

出國報告(出國類別:研習)

植物遺傳資源體外超低溫

冷凍保存技術研習報告

**Report of Attending
The Sixth International Training
Course on *In Vitro* and
Cryopreservation of Plant Genetic
Resources**

服務機關：農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所

姓名職稱：邱金春 助理研究員

派赴國家：印度(India)

出國期間：民國100年11月13日-27日

報告日期：民國101年1月18日

目 次

公務出國報告摘要-----	1
壹、前言-----	2
貳、研習目的-----	3
參、研習內容-----	3
肆、心得-----	6
伍、建議-----	12
陸、研習照片-----	14
柒、附錄-----	19

公務出國報告摘要

頁數：共 22 頁

報告名稱：植物遺傳資源體外超低溫冷凍保存技術研習

主辦機關：行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所

聯絡人/電話：邱金春/ 07-7310191

出國人員：邱金春助理研究員

出國類別：研習

出國地區：印度新德里(New Delhi, India)

出國期間：民國 100 年 11 月 13 日至 11 月 27 日

報告日期：民國 100 年 12 月 30 日

分類/目：F0/綜合（農業類）

關鍵詞：體外保存(*in vitro* conservation)、超低溫冷凍保存 (cryopreservation)、玻璃質化法 (vitrification)、包埋脫水(encapsulation-dehydration)、液滴冷凍法(droplet freezing)

內容摘要：印度國家植物遺傳資源署(NBPGR)設置有國家種子庫、國家植物組織培養保存庫和超低溫庫，是全球保存管理植物遺傳資源的重鎮之一，與亞太農業研究機構聯盟(APAARI)、生物多樣性國際中心(Biodiversity International)合辦「第六屆植物遺傳資源體外超低溫冷凍保存技術」研習會，以當前應用於中長期保存無性繁殖作物及非傳統種子型態保存作物的試管保存技術與超低溫冷凍保存技術，包括體外保存、超低溫冷凍保存、玻璃質化法、包埋脫水及液滴冷凍法，研習課程除了安排講師授課外，並設計實際操作練習的實驗，目的在於加強學員超低溫冷凍保存的知識與技術，配合實際操作練習使其能應用於作物遺傳資源保存。研習會於西元 2011 年 11 月 14-26 日在 NBPGR 舉行，學員來自伊朗、南非、迦納、斯里蘭卡、台灣、奈及利亞及印度等六個國家，分別從事蔬菜、果樹及花卉育種或服務於種原庫實驗室，在工作或研究上都有種原保存知識與技術上的實際需求，因此整

個研習過程中大家都很認真學習，並熱烈討論。主辦單位提供的課程資訊與技術，有助提升我國種原保存技術，也可以建立台灣與印度雙邊農業技術與種原材料交流窗口。應用超低溫冷凍保存為無性繁殖作物長期保存的最佳方式，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、病害或蟲害等之因子的干擾，唯現階段熱帶或亞熱帶作物成功案例不多尚有待努力。台灣因地理氣候條件多為熱帶或亞熱帶作物，我們應可以就此領域尋求技術上的突破，讓台灣在植物遺傳資源超低溫冷凍保存研究迎頭趕上其他各國且能異軍突起。

壹、前言

植物遺傳資源的保存與有效利用，可以永續生產安全糧食、避免飢餓和貧窮並保護環境。將種子儲藏於種原庫是傳統的保存方式，然而無性繁殖作物及很多熱帶及亞熱帶植物無法以種子保存遺傳資源。目前已知利用組織培養技術進行植物體外保存(*in vitro* conservation)及超低溫冷凍保存(cryopreservation)，不但能減少保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，在分子生物檢測技術輔助下，為安全且有效的中、長期保存方法。印度國家植物遺傳資源署(National Bureau of Plant Genetic Resources, NBPGR)為全球部份作物的基礎保存中心之一，配置有國家種子庫、國家植物組織培養保存庫和超低溫庫，專責辦理及研發種原在基因庫內之長期保存。NBPGR與亞太農業研究機構聯盟(Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, APAARI)、生物多樣性國際中心(Biodiversity International)合辦「第六屆植物遺傳資源體外超低溫冷凍保存技術」研習會，以當前應用於中長期保存無性繁殖作物及非傳統種子型態保存作物的試管體外保存技術與超低溫冷凍保存技術，設計實際操作練習的研習課程。

貳、研習目的

- 一、提升組織培養保存與管理植物遺傳資源的技術。
- 二、加強超低溫冷凍保存種原必備的基本知識。
- 三、瞭解分子生物技術在植物遺傳資源管理上的應用。
- 四、瞭解超低溫冷凍保存作物種原基本的耐逆境原理。
- 五、實際操作植物組織培養體外保存法與超低溫冷凍保存技術，使其能應用於作物遺傳資源保存。

