

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

芹菜體胚細胞之誘導、培養及其生物反應器之操作策略(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2214-E-002-034-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：黃世佑

計畫參與人員：詹#21177；松,洪嘉鴻,周士農

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 5 月 29 日

芹菜體胚細胞之誘導、培養及其生物反應器之操作策略(1/2)

Induction and Cultivation of Somatic Embryogenic Cell and It's Bioreactor Operation Strategy

計畫編號：NSC 91-2214-E-002-034

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：黃世佑 台灣大學化工系教授

中文摘要

植物體胚發生 (somatic embryogenesis) 為利用其全潛能性 (totipotency) 於體細胞誘導不定胚之技術，由於其為人工種子的關鍵之一，故近年來甚受重視。本研究以芹菜 (*Apium graveolens* L.) 葉及莖為培植體，利用 SH 培養基誘導癒合組織 (含 2,4-D 7.5 μ M) 及繼代培養 (含 2,4-D 1 μ M, kinetin 1 μ M)，其中以葉誘導之癒合組織 LC1 於第 28 天鮮重平均生長率為 0.39(1/day); 以莖誘導之癒合組織 SC1 於第 28 天鮮重平均生長率為 0.56(1/day)。懸浮細胞培養於第 8 天沉降體積 (SCV) 增加一倍。利用回應曲面法 (Response surface method) 針對蔗糖濃度、還原氮濃度、初始 pH 值三個因子，探討固態培養癒合組織最佳生長條件。一階 RSM 實驗結果顯示蔗糖 2%，還原氮 (NH₄⁺) 300 ppm，初始 pH 6.2 的組合有較高的鮮重生長率 (0.32 1/day，於第 16 天)，而乾溼重比隨蔗糖濃度增加而上升。未來幾個月內將從事篩選胚性癒合組織及探討體胚發生率，利用部分因子設計，回應曲面法，以初始 pH，還原氮濃度，碳源及培養液黏度等因子，尋求最佳體胚誘導條件，以作為未來生物反應器培養的依

據。

關鍵詞: 胚細胞，芹菜，再生，擴大規模，生物反應器，高濃度細胞胚

英文摘要

Somatic embryogenesis has been receiving much attention due to its inherent totipotency and favorable in inducing elite plant species and mass production of the plants. Artificial seed production via somatic embryogenesis is the future prospect in breeding. The aim of this work is to investigate the key factors for developing somatic embryos and elaborating the bioreactor configuration suitable for mass production of the embryo. Celery (*Apium graveolens* L.) was adopted as a model system. The work began with inducing a callus from leaves with SH medium containing 7.5 μ M of 2,4-D, and subcultured with the same medium containing 1 μ M of 2,4-D and 1 μ M kinetin. The callus obtained from the leaves (LC1) exhibited an Average Growth Rate (AGR) of 0.39 day⁻¹ on day 28. The AGR was the objective function of the optimization. While that obtained from stem (SC1)

showed the AGR of 0.56 day^{-1} on day 28. Embryogenic suspension culture for 8 days resulted in a doubling in settling cell volume (SCV). As a preliminary optimization of culture condition of callus induction, Response Surface Method was employed to search the optimum condition for obtaining the AGR and Dry wt./Fresh wt. Ratio. The result showed that under 2% of sucrose, 300 ppm of NH_4^+ , and the initial pH of 6.2, the highest AGR(0.32 day^{-1}) was obtained (based on 16th day). The other objective function, Dry wt./Fresh wt. increases with increase of sucrose concentration.

In coming months, the work will be focused on the screening of embryogenic callus as well as the efficient regeneration rate of embryos. The optimum conditions for inducing somatic embryos will be searched by employing fractional factorial design/Response Surface Method, taking initial pH, concentrations of NH_4^+ and sucrose/mannitol and viscosity as the independent variables. The results will throw light on the operation of bioreactor.

Keywords: embryogenic cells, celery, regeneration, bioreactor, high density embryogenic cell.

前言

在正常情況下，植物的胚胎發生 (embryogenesis) 是由精子和卵受精後形成合子 (zygote) 開始的。然而在自然

界中，由於植物存在有全潛能性 (totipotency)，除了受精卵外，其他部位的細胞，透過產生體胚的方式，都具有發展成一個完整植株的可能性。體胚發生的相關研究起源於 Steward(1958)，藉由調節植物營養物及荷爾蒙種類的方式，來達成誘導體胚的目的。由於體胚的誘導為人工種子的關鍵技術之一，可用來大量生產農作物，花卉，種苗，及保存稀有植物，故近年來甚受重視。

