蔗糖濃度的 LS，每支抗凍管添加 1 mL，供試之 LS 配方分別含有 2 M 甘油、不同蔗糖濃度 (0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 或 1.6 M) 以及 MS 基本鹽類，pH 值為 5.8。在 25°C 的環境溫度下滲透保護處理 90 min，每支抗凍管中有 10 個培植體。經滲透保護處理後的培植體，各依序以 1 mL 的 1.2、0.8、0.6 及 0.2 M 蔗糖濃度 MS 培養液浸漬清洗 10 min，使培植體內甘油成分降低、並漸進增加組織含水率，最後將藻膠球接種在 MS 固體培養基培養 14 d，觀察和紀錄各處理組之培植體存活率。

不同 PVS2 脫水時間對不同腋芽培植體存活率之影響：分別切取不同腋芽 (芽體尺寸小於 1 mm 和 1–2 mm) 作為供試材料，經包埋成藻膠球後，使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min。再利用微量吸管個別吸取 1 mL PVS2 注入抗凍管，並在固定溫度 25°C 的乾浴槽中分別脫水 60、120、180 及 240 min，PVS2 為含有 30% w/v 甘油、15% 二甲基亞砒 (DMSO)、15% 乙二醇及 0.4 M 蔗糖的 MS 無機鹽類營養液 (pH 5.8)。待處理完畢後將 PVS2 吸出，再依序以 1 mL 的 1.2、0.8、0.6 及 0.2 M 蔗糖濃度的 MS 培養液各浸漬清洗 10 min，最後，將藻膠球自抗凍管中取出，放置濾紙上吸取殘液後，先接種於含活性碳之 MS 培養基 (MS 基本鹽類 + 30 g L⁻¹ 蔗糖 + 0.2 mg L⁻¹ BAP + 1.0 g L⁻¹ PVP + 3.0 g L⁻¹ 活性碳 + 0.8% agar) 暗培養 1 d，再轉至 MS 再生培養基 (MS 基本鹽類 + 0.1 M 蔗糖 + 0.2 mg L⁻¹ BAP + 0.8% agar) 培養 14 d，調查和比較各處理組之培植體存活率。

抗凍管內不同 PVS2 用量與凍存後回溫時間對腋芽培植體存活率的影響

取包埋單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且依序經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲透保護處理 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，再各別於抗凍管內加入不同用量 (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 3 種含不同 PVS2 體積之處理組迅速置入 38°C 恆溫水槽中，個別進行回溫處理 (60、90 及 120 s)。各處理組在回溫後使用之 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，皆與前項試驗相同，培植體經培養 14 d 後，調查和比較各處理組之存活率。

液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響

取包埋單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且依序經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲透保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 的藻膠球作為供試材料，每 1 支 2 mL 容量抗凍管內置入 10 個藻膠球，再各別於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍液。最後，直接浸入液態氮中超低溫冷凍保存不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d 及 90 d) 後取出，再迅速置入 38°C 恆溫水槽中回溫處理 60 s。各處理組在回溫後使用之 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，皆與前項試驗相同，培植體經培養 14 d 後，調查和比較各處理組之存活率。

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腋芽培植體存活率之影響

草莓組織培養苗從試管中取出，先於無菌操作台內，在 10 倍放大倍率的解剖顯微鏡下切取腋芽組織（芽體尺寸 1–2 mm），分別接種在 0.1 M (Control)、0.2 M、0.3 M 及 0.4 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基進行預培養 14 d。經統計分析結果顯示，培養於前 3 項處理組的腋芽培植體存活率皆達到 96.7–100% (圖 1)，顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度處理組之 60% 存活率。

不同 LS 滲透壓處理對腋芽培植體存活率之影響

將包埋有單一腋芽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 溶液在 25°C 的環境下滲透壓保護處理 90 min，再置於 MS 固體培養基培養 14 d。試驗結果顯示，腋芽培植體不論是使用

