

- [28] Young RG, Butler DL, et al., 1998, *J Ortho. Res*, **16**: 406-413.
- [29] Majumdar MK, Thiede MA, et al., 2000 *J Hematother Stem Cell Res*, **9**(6):841-848.
- [30] Orlic D, Kajstura J, et al., 2001; *Nature*, **410**: 701-705.
- [31] Jackson KA, Majka SM, et al., 2001, *J Clin Invest*, **107**:1395-1400.
- [32] Kopen GC, Prockop DJ, et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:10711-10716.
- [33] Brazelton TR, Rossi FM, et al., 2000, *Science*, **290**: 1775-1779.
- [34] Mezey E, Chandross KJ, et al., 2000, *Science*, **290**:1779-1782.
- [35] Reyes M, Dudek A, et al, 2002., *J Clin. Invest.*, **109** (3):337-346.
- [36] Robert ES, et al., 2002., *J Clin. Invest.*, **109** (10): 1291-1302.
- [37] Tomita M, Adachi Y, et al., 2002, *Stem Cells*, **20**:279-283.
- [38] Kopen GC, Prockop DJ, et al., 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**,1071.
- [39] Pittenger MF, Machay AM, et al., 1999, *Science*, **284**: 1460-1466.
- [40] Bruder SP, Jaiswal N, et al., 1997, *J Cell Biochem*, **64**: 278-294.
- [41] Lou J, Xu F, et al., 1999, *I Orthop Res*, **17**:43-50.
- [42] Majumdar MK, Thiede MA, et al., 1998, *J Cell Physiol* **176**:57-66.
- [43] Reyes M, Verfaillie CM, 1999, *Blood*, **94**: 10 (S1) : 586a.
- [44] Reyes M, Verfaillie CM, 1999, *Blood*, **94**:10(S1):377a.
- [45] Buckingham ME, 1994, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**: 745-755.
- [46] Fajas L, Fruchart J-C, et al., 1998, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **10**:165-173.
- [47] Dennis JE, Charbord P, 2002, *Stem Cells*, **20**(3):205-214.
- [48] Filshie RJA, Zannettino ACW, et al., 1998, *Leukemia*, **12**:414-421.

园艺植物多倍体诱导研究进展

张全美 张明方*

(浙江大学园艺系 杭州 310029)

摘要 园艺植物多倍体在育种中具有重要的地位和应用价值,有很大的发展前景。人工诱导方法有物理方法诱导、化学方法诱导和体细胞杂交等,其中以化学诱导方法为主。化学诱导剂普遍应用秋水仙碱。如何达到高效诱导多倍体,缩短育种进程还需对诱导的群体进行鉴定,目前的鉴定方法主要有形态学鉴定法、细胞学鉴定法、染色体数计数法和流式细胞仪分析法等鉴定方法。本文概述了园艺植物多倍体的诱导方法、鉴定方法及其优缺点。

据统计,自然界有30% - 35%的被子植物,其中70%的禾本科植物是多倍体^[1]。多倍体植株表现生长健壮、抗逆力增强、果实增大以及维生素、氨基酸和其他营养物质含量提高,因此受到人们的关注。自然突变发生频率低,人工诱导提高了多倍体发生频率。通过人工诱变创造植物多倍体类型,在园艺植物育种工作中具有广阔的发展前景。本文就多倍体产生的途径、方法、鉴定及其发展做一概述。

一、自然突变形形成多倍体

自然突变有无性和有性两种方式。

无性方式是自然界的二倍体在减数分裂过程中发生偶然的染色体加倍而产生多倍体,然后通过选育手段和繁殖手段培育成多倍体植株,如芽变就是一典

型的突变例子^[2]。有性方式是小孢子母细胞或大孢子母细胞减数分裂过程中染色体未减数形成了2n配子,经杂交或直接形成多倍体种子产生多倍体植株。但自然突变的发生频率低,生产上主要利用人工诱导。