目前已有不少植物之體胚已誘導成功，其中紅蘿蔔 (carrot)，苜蓿 (alfalfa)，芹菜 (celery)，及稻米的體胚誘導較具成果。然而大規模的生產仍有待開發，其主要的困難有二 (Suehara K., 1995): (1) 在大量的去分化癒合組織中僅有很少部分能形成體胚。(2) 胚的發生至形成植株的時間週期有相當大的變異性。故體胚的發展目前仍有許多問題有待克服。

芹菜 (*Apium graveolens* L.) 的體胚發生最早由 Williams 與 Collin(1976) 發表。Kim Y.W. et al.(1989) 曾針對芹菜體胚細胞的起源作相關研究，顯示於體胚發生起源於絮聚體表面的單個細胞，由葉誘導的癒合組織相較於莖誘導的癒合組織有較高的體胚發生率。Nadel B.L. et al. (1990) 則針對誘導芹菜體胚的繼代週期及同步化進行探討，其認為較低的繼代頻率可提高體胚發生的潛力，以及離層酸 (ABA) 可有效提高體胚發生的同步率而能增加體胚成功再生率。Uozumi N. et al. (1993) 指出了光照對芹菜體胚發生有正面的影響，尤其對魚雷型胚的發育為不可或缺的物理條件。

本研究即以芹菜為研究材料，以

生物反應器大量生產體胚為最終目標，初期利用無菌苗的葉及莖作為培植體，誘導癒合組織，同時探討癒合組織最佳生長條件，如碳源，氮源，pH，植物荷爾蒙等，使能獲得足夠的細胞量；其後對於錐形瓶懸浮培養之體胚誘導條件進行探討。期能根據實驗結果，對反應器生產體胚的操作策略提供參考數據。其流程圖如 Fig. 1。

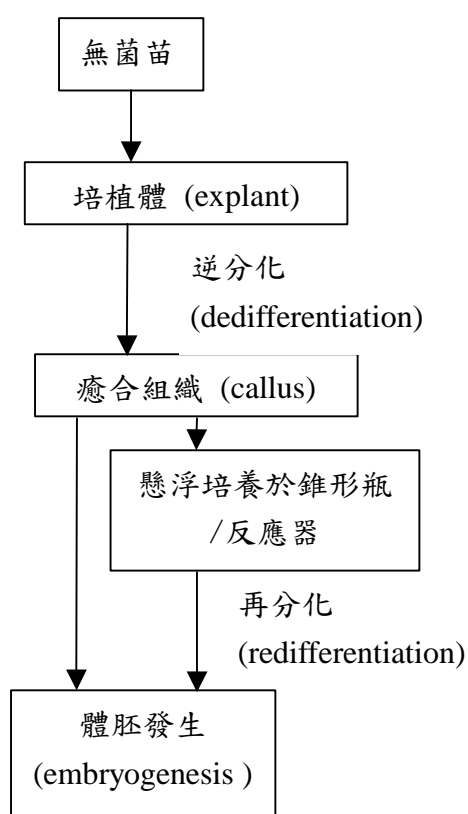


Fig. 1 實驗流程圖

材料與方法

(1) 無菌苗培養

本研究以芹菜 (*Apium graveolens* L.) 為材料，首先進行無菌苗培養以無菌水清洗芹菜種子表面，將種子浸泡於 2% NaOCl 溶液，加 2-3 滴 Tween20 幫助潤溼種子表面，搖洗 15 至 20 分鐘

(Gamborg, 1995)，以無菌水沖洗後將種子浸泡於 10% H_2O_2 溶液中，搖洗 5 分鐘 最後再用無菌水沖洗以除去殘留藥劑。

種子消毒後，植入 1/2 MS 的固態培養基中培養，培養基中添加 1.5% 蔗糖，1% 洋菜，pH 5.8。種子接種後，於恆溫培養箱中 26°C 光照培養。所有培養基皆經過高壓滅菌釜 121°C 滅菌 20 分鐘。

(2) 癒合組織誘導與培養

無菌苗培養 3 週後，取葉片及莖，切成約 1-2 mm 的小片段作為培植體，接種於 SH 培養基，培養基中添加 3% 蔗糖，7.5 μ M 2,4-D，pH 5.8，在 26°C 無光照下進行癒合組織的誘導。培植體約在二個月後在切口部分逆分化長出淡黃色鬆散狀癒合組織。癒合組織出現後，將它移至含 3% 蔗糖，1 μ M 2,4-D，0.5 μ M kinetin，pH 5.8 之 SH 培養基，於恆溫培養箱中 26°C 無光照下培養，每 18 天繼代一次。

(3) 懸浮培養系統之建立

取生長情況良好的由葉片誘導出的癒合組織，在無菌操作下用藥杓壓碎，接種至 125ml 三角錐形瓶，其中含有 25ml 培養液 (SH 培養基，3% 蔗糖，1 μ M 2,4-D，0.5 μ M kinetin，pH 5.8)，26°C 無光照下振盪培養 (100 rpm)，每 7 天繼代一次，達穩定之生長狀態後，改用 250ml 三角錐形瓶裝有 50ml 培養液的方式培養，其餘條件不變。