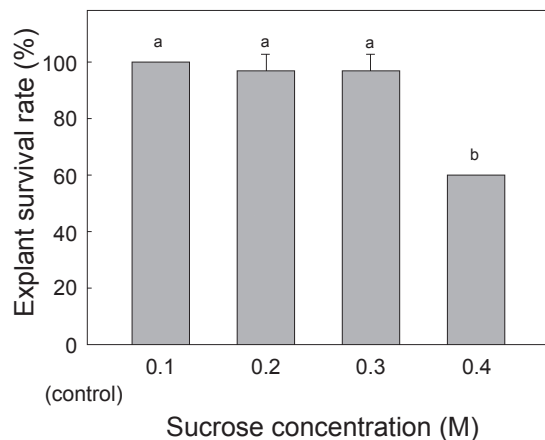


圖 1. 在含不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) MS 培養基預培養 14 d 之草莓「桃園 1 號」腋芽存活率。

Fig. 1. The survival rates of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') axillary buds pre-cultured on MS medium with different sucrose concentrations (0.1, 0.2, 0.3, and 0.4 M) for 14 d. Vertical bars indicate standard error ($n = 3$).

含有 0.6 M 蔗糖濃度的處理組或是添加量達到 1.6 M 的處理組，調查試驗後培植體之存活率皆為 100% (圖表未提供)。

不同 PVS2 脫水時間對於不同腋芽培植體存活率之影響

不同芽體尺寸 (小於 1 mm 和 1–2 mm) 的腋芽材料，經個別包埋成藻膠球後，先使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min，再利用微量吸管個別吸取 1 mL PVS2 注入抗凍管，並在固定溫度 25°C 的乾浴槽中分別脫水處理 60、120、180 及 240 min，經 MS 培養液清洗後，在 MS 再生培養基培養 14 d。結果顯示，芽體尺寸小於 1 mm 的腋芽以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率為 60.0% ± 8.2% (圖 2A)，顯著高於脫水 120 min (43.7% ± 4.7%)、180 min (33.3% ± 4.7%) 及 240 min (23.3% ± 4.7%) 之處理組。另外，若取芽體尺寸 1–2 mm 的腋芽以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率則達到 86.7% ± 4.7% (圖 2B、圖 3)，略高於脫水 120 min 者 (66.7% ± 4.7%)，且顯著高於 180 min (46.7% ± 4.7%) 及 240 min (46.7% ± 17.0%) 之處理組。

抗凍管內不同 PVS2 用量與凍存後回溫時間對腋芽培植體存活率的影響

將包埋有單一腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 且經 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲透保護處理 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，在使用 -196°C 液態氮進行凍存前，於抗凍管內先加入 PVS2 抗凍液 0.3 mL 且凍存 1 h 後取出迅速回溫 60 s (代號 RW60s) 的處理組。在培養 14 d 後，平均存活率為 76.7% ± 4.7% (表 1)，略高於加入 PVS2 0.5 mL (66.7% ± 12.5%) 或 1.0 mL (60.0% ± 0.0%) 之處理組；若是回溫時間 90 s (代號 RW90s) 時，抗凍管內加入 0.3 mL 新鮮 PVS2 抗凍液的處理組，其腋芽培植體平均存活率為 80.0% ± 8.2%，略高於加入 0.5 mL (66.7% ± 4.7%) 或 1.0 mL (63.3% ± 9.4%) 之處理組；當設定回溫時間為 120 s (代號 RW120s) 時，則抗凍管內加入 0.3 mL PVS2 抗凍液的處理組，其腋芽存活率僅有 63.3% ± 9.4%，其與加入 0.5 mL