二、人工诱导获得多倍体

1. 物理方法诱导

高温、低温、离心、超声波和射线都可诱导多倍体形成。Smith-MK^[45]抗枯萎病4号小种矮型香蕉品种进行 γ 射线诱导获得突变型四倍体,突变体的果重和耐寒性优于标准品种,突变体也获得了抗4号小种抗性。但此类方法由于诱导率低、嵌合率高、

* 通讯作者。E-mail:mfzhang@zju.edu.cn

危害性大(射线)而逐渐被淘汰。

2. 化学方法诱导

化学方法诱导即利用化学药剂进行诱导,目前主要应用秋水仙碱,除草剂类药剂也取得了较好的效果。诱导方法可分为活体诱导和离体诱导两种方法。利用化学方法诱导多倍体已在多种园艺植物如大白菜^[3]、西瓜^[4,5]、甜瓜^[6,7]、柑橘^[8]、香蕉^[9]等植物上获得成功。

活体诱导处理部位可为种子、幼苗茎尖、幼苗生长点等,诱变率一般在0.1%—1%。具体的应用方法应方便、有效、安全和切实可行。谭素英等^[10]通过剥去生长点外幼叶后用1%秋水仙素的羊毛脂膏涂抹和0.2%的秋水仙素水溶液浸芽处理,显著提高了西瓜变异频率和秋水仙碱处理效果。刘惠吉等^[3]用0.4%的秋水仙碱水溶液处理短白梗白菜具2—3片真叶的幼苗,选育出四倍体白菜‘热优2号’,用0.2%的秋水仙碱溶液处理耐寒黑菜(连云港地区冬种春收的主栽小白菜)子叶期的幼苗生长点获得四倍体。

但传统的活体诱导处理方法具有诱变率低、嵌合率高,且获得的四倍体植株稔性低,不易获得大量四倍体个体等缺点,而离体培养过程中应用诱变剂的诱导技术能够克服活体诱导技术的缺点。

离体培养可提高多倍体诱导率,降低嵌合率。Compton和Gray等^[11]研究表明,采用子叶作为外植体进行西瓜离体培养可有效产生可育、非嵌合四倍体植株,纯合率达90%,比用秋水仙碱处理二倍体西瓜幼苗获得的四倍体植株纯合率高得多(幼苗处理的嵌合率高达36%—75%)^[4]。Zhang等^[5]在西瓜幼胚子叶不定芽再生的前7天在再生培养基中添加0.05%秋水仙碱,使再生植株中四倍体的频率由对照(不加秋水仙碱)的8%提高到52%,大大提高了组织培养再生四倍体的频率和效率。Frederick G Gmitter等^[8]报道,在离体培养未成熟柑橘的未发育子房过程中加入0.01%秋水仙素获得四倍体,茎尖和叶芽细胞染色体数鉴定结果表明,获得的四倍体是单细胞来源,而非嵌合体,这类四倍体可作为三倍体无籽柑橘繁殖很有用的繁殖亲本。

离体培养过程中用化学药剂诱导材料加倍可大体分为两种,一是直接诱导法,即将材料放在含诱变剂的培养基中处理一段时间,再转到不含诱变剂的培养基中培养;二是间接诱导法,即先在不含诱变剂的培养基中培养一段时间,再转移到含诱变剂的培养基中培养,培养基可是固体培养基,也可是液体培

养基。一般来说,直接处理外植体产生的药害大,经预培养后再用诱导剂处理可提高四倍体获得率,Hansen-AL等^[12]研究表明,预培养时间从0天延长到10天时,四倍体频率从10%提高到25%。

悬浮培养可使细胞群分离成单个的细胞,获得的多倍体纯合率提高,嵌合率降低。Don J Heinz等^[13]用甘蔗茎尖作外植体,将形成的愈伤组织转移到固体培养基中增殖后置于含50mg/L秋水仙碱的液体培养基上悬浮培养,对46株植株的细胞学鉴定结果表明,22株是四倍体,22株是二倍体,其余2株是混倍体。