(4) 生長曲線的測定

以葉片及莖為培植體所誘導的癒合組織 LC1, SC1，於固態培養下，每三

天利用無菌操作的方式取出秤溼重一次，得其生長曲線。

懸浮細胞生長測定採用細胞沉降體積百分率 (SCV, sediment cell volume), 以 LC1 所建立之懸浮細胞培養 LS1, 接種於有側管之 125ml 三角錐形瓶, 每三天將培養液震盪混合均勻後, 傾注細胞及培養液於側管中, 側管垂直靜置 10 分鐘待細胞沉降, 得細胞沉降體積佔培養液的比例。另外, 以位相差顯微鏡觀察細胞。

(5) 回應曲面法 (Response Surface Method) 探討固態培養癒合組織最佳生長條件

回應曲面法為利用統計方法將會影響產品結果的因子次數以數學模式求出最適條件的方法。參考前人的研究結果 (Okamoto A., et al, 1992), 本研究初期選擇碳源(蔗糖)濃度(以 X1 表示), 還原氮源($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)濃度(以 X2 表示), 及初始 pH 值(以 X3 表示)等三個自變因子(independent variable), 每個自變因子分為三個層級(-1,0,+1), 其所代表的自變因子之最大值及最小值示於 Table 1, 作一組中心點(X1,X2,X3 =0,0,0)及其他組合, 共進行 9 組實驗 (Table 2.), 針對目標函數—鮮重平均生長率(以 Y1 表示)及乾溼重比(以 Y2 表示)—採用數學統計軟體 STATISTICA 進行迴歸分析運算並作回應曲面圖。其中, 平均生長率定義示於式(1)。

平均生長率(Average Growth Rate)

$$\text{AGR} = \frac{M_f - M_i}{M_i \cdot T} \quad (1)$$

其中, M_f : 末細胞重 final biomass(g)

M_i : 初細胞重 initial biomass (g)

T: 時間 (day)

結果與討論

(1) 癒合組織培養生長曲線

以葉片及莖為培植體所誘導的癒合組織 LC1, SC1, 於固態培養下, 其生長曲線如 Fig. 2. 所示, 其中 LC1 由最初接種的 0.0293g 於 37 天後成長為 0.5973g, 在第 28 天平均生長率為 0.39(1/day), SC1 由最初接種的 0.0419g 成長為 1.0366g, 在第 28 天平均生長率為 0.56 (1/day), 可知以葉片所誘導的癒合組織成長較以莖誘導者為慢, 此結果與 Kim Y.H.(1989)所發表的結果相符, 其以葉片誘導的癒合組織, 在較低 2,4-D 濃度下的成長較葉柄誘導的癒合組織慢。

另外, 由於癒合組織團塊在第 20 天左右會出現褐化現象, 可能原因為細胞老化, 以及團塊過大而質傳較差, 造成養分傳遞不易, 故癒合組織的繼代週期以 16-18 天為佳。

(2) 懸浮培養細胞生長曲線

懸浮培養系統建立後, 利用測量沉降體積(SCV)方式求得生長曲線, 如 Fig. 3 所示, 由圖可知, 懸浮細胞約隔 8-9 天可增加一倍體積, 至第 12 天細胞體積增加趨於平緩, 細胞所佔的體積分率達 90% 以上, 且有細胞褐化的現象。根據此生長曲線, 芹菜懸浮細胞的繼代週期以 7-9 天為佳。

由位相差顯微鏡觀察細胞, 可發現懸浮培養的細胞大致上可分為兩種, 一是細胞排列鬆散, 細胞較大, 多半拉成長形的非胚性癒合組織 (Fig. 4a); 以及細胞排列緊密, 細胞質較濃, 細

胞接近圓形的胚性癒合組織(Fig. 4b), 這些不同的細胞族群, 會在培養液中不斷分裂增殖。而若考量將來要誘導體胚, 則應儘量增加懸浮細胞中胚性細胞所佔的比例。

