

· 综 述 ·

流式细胞术的发展及在植物研究中的应用

陈林, 宋丽*

扬州大学 农业科技发展研究院, 江苏 扬州 225009

陈林, 宋丽. 流式细胞术的发展及在植物研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 472-487.

CHEN Lin, SONG Li. Development of flow cytometry and its application in plant research[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 472-487.

摘 要: 流式细胞术是通过对液流中各种荧光标记的颗粒进行多参数快速高效的定性或定量测定的方法, 在科学研究的多个领域发挥重要作用。然而, 由于植物组织及细胞壁和次生代谢产物等细胞的特殊成分和结构, 限制了其在植物研究领域的应用。本文在介绍流式细胞仪发展和组成分类的基础上, 着重讨论了流式细胞术在植物领域的应用、研究进展及应用限制, 进而展望该研究领域的发展趋势, 为拓宽植物流式细胞术的潜在应用范围提供新的思考方向。

关键词: 植物流式细胞术; 解离液; 植物细胞核; 荧光染料; 亚细胞结构分离

Development of flow cytometry and its application in plant research

CHEN Lin, SONG Li*

Institutes of Agricultural Science and Technology Development, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Flow cytometry is a multi-parameter, rapid and efficient method for qualitative analysis and quantitative determination of various fluorescently labeled particles in liquid flow. Flow cytometry has been applied in multiple disciplines such as immunology, virology, molecular biology, cancer biology and infectious disease monitoring. However, the application of flow cytometry in plant research is hampered due to the special composition and structure of plant tissues and cells, such as cell walls and secondary metabolites. In this paper, the development, composition and classification of flow cytometry were introduced. Subsequently,

资助项目: 国家自然科学基金(31871540); 江苏省自然科学基金(BK20191438)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871540) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191438).

*Corresponding author. E-mail: songli@yzu.edu.cn

Received: 2022-05-08; Accepted: 2022-07-26; Published online: 2022-07-28

the application, research progress and application limitations of flow cytometry in plant field were discussed. At last, the development trend of flow cytometry in plant research was prospected, which provides new perspectives for broadening the potential application scope of plant flow cytometry.

Keywords: plant flow cytometry; dissociation buffer; plant cell nucleus; fluorescent dyes; subcellular structure separation

20 世纪 50 年代初,Wallace Coulter 提出了一种流动的细胞计数方法,该方法基于检测微粒电导率的差异所形成不同的脉冲信号的强度和数量,从而获得微粒大小、数目、颗粒的复杂程度等信息^[1]。60 年代早期,研究人员 Hallermann Leitz 和同事合作开发设计了一种具备荧光测量能力的血清红细胞计数器,他们在血液样本中加入荧光染料,白细胞的荧光信号远强于红细胞,通过荧光信号和散射光信号分别计数白细胞和红细胞,荧光测量在 60 年代末才引入流式细胞术的定性和定量分析^[2]。20 世纪 70 年代初,Los Alamos 团队率先实施应用了多参数流式细胞仪检测分析^[3-5],该大型流式细胞仪不仅具有双色荧光测量、体积测量和多角度的散射光测量能力,还具有液滴分选能力。随着计算机的发展和应用软件的开发,仪器各种性能和检测器灵敏度的提高,以及越来越多的新式荧光染料和荧光分子标记物的开发,流式细胞检测操作开始变得简单易掌握,检测分辨率大幅提高,检测速度更快,分选更加准确。在过去几十年的时间里随着流式细胞仪的日趋完善,流式细胞术已成长为一项非常强大的技术,影响了从基础细胞生物学到遗传学,以及免疫学、分子生物学、细菌学、病毒学、植物学和环境科学等领域。近年来,一些新的用途如流式细胞仪与质谱技术、显微成像技术等相结合,拓宽了流式细胞技术的应用范围,为人类的科学研究提供了更加

强而有力的技术手段。

1 流式细胞术概述

1.1 流式细胞术的定义和特点

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是应用流式细胞仪对处于液流中悬浮的细胞及亚细胞结构等生物颗粒和非生物颗粒进行多参数、快速准确分析定量及分选的技术^[6]。流式细胞术有以下几个特点:检测速度快,在 1 s 内能检测溶液中 10 万个单个的生物颗粒或其他颗粒,可以在很短的时间内评估大量的粒子,这使得结果在统计上具有很强的说服力,并具有整个种群的代表性;检测参数众多,可同时检测单个生物颗粒的散射光和多种不同的荧光信号,即使粒子检测速度高达每秒 10 万次,每个粒子也可以同时收集和分析 20 个参数;对单个生物颗粒进行快速分析的同时还能准确地分选,分选是一种细胞颗粒分类的过程,能够以每秒数万个细胞的速度从混合群体中物理分离单个颗粒或细胞,并且细胞分选保留了大多数细胞的生存能力^[7]。因此,其强大的分析和分选能力,集合其他分析检测手段,令其在生物学研究领域应用广泛。