二甲基亚砜(DMSO)是运输化学物质进入组织的一种载体,在组织培养过程中加入DMSO可作为秋水仙碱的一种调节剂,促进多倍化^[14]。Hamill-SD等^[9]将香蕉茎尖外植体浸入0.5%的秋水仙碱和2%的DMSO溶液中处理2小时获得30%的四倍体诱导率。

离体培养条件下外植体类型不同,芽再生率有很大不同。Adelberg等^[6,7]对甜瓜子叶再生四倍体进行了探索和研究,结果表明从授粉后18天到22天的幼胚子叶再生植株中高达50%为四倍体,而从授粉后34天的成熟胚子叶再生的植株中只有7%为四倍体。从子叶不同部位再生的植株,四倍体的频率也大不相同,近胚轴端子叶组织再生的植株四倍体频率显著高于从其他子叶部位再生的植株。在*S. tuberosum*和*S. commersonii*组织培养中,用叶作外植体的芽再生率略高于茎外植体的芽再生率,用叶外植体获得四倍体的频率为40%,嵌合率较低^[15]。

培养基类型和激素类型也影响四倍体的获得率。Shinichi Adaniya^[16]分别在液体培养基和固体培养基上培养姜的茎尖外植体,结果表明液体培养基促进了茎尖的生长,固体培养基对四倍体的诱导更有效。BA浓度不同,四倍体出现频率有很大不同,西瓜品种‘郑杂五号’在BA浓度为2.25mg/L时,四倍体出现频率达54.2%,而在4mg/L时四倍体出现频率为零^[17]。

基因型不同对四倍体出现频率也有很大影响。Compton和Gray^[18]用四种四倍体西瓜品系F92U8、SP90-1、SP90-2、SP90-4作子叶外植体来源,结果表明,在每一个外植体年龄段,这四种基因型的芽分化能力都不相同。品系F92U8和SP90-2两天大幼苗子叶外植体分化率最高,分别为66%和60%。当用成熟种子或超过两天大的幼苗子叶作外

植株时,分化出较少的芽。相反,品系 SP90-4 四天大的幼苗子叶外植体分化率最高(40%),但这一分化率低于品种 F92U8 和 SP90-2 的最优分化率。在这四种品系中,品系 SP90-1 的子叶外植体分化最差(11%)。

离体培养中除了利用秋水仙碱作为诱导剂外,除草剂类药剂的应用也在扩大。研究表明,生物碱、除草剂在某些植物种中的多倍化程度高,药害轻^[38]。在这些化合物中,Oryzalin(一种二苯基胺类除草剂)、amiprofos-metyl(一种磷酰胺除草剂,简称 APM)、Pronamide(一种苯基酰胺除草剂)和氟乐灵(一种二苯基胺类除草剂)比秋水仙碱对植物微管蛋白有更高的亲和性,低浓度条件下具有更高的微管蛋白解聚能力,比秋水仙碱更有效。M. van Duren 等^[39]用 30 μ mol/L 的 Oryzalin 添加 2% (v/v) 的 DMSO 获得 29.1% 的四倍体,对照用 5.0mmol/L 秋水仙碱添加 2% (v/v) 的 DMSO 处理仅得 23.1% 的四倍体。L. Chalak 和 J. M. Legave^[40]用 Oryzalin 和秋水仙碱处理三倍体猕猴桃获得六倍体的实验表明,相比秋水仙碱而言,Oryzalin 对染色体加倍具有更好的效果,对材料的毒害性更小,用 0.025mmol/L 的秋水仙碱处理,仅有 13.3% 的外植体形成愈伤组织,但未存活,用 5 μ Moryzalin 处理,H1 繁殖系获得 45.7% 的六倍体植株,H2 繁殖系获得 50.0% 的六倍体植株。Pronamide、APM^[41]和氟乐灵^[42]在甜菜胚培和甘蓝胚培培养中已有成功的报道,在众多园艺植物多倍体诱导上的应用效果还有待进一步研究。