(3)一階 RSM 實驗結果

參考前人的研究結果(Okamoto A., et al., 1992), 本研究初期選擇碳源(蔗糖)濃度(X1),取 4%為中心點; 還原氮源(NH₄H₂PO₄)濃度(X2), 取 650 ppm 為中心點, 及初始 pH 值(X3), 取 pH 5.7 為中心點, 三個自變因子(independent variable), 每個自變因子分為三個層級(-1,0,+1), 進行一階 RSM 實驗, Table 3 所示為一階 RSM 實驗結果, Fig.5 為鮮重生長率實驗結果的比較圖, Fig. 6.為乾溼重生長率實驗結果的比較圖, 由實驗結果可知本試驗以編號第五的組合(蔗糖 2%, 還原氮 300 ppm, 初始 pH 6.2)有最佳的鮮重生長率; 而在乾溼重比方面, 編號 2, 4, 6, 8 的組合, 乾溼重比值接近且較其他組合大, 其共通點為蔗糖濃度皆為 6%, 由試驗結果可知隨蔗糖濃度升高, 乾溼重比值會增加, 而還原氮濃度及初始 pH 在設定的試驗範圍內, 對乾溼重比的影響不顯著;原因應為在本實驗設計中, 蔗糖濃度對培養基的滲透壓有決定性影響, 而細胞為因應不同滲透壓的環境而有不同的細胞質密度。利用 STATISTICA(Statsoft Co., Tulsa, USA)統計套裝軟體進行迴歸分析, 顯示可由迴歸方程式(式(2), 式(3))來描述三因子對目標函數 Y1(溼重生長率, AGR)及 Y2(乾溼重比, DW/FW)的影響。同時利用實驗結果繪製回應曲面圖(Figs. 7-12), 其結果顯示, 針對溼重

生長率而言, 蔗糖濃度應由中心點(4%)向下修正, 還原氮濃度應由中心點(650 ppm)向下修正, 初始 pH 應由中心點(5.7)向上修正, 有利於溼重生長率的增加。而針對乾溼重比而言, 蔗糖濃度應由中心點(4%)向上修正, 還原氮濃度應由中心點(650 ppm)向下修正, 初始 pH 應由中心點(5.7)向上修正, 但蔗糖濃度對乾溼重的影響為還原氮濃度造成影響的 17 倍, 為初始 pH 值造成影響的 11 倍, 相較而言, 後二者的對乾溼重比值的影響可忽略。

$$Y1=0.2129-0.0352X1-0.0565X2+0.0615X3 \quad (2)$$

$$Y2=0.0943+0.0428X1-0.0025X2+0.0037X3 \quad (3)$$

未來研究方向

1. 利用篩網篩選胚性癒合組織

由於僅有胚性癒合組織有在表面產生體胚的潛力, 故在懸浮細胞培養系統建立後, 應朝向篩選胚性癒合組織方面進行。一般而言, 利用篩網篩選胚性癒合組織是最常使用的方法, 而在不同絮聚大小中, 以較大絮聚體有較高的體胚發生率(Nagamori E. et al., 2001), 故未來在無菌操作下, 利用 1000, 600, 150μm 的篩網將懸浮細胞接種至低荷爾蒙培養基(體胚誘導培養基), 針對不同絮聚大小, 探討其體胚發生率。

2. 利用回應曲面法探討最佳體胚誘導條件

第一階段懸浮培養目的在於產生大量的細胞, 進入第二階段後, 則以誘導體胚發生及植株再生為首要目標。影響體胚發生的因素有許多, 包括

無機鹽、碳水化合物、植物荷爾蒙等。一般認為，將癒合組織由含有植物荷爾蒙的培養基移至無荷爾蒙培養基可於癒合組織表面長出體胚(Harada, 1999)。本研究由先期對懸浮培養條件的探討得到大量細胞，未來將利用部分因子設計法，以碳源(sucrose 或 mannitol)濃度，還原氮濃度，初始 pH，黏度，四個因子為獨立變數，探討最佳體胚誘導條件，作為未來生物反應器培養的依據。

參考文獻

- Gamborg O. L., Phillips G. C. (1995), "Plant Cell, Tissue and Organ Culture", pp.37, Springer, Berlin.
- Harada J.J. (1999) "Signaling in plant embryogenesis", Current opinion in plant biol, **2**, 23-27
- Kim Yong-Hwan (1989), "Origin of somatic embryo in celery tissue culture", Hortscience **24**(4), 671-673.
- Nadel B. L., Altman A. and Ziv M. (1990), "Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspension", Plant cell, tissue and organ culture, **20**, 119-124.
- Nagamori E., Omote M., Honda H., and Kobayashi T. (2001), "Enhanced and prolonged production of plantlets regenerate from carrot callus in a viscous additive-supplemented medium.", J. Biosci. and Bioeng., **91**(3), 283-287
- Okanoto A. et al. (1992), "Studies on the efficient culture of suspension cultured celery cells", Plant Tissue Culture Letters, **9**(1), 22-26
- Steward, F. C., Mapes, M. O., and Mears, K., (1958) "Growth and organized development of cultured cells", Am. J. Bot. **45**, 705-708
- Suehara K.I., et al. (1995) "Efficient production of celery embryos and plantlets released in culture of immobilized gel beads", J. Ferm. and Bioeng., **79**(6), 585-588
- Williams, L. and Collin H.A. (1976) "Embryogenesis and plantlet formation in tissue cultures of celery. Ann. Bot. **40**, 325-332