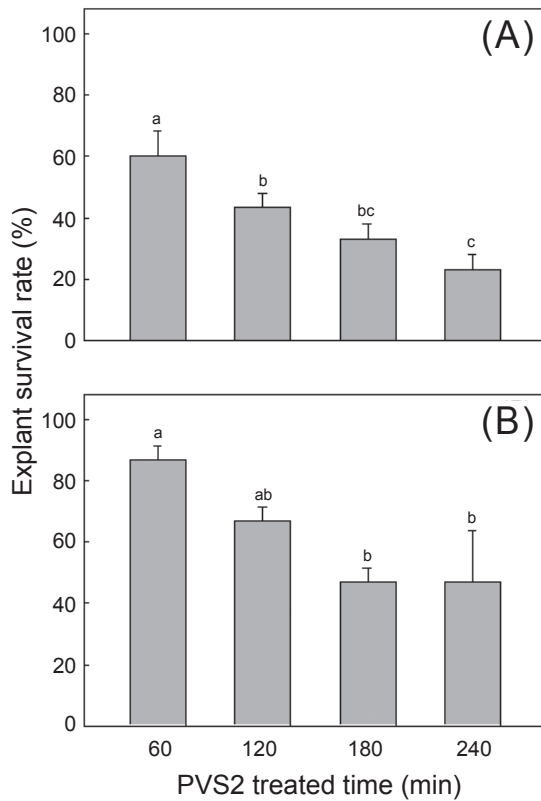


圖 2. 草莓 (「桃園 1 號」) 不同尺寸的腋芽 (A: 小於 1 mm; B: 1–2 mm) 以植物玻璃質化溶液 2 (PVS2) 浸漬不同時間 (60、120、180 及 240 min) 後的存活率。

Fig. 2. The survival rates of different sizes axillary buds of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') (A: less than 1 mm; B: 1–2 mm) after immersing in plant vitrification solution 2 (PVS2) for different time periods (60, 120, 180, and 240 min). Vertical bars indicate standard error ($n = 3$).

之處理組相似 ($63.3\% \pm 4.7\%$)，但略低於加入 1.0 mL PVS2 之處理組 ($80.0\% \pm 8.2\%$)。

液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響

將經過包埋且依序以 LS (含 1.6 M 蔗糖) 滲壓保護處理 90 min 和 PVS2 浸漬脫水 60 min 的腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 置入抗凍管中，再於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍液，最後直接浸入液態氮分別超低溫冷凍保存不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d 及 90 d) 後取出，迅速置入 38°C 恆溫水槽中回溫處理 60 s。結果

顯示，各處理組在回溫後，依序經過 MS 培養液清洗、暗培養以及 MS 再生培養基培養等程序，各處理組之存活率分別為 $76.7\% \pm 4.7\%$ 、 $73.3\% \pm 9.4\%$ 、 $80.0\% \pm 16.3\%$ 、 $66.7\% \pm 9.4\%$ 及 $66.7\% \pm 9.4\%$ 。經比較和分析後，彼此間並無顯著差異 (圖 4)，此種經過超低溫冷凍保存之腋芽培植體，在繼代培養 7 mo 後，能發育成為根系強健的苗株 (圖 5)。

討論

自 1976 年由 Seibert 首度發表康乃馨莖頂超低溫保存研究後 (Bajaj 1991)，至今此一技術已被廣泛應用於更多的植物種類，例如，日本已建立甘藷、百合、柿子、梨、櫻桃、柑桔和櫻花等十數種植物之超低溫冷凍保存技術 (Niino 2006)。我國則以中興大學累積 15 年以上之研究經驗最具成效，試驗種類包括高氏柴胡、台灣黃芩、牛樟、番木瓜、鳳梨、葡萄、北蕉、山藥、甘藷以及原生種報歲蘭等。台灣大學則是探討香蕉體胚玻璃質化超低溫保存之影響因子。植物種原應用超低溫冷凍保存所需的空間較之田間保存小，但培植體在以液態氮冷凍之前，需先藉助較高濃度的含糖溶液、LS 和 PVS2 進行預處理，以達到滲透壓保護和適度脫水的效果；另在解凍回溫過程中，也需儘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，以致喪失正常的生理機能。上述各項程序，被認為是影響玻璃質化冷凍保存技術成功與否的重要因素 (Thomashow 1999; Ashworth & Pearce 2002; Hirai & Sakai 2003)。例如，在室溫下，將龍膽屬植物幼苗先繼代培養數日後，再用二階段含高蔗糖濃度 (0.4 M 及 0.7 M) 的培養基各培養 1 d，可以增加腋芽培植體之存活率 (Suzuki *et al.* 2005)；若利用低溫逆境培養數週再搭配滲透逆境培養的方式，也能提升馬鈴薯等作物在超低溫冷凍保存後之存活率 (Hirai & Sakai 1999)。另外，在本項研究的預備試驗發現，在解剖顯微鏡下直接切取草莓休眠腋芽時，供試材料多小於 1 mm，且經過含高糖溶液處理後會影響腋芽之存活率。據學者研究指出，苗株在尚未去除葉