3. 体细胞融合和远缘杂交获得多倍体

原生质体融合可以克服远缘杂交遇到的生殖障碍,获得有价值的多倍体植株。原生质体的融合方法有电融合法和 PEG 融合法,原生质体融合后经培养产生愈伤组织,再诱导分化为杂种植株获得异源多倍体或同源多倍体。Teodoro Cardi 等^[20]利用电融合技术将马铃薯和野生种二倍体的原生质体融合,获得了比亲本更有活性的再生株,杂种植株获得了野生种的耐冷性、高比重、有丝分裂突变率高等特性。S. Warra 等^[21]将马铃薯双单体的原生质体用化学方法融合获得了四倍体和六倍体杂种植株。

多倍体可用来克服远缘杂交的障碍,转移有益性状的外源基因。同亲本相比,种间杂种存在育性降低、自交不亲和或生活力降低的现象。种间杂交产生的杂种经染色体加倍可获得异源多倍体,恢复杂种育性。如 *S. melongena* 和 *S. integrifolium* 杂

交获得不育杂种,在离体培养杂种茎尖外植体过程中加入 0.05% 秋水仙碱可高频率诱导出双二倍体,除倍性不同外,双二倍体的基因状况与二倍体杂种相同,但双二倍体高抗叶萎病、枯萎病病毒株系 I (8107)和病毒株系 II (8215)^[22]。C. Mollers 等^[20]报道双单体体细胞杂交是获得四倍体杂种的最好方法,电融合法优于 PEG 融合法,硝酸银的加入大大促进了愈伤组织的芽再生。雄性可育的双单体马铃薯染色体加倍可提供基因型纯合的雄性可育四倍体,可进一步应用于基因研究和繁殖中。

4. 2n 配子有性多倍化获得多倍体

在小孢子和大孢子时期减数分裂异常产生 2n 配子,2n 配子在植物多倍体形成中起着重要的作用^[23]。不减数雄配子(2n 花粉)的发生在植物界是广泛存在的,已在 85 个属的植物中发现过 2n 花粉的发生,在蔓陀罗、玉米、菜豆、大白菜及马铃薯等植物上已有报道^[23,37]。但就其研究的深度和广度,均以马铃薯 2n 配子的研究最为突出。D. Carputo^[27]研究表明,2n 配子的应用使育种家拓宽了栽培马铃薯的基因基础,可转移改善有利性状的新基因,使等位基因多样化,扩大植株杂合性,还可利用 2n 配子将抗生物和非生物逆境基因转移到多倍体中。2n 配子是一种转移野生品种的目标基因到栽培品种(4x)基因库的独一无二的工具。

以能产生 2n 配子的二倍体作母本与四倍体杂交是获得新型四倍体的有效方法,以此方法获得的四倍体比秋水仙碱处理获得的四倍体稔性提高快^[25]。申书兴等^[37]报道中国大白菜二倍体 Bp058 能产生 2n 配子,2n 雌配子的产生率为 8.33%,受精率为 66.03%,2n 雄配子的受精率低于 2n 雌配子。2n 配子与四倍体大白菜的 n 配子杂交产生新型四倍体,具四倍体胚胎的可育子房能发育成饱满种子。刘学岷等^[25]用 5 个不同包球类型并含有 2n 配子的二倍体大白菜与四倍体大白菜杂交,选育出具有不同熟性、抗逆性强、品质优良的大白菜材料和多育 1、2、3 号杂交一代。

除利用自然产生 2n 配子外,还可利用人工诱导产生,Sanford^[46]用秋水仙碱处理甜樱桃枝获得 55% 的未减数花粉。

5. 其他特殊方法

Tsayoshi Imai 等^[19]报道利用二倍体马铃薯块茎片进行农杆菌介导的转化体中四倍体频率高达 65%,利用再生植株在含抗生素的培养基上生根情况来确认具抗生素抗性的编码基因的整合,这一方

法是有效的。通过 Southern 杂交,所有被选择株都带有编码基因。在一年继代繁殖时间内,这一抗性性状可稳定表达。转化体中二倍体和四倍体比率为 1:2。在没有与农杆菌共培养的 78 株转化植株中,表现出相当低的四倍体比率(35%),只有 27 株是四倍体。

