

芹菜體胚細胞之誘導、培養及其生物反應器之操作策略(2/2)

Induction and Cultivation of Somatic Embryogenic cells of Celery and Its Bioreactor Operation Strategy

黃世佑

國立台灣大學化學工程研究所

國科會計畫編號: NSC 92-2214-E-002-017(2/2)

一、中文摘要

體胚發生(somatic embryogenesis)為由單一細胞發生類似結合子胚(zygotic embryo)的極化作用，再依照球形胚、心形胚、魚雷形胚的過程發育為成熟的體胚，其可藉由培養條件之最佳化(如 培養基組成、氣相組成及添加誘導劑等)以增加細胞體胚發生潛力(embryogenic potential)，並於反應器將體胚發生大規模化量產，以利種苗之大量生產、人工種子的開發及植物之育種。本研究以芹菜(*Apium graveolens* L.)葉為培植體，利用SH培養基(添加2,4-D 1 μ M, kinetin 0.5 μ M, 蔗糖 3 %, pH 5.8)建立懸浮細胞培養系統，探討培養基中碳源種類、氮源濃度及添加物(如 yeast extract, salicylic acid, abscisic acid等)、反應器中氣相組成等對體胚發生的影響。於懸浮培養之培養基中添加 6 g/L yeast extract與1 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 可提升胚性細胞之比例，體胚發生率分別為對照組之2.2與2.1倍。以乳糖(30 g/L)與glucose(30 g/L)為體胚誘導之碳源時，體胚發生率為對照組(80 g/L mannitol)之1.83與2.72倍。添加yeast extract (YE), salicylic acid (SA)及abscisic acid (ABA)分別可提升體胚發生率達1.49、2.6、2.74倍。比較三種不同類型反應器(STR, Airlift, Mist trickling bioreactor, MTB)對體胚誘導之影響，其體胚發生率分別為6.1, 8.3, 9.6 %，攪拌式反應器若使用hydrofoil 葉片取代six flat-blade paddle 則可大大改進體胚細胞之存活度。從細胞之固著於多層篩網上之體胚

細胞之趨向於同步化之觀點，MTB有其獨特之優點。

關鍵詞：體胚發生、芹菜、體胚發生率、絮聚大小分布、生物反應器

英文摘要

Embryogenesis which resembles a zygotic embryo of pollinated egg is developed from a single cell. It is developed via globular, heart and torpedo embryos and to a matured embryo. The embryogenesis frequency (EF) can be promoted through a medium optimization, elicitor dosages and controlling gas composition of the bioreactor. Induction of embryogenetic cells in large scale bioreactors is most important for mass production of plantlets and development of artificial seeds. The celery (Tall Utah) was adopted as a model system to investigate the effective methods for enhancing embryogenic cells. For medium optimization, several carbon sources were compared for obtaining the high total amount of embryo cells in a cultivating system. Nitrogen source and some specific components, e.g., yeast extract, salicylic acid and abscisic acid which related the protective function of plants affecting the embryogenesis frequency were optimized, ABA (3 μ M) enhanced the EF 2.74 folds compared to control medium.

Performances in embryo induction for three different types of bioreactor were compared. For agitated bioreactor, low shear stress and well dispersion of cells within the

reactor were the essential issue to be sought. An impeller like hydrofoil exhibited a mild shear and well lifting capability. Mist trickling bioreactor had merits for adhering the cells on the wire mesh which facilitated the synchronization of the embryo cells.

Keywords: Embryogenesis, Celery, Embryogenesis Frequency, Aggregate size distribution, Bioreactor

二、計畫緣由與目的

植物細胞生長的特性之一為胚性細胞其分化過程為可逆，故可以利用其全潛能性(totipotency)，以植物組織培養技術，在適當的培養條件下誘導成體胚(somatic embryos)。體胚細胞培養技術可應用於植物育種(雜交育種、轉殖)以及開發人工種子。對於不同植物的體胚發生必須具有特殊的環境控制與合適之生物反應器，並考慮培養環境與培養基組成之交互作用對體胚發生的影響(Preil and Beck, 1991)，使得所培養的細胞中僅有少部分能順利形成體胚(Suehara *et al.* 1995)，以致目前仍無商業化生產的例子出現。

芹菜(*Apium graveolens* L.)體胚的研究最早由Williams與Collin (1976)所發表。比較不同培植體所誘導之細胞株，以葉為培植體的細胞株有較高的體胚發生率(Kim *et al.*, 1989)。ABA的添加可促進體胚的同步化(synchronization)，並降低不正常胚的發生。Nadel(1990)提出關於ABA可有效提高體胚發生的同步化並增加植株再生率。