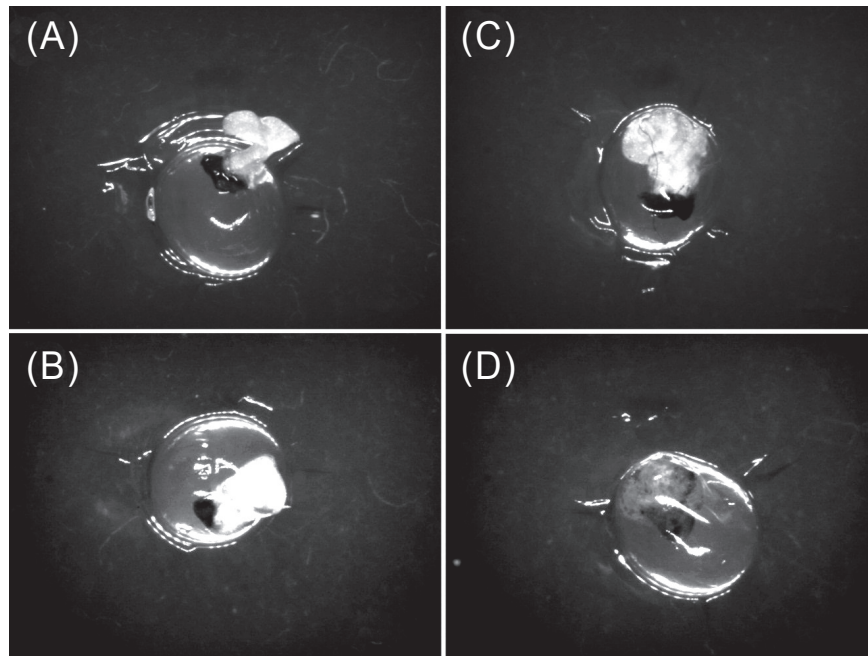


圖 3. 以 PVS2 溶液處理不同時間再培養 14 d 後之草莓「桃園 1 號」腋芽。(A) 60 min ; (B) 120 min ; (C) 180 min ; (D) 240 min (比例尺 = 1 mm)。

Fig. 3. Recovery of axillary buds of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. ‘Taoyuan No.1’) after immersing in plant vitrification solution 2 (PVS2) for different durations and then cultured for 14 d. (A) 60 min; (B) 120 min; (C) 180 min; (D) 240 min (Scale bar = 1 mm).

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「台農 1 號」腋芽存活率的影響。

Table 1. Effects of different volumes of plant vitrification solution 2 (PVS2) in cryotube and rewarming time on the survival rate of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. ‘Taoyuan No.1’) axillary buds after immersing in liquid nitrogen for 1 h².

PVS2 volume per cryotube (mL)	Axillary buds survival rate (%)		
	RW60s ^y	RW90s	RW120s
0.3	76.7 ± 4.7 a ^x	80.0 ± 8.2 a	63.3 ± 9.4 a
0.5	66.7 ± 12.5 a	66.7 ± 4.7 a	63.3 ± 4.7 a
1.0	60.0 ± 0.0 a	63.3 ± 9.4 a	80.0 ± 8.2 a

² The axillary buds were precultured on MS medium for 3 d, and then pretreated with 1.6 M loading solution (LS) for 90 min and PVS2 for 60 min before immersed into liquid nitrogen (-196°C). MS medium: MS basal salts + 102.6 g L⁻¹ sucrose + 0.8% Difco agar, pH = 5.8. 1.6 M LS: MS basal salts + 184.18 g L⁻¹ glycerol + 547.2 g L⁻¹ sucrose, pH = 5.8. PVS2: MS basal salts + 136.8 g L⁻¹ sucrose + 30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sulfoxide, pH = 5.8.