1.2 流式细胞仪的组成和工作原理

传统流式细胞分析仪由一个用于进行细胞处理的流体系统、对光信号识别的光学系统、收集信号并进行传输和转化的电子控制系统和用于分析和储存数据的计算机分析系统组成,以及具有分选系统的细胞分选仪。世界上仅有

几个国家能够自主研发并生产制造流式细胞仪,其中最具影响力的有 BD 公司的 FACS Aria、FACSCalibur、LSRFortessa 等型号仪器,以及 Beckman Coulter 公司的 MoFlo XDP、MoFlo Astrios、Gallios、FC500 等,国产流式细胞仪如迈瑞公司的 BriCyte E6、唯公科技的 EasyCell 系列等。

流式细胞仪的工作原理如下:流体系统将荧光染色的悬浮细胞或微粒在压力下从试管或多孔板中抽取细胞样品,并将其注入流动液体(称为鞘液)层流中间的流室中,鞘液可帮助缩窄细胞流,从而将细胞组织成一行大致单行的单细胞颗粒流并输送至流式检测室。细胞颗粒经光学系统的激光器照射产生了前向散射光信号(forward scatter, FSC)、侧向 90°方向的侧向散射光信号(side scatter, SSC)和激发荧光信号,一系列的滤光片分离出不同波段的荧光信号并引导至特定检测器,以便可以检测和测量每个单独的荧光染料。光学收集元件(光电倍增管、PMTs、光电二极管)收集分析样品的可见光和荧光信号,电子控制系统将收集的光学信号进行光电转换和放大处理,检测的原始数据以规范的 FSC 数据文件储存在计算机上,通过分析系统进行数据处理和分析。

1.3 流式细胞仪的分类

传统的流式细胞仪的多参数分析检测能力通常可具有 20 个检测参数,一些新的仪器平台具备更多的激光器和检测器,可实现 30–50 个参数的检测。声聚焦流式细胞仪(acoustic focusing cytometers)通过超声波可以更好地聚焦细胞颗粒进行激光检测,允许更高的样品输入和更少的样品堵塞^[8]。细胞分选仪(cell sorters)除了分析能力外,还可以纯化和收集样本以进行后续的研究。成像流式细胞仪(imaging flow cytometers, IFC)将传统流式细胞仪与荧光显微

成像相结合,实现了在细胞水平和群体水平上快速分析样品的形态和多参数荧光,应用在细胞信号传导、共定位研究、细胞间相互作用、细胞群的荧光表达^[9]。质谱流式细胞仪(mass cytometers)继承了传统流式细胞仪的高速分析特点,又具有质谱检测的高分辨能力,不同的是使用重金属离子标记抗体而不是荧光标记的抗体,并使用飞行时间质谱进行检测^[10]。全光谱流式细胞分析仪(spectral flow cytometry)为解决荧光染料之间的光谱重叠,测量多色样品中每种荧光染料的整个荧光发射光谱以创建光谱指纹,在分析过程中将每个光谱混合为每种荧光染料提供纯信号^[11]。基于微珠矩阵分析的细胞仪(cytometers for bead array analysis)用于分析少量样品中的大量分析物^[12]。纳米流式检测仪(flow nanoAnalyzer)可实现单个粒径在 7–1 000 nm 间的纳米颗粒检测,使亚细胞结构颗粒、细菌、病毒、外泌体等的检测成为了可能^[13]。

1.4 荧光是流式细胞术中最基础的光学参数

荧光是一种物理现象,其中有机或无机物质吸收某种颜色的光,即吸收某种波长和能量并激发出另一种颜色的光,因此激发光的能量较低,波长较长。能够进行这种光(能量)转换的染料分子称为荧光染料,一种行之有效的荧光染料必须能够使用滤光片依据吸收光和发射光波长的差异将它们分离开。一种特异的荧光分子标记是成功运用流式细胞检测的关键,流式细胞术中使用的荧光试剂多种多样,可分为有机小分子(small organic molecules)、藻胆蛋白(phycobiliproteins)^[14]、量子点(quantum dots)^[15]、多聚染料(polymer dyes)、串联染料(tandem dyes)^[16]、金属离子偶联染料(metal conjugates for mass cytometry)、荧光蛋白(fluorescent

proteins)^[17]、核酸染料(nucleic acid dyes)、扩散染料(proliferation dyes)、活性染料(viability dyes)、钙指示剂染料(calcium indicator dyes)等^[13]。