參、研習內容

- 一、出國期間：中華民國 100 年 11 月 13 日至 11 月 27 日，為期 15 天。

二、出席研習人員

姓名	職稱	服務單位
邱金春	助理研究員	行政院農業委員會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所

三、會議及活動行程

日期	研習內容與活動行程
11 月 13 日(日)	自台灣高雄國際機場啟程，經香港國際機場轉機，直飛印度德里，NBPGR 派員接機送至住宿旅館。
11 月 14 日(一)	報到、領取資料，開業典禮長官致詞後，安排學員自我介紹服務機關及工作內容，拍照後，隨即進入正式研習課程。 課程 1. 介紹國家植物遺傳資源署(NBPGR)。 課程 2. 美國遺傳資源的管理。 課程 3. 亞太農業生物科技聯盟(APCoAB)在開發中國家資助

日期	研習內容與活動行程
	<p>生物技術的應用。</p> <p>參訪 NBPGR 的各個研究室</p>
11 月 15 日(二)	<p>課程 4. 植物超低溫冷凍保存的基本原理與技術。</p> <p>課程 5. 種子儲存及非傳統種子的冷凍保存。</p> <p>實習 1. 非傳統種子及胚軸的超低溫冷凍長期保存。</p>
11 月 16 日(三)	<p>課程 6. 花粉及休眠芽的超低溫冷凍保存。</p> <p>課程 7. 不同培植體冷凍保存庫的操作與管理。</p> <p>實習 2. 花粉及休眠芽的超低溫冷凍長期保存。</p>
11 月 17 日(四)	<p>課程 8. 作物種原體外保存技術概論。</p> <p>課程 9. 熱帶塊莖及藥用植物的體外保存技術與超低溫冷凍保存技術。</p> <p>課程 10. 在生物技術背景中種原保存的需求、機會與挑戰。</p> <p>實習 3. 利用玻璃質化法的體外莖頂冷凍技術：以藥用植物為範例。</p>
11 月 18 日(五)	<p>課程 11. 全球種子保存：千禧年種子基因庫計畫。</p> <p>課程 12. 球根作物的體外保存與超低溫冷凍保存技術。</p> <p>課程 13. 大蒜超低溫冷凍保存：在 RDA 的經驗。</p> <p>實習 4. 利用 PVS2 及 PVS3 做為護凍劑的大蒜莖頂玻璃質化法。</p> <p>學員工作報告：1 位。</p>
11 月 19 日(六)	<p>課程 14. 種子基因庫的生理變化。</p> <p>課程 15. 毛狀根培植體的超低溫冷凍保存。</p> <p>實習 5. 毛狀根培植體的超低溫冷凍保存法。</p>
11 月 20 日(日)	<p>假日(自行活動)</p>

日期	研習內容與活動行程
11月21日(一)	<p>課程 16. 體外保存與超低溫冷凍保存技術：熱帶作物 vs. 溫帶作物。</p> <p>課程 17. 溫帶果樹種源的體外保存與超低溫冷凍保存：以 <i>Pyrus</i> 屬與 <i>Rubus</i> 屬為例。</p> <p>實習 6. 試管植物的莖頂培植體超低溫冷凍保存的包埋脫水技術。</p> <p>正式晚宴。</p>
11月22日(二)	<p>課程 18. 建立、管理與利用收集的體外種源。</p> <p>課程 19. 香蕉超低溫冷凍保存：比利時 ITC 的現況。</p> <p>課程 20. 廣泛應用於多種植物的液滴冷凍技術。</p> <p>實習 7. 液滴冷凍技術。</p> <p>學員工作報告：3位。</p>
11月23日(三)	<p>課程 21. 營養繁殖作物的種源交換：體外保存技術的重要性。</p> <p>課程 22. 以分子生物法加強植物遺傳資源的保存與利用。</p> <p>課程 23. 分子生物標記概論。</p> <p>實習 8. DNA 萃取、純化與定量。</p>
11月24日(四)	<p>課程 24. 分子生物數據的分析。</p> <p>課程 25. 作物種原體外保存與超低溫冷凍保存基因穩定度評估的實際考量。</p> <p>實習 9. SSR、ISSR 的 PCR 與電泳膠分析。</p> <p>實習 10. RAPD 的 PCR 與電泳膠分析。</p>
11月25日(五)	<p>實習 11. 數據的轉換與分析。</p> <p>學員工作報告：6位。</p>

日期	研習內容與活動行程
	學習問卷填寫。 參訪國家種子庫、國家植物組織培養保存庫和超低溫庫。
11月26日(六)	結業典禮。 參訪國家農業科學中心博物館。
11月27日(日)	凌晨搭機直飛香港國際機場轉機，下午自香港返抵高雄國際機場。