Table 1. 一階 RSM 實驗設計:部分因子
試驗濃度範圍

Independent Variable	Symbol	Code levels		
		-1	0	1
sucrose(%)	X1	2	4	6
NH ₄ ⁺ (ppm)	X2	300	650	1000
initial pH	X3	5.2	5.7	6.2

Table 2. 一階 RSM 實驗設計表

	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9 (C)	0	0	0

Table 3. 一階 RSM 鮮重(fresh wt.)生長率實驗結果

Run No.	Independent Variables			GR(1/day)	DW/FW
	X1	X2	X3		
1	2	300	5.2	0.1904	0.0743
2	6	300	5.2	0.1932	0.112
3	2	1000	5.2	0.2068	0.0656
4	6	1000	5.2	0.1581	0.1178
5	2	300	6.2	0.3254	0.0768
6	6	300	6.2	0.2756	0.1189
7	2	1000	6.2	0.2193	0.0748
8	6	1000	6.2	0.1743	0.1138
9	4	650	5.7	0.1727	0.0943

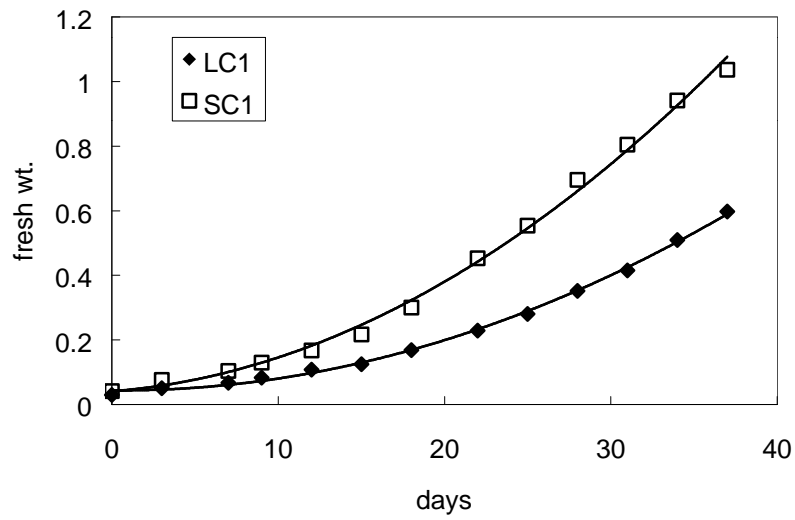


Fig. 2. 芹菜癒合組織溼重生長曲線。(LC1: 以葉誘導的癒合組織, SC1: 以莖誘導的癒合組織).

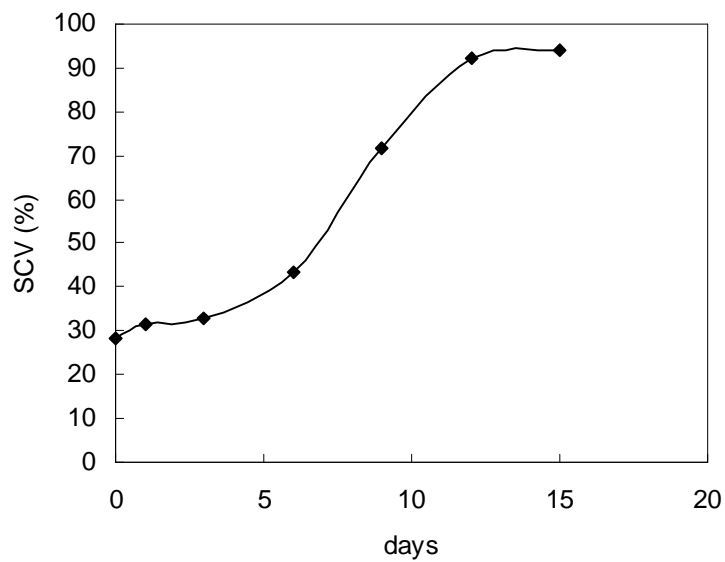
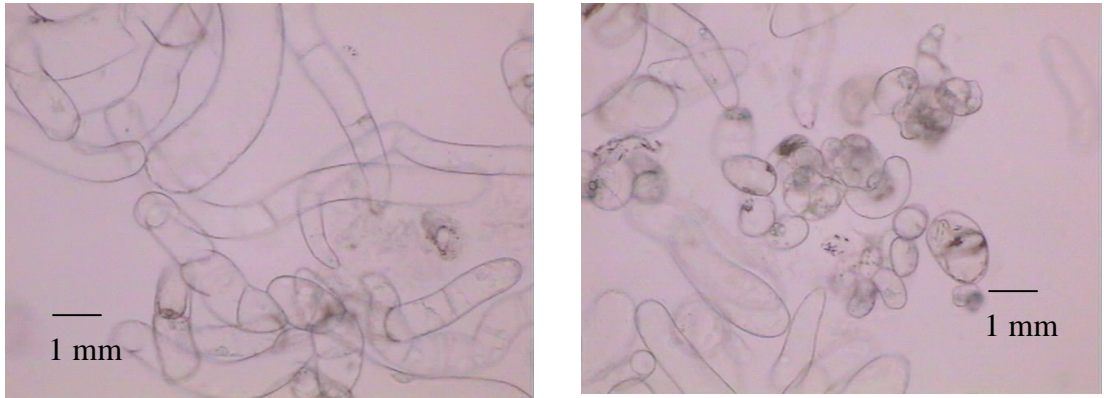