^y RW60s: Each cryotube with axillary buds was rapidly rewarmed in a water bath at 38°C for 60 s.

^x 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).

片和莖頂分生組織時，仍具有頂芽優勢和抑制腋芽萌生的作用，故在一般情況下，潛伏於短縮莖節和葉腋之間的腋芽常處於休眠狀態，需待頂芽優勢打破或抑制其萌發的因素消除後，

植物腋芽細胞的分裂能力才會增加 (Rubinstein & Nagao 1976)。因此，將去除葉片且預培養 14 d 的草莓莖節，在切取莖頂組織後，再度將短縮莖接種回原來的 MS 固體培養基並繼續培

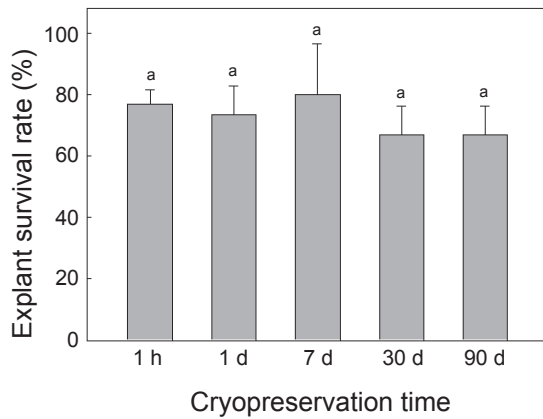


圖 4. 草莓「桃園 1 號」腋芽以液態氮處理不同時間 (1 h、1 d、7 d、30 d 或 90 d) 後的存活率。

Fig. 4. The survival rates of axillary buds of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after treated with liquid nitrogen for different durations (1 h, 1 d, 7 d, 30 d, or 90 d). Vertical bars indicate standard error ($n = 3$).

養 7 d，能促使休眠中之腋芽萌生，待其發育至 1–2 mm 時，即可切取作為供試培植體，此也與筆者在上一篇論文 (Shiau & Chen 2014) 中直接切取草莓苗株莖頂組織作為試驗材料的取得方法不同。

草莓種原利用超低溫冷凍保存的程序，通常會先在 4–5°C、光週期 8 h 的環境下冷馴化 20–40 d，再以高蔗糖濃度的固體培養基預培養 1–2 d，另進行後續的滲透壓保護及脫水處理 (Ramírez *et al.* 2004; Niino 2006; Zhao *et al.* 2006; Medina *et al.* 2007)。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°C、光照周期 8 h 的環境下冷馴化處理 30 d (Hwang 2007)。換言之，其完成一項試驗所需的時間較長。本研究則是取未經低溫冷馴化的草莓 (「桃園 1 號」) 腋芽作為供試材料，由於幼嫩的腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 經過包埋且進行離體培養時，培植體並無葉片可行光合作用合成生長所需之碳水化合物，故需在 MS 培養基中添加蔗糖作為主要碳源，否則培植體的生長可能會受到影響。因此，Hirai *et al.* (1998) 在預培養草莓莖節時之培養基蔗糖濃度為 30 g L⁻¹，本項試驗則是以近似於 Hirai *et al.* (1998) 蔗糖用量之 0.1 M (34.2 g L⁻¹) 作為對照組；另為

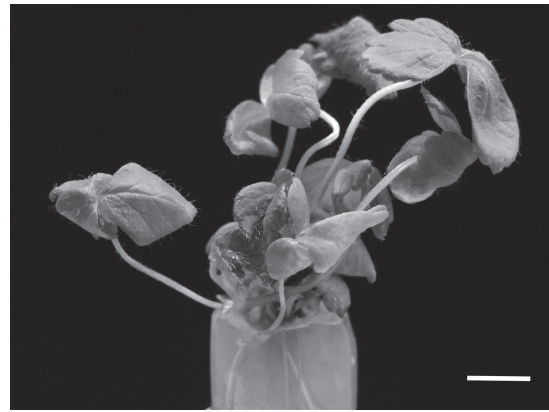


圖 5. 草莓「桃園 1 號」腋芽以液態氮超低溫冷凍保存 1 h，再回復生長及繼代培養 7 mo 後的苗株 (比例尺 = 1 cm)。

Fig. 5. The plantlet of axillary buds of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. 'Taoyuan No.1') after treated with liquid nitrogen for 1 h and then recovered by growth and subculture for 7 mo (Scale bar = 1 cm).