1.5 流式数据分析

FCS 文件格式创建于 1984 年,所有流式细胞术数据文件都具有“.fcs”文件扩展名,标准化流式细胞仪检测数据的存储,允许任何流式细胞术分析程序读取分析文件。Spidlen 等^[18]在 2020 年 9 月依据一些新的需求和建议,制定了最新 FCS 文件标准 FCS 3.2。流式检测数据的分析软件除了仪器提供的软件外,还有多种商业计算机程序可用于分析流式细胞术数据^[13],如:FlowJo、FCS Express、WinList、Kaluza 和 WinMDI,而 ModFit LT 仅是一个专门用于细胞周期分析的软件。传统的流式细胞术分析是在细胞群体周围绘制一个区域称为设门,选择特定的细胞群以进一步分析其他的分子标记。传统的流式设门分析策略对于 14 个以上多个参数的高维数据是麻烦而费时的,可能会错过想要分析的细胞群体并且不易确定分子标记之间的关系,对于这类高维数据分析诞生了新的可视化和分析工具,如 SPADE (spanning-tree progression analysis of density-normalized events)^[19]、t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding)^[20]、PCA (principal component analysis)^[21]等。

2 流式细胞术在植物研究中的应用

1973 年发表了流式细胞术首次成功用于植物细胞核分析的文章,但是该方法制备细胞核悬浮液过程比较复杂且是用德文发表,因此几乎被忽略^[22]。1983 年, Galbraith 等最早提出建立机械切割从而简单快速制备适合流式细胞仪分析的细胞核悬浮液的方法并通过 Galbraith's 细胞核解离液成功测定了数种植物

的 DNA 含量和细胞周期^[23],从此开启了流式细胞术在植物研究中的应用的大门。目前流式细胞术在植物研究中有着广泛的应用,主要包括通过流式细胞术分析测定 DNA 的含量,从而进行基因组大小测定、遗传倍性测定^[24]、细胞周期分析^[25],以及原生质体及其融合细胞分析分选、染色体分析及分选^[26]等细胞及亚细胞结构颗粒的分析。

2.1 植物细胞核检测

细胞核 DNA 含量的测定是流式细胞术在植物研究中的重要应用之一,为了减少歧义以及正确表述, Greilhuber 等^[27]系统地定义了植物核 DNA 流式细胞术的专业术语、意义和符号。Doležel 等^[28]提出了在 4 种细胞核解离液中分离完整细胞核悬浮液的制备方法,从必要的试剂和仪器设备、测量过程、数据分析、最常见的问题等方面描述了如何使用 FCM 对核 DNA 的含量进行分析。目前植物细胞核 DNA 含量的分析已广泛地应用在遗传倍性水平分析^[29]、基因组大小测定^[30-31]、DNA 碱基组成、细胞周期^[32]、核内复制^[33]、生殖途径检测、核染色质的组成^[34],以及细胞核的分选^[35]等。

2.1.1 植物核 DNA 的分离策略

植物流式细胞术检测分析与微生物、动物细胞或医学研究领域不同,植物细胞外围有细胞壁,细胞壁参与维持细胞形态,增强细胞的机械强度。细胞壁的存在为核 DNA 的分离增加了难度。目前为分离适用于流式细胞仪检测的核 DNA 主要采取两种策略^[28]:一种是酶解去除植物细胞的细胞壁从而收获原生质体经染色后直接进行流式细胞检测,或者为了减少叶绿体、线粒体、质体的影响,可将原生质体在低渗溶液中吸水破裂进一步游离细胞核颗粒,染色后进行分析检测。该方法需要用到纤维素酶及果胶酶等在合适的渗透压缓冲液中消化细胞

壁,需要优化酶解条件,如酶解的温度、时间、酶的比例和酶量,不同物种、品种、组织部位的最适酶解条件不同。另一种策略是在适当的低渗缓冲液中,通过刀片切割、钵体研磨、匀浆或珠击破碎等破裂植物材料的组织细胞,释放出细胞核游离在低渗缓冲液中,荧光染料染色后通过流式细胞仪进行检测,该方法对于有经验的操作者最快仅需要 3–5 min,样品的制备最少仅需要几十毫克的植物组织,这是目前植物细胞核的流式细胞检测最常用的方式,已实现了在拟南芥^[32]、大豆^[36]、兰花^[37]、玉米^[33]、梨^[38]、黄芩^[39]等多个物种细胞核的检测分析,甚至适用于标本^[40]、二氧化硅干燥样品^[41]和种子^[42]中的相对核 DNA 含量的检测。

2.1.2 细胞核释放方法的比较与选择

制备单个的细胞及亚细胞结构颗粒样品悬浮液对于成功应用流式细胞检测至关重要。在低渗缓冲液中裂解原生质体,细胞核以这种方式可轻易地从细胞中释放出来,其流式细胞检测结果通常很好,可获得背景低的 DNA 含量直方图和具有非常低 CV 值的 DNA 峰,适用于研究基因组的大小测定、分析检测组成等,但是原生质体分离方案却很费时费力,可能并不适用于细胞周期的分析。原生质体也能够直接分析核 DNA 的含量,由于原生质体的直径可以达到 100 μm ,在分析时需要使用大孔径(100–200 μm)的喷嘴,并存在叶绿体和线粒体 DNA 荧光的干扰。