本研究以西洋芹菜葉片為培植體所誘導之懸浮細胞為材料，探討影響懸浮細胞胚性的物理條件與生化條件以獲致具有較高胚性的懸浮細胞，亦嘗試幾種適合誘導體胚細胞反應器，以期開發大量生產體胚細胞之反應器。

三、材料與方法

1. 癒合組織誘導與懸浮培養

根據Okamoto *et al.* (1992)，以芹菜無菌苗之葉片為培植體，於癒合組織誘導培養基(SH培養基，添加 3 %蔗糖, 7.5 μ M 2,4-D, pH 5.8)，在26℃無光照下進行癒合組織的誘導。每20天以含3%蔗糖, 1 μ M 2,4-D, 0.5 μ M kinetin, pH 5.8之SH培養基進行繼代。

將癒合組織，接種至250 ml三角錐形瓶(含50 ml SH培養基，3%蔗糖, 1 μ M 2,4-D, 0.5 μ M kinetin, pH 5.8)，26℃無光照下振盪培養(110 rpm)，每14天繼代一次，細胞接種密度(inoculum size)為8-10 % SCV。

2. 體胚誘導

體胚誘導培養基參考Suehara等之論文，於SH培養基中添加mannitol 80 g/L, zeatin 10 ng/L, pH 5.8。將經篩網過篩之絮聚體(> 180 μ m, 取0.5 g fresh weight)，接種到含50 ml體胚誘導培養基之錐形瓶(250 ml)中，以26℃，光照條件(約20 μ mol / m² · s)下振盪培養(110 rpm) 21天。以位相差顯微鏡搭配浮游生物計數器(Plankton counting chamber, A1498)計算體胚之數目而求出體胚發生率(體胚數目/總絮聚體數目)。

以密度梯度離心分離誘導體胚前細胞之比重利用不同濃度的Ficoll溶液(2,6,10 wt%)，緩慢滴加於離心管中，形成不同的比重層，將前培養14天後的細胞液，沉降濃縮後滴加於裝有不連續密度梯度溶液的離心管中，以12000 rpm的轉速離心(Beckman L8-70M Ultracentrifuge)，17760 g 離心25分鐘，分離不同比重的細胞，求不同比重細胞所佔之乾重百分率。

3. 生物反應器誘導體胚細胞

(1) 噴霧滴流式反應器(MTB):

利用體胚誘導培養基添加zeatin, ABA, mannitol及30 g/L 蔗糖, pH 5.8之下，利用不

銑鋼噴嘴(spraying systems, Wheaton, ILL Type 1/4 LN1, Orifice diam. 0.51mm)。流量60 mL/min, 採間歇噴霧方式供給, 通氣量為100 mL/min, 光照條件為 $40 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$, 25 °C。將經14天懸浮培養之細胞接種到反應器中之各層不銑鋼網上(網目分別為16, 24, 30, 34, 80 mesh), 培養21天後將各層細胞取出並計算各層之體胚發生率。

(2) 攪拌式反應器(STR)之操作條件:

利用 six flat-blade paddle (200 rpm) 與 hydrofoil impeller (Lightnin A310, Rochester)(100 rpm) 兩種攪拌葉片於通氣量為0.06 vvm, 光照(如(1)), 25 °C 下進行培養。培養基同 “1”。

(3) 氣舉式(Airlift)反應器之操作條件:

如圖七所示, 以2 L SH培養基, 添加10 ng/L zeatin, 3 μM ABA, 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 通氣量為 0.15 vvm, 光照條件及溫度同上。

四、結果與討論

1. 增加懸浮培養中胚性細胞所佔比例

於培養基中分別添加0, 2, 4, 6 g/L yeast extract與0, 0.5, 1.0, 1.5 g/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 。經振盪培養14天後, 測量細胞比重分佈(以超高速離心機Beckman Model L8-70M S/N)進行不連續蔗糖梯度離心, 以位相差顯微鏡觀察並將細胞接種至體胚誘導培養基進行體胚誘導。由圖一與圖二中可看出, 所培養的細胞中含比重較高細胞之比例隨著添加物濃度的增加而增加, 將此現象對應到經過21天體胚誘導培養結果, 可發現隨著添加物濃度的增加, 體胚發生率也隨之增加。此結果不但說明此二種添加物對於所培養之細胞之胚性有所助益, 進而提高了體胚之生成率。