肆、心得

- 一、印度地處南亞，北隔喜馬拉雅山與尼泊爾、不丹、中國西藏為鄰；西北邊是巴基斯坦，東北有緬甸和孟加拉；此外東鄰孟加拉灣、西濱阿拉伯海、南端深入印度洋。印度面積約 329 萬平方公里，行政區域分為 25 個邦、7 個政府直轄市，首都為新德里(New Delhi)。人口約 11.3 億，人口多集中於北方邦，約占全國總人口 1/6 以上。印度在種姓階級上非常堅持，因此社會階級地位明顯區分；英語雖為官方語言之一，但一般百姓多使用印度語及地方語言，因此中低階級的印度人很多無法以英語溝通。印度在歷史上曾為英國殖民地之一，至今仍保有英國建築物特色及喝茶的生活習慣；正常工作時間自週一至週六，因此整個研習課程安排相當緊湊。
- 二、本次研習學員來自伊朗、南非、迦納、斯里蘭卡、台灣、奈及利亞(2 人)及印度(4 人)等六國，中國學員因故缺席，另有印度旁聽生 2 人，共計 13 人參加。研習學員中有 4 名為種源庫實驗室的研究人員，4 名為公立大學教師，其餘分別從事蔬菜、果樹及花卉育種，學員在工作或研究上都有種原保存知識與技術上的實際需求，因此整個研習過程中大家都很認真學習，並熱烈討論。
- 三、本次研習講師除了來自 NBPGR「組織培養及冷凍保存研究室」(Dr. Rekha Chaudhury、Dr. Ruchira Pandey、Dr. Neelam Sharma、Dr. Anuradha Agrawal、

Dr. Sandhya Gupta、Dr. S. K. Malik 及 Dr. Zakir Hussain)、「種原保存組」(Dr. R. K. Tyagi)及「NRC-DNA 指紋鑑定研究室」(Dr. K. V. Bhat、Dr. Mukesh Kumar Rana、Dr. Amit Kumar Singh 及 Dr. Parimalam R.)的研究人員擔任外，另聘請來自英國的 Prof. Huge Pritchard，其為「種子保存系」及「千禧年種子銀行計劃」(Millennium Seed Bank Project)的研究主管；來自比利時的 Dr. Ir. Bart Panis 服務於 Katholieke Universiteit Leuven「熱帶作物改良研究室」；來自韓國的 Dr. Haeng-Hoon Kim 服務於國家農業生物技術研究所(National Institute of Agricultural Biotechnology)；來自奧立岡州立大學園藝系的 Dr. Barbara M. Reed；來自亞太農業生物科技聯盟(Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, APCoAB)的 Dr. J. L. karihaloo 與來自 NRC 植物生物科技的 Dr. S. R. Bhat 共同擔任講師。講師們在體外保存技術、超低溫冷凍保存技術與分子生物技術上都有多年的實際工作經驗，因此能提供詳盡的上課講義並適時的解答學員們的疑惑。實習部分除了授課講師親自講解示範外，並有很多研究室的工作人員協助整個實習過程；實驗器材數量準備得當，因此每位學員都有機會親自操作練習加深印象。

四、國家植物遺傳資源署(NBPGR)為印度農業研究委員會(Indian Council of Agricultural Research, ICAR)下之獨立機構，並在不同生態區設立 10 個分支機構，專責植物遺傳資源收集、交換、特性調查、評估、保存及建檔，並辦理種源交換時之檢疫工作；並配置有國家種子庫、國家植物組織培養保存庫和超低溫庫，辦理及研發種原在基因庫內之長期保存，包括體外種子保存、試管培養苗及超低溫冷凍保存，共有 25 萬份的保存，其中 1/4 為野生種及其相關的栽培種，藥草植物約有 2 萬份材料。目前國家種子基因庫收集有 40 萬份涵蓋 1500 個物種的保存；另保存 2,000 份以上包含塊根／鱗莖作物、熱帶及溫帶果樹、香料和藥用植物約 132 個物種的組織培養瓶苗，這些種原皆非常有經濟價值；長期保存部分植物遺傳資源並作為一些特定作物的全球保存系統內之地區備份保存中心。在種原鑑定上，則利用

RFLPS、AFLPS、RAPDS 及其他以 PCR 為基本的一些分生技術，從事 DNA 指紋比對和基因序列之探討。 NBPGR 之經費大多由 ICAR 所支援，以辦理國家植物遺傳資源相關計畫，另外也有與其他各國合作之國際計畫，是全球保存管理植物遺傳資源的重鎮之一。因此主辦單位提供的課程資訊與技術，不僅有助提升我國種原保存技術，也可以建立台灣與印度雙邊農業技術與種原材料交流窗口，並藉由參與研習向專家請教或與其他國家研究人員之間的交流。

五、試管培養法在植物遺傳資源保存上通常採用緩慢生長策略進行種原保存，透過調節培養條件如降低培養環境的氧氣含量、降低培養溫度，培養基中添加生長調節劑(如 ABA)或提高培養基滲透壓，降低培養基中的營養成分含量等都可以限制材料生長及減少營養消耗，因而得以延長繼代培養時間；其中最常被使用的是低溫、低光照或低溫低光照兩者並用的方法。一般而言，耐寒物種可在 0~5°C 下進行保存，亞熱帶物種則保存在 10°C 左右，而熱帶作物則必須保存在 15°C 以上。