刀片切割释放出细胞核是目前最常用细胞核悬浮液制备方法,常用在植物组织的基因组大小测定、分析遗传倍性、细胞周期变化等,在研究新物种时,建议根据物种和植物材料特性,控制初始植物材料的量、细胞核解离液的体积、植物材料切碎强度,通过多种细胞核解离缓冲液制备细胞核悬浮液,流式上机检测比

较细胞核分离效果及检测结果的差异,从而选择最合适的缓冲液。与其尝试直接获得大量的细胞核数量,不如先使用少量组织和最小化的切割,容易获得具有细胞核数量少但高质量 DNA 含量峰,则可以增加组织和切割的数量,直到细胞核的浓度达到需要的量可以快速检测大量的细胞核。植物材料的切碎程度通常由操作者的经验决定,切碎过程是将植物材料切成细小的碎片,而不是压碎或是扯裂开,因此刀片的锋利程度在植物材料切碎过程中非常重要。干燥或旱生型的材料会比柔软的材料使刀片更快变钝,玻璃材质的培养皿比塑料材质更容易降低刀片的锋利程度,更换刀片能够更有效地将植物材料切割成细小的组织块。在切碎植物材料时倾斜培养皿,使较少的缓冲液聚集在培养皿的较小区域,使植物材料充分润湿,但不是完全浸没在缓冲液中(会妨碍有效切碎);或者在一半体积缓冲液中进行切碎,另一半在切碎后的过滤之前加入,并且在冰上或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏室切碎样品可能有利于高次生代谢含量的植物样品^[43]。

粉碎植物组织常用的方法有匀浆、研磨、珠打,操作者根据自己的经验来控制组织的粉碎程度,可从各种植物组织中释放细胞核,细胞破碎程度的监测完全依赖于操作者的经验感知。匀浆和研磨通常对植物组织破碎程度较大,游离出细胞核的同时也释放了大量的细胞碎片,在制备细胞核悬浮液时,植物材料组织细胞的破碎程度难以保持一致,平行样品间难以建立质量控制标准。而珠打是使用可容纳相对较少样本的组织均质器,在含有直径为 2–3 mm 的玻璃、金属或陶瓷微珠的缓冲液中,通过机械搅拌从组织中释放细胞核,这种高通量的样品制备方法已成功用于各种类型组织^[44],甚至是干燥或新鲜的叶子^[45]、花粉^[46–47]及小孢子^[48],

以及石松和蕨类植物的孢子^[49]。珠打制备样品可以精确控制珠子击打的强度、频率和时间,平行植物样本之间破碎程度非常类似,其流式细胞检测结果的碎片背景和变异系数 CV 值更加接近,平行样品间更具备可比性。珠打样品与切碎样品进行比较时,结果表明两种方法的样本 CV 值通常相似,而细胞核数量可能会随着珠子击打频率的增加而增加,而样品制备速度的提高,易于制备和降低成本,该方法的应用具有较大的潜力。

作者实验室从事大豆遗传育种研究,大豆种子的蛋白质和脂质含量高并且硬度较高。对比不同细胞核释放方法发现,通过匀浆、研磨、珠打等方式制备细胞核悬浮液因杂质碎过多难以用于流式细胞仪分析,而通过锋利的刀片对不同生理状态和品种的大豆种子进行切片所释放出的细胞核可用于流式细胞检测细胞周期的变化。图 1 所示为大豆 Williams 82 干种子经水(A)和细胞核解离液 LB01 (B)浸泡 5 h、灌浆期的大豆种子(C)、成熟期大豆种子(D)的细胞周期结果。结果表明在核解离液浸泡后通过刀片切割的方式使大豆种子在 G0/G1 期和 G2/M 期观察到呈正态分布的 DNA 峰,因此细胞解离液对种子细胞核分离效果(图 1B-1D)较

水(图 1A)更好。

2.1.3 细胞核解离液组成及选择

细胞核解离液是获得可靠、准确、高分辨率的植物细胞核流式细胞检测结果的关键之一。因植物组织结构和化学成分的多样性,没有一种通用的缓冲液适用于所有物种^[50],但在分析模式植物时,某些细胞核解离液的核分离效果始终比其他缓冲液的效果更好。Greilhuber 等^[27]总结了 10 种最常用的非商业缓冲液及其化学成分,通过这些细胞核解离液进行研究的文献数量约占当时植物 FCM 研究论文的 3/4^[51]。在 2006 年, Loureiro 等^[52]介绍了 2 种新的应用广泛细胞核解离缓冲液 GPB (general-purpose buffer)和 WPB (woody plant buffer)。到目前为止,已报道 30 多种不同细胞核解离缓冲液用于植物细胞核分离或同时分离和染色,其中 Galbraith's、MgSO₄^[53]、LB01^[54]、Otto^[55]、GPB 和 WPB 是植物 FCM 中最常用细胞核解离液。流式细胞仪制造商 Partec 和 Sysmex 也出售多种商业化的细胞核解离液,在植物 FCM 的研究应用上取得良好流式细胞检测的结果,但这些细胞核分离缓冲液的配方并没有公开^[51]。