2. 碳源種類對體胚發生率的影響

以3 %蔗糖、葡萄糖、乳糖與8 %甘露醇(mannitol)為體胚誘導培養基之碳源, 經21

天體胚誘導之結果如圖三所示, 添加葡萄糖與乳糖之實驗組, 體胚發生率可高達7.02 %與10.4 %, 然而由biomass index(培養21天內細胞乾重之變化)可看出其無法增加細胞數量。以蔗糖為碳源之體胚發生率雖為最低(2.97 %), 但由於蔗糖易於被細胞利用以促使細胞增生(biomass index為6.9)而提高總體胚數目。

3. 不同添加物對體胚的影響

酵母萃取物(yeast extract, YE)可被利用於植物組織培養作為誘導劑(elicitor)以增加丹蔘毛狀根之二次代謝產物(Chen *et al.*, 2001), 結果顯示YE可以刺激並引起植物細胞之防禦機制。而植物細胞防禦機制的誘發, 也常被利用來提高植物體胚發生。此外防禦機制中的salicylic acid (水楊酸, SA)與 H_2O_2 也被利用作為增加體胚發生率的添加劑(Luo *et al.*, 2001)。由圖四可看出YE, SA, YEP(酵母萃取物經乙醇初步純化之沉澱物)之添加均會抑制細胞之生長, 其中又以SA之抑制效果最為明顯, 細胞於體胚誘導培養的21天內幾乎不生長。YE, YEP的添加均可提升體胚發生率, 但變化趨勢隨添加濃度之改變並不顯著。

培養基中還原氮與氧化氮之濃度與比例對植物之生長與發育有著極大的影響, 針對不同的植物與組織均有適合其生長與發育之比例 (Grimes and Hodges, 1990), 當 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 增加一倍濃度(600 mg/L)時, 體胚發生率可增加2.2倍(5.8 %)。完成液態體胚誘導培養後將細胞轉移至平面培養, 由觀察可發現增加氮源濃度的實驗組, 其球型胚的數目較控制組多(圖五)。

ABA主要的作用在於防止二次體胚的發生、降低細胞由體胚轉化為植株的轉化率以促進體胚的同步化而縮短培養時間及增加體胚再生率。改變體胚誘導培養基中之碳源, 分別以3 %, 8 % 之mannitol或3 %, 6 % 蔗糖取代, 並添加不同濃度之ABA(0, 1, 3, 5 μM), 由圖六可發現含6 %蔗糖之體胚誘導培養基之體胚發生率最低; 含3 %蔗糖之培

養基中體胚發生率可達13.7%。在含蔗糖與mannitol之體胚誘導培養基中添加不同濃度之ABA (0, 1, 3, 5 μ M)均可提高體胚之生成率。由圖中可看出在含3%蔗糖 + 1 μ M ABA與3% mannitol + 3 μ M ABA之實驗組中的體胚發生率最為顯著，其值分別為15.6與15.64%。

4. 不同型式反應器對體胚誘導之影響

以攪拌式反應器懸浮培養大量生產出均一體胚有其困難(Nagamori *et al.*, 2001)。攪拌剪應力對植物細胞的影響包括抑制生長速率，改變代謝物濃度，抑制器官之形成等。由表一可看出以8% 甘露醣醇搭配six flat-blade paddle攪拌葉片於轉速200 rpm進行培養時，由螢光顯微鏡觀察細胞存活度，發現大部分之細胞均已受傷或死亡，推測培養環境中剪應力之傷害應是主因。另一原因可能是本細胞株對於甘露醣醇之利用率不佳，導致細胞活性下降所致。改變培養基碳源(3%蔗糖，six flat-blade paddle, 200 rpm)，並以具較低剪應力之hydrofoil impeller (100 rpm)進行培養。

由表一可發現以3%蔗糖為碳源之實驗組均會提高體胚之發生率，而以具較低剪應力之攪拌葉片確實可提高細胞之存活度。

噴霧滴流式反應器由於可以提供細胞類似於固定化的環境，利用不同網目之不銹鋼篩網當作支撐物，以利同步化，採用噴霧方式由上方供給培養基，除了有助於沖刷掉不易形成體胚之小絮聚體外，以間歇方式供給培養基可提供具些微程度的乾旱(drought)環境以刺激體胚之發生，氣相中培養使得氧氣供應不虞不足，並利於進行氣相組成之控制。而由表二發現，以8%甘露醣醇為碳源具有較高的體胚發生率；但是其細胞乾重卻低於以3%蔗糖為碳源的實驗組。顯示蔗糖利於細胞的增生但卻不利於體胚發生，此結果與攪拌式生物反應器所得之結果相異。甘露醣醇之結構類似於proline，具有幫助植物抵抗高鹽濃度以及乾旱環境之作用(Heldt, 1997)，而在此間歇噴霧供給培養基的環境