六、超低溫保存是指在 -80°C 以下的超低溫保存種原的技術。常用的冷源有乾冰 (-79 °C)、液態氮(-196 °C)及液態氮蒸氣相(-140 °C)。在超低溫條件下保存材料，可大大減慢甚至終止代謝和衰老過程，保持生物材料的穩定性，最大限度地抑制生理代謝強度，減少工作量，減少污染機會等。超低溫保存使用的方法有慢速冷凍法、快速冷凍法、玻璃質化法及包埋脫水法，其中慢速冷凍法是以 0.5~1.0°C/min 的降溫速率，從 0°C 降到 -30~-40°C 隨後浸入液態氮，因此需配合儀器使用，此次研習課程主要學習快速冷凍法、玻璃質化法及包埋脫水法等三種技術。快速冷凍法以超過 40°C/min 的速度降溫，或將材料直接放入液態氮中。玻璃質化法則在冰凍前使用高濃度的護凍劑，在 25°C 或 0°C 處理一段時間誘導材料部分脫水，然後再直接浸入液態氮中，此時護凍劑和材料同時進入玻璃質化狀態，方法較簡單易行，但對植物的毒害較大，細胞對玻璃質化護凍劑的滲透耐受性是很重要的一環，較難在同一時間內處理大

量材料。包埋脫水法則利用藻膠包埋培植體(如芽體)，在含高濃度蔗糖培養基中預培養後，經過脫水作用後，然後進行超低溫冷凍保存，此方法一次能處理較多材料，且對植物的毒害較小。

七、水分在細胞內扮演重要角色維持植物各種生理機能，植物細胞含水量約85-95%，種子含水量約8-15%。水在低於0°C開始形成冰晶，破壞細胞膜導致細胞失去膨壓、崩解而死亡。因此進行超低溫冷凍保存時，植物材料需要部分脫水，配合玻璃質化或藻膠包埋技術，可以提高培植體存活率。

八、對於難以種子儲藏的作物如含水量高、含脂質多、對低溫敏感的種子類型或體積大的種子，除了整粒種子儲藏外，也可以只切取胚(embryo)或胚的分生組織(embryonic axis)作為保存體，唯材料均應先進行含水量與發芽率的評估。一般而言，種子其含水量以10-14%為宜，保存體若為胚分生組織則以10-25%含水量為底線，若發芽率差則必須改變材料脫水速率或考慮以不同成熟期的材料作為保存體。材料在適當含水量下，即可採用(一)快速冷凍法：將材料放入冷凍瓶(cryovial)後再直接液態氮中保存；回溫時，以37-40°C水浴法進行即可。(二)玻璃質化法：利用護凍劑前處理後再快速冷凍，此法適用於莖頂、懸浮細胞或體胚(somatic embryo)材料，目前大蒜及多種藥用植物都成功以莖頂保存種原；熱帶作物中波蘿蜜、荔枝、部分柑橘品種及枳殼都成功以此技術保存種原且獲得高存活率。(三)包埋脫水法：利用藻膠包埋培植體(如芽體、胚分生組織)，經過部份脫水後再以液態氮保存，目前應用此技術成功保存熱帶作物如楊桃、枳殼、巴西橡膠樹和甜橙等胚分生組織且獲得高存活率。

九、植物在放入超低溫冷凍保存前，會先以護凍劑前處理以避免冰晶形成。有多種化合物如sucrose、glucose、proline、mannitol、glycerol、sorbitol、trehalose、polyethylene glycol、ethylene glycol等都可作為植物組織的護凍劑。誘導玻璃質化通常以兩種以上化合物配製成高濃度(15-30%)溶液於0°C或25°C使用。這些高濃度添加物對植物細胞而言是有毒害的，因此使用上要非常小心。PVS2

溶液(Sakai *et al.*, 1990)含30% (w/v) glycerol、15% (w/v) ethylene glycol、15% (w/v) DMSO及0.4 M sucrose；PVS3溶液(Nishizawa *et al.*, 1993)含50% (w/v) sucros 與50 % (w/v) glycerol；兩者都常作為超低溫冷凍保存時的植物護凍劑，但目前已知PVS3溶液對植物細胞的毒害較輕。

十、花粉保存主要是基於雜交育種的需要，就冷凍基因庫而言花粉超低溫冷凍保存是最簡單、最符合成本效益的長期儲藏，可作為種子及營養系保存的補充；此法對於花粉壽命短的禾本科、十字花科、菊科等產生三核花粉(trinucleate pollen)作物，或是對於不同地區栽植、甚至不同開花期的作物而言，可以增加機會進行雜交育種改良。惟受限於花粉培養其植株再生率低，因此目前花粉還不是保存植物遺傳資源的有效方法。如同種子冷凍保存過程，花粉應先進行含水量與萌芽率的評估，將花粉乾燥至適當含水量後放入冷凍瓶，再浸入液態氮中，可以避免冰晶形成。一些短命花粉如小麥、玉米、水稻、甘蔗等應用此技術已成功延長花粉授命。