Fig. 3. 芹菜細胞懸浮培養 SCV 生長曲線.



(a)

(b)

Fig. 4. 芹菜懸浮細胞以顯微鏡觀察結果 (a)非胚性癒合組織，多為長形 (b) 胚性癒合組織，較接近圓形，細胞質較濃

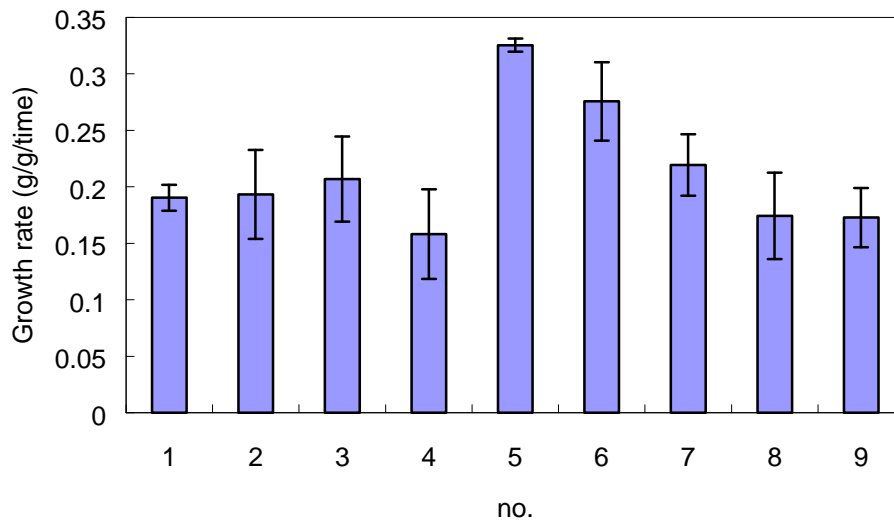


Fig. 5. 一階 RSM 針對溼重生長率所得之實驗結果

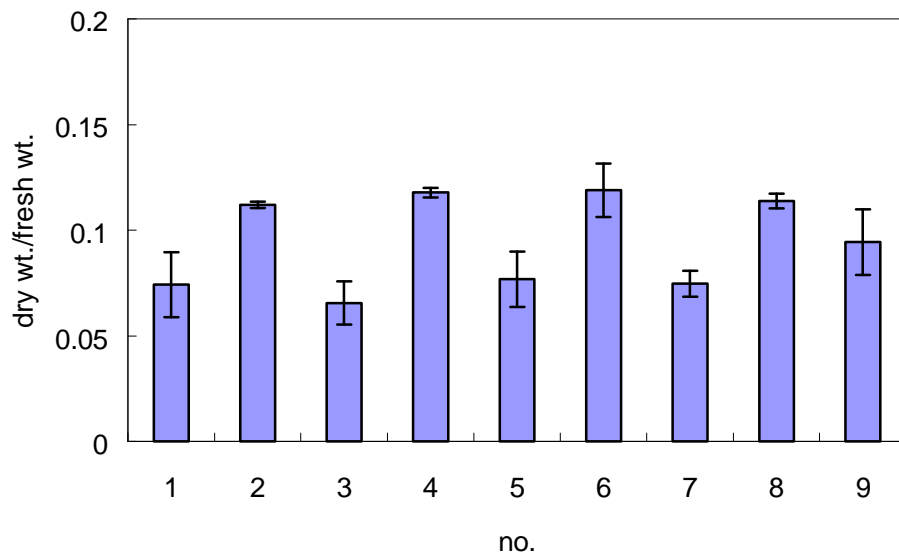


Fig. 6. 一階 RSM 針對乾溼重比所得之實驗結果