中，細胞可能因為某種程度的乾燥逆境而引發細胞本身合成proline，亦或是由於甘露醣醇之保護作用使得細胞能順利分化。

氣舉式生物反應器由於構造簡單，操作容易並具有低剪應力等諸多優點，較適用於植物懸浮細胞與體胚之培養。以3%蔗糖為碳源所得之體胚發生率為8.3%，略高於同為液相培養系統之攪拌式生物反應器之結果。

5. 總結及結論

針對芹菜體胚誘導過程中之懸浮培養、體胚誘導、反應器培養等各階段採用不同的策略以提高體胚的發生率。

1. 於前培養時期，可藉由添加yeast extract與 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ，改變細胞之胚性以提高體胚發生率，並利用超高速離心法量測出所培養懸浮細胞之比重分佈。當細胞前培養結束時，中比重(在6-10% ficoll溶液間)與高比重(大於10% ficoll溶液)細胞所佔比例大，則在體胚誘到階段會有較高體胚發生率。

2. 於體胚誘導階段，可藉由改變碳源的種類、3 μ M ABA與600 mg/L $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的添加以提升體胚發生率。

3. 有機誘導劑yeast extract、salicylic acid均會抑制細胞之增生與提高體胚發生率，可能與此二種添加物引發植物細胞之防禦機制有關。

4. 在反應器培養階段，針對攪拌式生物反應器，可藉由降低培養剪應力(如使用hydrofoil葉片)以增進細胞存活度、控制氣體循環以改變氣相組成以期有利於體胚細胞之生長及發生率。於噴霧滴流式生物反應器可藉由改變間歇噴霧之頻率以得更潮濕或乾燥之培養環境、添加細胞保護劑、改變氣相組成等。期能尋找出適合體胚發生之培養條件與反應器操作策略。

誌謝

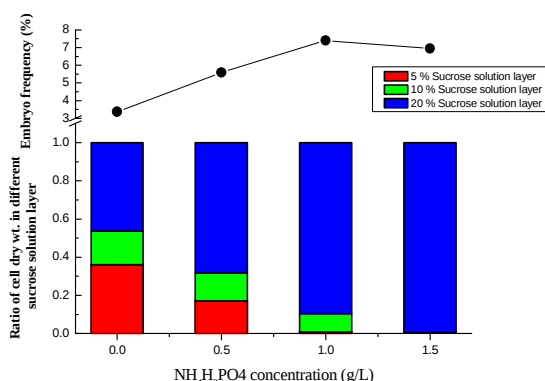
本研究獲行政院國科會之經費補助(計畫編

號: NSC 92-2214-E-002-017) 謹致謝忱。

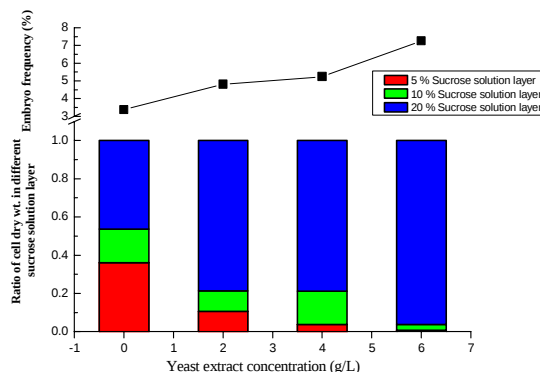
六、參考文獻

- Chen H., Chen F., Chiub F. C. K. and Lob C. M. Y. (2001) The Effect of Yeast Elicitor on The Growth and Secondary Metabolism of Hairy Root Cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme and Microb Technology*, **28** : 100-105.
- Grimes H. D. and Hodges T. K (1990) The Inorganic $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ Ratio Influences Plant Regeneration and Auxin Sensitivity in Primary Callus Derived from Immature Embryos of Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.*, **136** : 362-367.
- Heldt H. W. (1997), "Nitrate Assimilation" in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, New York, 248-276.
- Huang S. Y., Hu J. J. and Wang T. T. (2001) Effect of Gas Composition on the Cell Growth and L-DOPA Production in the Suspension Culture of *Stizolobium hassjoo*. *J. Chin Inst. Chem. Engrs.* **32**:1-11.
- Kim Y. H., (1989) "Origin of Somatic Embryo in Celery Tissue Culture", *Hortscience*, **24**(4), 671-673.
- Luo J. P., Jiang S. T. and Pan J. L. (2001) Enhanced Somatic Embryogenesis by Salicylic Acid of *Astragalus adsurgens* Pall.: Relationship With H_2O_2