檢測腋芽培植體在預培養時，對於培養基中添加蔗糖的最高耐受濃度，因此使用含不同蔗糖濃度 (0.1、0.2、0.3 及 0.4 M) 的 MS 固體培養基進行試驗。結果顯示，腋芽培植體接種在含有 0.1 M (Control)、0.2 M 和 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基預培養 14 d，其存活率可達到 96.7–100%，顯著高於含 0.4 M 蔗糖濃度處理組之 60% 存活率 (圖 1)，據此得知腋芽 (芽體尺寸 1–2 mm) 在應用超低溫冷凍保存前的預培養期間，可適度提高蔗糖濃度至 0.3 M，使其先行適應較低含水量的培養環境，此也與使用莖頂 (Shiau & Chen 2014) 作為培植體的試驗結果相似。另外，Matsumoto *et al.* (1998) 曾研究指出，植物組織以 PVS2 脫水處理前，先以 LS 進行滲透壓保護，可使細胞質壁分離 (plasmolysis) 並避免冰晶形成破壞細胞膜結構。而含有高濃度蔗糖的 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；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 3 h，結果含 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 (Hirai & Sakai 2003)；在未經 4°C 冷馴化培養的馬鈴薯腋芽滲透壓保

護試驗中，則是使用含 0.6 M 蔗糖濃度的 LS 浸漬處理 90 min，最終培植體的存活率也達到 70% 以上 (Hirai & Sakai 1999)。本試驗結果顯示，包埋草莓腋芽培植體的藻膠球，不論是使用含有 0.6 M 蔗糖濃度的處理組或是添加量達到 1.6 M 的處理組，在 25°C 的環境下滲透壓保護處理 90 min 後之存活率仍為 100% (資料未列出)。

Wang *et al.* (2005) 研究指出，在藻膠包埋玻璃質化法 (encapsulation-vitrification) 之脫水處理和冷凍保存過程中，應用 PVS2 作為冷凍保護劑，可維持超低溫冷凍保存後之植物細胞活力並避免冰晶產生。由於 PVS2 組成成分中含有 15% (w/v) DMSO，其為一種具有高滲透壓及輕微細胞毒性的溶液 (Sakai *et al.* 1990)，因此必需依據冷馴化培養時間、植物種類、供試部位和體積之不同，適當調整脫水處理的時間 (Volk *et al.* 2006)。例如，進行草莓玻璃質化試驗前，先以 10°C 低溫冷馴化 30 d，待取得供試培植體後，使用含 0.4 M 蔗糖濃度之 LS 處理 20 min，再以 PVS2 脫水處理 150 min，培植體有高達 97% 的存活率 (Hwang 2007)。本試驗係將不同芽體尺寸 (小於 1 mm 和 1–2 mm) 的草莓腋芽，先使用含蔗糖濃度 1.6 M 的 LS 滲透保護處理 90 min，再使用 PVS2 脫水處理 60 min，經 MS 培養液清洗後，接種在 MS 再生培養基培養 14 d。結果體積小於 1 mm 的腋芽培植體存活率為 60.0% ± 8.2% (圖 2A)，雖顯著高於脫水 120 min、180 min 及 240 min 之處理組 (23.3–43.7%)，但仍低於芽體 1–2 mm 腋芽培植體以 PVS2 脫水處理 60 min 後之存活率 (86.7% ± 4.7%) (圖 2B、圖 3)。不同尺寸的腋芽存活率會產生差異的原因，可能是腋芽生長之節位處，在切取供試材料的過程中，如因腋芽太小，易被解剖刀刃傷害導致組織迅速褐化死亡，當腋芽發育至適當大小，不但易於辨識且在切取時也減少幼嫩組織褐化死亡率，並可提高對 PVS2 溶液的耐受程度，因此適宜作為超低溫冷凍保存的草莓腋芽尺寸應為 1–2 mm。另外，在完成本項試驗後，作者也曾探討縮短 PVS2 脫水時間之可行性，結果以 PVS2 浸漬 0、20 及 40 min 之處理組，