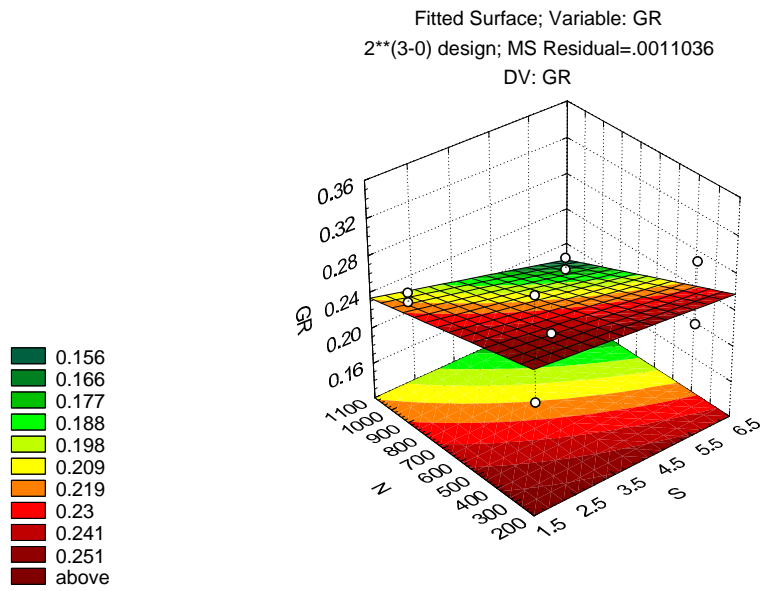


Fig.7. 蔗糖濃度與還原氮濃度對溼重生長率回應曲面圖

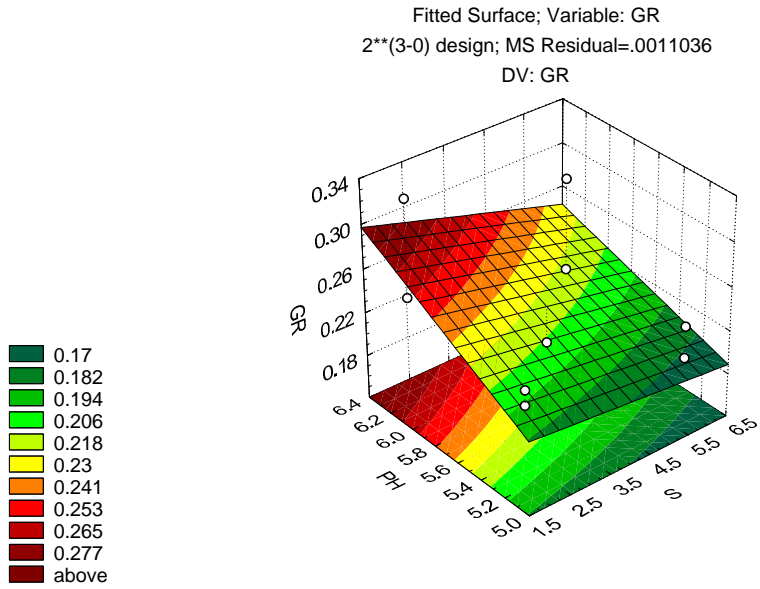


Fig .8. 蔗糖濃度與初始 pH 對溼重生長率回應曲面圖

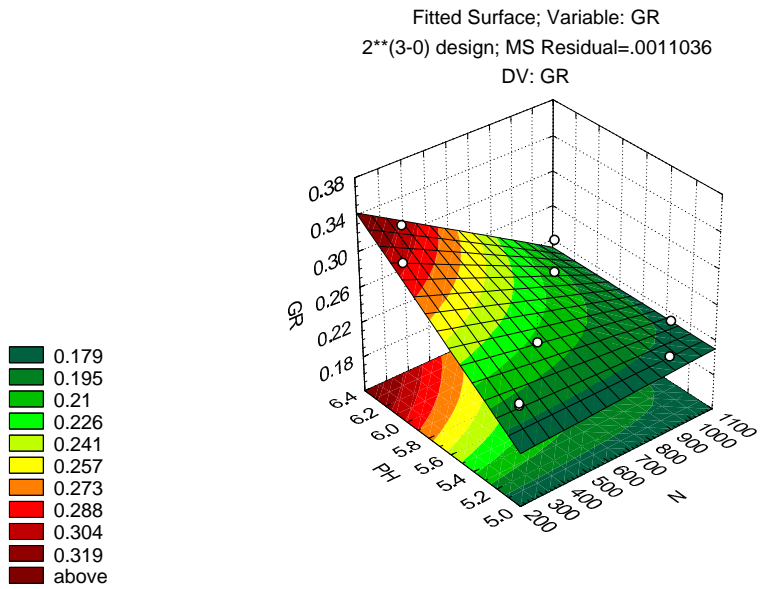


Fig .9. 還原氮濃度與初始 pH 對溼重生長率回應曲面圖

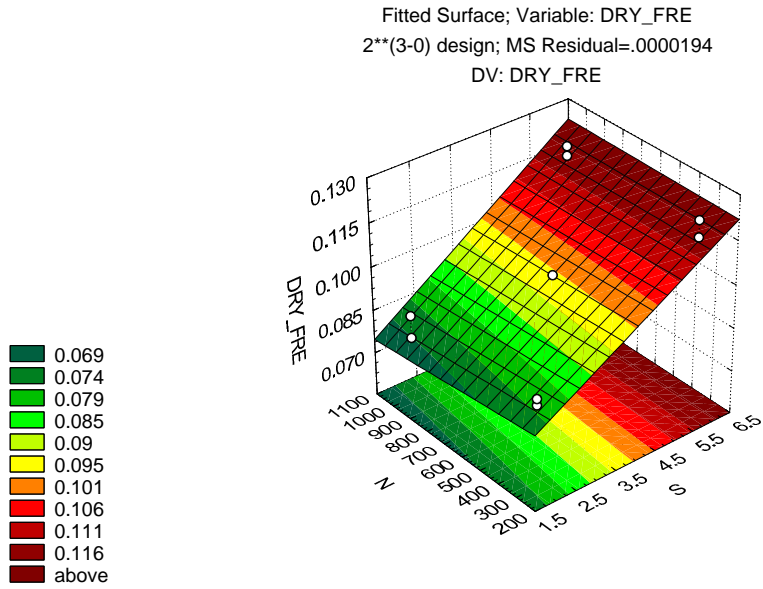