十一、果樹作物長期以來都以無性繁殖保存品種特性，溫帶性果樹本質上較耐寒，於冬季摘取經自然冷馴化後的枝條或休眠芽作為冷凍保存材料，材料經部分脫水後即可復入液態氮保存，方法簡單易行，且嫁接後有提早開花的優點；但是蘋果等對低溫敏感種原的營養芽，在乾燥及冷凍保存過程則需保護莖頂分生組織免於受到凍傷，通常以5%藻膠包埋，逐步地提高蔗糖濃度後進行乾燥脫水，有助於提高對低溫(-30°C)的耐受性而提高冷凍保存的存活率。目前在蘋果屬(*Malus*)、桑屬(*Morus*)、梅屬(*Prunus*)、榆屬(*Elm*)及 *Amelanchier alnifolia*都成功地以此法進行種原保存；但是熱帶性果樹因缺乏休眠性，尚未有成功案例。

十二、由玻璃質化法衍生的液滴冷凍(droplet freezing)技術則是以鋁箔條帶取代冷凍瓶(cryovial)，將培植體直接放在鋁箔上可確保較高的冷凍及回溫速率，依材料的大小及對護凍劑毒性的耐受性選擇適當的護凍劑，目前應用此技術已成功保存馬鈴薯、蘆筍、香蕉等多種作物莖頂及*Rubia*毛狀根培植體。

十三、包埋脫水法(encapsulation-dehydration)是利用滲透壓及蒸發乾燥去除細胞水分使材料呈一致的狀態，在切取莖頂後進行預培養、包埋、滲壓保護及脫水等一連串過程，再置入液態氮桶內迅速凍結，目前應用此技術已成功保存多種溫帶及熱帶作物莖頂、懸浮細胞及體胚，包括蘋果、梨、黑莓、覆盆子、桑葚、薄荷、桉樹屬(*Eucalyptus*)、楝屬(*Melia*)和刺槐(*Robinia*)種原，以及甘蔗、山藥、百合、香蕉、狗牙根屬(*Cynodon*)、朝鮮草屬(*Zoysia*)和毒麥屬(*Lolium*)等單子葉植物。

十四、應用超低溫冷凍保存為無性繁殖作物長期保存的最佳方式，目前植物種原超低溫保存技術與研究逐漸成熟，在印度、美國、韓國、日本等國家都應用於實際種原保存工作上，唯現階段仍以溫帶性作物有較多成功的案例，熱帶或亞熱帶作物因本質上不耐低溫及乾燥，目前僅香蕉、柑橘、甜橙、枳殼、桑葚、楊桃、荔枝、波蘿蜜等有成功案例，對於熱帶性作物的種原保存尚有待努力。台灣因地理氣候條件多為熱帶或亞熱帶作物育種如木瓜、芒果、蓮霧等，應可以就此領域尋求技術上的突破讓台灣在植物遺傳資源保存研究上異軍突起。

十五、利用基因工程技術將特定基因或性狀導入缺乏此基因或特性之目標作物的育種方法，稱為基因工程育種或分子育種，可以突破種原之限制及種間雜交之瓶頸，創造新性狀或新品種如抗病、抗蟲、抗殺草劑、新花色或提高營養成分等。因應「基因農場」時代的來臨，植物遺傳資源保存體除了種子、胚、胚芽、莖頂等材料外，特定性狀基因片段、突變體、雙單倍體(double haploid)、遠緣雜交種等都是值得保存的植物遺傳資源。

十六、近年來分子生物技術突飛猛進，除了可利用分子標誌輔助育種外，在植物遺傳資源保存研究上，可用分子標誌檢驗植物培植體經超低溫冷凍保存後的基因穩定度，因此主辦單位安排由「NRC-DNA 指紋鑑定研究室」的研究人員講解近年常用的分子生物技術基本原理及應用操作方法。由於台灣在生物技術領域無論是硬體設備或研究技術上都非常先進，在國內不同研究機關也

常辦理相關的研習會，相對之下，此次研習所安排的課程及操作實習都屬於初級入門技術。以國內生物技術的優勢及所培育的人才，未來可結合超低溫冷凍保存研究，有助於台灣在植物遺傳資源保存研究領域的發展。