细胞核解离缓冲液通常由以下几种常见成分组成:有机缓冲成分、非离子去垢剂、染色

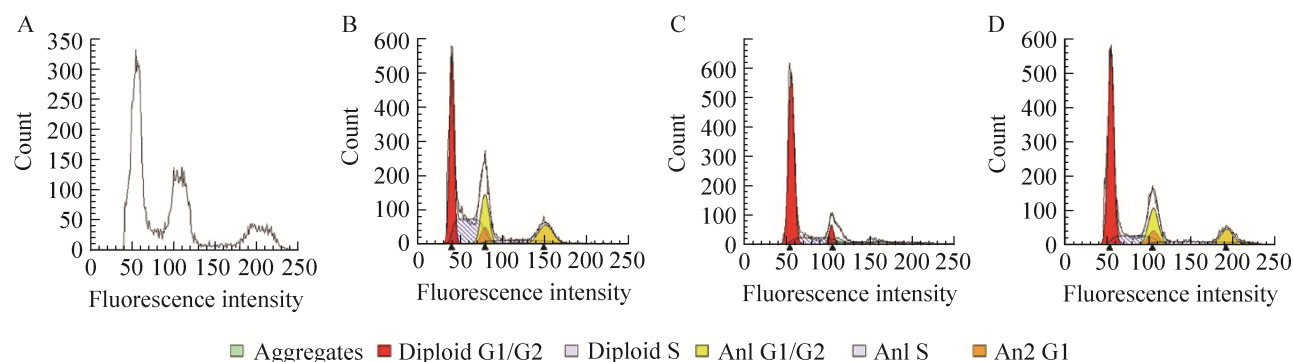


图 1 流式细胞术分析 Williams 82 大豆种子的相对 DNA 含量

Figure 1 Flow cytometry analysis of relative DNA content of soybean Williams 82 seeds.

质稳定成分、螯合剂、无机盐、还原剂等。有机缓冲物质如 MOPS、Tris 和 HEPES 等, 这些有机缓冲成分调节着溶液 pH 接近中性(pH 在 7.0–8.0 之间)并使细胞核状态保持完整, 兼容常见的 DNA 荧光染料, Tris 在 pH 小于或等于 7 时其缓冲效果不好。非离子去垢剂释放并清洗细胞核, 并降低细胞核和碎片聚集的趋势, 如 Tween-20、Triton X-100 等, Triton X-100 的浓度在很大程度上影响细胞碎片对细胞核的黏附, 值得注意的是离子型去污剂(如十二烷基硫酸钠 SDS)会改变染料分子的荧光特性^[56]。染色质稳定剂, 例如 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、精胺, 其中精胺在多数情况下比 MOPS、 $MgSO_4$ 更好的染色质稳定剂; 螯合剂(如 EDTA、柠檬酸钠等)与作为核酸酶辅助因子的二价阳离子结合, 从而阻断 DNase 活性, 减少核酸的降解。无机盐(如 KCl、NaCl)提供适当的离子强度, 起到维持渗透压的作用^[57]。此外, 一些细胞核解离液富含抗氧化的还原剂成分, 如巯基乙醇、焦亚硫酸氢盐、抗坏血酸和二硫苏糖醇等, 以及与酚类物质结合的聚乙烯吡咯烷酮(PVP-10 或 PVP-40)。

最合适的细胞核解离液取决于物种本身的组织结构和组成, 新鲜幼嫩的组织细胞更容易释放出细胞核。在分析新物种时, 建议测试对比多个细胞核解离液的制备幼嫩组织的细胞核悬浮液从而进行流式细胞检测的效果, 以获得准确可靠、荧光量高、核产量高、细胞碎片少、变异系数低的优质流式检测结果。不同细胞核解离的缓冲特性以及在切碎植物材料时释放的次级代谢物均会影响样品制备和检测的质量, 每种细胞核解离缓冲液的特性效果都不同, 在大多数情况下某一物种在一些缓冲液中制备的样品都能获得可接受的结果。细胞核解离液 GPB 是以 LB01 的化学成分为基础, 将缓冲成

分 Tris 替换为缓冲效果更好的盐酸精胺和 MOPS, Triton X-100 的浓度提高到 0.5%从而减少了细胞碎片对核的附着。因此通常认为 GPB 对于很多物种的通用性和核分离效果会更好, 但在利用流式细胞仪分析大豆叶片在 Galbraith's、GPB、WPB、LB01 等 6 种细胞核解离液制备的细胞核悬浮液时, 发现细胞核解离液 Galbraith's 和 LB01 更适合大豆组织的分析^[36]。

本实验室进而通过对比不同大豆品种的灌浆期或成熟期种子, 发现在细胞核解离液 LB01 中通过切片方式均可获得较好的分离效果。图 2 所示为不同大豆品种在灌浆至成熟期阶段细胞周期情况。结果表明该解离液和方法可以制备不同大豆品种种子中的细胞核悬浮液, 用于流式细胞检测分析 DNA 的含量、细胞周期和遗传倍性分析。上述研究结果为后期细胞周期调控大豆种子发育研究提供了技术支持。