Fig. 10. 蔗糖濃度與還原氮濃度對乾溼重比回應曲面圖

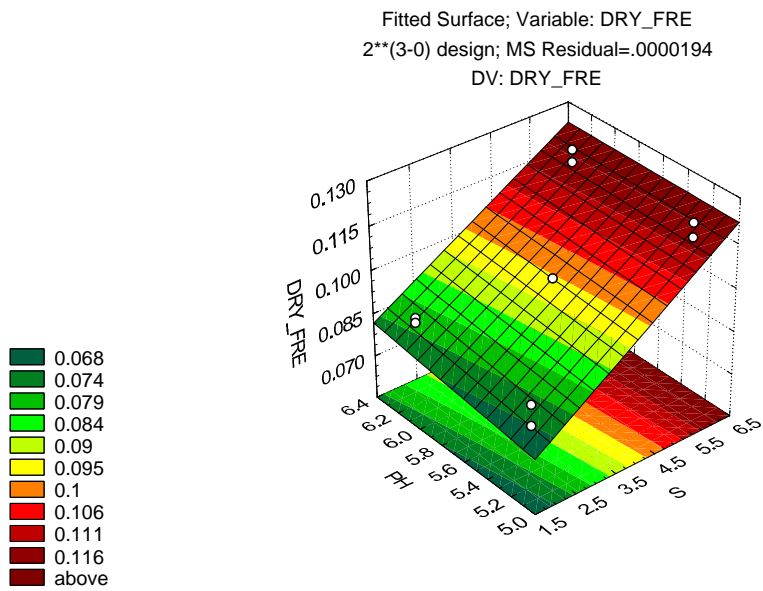


Fig. 11. 蔗糖濃度與初始 pH 對乾溼重比回應曲面圖

Fitted Surface; Variable: DRY_FRE
2**(3-0) design; MS Residual=.0000194
DV: DRY_FRE

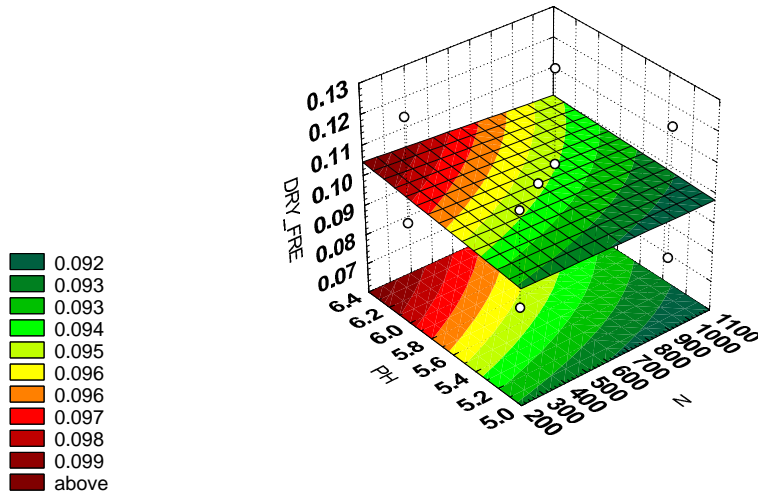


Fig. 12. 還原氮濃度與初始 pH 對乾溼重比回應曲面圖