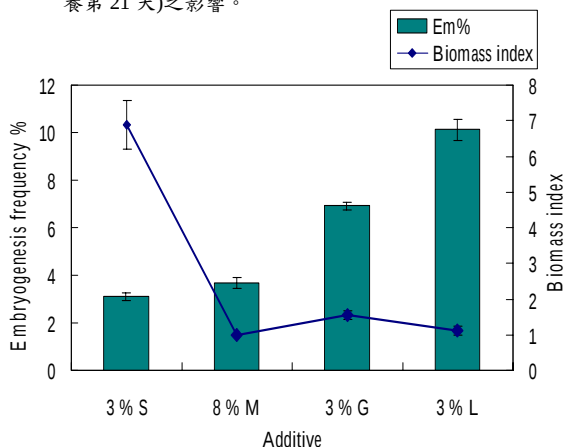
- Production and H_2O_2 - Metabolizing Enzyme Activities. *Plant Science*, **161** : 125-132.
- Nadel B. L., Altman A. and Ziv M., (1990) "Regulation of Somatic Embryogenesis in Celery Cell Suspension", *Plant Cell Tissue and Organ Cult.*, **20**, 119-124.
- Nagamori E., Omote M., Honda H. and Kobayashi T. (2001) Enhanced and Prolonged Production of Plantlets Regenerated from Carrot Callus in a Viscous Additive - Supplemented Medium. *Journal of Biosci. and Bioeng.*, **91** : 283-287.
- Okamoto A. Sakurazawa H. and Kobayashi T., (1992) "Studies on the Efficient Culture of Suspension Cultured Celery Cells", *Plant Tissue Culture Lett.*, **9**(1), 22-26.
- Preil W. and Beck A., (1991) "Somatic Embryogenesis in Bioreactor Culture", *Acta Horticulturae.*, **289**, 179-191.
- Suehara K. I., Kohketsu K., Uozumi N. and Kobayashi T., (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.



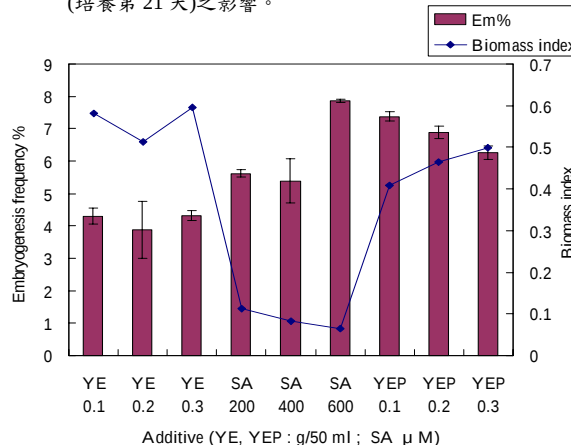
圖一. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 濃度對芹菜懸浮細胞比重分佈與體胚生成率(培養第 21 天)之影響。



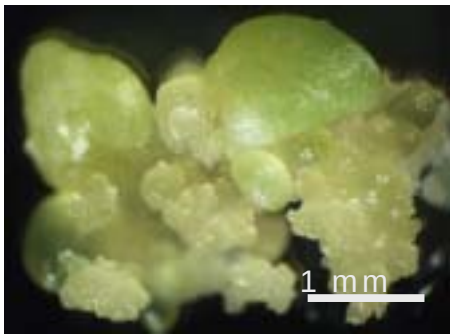
圖二. Yeast extract 濃度對芹菜懸浮細胞比重分佈與體胚生成率(培養第 21 天)之影響。