三、多倍体的鉴定

在诱导多倍体过程中,准确及时鉴定出多倍体植株可以缩短培养周期,提高四倍体育种工作效率。多倍体由于染色体加倍,其外部形态特征和内部特征都发生了明显变化。根据这些变化就可区别二倍体与多倍体。目前常用的几种鉴定方法如下所述。

1. 形态学鉴定法

形态学鉴定法是最直观的鉴定方法。多倍体植物由于染色体加倍,其外部形态特征和二倍体有明显的差别,主要表现在根、茎、叶、花器和果实的形态和大小上。Compton 和 Gray^[11]研究发现子房直径、雄花的花瓣和花粉囊直径、叶长与叶宽比是西瓜倍性水平很好的标志,四倍体子房直径是二倍体子房直径的 1.4 倍。四倍体和二倍体雌花的花瓣直径和子房长度没有差别。而雄花中,四倍体花瓣直径和花粉囊直径大于二倍体的。二倍体的叶长与叶宽比大于四倍体的叶长与叶宽比。

2. 细胞学鉴定法

与二倍体相比,多倍体的细胞学形态表现为保卫细胞叶绿体数目增多。Compton 和 Gray^[11]通过再生植株叶片每对保卫细胞中叶绿体数目多少鉴定二倍体和四倍体植株。每株四倍体西瓜植株中,平均每对保卫细胞有 19 个叶绿体,二倍体植株中每对保卫细胞有 11 个叶绿体。这样,随倍性从 $2n$ 到 $4n$,每对保卫细胞叶绿体密度增加系数为 1.7,用 10 株四倍体后代和四倍体与二倍体杂交获得的三倍体种子来确认了其四倍性。此方法也在黄瓜倍性加倍^[26]和用秋水仙碱处理获得的西瓜幼苗上得到了验证^[4]。Compton 和 Gray^[44]用荧光黄(fluorescein diacetate,简称 FDA)对离体培养小植株的叶片进行染色,保卫细胞叶绿体经 FDA 染色后会发出荧光,用显微镜和 UV 光观察就可确定保卫细胞叶绿体数目,二倍体和四倍体植株中每对保卫细胞的叶绿体数目平均为 9.7 和 17.8。Solov'-eva-LV^[28]报道保卫细胞叶绿体数是苹果倍性水平的指标,二倍体保卫细胞叶绿体数不超过 18 个,三倍体保卫细胞叶绿

体数在 23 - 25 个,四倍体保卫细胞叶绿体数是 26 个。

3. 染色体计数法

多倍体加倍后最本质的特征是染色体加倍,因此,染色体计数法是最直接最准确的鉴定方法之一。Peloquin 等^[29]通过染色体计数法准确鉴定出杂种香蕉的倍性水平。Vandenhout^[30]用 Hoetsch color 染色法进行染色体计数,此方法比其他染色技术如品红、醋酸洋红或丙酰洋红染色有更好的效果。Teodoro Cardi^[15]用茎尖染色体计数法证实了用叶绿体计数法鉴定出的马铃薯四倍体(40%)的正确性。Nair-RR^[31]用根尖染色体和气孔密度成功鉴定了辣椒再生株的倍性。杜胜利等采用去壁低渗法进行染色体制片,成功鉴定出加倍体^[26]。

4. 流式细胞仪分析法

流式细胞仪分析法可迅速测定细胞核内 DNA 的含量和细胞核大小,是大范围实验中鉴定倍性的快速有效的方法^[32]。其原理是用染色剂对细胞进行染色后测定样品荧光密度,荧光密度与 DNA 含量成正比,DNA 含量柱形图直接反映出不同倍性水平的细胞数,测定前用鸡红血细胞或鱼血细胞校正仪器。染色剂有 PI(Propidium iodide,碘化丙啶)、EB(Ethidium bromide,溴化乙啶)、HO33342(Hoechst 33342)、FITC(Fluorescein isothiocyanate,异硫氰基荧光素)等^[51]。将样品放在冰水中可放置两天,整片叶子可储存一周而不影响倍性鉴定结果^[33]。细胞核 DNA 含量不受外部因素如光密度、植物组织水含量的影响^[18]。张兴平等^[34]利用该仪器快速检测出西瓜再生芽情况。