本植物组织通常富含酚类和其他次生代谢物, 研究人员开发了一种新的细胞核解离缓冲液 WPB, 基于 Tris· $MgCl_2$ 缓冲液的成分, 加入了螯合剂和无机盐, 1% Triton X-100 以及焦亚硫酸钠和 PVP-10 以减少次生代谢产物的干扰影响。因此对于分析富含多糖多酚的植物材料时, 首选 WPB 缓冲液可以提高 DNA 含量检测效果^[51]。若常用的细胞核解离液都难以制备某一物种的细胞核悬浮液, 可根据细胞核解离液成分发挥的作用, 从而对细胞核解离液成分和浓度进行改良和优化, 也可制备出适用于流式细胞仪分析的细胞核悬浮液。

2.1.4 常用的核酸荧光染料

在流式细胞术中所使用的 DNA 荧光染料, 必须能选择性地或化学计量地与 DNA 链结合。目前已开发了许多荧光染料能与 DNA 特异性

结合,但只有少数的染料适用于植物 DNA 含量分析(表 1)^[58-59]。溴化乙锭(ethidium bromide, EB)和碘化丙锭(propidium iodid, PI)能够嵌入到双链的 DNA 和 RNA 中,每个染料分子结合 4-5 个碱基,这种嵌入结合没有碱基和序列

的偏好性,因此适用于基因组大小的测定,但在用于植物细胞核的检测时需要经核酸酶处理以排除 RNA 染色荧光。待检测基因组在碱基含量上没有较大差异时,AT 或 GC 特异性结合的荧光染料适用于 DNA 相对含量分析、DNA 的

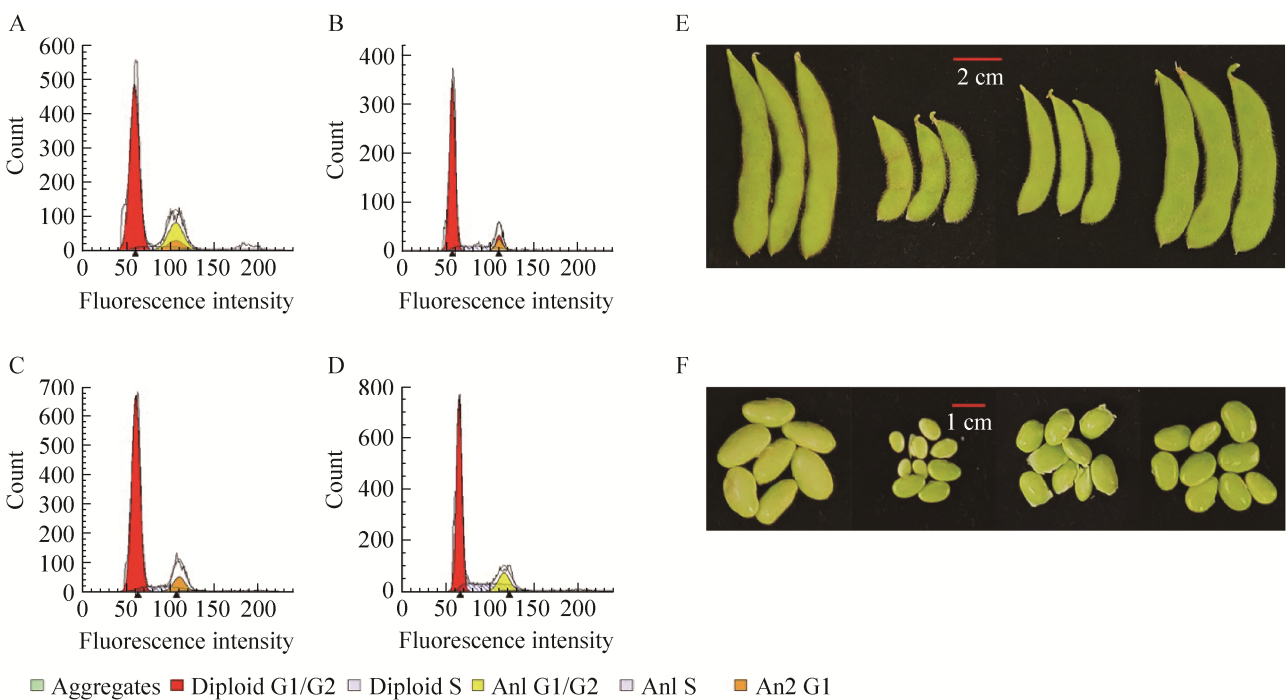


图 2 流式细胞术分析不同大豆品种灌浆或成熟期种子的相对 DNA 含量 A: 灌云大四粒. B: 苏豆 13. C: 黔豆 6 号. D: 南农 S5-1. E: 大豆果荚. F: 豆粒

Figure 2 Flow cytometry analysis of relative DNA content of seeds from different soybean genotypes. A: Guanyun large 4. B: Sudou #13. C: Qiandou #6. D: Nannong S5-1. E: Soybean pods. F: Soybean seeds.