十七、參與研習過程中，講師與主辦單位提供體外超低溫冷凍長期保存技術的上課講義及參考文獻等相關資料，可作為實務操作上的參考。

伍、建議

- 一、 目前已知植物種原試驗材料經 PVS2 或 PVS3 等護凍劑溶液前處理後，再置入液態氮迅速降低溫度，可以降低莖頂細胞之冰晶的形成，減少細胞傷害，待回溫後材料仍可維持活力，提高冷凍保存之存活率，目前已實際應用於種原保存，由於 PVS3 對植物的毒害較 PVS2 輕微，材料玻璃質化時應優先考慮使用。
- 二、 雖然花粉目前還不是保存植物遺傳資源的有效方法，但是因為最簡單且符合成本效益，可促使不同開花期種原仍有機會進行雜交授粉，可加大育種親本的歧異度而提高雜交組合力。
- 三、 因應「基因農場」時代的來臨，植物遺傳資源保存體除了種子、胚、胚芽、莖頂等材料外，特定性狀基因片段、突變體、雙單倍體、遠緣雜交種等都是值得保存的植物遺傳資源。
- 四、 台灣農業育種技術非常先進，也育出許多優良品種，但是受地理氣候條件侷限多為熱帶或亞熱帶作物如木瓜、芒果、蓮霧等，就熱帶果樹而言，種子無休眠性難以儲藏，且多數以無性繁殖方式保持品種優良特性，現階段多以田野保存方式進行保存種原。應用超低溫冷凍保存為無性繁殖作物長期保存的最佳方式，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、病害或蟲害等之因子的干擾，唯現階段熱帶或亞熱帶作物成功案例不多尚有待努力，我們應可以就此領域尋求技術上的突破，讓台灣在植物遺傳資源超低溫冷凍保存研究迎頭趕

上其他各國且能異軍突起。

五、在植物遺傳資源保存研究上，可用分子標誌檢驗植物培植體經超低溫冷凍保存後的基因穩定度。台灣在生物技術領域無論是硬體設備或研究技術上都非常先進，以國內生物技術的優勢及所培育的人才，未來可結合超低溫冷凍保存研究，有助於台灣在植物遺傳資源保存研究領域的發展。

六、 陸、研習圖片



圖 1. 開幕典禮後 ICAR 貴賓、講師群、NBPGR 工作人員與第六屆研習學員合照。



圖 2. NBPGR 國家種子庫、植物組織培養保存庫和超低溫庫已保存種原數量 (左)及流程(右)。



圖 3.開幕典禮貴賓致詞。



圖 4. 講師 Dr. J. L. karihaloo 服務於亞太農業生物科技聯盟(APCoAB)。



圖 5. 講師 Dr. Barbara M. Reed 來自奧立岡州立大學。



圖 6. 講師 Prof. Huge Pritchard 授課情形。



圖 7. 講師 Dr. Haeng-Hoon Kim 親自示範大蒜莖頂玻璃質化技術。



圖 8. 講師 Dr. Ir. Bart Panis 講解液滴冷凍技術。



圖 9. 講師 Dr. Rekha Chaudhury(左一) 與 Dr. Ruchira Pandey(左二)。

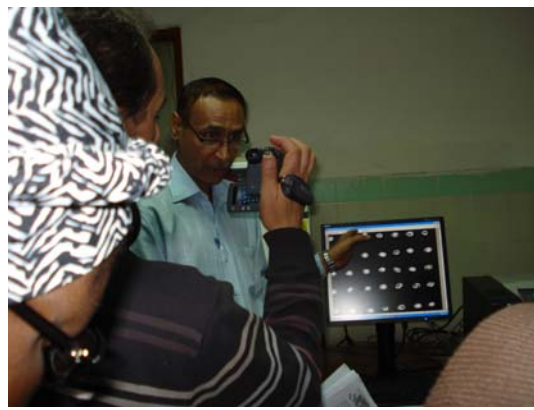


圖 10. NBPGR 植物檢疫研究人員解說。



圖 11. 講師 Dr. Anuradha Agrawal 講解香蕉莖頂切取及保存技術。



圖 12. 正式晚宴 NBPGR 署長 Dr. K. C. Bansal (中)及講師 Dr. Reed(左二)、Prof. Pritchard(左三)、Dr. Panis(右二) 與學員們合影。