腋芽培植體 (芽體尺寸 1–2 mm) 培養 14 d 之存活率皆達到 86.7–100%，雖與浸漬處理 60 min 之處理組 (86.7% ± 4.7%) 無顯著差異，但將其置入液態氮 1 h 後回溫並再生培養後，調查 PVS2 浸漬 0、20 及 40 min 等處理組之存活率，僅分別為 0%、13.3% ± 4.7% 及 46.7% ± 9.4% (資料未列出)。由此得知，培植體在置入液態氮冷凍保存前，比較適當的 PVS2 脫水處理時間仍為 60 min。

目前有關草莓超低溫冷凍保存的研究論文中，探討培植體以液態氮超低溫冷凍前，在抗凍管內加入 PVS2 體積及凍存後回溫時間影響培植體存活率的報導尚不多見。不過，Hwang (2007) 曾研究指出，草莓莖頂在凍存前，先置入抗凍管內並添加 0.5 mL 新鮮的 PVS2，經凍存後取出置入 40°C 恆溫水槽中迅速回溫 30 s，可獲得較高的培植體存活率。Hirai *et al.* (1998) 則是在抗凍管內加入 1 mL PVS2，且培植體經凍存後再於 38°C 恆溫水槽中回溫。至於作者先前發表的論文 (Shiau & Chen 2014)，則是將草莓莖頂先使用 0.3 M 蔗糖濃度的 MS 固體培養基預培養 14 d，再以含有 1.6 M 蔗糖的 LS 滲透保護 90 min，接著利用 PVS2 浸漬脫水 60 min 後，於凍存前添加 0.3 mL 新鮮的 PVS2，在凍存後取出並置於 38°C 的水浴槽中回溫 60 s，可得到 80% 存活率。本試驗結果也顯示，未經冷馴化的草莓腋芽包埋成藻膠球且經過預處理後，在 -196°C 液態氮凍存前，可於抗凍管內加入 0.3 mL 的 PVS2 抗凍劑且在凍存後回溫 60–90 s，其培養 14 d 後之存活率可達到 76.6–80% (表 1)。若 PVS2 用量為 1 mL 時，培植體在凍存後回溫的時間則應適度延長為 120 s，雖然各處理組的存活率經比較分析後，彼此間並無顯著差異，但在抗凍管內僅需加入 0.3 mL PVS2 即可達到良好成效且可縮短回溫所需時間，此一結果將有助於減少 PVS2 的使用量。另外，本研究也同時探討液態氮凍存時間對腋芽培植體存活率的影響，結果顯示凍存 1 h、1 d 及 7 d 之培植體存活率約在 73.3–80.0%，凍存時間達 30 d 和 90 d 之培植體存活率同為 66.7%，經比較分析後，彼此間並無顯著差異 (圖 4)。且此種經過超低溫冷

凍保存之腋芽培植體，在繼代培養 7 mo 後，能發育成為根系強健的苗株 (圖 5)。綜合上述各項結果可知，本研究不但得以簡化低溫冷馴化所需的時間及節省空調電力等能源損耗，操作過程中也減少了 PVS2 的用量，故有助於建構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