表 1 常用植物核 DNA 检测的荧光染料

Table 1 Commonly used fluorescent dyes for plant nuclear DNA detection

Fluorescent dyes	Binding modes	Membrane permeability	Excitation wavelength	Emission wavelength
DAPI	AT-specific	Semipermeable	350	450
PI	Interaction	Not permeable to live cells	535	640
EB	Interaction	Not permeable	538	617
SYBR Green I	Interaction	Living cell-permeable	498	522
Hoechst 33258	AT-specific	Living cell-permeable	352	455
Hoechst 33342	AT-specific	Living cell-permeable	350	461
Mithramycin	GC-specific	Living cell-permeable	445	575
Olivomycin	GC-specific	Living cell-permeable	440	560
Chromomycin A3	GC-specific	Living cell-permeable	445	570

碱基组成、遗传倍性、细胞周期等。其中 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 是最为常用的 AT 特异结合染料, 能与双链的 DNA 或 RNA 结合, 在荧光强度上与 RNA 结合时只有双链 DNA 结合的 20%, 并且具有不同的最大发射波长。DAPI 典型的蓝色荧光特性也易于与其他颜色的荧光染料搭配适用, 具有很高的光漂白承受能力, 可用于线粒体和叶绿体 DNA 的检测。

2.2 植物原生质体检测

植物组织通常在甘露醇或山梨醇等低渗溶液中质壁分离并切成细条, 与纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等的混合物共同孵育消化细胞壁, 释放的原生质体通过尼龙网过滤以消除组织碎片, 并通过低速、差速和等密度梯度离心相结合的方式纯化获得高质量的原生质体^[60]。

原生质体作为完整植物细胞的替代品而用于许多的实验研究, 植物原生质体的直径可以达到 100 μm , 流式细胞检测分析时需要使用大孔径(100–200 μm)的喷嘴, 能够在无菌条件下分析和分选具有活性的原生质体并进行下一步的培养是最有意义的应用^[61], 如原生质体的分选、构建体细胞杂交。植物流式细胞术对于原生质体的分析也有着广泛应用, 主要用来检测原生质体的生理指标及活性^[62]、原生质体细胞周期、细胞计数、原生质体内标记物表达和基因表达情况^[63]、次生代谢产物分析^[64–65]等。近年来单细胞转录组测序(single-cell RNA-seq, ScRNA-seq)技术在发育生物学、肿瘤生物学及微生物学领域上得到了充分的应用, 但是由于植物细胞存在细胞壁, 为保证微流体技术的正常功能, 植物中进行的单细胞转录组测序很大程度依赖于原生质体的生成, 其中利用流式细胞仪分离纯化原生质体是保证该技术在植物中成功应用的重要因素。如 Xu 等通过流式细

胞仪分离了玉米穗原生质体进而利用单细胞测序的方式构建了单细胞转录组图谱^[66]。但是, 由于许多植物组织的次生细胞壁阻碍了单个原生质体的分离, 导致原生质体群体中细胞类型的代表性不平等, 最近研究人员建立了利用流式细胞仪分选通过切割方法获得的细胞核进而结合单核测序(single-nucleus RNA-seq, SnRNA-seq)的实验方法, 该方法已在杨树上成功应用^[67–68]。

2.3 分析花粉和小孢子

高效可靠地分析花粉质量对于种子和果实生产、植物育种和植物研究等行业具有重要意义, Heidmann 等^[69]描述了一种快速可靠无需使用标签的方法, 通过嵌入微流体芯片的阻抗流式细胞仪(impedance flow cytometer, IFC)对花粉质量参数进行分析。小孢子体外培养可用于产生单倍体植株和胚胎发生的研究, Deslauriers 等^[70]通过植物流式细胞术快速评价多种培养基条件对油菜小孢子的胚胎发生的影响并分离了有潜在研究价值的小孢子胚群体。

2.4 植物染色体分析及分选

通过流式细胞术对染色体进行分类, 即流式核型分析(flow karyotyping), 能够检测到植物的数目和染色体结构变化, 分析染色体多态性^[71]。流式细胞术是唯一可以提供大量高纯度染色体片段的技术, Doležel 等^[72]和 Vrána 等^[73]均描述了一种从细胞周期同步化的植物组织的幼嫩根尖细胞制备大量高纯度的完整有丝分裂染色体的方法, 并通过流式细胞仪对有丝分裂染色体进行分析和分选, 目前已成功在玉米^[74]、矮牵牛^[75]、豌豆^[76]、水稻^[77]、西红柿^[78]等多种植物中分选了染色体, 分选后的染色体可用于下游的物理定位、染色体特异性(bacterial artificial chromosome, BAC)文库的制备、测序和光学定位等。