圖 13. NBPGR 組織培養研究室。



圖 14. 胚的冷凍保存活力檢測。



圖 15. 依種子大小選擇適當的冷凍瓶。



圖 16. NBPGR 設置的超低溫冷凍庫。



圖 17. 工作人員解說超低溫冷凍保存種原紀錄須詳細並建檔。



圖 18. 超低溫冷凍保存種原放置有一定規則以方便管理。



圖 19. 冷凍保存種子需定期檢測活力。



圖 20. 花粉冷凍保存實習。



圖 21. 練習摘取休眠芽進行冷凍保存。

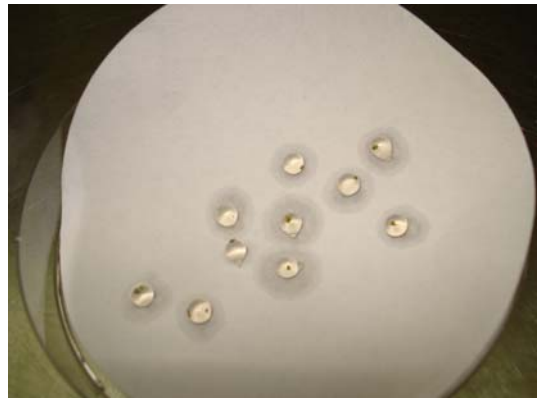


圖 22. 植物莖頂冷凍保存的包埋技術。

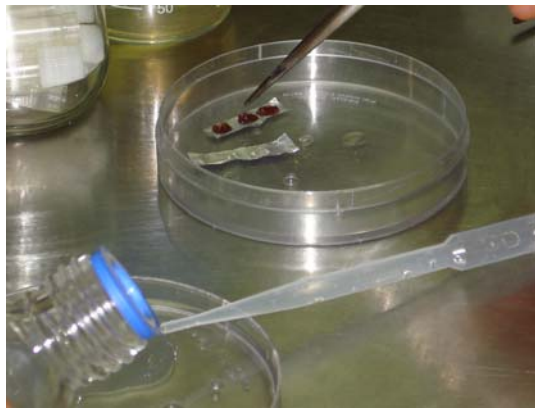


圖 23. 液滴冷凍法的練習。



圖 24. 學員認真練習萃取植物 DNA。



圖 25. 講師 Dr. Mukesh Kumar Rana 講解分子生物檢測技術。



圖 26. 香蕉莖頂經超低溫冷凍保存後仍保持生命力。

柒、附錄

附錄一、研習課程表

NBPGR (ICAR) - Bioversity International Centre of Excellence

International Training Course on *In Vitro* and Cryopreservation Techniques for Conservation of Plant Genetic Resources (14 -26 November 2011)

PROGRAMME SCHEDULE

Date	Time	Activity	Speaker/Contact person
14.11.11 (Mon.)	9.30 – 10.00 a.m.	Welcome, reception and registration of Trainees	Rekha Chaudhury & Ruchira Pandey
	10.00 – 11.15 a.m.	Film on NBPGR Visit to various laboratories of NBPGR (Museum, Gene bank, PQD, TEM Lab, Containment facility, NPC DNAFP)	Sandhya Gupta & Mukesh Rana
	11.15 – 12.30 p.m.	Inaugural session	
	12.30 – 1.30 p.m..	Lecture 1: NBPGR: Leading the way in PGR management	K.C.Bansal and Sunil Archak
	1.30 – 2.30 p.m.	Lunch	
	2.30 – 3.30 p.m..	Lecture 2: Management of genetic resources in the USA	Barbara M. Reed
	3.30 – 4.30 p.m..	Lecture 3: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology – Supporting biotechnology application in developing countries	JL Karihaloo
15.11.11 (Tues.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 4: Understanding the principles and techniques of plant cryopreservation	Rekha Chaudhury
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 5: Seed storage behaviour and cryostorage of non-orthodox seeds	S.K. Malik
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 1.00 p.m.	Practical 1: Cryotechnology for long-term conservation of non-orthodox seeds and embryonic axes	Rekha Chaudhury, A.P. Singh, Susheel Kumar and Digvender Pal
	1.00 – 2.00 p.m.	Lunch	
	2.00 – 4.30 p.m.	Practical 1: Contd.	
16.11.11 (Wed.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 6: Cryostorage of pollen and dormant buds	Rekha Chaudhury

	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 7: Cryobanking of diverse explants: Operational and management aspects	S.K. Malik
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45a.m.-1.30p.m.	Practical 2: Cryotechnology for long-term conservation of pollen and dormant buds	S.K. Malik, Ravish Choudhary and Poonam Chaudhary
	1.30 – 2.30 p.m.	Lunch	
	2.30 – 4.00 p.m.	Practical 2: continued	
	4.15 – 5.00 p.m.	Visit to Bioversity International	S.K.Malik/ Anuradha Agrawal
17.11.11 (Thur.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 8: An overview of <i>in vitro</i> conservation of germplasm	R.K. Tyagi
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 9: Application of <i>In vitro</i> conservation and cryopreservation techniques in tropical tuber and medicinal plants	Neelam Sharma
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 12.30 p.m.	Lecture 10: Germplasm conservation demands, opportunities and challenges in the context of biotechnology	S.R. Bhat
	12.30 – 1.30 p.m.	Lunch	
	1.30 – 4.00 p.m.	Practical 3: Freezing of <i>in vitro</i> shoot tips using vitrification method: case study in medicinal plants	Neelam Sharma, Ruchira Pandey and Ramesh Chamola
	4.00 – 4.30 p.m.	Presentation by trainees (2)	Neelam Sharma
18.11.11 (Fri.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 11: Global conservation of seeds: Millennium Seed Bank Project	Hugh Pritchard
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 12: Methods of <i>in vitro</i> conservation and cryopreservation in bulbous crops	Ruchira Pandey
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 12.45 p.m.	Lecture 13: Garlic cryopreservation : experiences at RDA	Kim Haeng-Hoon
	12.45 – 1.45 p.m.	Lunch	
	1.45 – 4.30 p.m.	Practical 4: vitrification of garlic meristem tips using PVS2 or PVS3 as a cryoprotectant	Ruchira Pandey, Neelam Sharma, Ramesh Chamola
19.11.11 (Sat.)	9.45 – 10.45 a.m.	Lecture 14: Physiological aspects of seed banking	Hugh Pritchard
	10.45 – 11.45 a.m.	Lecture 15: Cryopreservation of hairy	Kim Haeng-Hoon