5. 体细胞杂种的鉴定方法

体细胞杂种的鉴定以同工酶和 RFLP^[21]等分析法为主。M. Hagimori 等^[35]以同工酶分析法成功鉴定出了日本萝卜和花椰菜的体细胞杂种。J. Preiszner^[36]在愈伤组织阶段利用杂种优势鉴定四倍体 *Solanum tuberosum* 与二倍体 *S. brevidens* 的体细胞杂种。在 31 个无性系中有 86% 的组织是六倍体,杂种同亲本相比较,耐寒性强、抗霉菌和细菌病。杂种特征也可由染色体组型来确定,S. Waara 等^[21]通过 RFLP 分析杂种叶绿体基因组表明,所有杂种都具有与亲本相似的 cpDNA,带全套染色体的四倍体明显比双单倍体亲本的生长势强。

形态学、细胞学鉴定法、染色体计数法都达不到早期快速的鉴定目的。流式细胞仪测定价格昂贵。研究者们都在寻求可快速、有效鉴定出群体倍性的

方法,根据多倍体比二倍体对逆境抗性增强的特点、对某种化学药剂的耐性不同上可望鉴定出群体倍性水平,达到早期快速鉴定出群体倍性的目的。郭启高^[43]通过增殖系数法、高温胁迫法、低温胁迫法检出倍性平均符合程度分别为88%、90%和80%。此类方法的应用还有待于进一步验证。

四、展 望

多倍体最明显的特征是“巨大性”,生产上利用多倍体可以提高产量和品质、增加抗病抗逆能力;利用多倍体作为亲本获得三倍体,如三倍体西瓜和三倍体甜菜;还可利用多倍体克服远缘杂交遇到的障碍。异源多倍体的杂合度提高和同源多倍体的基因序列增加提高了基因功能的保险性,为逆境条件下的生存竞争提供了稳定的基础^[48]。

自从1937年Blakeslee和Avery^[47]发现秋水仙碱诱导染色体加倍以来,育种学家开展了大量的多倍体诱导工作。但是,目前多倍体在园艺学方面的应用不及作物学和花卉学方面,原因有几方面,一是大多数木本多年生植物开花期太长使得诱导的多倍体应用于栽培的步骤繁琐、耗时;二是目前的诱导鉴定方法还不完善,如不能获得真正非嵌合的多倍体,秋水仙碱对植物材料的毒害作用太强,诱导频率也需进一步提高。三是获得的多倍体育性低^[49],稳定时间长,导致育种成本太高。因此,需探索新的诱变方法和诱变剂来进一步提高诱变率,找到早期快速鉴定出群体倍性的方法。

此外,RAPD技术是近几年来发展起来的新技术,为在分子水平上研究多倍体提供了思路。Kunikak Sugawara等^[50]利用RAPD技术成功鉴定出柑橘嵌合体,其广泛应用有待于研究。

多倍体的诱导与植物类型、外植体类型、激素类型和浓度、诱变剂类型和浓度、处理时间等多种因素有关,要想找到它们之间的相关性,尤其是离体培养诱导方法中各种因素的相关性,还需要很长时间。此外,分子水平上的研究更待深入。因此,园艺植物多倍体的诱导要成为一项成熟的技术,需要育种家们的共同努力。