本試驗承農委會科技計畫經費補助 [103 農科-9.2.6-農-C1(2)]，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 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. 1991. Storage and cryopreservation of *in vitro* cultures. p.361–381. *in*: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, High-Tech and Micropropagation I. (Bajaj, Y. P. S., ed.) Springer-Verlag. Berlin. 555 pp.
- 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 Y. Nako. 1998. A novel preculturing for enhancing the survival of *in vitro*-grown meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) cooled to -196°C by vitrification. *Cryo. Lett.* 19:27–36.
- Medina, J. J., I. Clavero-Ramírez, M. E. González-Benito, J. Gálvez-Farfán, J. M. López-Aranda, and C. Soria. 2007. Field performance characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants derived from cryopreserved apices. *Sci. Hort.* 113:28–32.
- 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. イチゴ培養茎頂 (ガラス化法). 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.
- Ramírez, C., J. M. López-Aranda, J. Gálvez, C. Soria, J. F. Sánchez-Sevilla, J. J. Medina, and M. E. González-Benito. 2004. Cryopreservation of *in vitro* apices of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) by a new encapsulation-dehydration method. *Acta Hort.* 649:115–118.
- Reed, B. M., D. Dumet, J. M. Denoma, and E. E. Benson. 2001. Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: A pilot study using *Ribes* L. *Biodivers. Conserv.* 10:939–949.
- Rubinstein, B. and M. A. Nagao. 1976. Lateral bud outgrowth and its control by the apex. *Bot. Rev.* 42:83–109.
- 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 × ananassa* Duch.): A newly introduced crop in Bangladesh. *American-Eurasian J. Sci. Res.* 2:151–154.
- 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.* 63:57–67. (in Chinese with English abstract)
- Shih, J. C., T. F. Hsieh, and C. C. Ho. 2009. Ecological production of strawberry in Taiwan. *Acta Hort.* 842:397–400.

- Suzuki, M., M. Ishikawa, and T. Akihama. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary buds following 2 step-preculture with sucrose and desiccation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83:115–121.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:571–599.
- Tsai, J. H., G. M. Chang, T. Y. Wu, S. C. Peng, H. Y. Chang, and S. J. Chang. 2009. Present status and future prospects of strawberry industry in Taiwan. *Acta Hort.* 842:623–626.
- 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.
- Zhao, M., Z. Wang, J. Su, and Y. Qian. 2006. Cryopreservation of *in vitro* cultured shoot tips of strawberry. *Acta Hort.* 708:265–270.

Study on the Cryopreservation of Non-Cold Hardened *Fragaria* × *ananassa* Duch. Axillary Buds

Yih-Juh Shiau^{1,*} and Guan-Wen Chen²

Abstract

Shiau, Y. J. and G. W. Chen. 2015. Study on the cryopreservation of non-cold hardened *Fragaria* × *ananassa* Duch. axillary buds. J. Taiwan Agric. Res. 64(3):228–238.

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) is one of the perennial crops with the high economic value. It belongs to the Rosaceae family and is distributed and cultivated in more than 70 countries. Therefore, the research on long-term storage of strawberry germplasm is important. The major objective of this study is to establish an optimum axillary bud cryopreservation method of non-cold hardened strawberry 'Taoyuan No.1'. The results obtained on pretreatment of axillary buds (bud size: 1–2 mm) prior to plunge into liquid nitrogen (LN) at -196°C were as follows: (1) The average survival rate of buds was 96.7% ± 5.8% when the buds were precultured on MS basal medium supplemented with 0.3 M sucrose for 14 d; (2) By increasing sucrose level from 0.6 M to 1.6 M in loading solution (LS) and then osmoprotected for 90 min, the survival rate of axillary buds remained 100%; (3) The axillary buds survived was 86.7% ± 4.7% when treated with plant vitrification solution 2 (PVS2) for dehydration for 60 min. This survival percentage was significantly higher compared to PVS2 dehydration treatment for 180 min (46.7% ± 4.7%) and 240 min (46.7% ± 17.0%). After storage in LN, cryotubes were rapidly rewarmed in a water bath at 38°C for 60–90 s. The survival rates of axillary bud beads in the range of 66.7–80% were achieved after a subculture for 14 d. There were no significant differences in survival percentages of revived axillary buds among the storage duration in LN. These results appear promising for a simplifying cryopreservation method of strawberry axillary buds.

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

Received: November 6, 2014; Accepted: March 10, 2015.

* Corresponding author, e-mail: yjshiau@tari.gov.gov.tw

¹ Associate Research Fellow, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

² Research Assistant, Plant Germplasm Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.