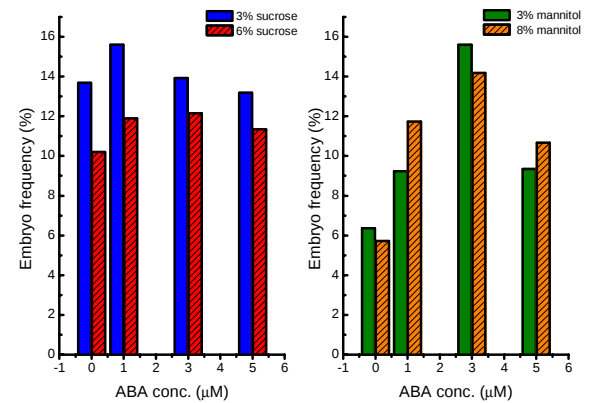
圖三. 不同碳源添加對體胚生成率及細胞生長(biomass index)的影響 (biomass index 對照組為 8 % mannitol)。



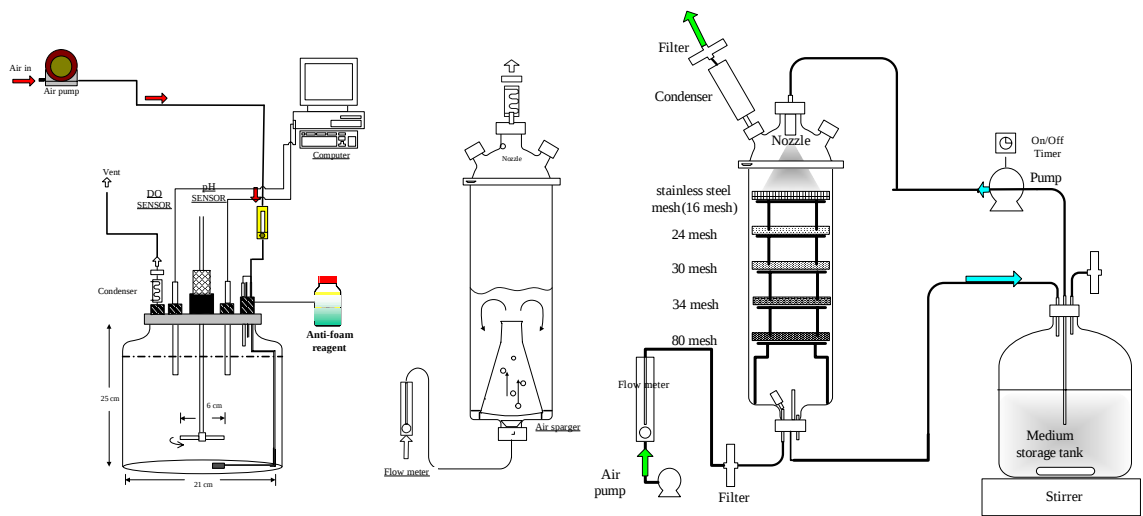
圖四. 不同添加物對體胚生成率及細胞生長(biomass index)的影響 (biomass index 對照組為 3 % sucrose)。



圖五. 由 SH 培養基($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 之濃度為 600 mg/L (2 倍濃度)) 誘導培養 21 天後,轉移至平面培養 40 天之體胚照片。



圖六. 添加不同碳源與 ABA 濃度對芹菜體胚發生率之關係。



圖七. 攪拌式生物反應器 (Stirred tank bioreactor)、氣舉式(Airlift)反應器、噴霧滴流式反應器 (Mist-trickling bioreactor)之簡圖。

表一. 不同攪拌翼與不同培養基碳源對攪拌式生物反應器體胚誘導之影響(培養天數為 21 天)。

攪拌式生物反應器 STR		
	體胚發生率 Embryo frequency (%)	細胞存活度 Viability (%)
Flat-blade paddle, 200 rpm, 8% Mannitol	2.75	65.4
Flat-blade paddle, 200 rpm, 3% Sucrose	6.12	79.8
Hydrofoil impeller, 100 rpm, 3% Sucrose	5.84	91

表二. 不同培養基碳源對噴霧滴流生物反應器體胚誘導之影響(培養天數為 21 天)。

噴霧滴流式生物反應器 MTB (間歇噴霧方式 on/off : 15 min /30 min)					
8 % Mannitol			3 % Sucrose		
	體胚發生率 Embryo frequency (%)	細胞乾重(g)		體胚發生率 Embryo frequency (%)	細胞乾重(g)
16 mesh	16.4	0.253		18.4	0.0359
24 mesh	19.1	0.218		9.62	0.212
30 mesh	26.2	0.087		5.68	0.336
34 mesh	24.7	0.095		6.86	0.3913
80 mesh	11.8	0.481		7.55	1.122