参 考 文 献

- [1] Goldblatt, 1980, In WH Lewis [ed.]. *Polyploidy biological relevance*, 291-240, Plenum press. New York NY.
- [2] John Einset, Barbara Lamb, 1951, *J. Hered.*, **42**: 158-162.
- [3] 刘惠吉、王华等, 1994, *南京农业大学学报*, **17**(2): 118-120.
- [4] McCuiston. F., G. W. Elmstrom, 1993, *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **106**: 155-157.
- [5] Zhang XP, Rhodes BB, et al., 1995, In Lester and Dunlap (eds.). *Cucurbitaceae* '94134-94139. Gateway Printing, TX.
- [6] Adelberg JW, Rhodes BB, et al., 1993, *Acta Hort.*, **336**: 373-380.
- [7] Ade lberg JW. Rhodes BB, et al., 1994, *HortScience*, **29**: 689-692.
- [8] Gmitter FG Jr, Ling XB, 1991, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116**: (2)317-321.
- [9] Hamill-SD; Smith-MK, Dodd-WA, 1992, *Australian-Journal-of-Botany*, **40**: (6), 887-896; 23 ref.
- [10] 谭素英、黄秀强、刘济伟, *华北农学报*, 1993, **8**(4): 12-15.
- [11] Compton, Gray et al., 1996, *Euphytica*, **87**: 165-172.
- [12] Hansen-AL, Gertz-A, Joersbo-M and Andersen-SB, 2000, *Acta-Agriculturae-Scandinavica. -Section-B, -Soil-and-Plant-Science.*, **50**(2): 89-95.
- [13] Don J Heinz, Grace W. P. Mee, 1970, *Crop Science*, **10**: 696-699.
- [14] Hauthal HG, R. Sowada, 1975, In: D. Martin, and H. G. Hauthal (eds). *Dimethyl Sulphoxide*. 436-458. Van Nostrand Reinhold, Workingham, 436-458.
- [15] Teodoro Cardi, Vittoria Iannamico et al., 1993, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **34**(1): 107-114.
- [16] Shinichi Adaniya, Daisuke Shirai., 2001, *Scientia Horticulturae*, **88**: 277-287.
- [17] 郭启高、宋明、杨天秀、梁国鲁, 2000, *西南农业大学学报*, **22**(4): 298-300.
- [18] Michael E, Compton and Gray DJ, 1994, *Hortscience*, **29**(3): 211-213.
- [19] Tsayoshi Imai, Ryutaro Aida, et al., 1993, *Plant Cell Report.* **12**: 299-302.
- [20] *Physiol. Plant*, 1991, A24.
- [21] S. Waara, L. Pijnacker, et al., 1992, *Thero Appl Genet*, **85**: 470-479.
- [22] Mohammad Ali, Hiroshi Okubo, et al., 1992, *Scientia Horticulturae*, **49**: (3-4), 181-196.
- [23] Den Nijs, TPM., et al, 1997, *Euphytica*, **29**: 25-30.
- [24] 屈东钰等, 1988, 《马铃薯杂志》, **2**(2): 102-105.
- [25] 刘学岷、李贵夕等, 1998, *华北农学报*, **13**(2): 102-105.
- [26] 杜胜利、韩毅科、魏爱民等, 2002, *园艺学报*, **29**(3): 280-281.
- [27] D. Carputo, A. Barone, L. Frusciant, 2000, *Thero. Appl. Genet.*, **101**(5-6): 805-813.
- [28] Solov'eva-LV. 1990, *Tsitologiya-i-Genetika*, **24**(4): 3-5.
- [29] Peloquin SJ, R. Ortiz, 1992, In: H. T. Stalker & J. P. Murphy (Eds), *Plant Breeding in the 1990s*, 485-507, CAB International.
- [30] Vandenhout H., 1993, Belgium, L12pp.
- [31] Nair-RR, Ravindran PN, 1992, *Journal-of-Spices-and-*