		roots	
	11.45 -12.00 a.m.	Tea	
	12.00 – 1.30 p.m.	Practical 5: Hairy roots cryostorage	Kim Haeng-Hoon
	1.30 – 2.30 p.m.	Lunch	
	2.30 – 3.45 p.m.	Practical 5: contd	
	3.45 – 4.30 p.m.	Presentation by Trainees (3)	Ruchira Pandey
20.11.11 (Sun.)		holiday	
21.11.11 (Mon.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 16: In vitro and cryopreservation : Tropical vs Temperate crops	Sandhya Gupta
	10.30 – 11.30 a.m.	Lecture 17: In vitro / cryopreservation of temperate fruit germplasm: case studies in <i>Pyrus</i> and <i>Rubus</i>	Barbara M. Reed
	11.30 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 1.00 p.m.	Practical 6: Encapsulation-dehydration technique for cryopreservation of <i>in vitro</i> - grown shoot tip explants	Sandhya Gupta, Barbara M.Reed, Antima, Hardev Prasad & Rakesh
	1.00 – 2.00 p.m.	Lunch	
	2.00 – 3.00 p.m.	Practical 6: Contd.	
	3.30 – 7.30 p.m.	Special session for discussion	Ali faculty & invitees
22.11.11 (Tues.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 18: Establishment, management and use of <i>in vitro</i> germplasm collections	Barbara M. Reed
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 19: Banana conservation : Activities at ITC, Belgium	Bart Panis
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 12.30 p.m.	Lecture 20: Droplet freezing : applications to a wide range of plant species	Bart Panis
	12.30 – 1.30 p.m.	Lunch	
	2.30 – 4.30 p.m.	Practical 7: Droplet freezing	Bart Panis, Anuradha Agrawal, Smriti Verma, Namrata Singh, Priyanka Vijay, Subhalakshmi A., D.P.S. Meena and R.K. Tyagi
23.11.11 (Wed.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 21: Transboundary movement of vegetatively propagated germplasm-importance of <i>in vitro</i> techniques	Anuradha Agrawal
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 22: Genomic tools for	K.V.Bhat

		enhancing conservation and utilization of genetic resources	
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 12.30 p.m.	Lecture 23: Molecular markers – An overview	Amit Kr Singh
	12.30 – 1.30 p.m.	Lunch	
	1.30 – 4.00 p.m.	Practical 8: DNA isolation, purification and quantification	R. Parimalan, Amit Kumar Singh, Sonika Singh, NSCB Raju and M.K. Rana
	4.00 – 4.30 p.m.	Presentation by Trainees (2)	Anuradha Agrawal
24.11.11 (Thur.)	9.45 – 10.30 a.m.	Lecture 24: Molecular data analyses	M.K. Rana
	10.30 – 11.15 a.m.	Lecture 25: Genetic stability assessment of <i>in vitro</i> and cryopreserved germplasm – Practical considerations	Zakir Hussain, R.P.Yadav, Devender Nerwal & Sanjay Kumar
	11.15 – 11.45 a.m.	Tea	
	11.45 – 1.00 p.m.	Practical 9: PCR and gel analyses for SSR and ISSR	Amit Kumar Singh, M.K.Rana
	1.00 – 2.00 p.m.	Lunch	
	2.00 – 3.30 p.m.	Practical 10: PCR and gel analysis for RAPD	Zakir Hussain, Amit Kumar Singh, Sonika Singh, NSCB Raju
	3.30 – 4.30 p.m.	Presentation by trainees (3)	Zakir Hussain, A.K Singh
25.11.11 (Fri.)	9.45 – 1.00 p.m.	Practical 11: Data scoring and analysis	M.K.Rana
	1.00 – 2.00 p.m.	Lunch	
	2.00 – 3.45 p.m.	Presentation by Trainees (3)	Sandhya Gupta, M.K.Rana
	3.45 – 4.30 p.m.	Feed back session	Rekha Chaudhury
26.11.11 (Sat.)	9.30 – 11.00 a.m.	Valedictory function	
	11.45 – 1.15 p.m.	Visit to NRC PB	S.K.Malik
	1.15 – 2.15 p.m.	Lunch	
	2.15 – 3.15 p.m.	Visit to NASC Museum	Rekha Chaudhury