- Aromatic-Crops*, 1(2): 151 - 153; 10ref.
- [32] Ozaki-Y, Nariykiyo-K, et al., 1998, *Journal-of-the-Faculty-of-Agriculture*, -*Kyushu-University*, 43(1-2): 83 - 88.
- [33] Mark W. Farnham, Ellis J. Caniglia, et al., 1998, *Hort. Science*, 33(2): 323 - 327.
- [34] Zhang XP, Rhodes BB, Whitesides JF, 1994, *Cucurbit Genet Coop Rep*, 17: 102 - 105.
- [35] M. Hagimori, M. Nagaoka et al., 1992, *Thero Appl Genet*, 84: 819 - 824.
- [36] J. Preiszner, A. Feher, O. Veisz, J. Surka and D. Dudits, 1991, *Euphytica*, 57: 37 - 49.
- [37] Shen Shuxing, Zhang Chenghe, Liu Xuemin, Wang Zixin, 1998, *Acta Horticulture*, 467: 113 - 118.
- [38] Van Tuyl JM, B. Meijer, et al., 1992, *Acta Horticulturae*, 325: 625 - 630.
- [39] M. van Duren, R. Morpurgo, et al., 1996, *Euphytica*, 88: 25 - 34.
- [40] Chalak L, Legave JM, 1996, *Plant Cell Reports*, 16: 97 - 100.
- [41] Hansen AL, Gertz A, Joersbo M and Andersen SB, 1998, *Euphytica*, 101: 231 - 237.
- [42] Jiping Zhao, Daina H. Simmonds, 1995, *Physiologia plantarum*, 95(2): 304 - 309.
- [43] 郭启高、宋明、杨天秀、梁国鲁, 2000, 西南农业大学学报, 22(3): 261 - 262.
- [44] Compton, Gray et al., 1999, *Tissue and Organ Culture*, 58: 199 - 203.
- [45] Smith-MK, Hamill-SD, Langdon-PW, Pegg-KG., 1993, *Mutation-Breeding-Newsletter*, 40: 4 - 5.
- [46] Sanford, J. C. 1983, *Ploidy manipulations*, p. 100 - 123. In: J. N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.
- [47] Blakeslee AF, AG avery, 1937, *J. Hered.*, 28: 393 - 411.
- [48] Pamela S. Soltis, Douglas. E. Soltic., 2000, *PANS*. 97(13): 7051 - 7057.
- [49] 邢少辰、蔡玉红、周开达, 2001, 吉林农业科学, 26(3): 12 - 15.
- [50] Kuniak Sugawara, Atsushi Oowada, 1995, *Hortscience*, 30(6): 1276 - 1278.
- [51] 宋平根、李素文, 流式细胞术的原理和应用, 1992, 北京师范大学出版社.

研究工作

不同的基质表面形貌对细胞生长行为的影响

朱邦尚 路庆华* 王宗光

(上海交通大学化学化工学院 上海 200240)

张奇巧 徐宇虹

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200030)

摘要 在细胞体外培养中,基质的表面形貌特征是影响细胞行为的一个重要因素。在微米尺度范围内本文研究了几种不同几何轮廓的脊/沟状形貌结构和不同间距的柱状体对鼠C6神经胶质瘤细胞生长的影响。脊/沟状形貌结构诱导细胞趋向生长,不同的几何轮廓对细胞行为的影响存在差异。柱状体间距影响细胞的贴壁和铺展,进而影响细胞的生长行为;大的间距不利于细胞生长,当间距很小时,柱状体截面的几何轮廓影响细胞的行为。

关键词: 基质 表面形貌 细胞行为 C6神经胶质瘤细胞

细胞和组织的培养通常是在培养基质如培养皿、培养板的表面进行的。在研究基质的表面特性对细胞行为的影响时,人们往往关注其表面物理化学特性如亲水/亲油性、表面能、表面电荷等,而忽略了基质表面形貌对细胞行为的影响。这是因为基质表面虽然存在着这样或那样的微结构,但由于这些微结构的大小不一且分布无序,在通常的细胞培养时很难具体地看出表面形貌对细胞行为影响的规律。直到上世纪70年代末,Clark和Curtis等把微电子的微制造技术用于制作基质表面微形貌然后观

察培养细胞的生长状况,形貌对于细胞生长影响的研究才逐步展开^[1-5]。事实上,基质的表面形貌与其表面的物理化学特性一样影响培养细胞的着附、贴壁、增殖、形态以及细胞的趋向等。本文研究了一种柱状纤维结构、两种沟槽结构(截面分别为三角形

本文2003年1月23日收到,5月4日接受。

*通讯联系人。E-mail: qhlu@sjtu.edu.cn

本研究受到国家自然科学基金(60087001)以及上海市科委启明星跟踪(02QME1407)和纳米专项资金(0249nm037)的资助。