2.5 叶绿体和线粒体的检测

叶绿体是植物细胞中进行光合作用细胞器,叶绿体的组成和结构是随着光环境的改变而不断变化的。利用流式细胞分析来自叶片的叶绿体悬浮液,可以获得叶片有关光合作用适应状态分布的统计信息。叶绿素在光谱范围650–800 nm内具有显著的自发荧光,可通过流式细胞仪检测叶绿体的自发荧光和散射光特征来识别和分选叶绿体亚群用于后续的生物化学和分子生物学的研究^[79]。另外也可以染色后分析叶绿体DNA的含量^[80]、研究叶绿体中荧光蛋白的结合^[81]、叶绿体发生和起源等,这对于认知植物光合作用过程具有重大意义。

线粒体是细胞中能量转化的场所,利用流式细胞术检测植物线粒体DNA的含量,分析线粒体的数量和质量^[82]、线粒体凋亡、膜电位^[83]、超氧化物分析^[84]等,对植物细胞中的活性线粒体的功能探究具有重大意义。

2.6 其他应用

植物病原微生物的检测是利用特异性抗体识别植物病原体,通过流式细胞仪的多参数检测分析,用于检测植物病原菌并评估其生存能力,是食品和饲料生产环节中重要的质量保证。流式细胞术用于植物病理学的研究数量较少,其潜在用途包括表征真菌和卵菌种群的基因组大小、多重病原体检测、监测植物病原体的活力、可培养性和基因表达等^[85–86]。

植物流式细胞术在藻类和藓类植物中的应用主要是核DNA的含量分析和基因组的大小测定,在浮游植物中的研究还包括物种筛选、浮游植物多样性和丰度^[87]、监测藻华^[88]等。

3 总结与展望

流式细胞术是一种重要且强大的分析方法和分选手段,其快速准确的多参数分析能力和

活性细胞分选能力吸引了植物领域研究者的注意,但由于植物细胞的组成和结构的复杂性和多样性,严重阻碍了植物流式细胞术的发展与应用。限制流式细胞术在植物上的应用主要有以下几个因素:植物组织样品难以制备单个游离的细胞颗粒悬浮液,主要原因是植物组织的细胞大小差异较大,细胞形态各异且具有坚韧的细胞壁,含有叶绿体、质体、液泡等细胞器会干扰检测,细胞成分如多糖、多酚及其他代谢产物等大量富集,因此较难分离得到适用于流式检测的单细胞颗粒悬液^[89]。其次,虽然大型流式细胞仪检测准确且灵敏度高,检测参数多,但其仪器本身价值较高难以普及,并且需要专业人士进行仪器日常使用和维护。再者,一种合适特异的荧光分子标记开发不易,需要与相匹配流式细胞仪相结合进行研究才行而有效,除部分核酸分子标记外,其他特异的分子标记如探针、荧光标记的抗体花费较高。最后,植物细胞具有高度异质性,即检测一个群体的平均生长速率、合成产量有可能并不是代表植物细胞的实际情况,如检测悬浮培养的植物细胞的生长速率和产量水平等^[90]。

目前植物流式细胞术主要是通过对植物细胞核DNA的含量进行研究,从而应用在植物分类学和种群生物学、生物技术研究、育种和种子工业等领域,而对于原生质体、叶绿体、线粒体、花粉、染色体等其他颗粒的应用较少。但是近年来随着成像流式细胞仪、质谱流式细胞仪和纳米流式细胞仪等不断发展和完善,必将拓宽植物流式细胞术的潜在应用范围。此外,值得期待的是,目前已有许多研究报道了植物中线粒体、质体,内质网、高尔基体、叶绿体、核糖体、过氧化物酶体、质膜和液泡膜等细胞器常用的定位标记^[91–92],若将这些标记与荧光蛋白融合,构建相应转基因植株,即可对不同

细胞器颗粒进行荧光标记, 可实现流式细胞术对植物的亚细胞结构的分析和分选。其次, 制备这些细胞器定位蛋白的抗体并偶联荧光分子标记, 也可实现对细胞器的标记。

近年来随着基因编辑技术及单细胞测序技术在动植物及酵母中的广泛应用^[93], 开展基因编辑结果及效率的检测及编辑细胞的分离实验越来越普遍, 目前已有文章报道流式细胞仪在动物及酵母基因编辑效率检测中发挥的重要作用^[94-95]。但是, 目前植物中尚无利用流式细胞仪检测基因编辑效率的报道, 主要原因应该是植物特有的细胞壁阻碍了其在该领域的应用。未来随着原生质体分离及转化效率的提高, 利用流式细胞仪检测基因编辑效率并结合单细胞测序技术必将得到广泛应用。

种子发育细胞核 DNA 的复制与种子大小和质量均相关^[96]。农作物若在种子灌浆期遭遇干旱将对产量造成极大的威胁。在许多植物中, 干旱胁迫可以通过降低细胞周期蛋白依赖性激酶的活性来抑制有丝分裂周期, 增加核内复制周期。细胞核内复制水平的提高可促进细胞扩张, 从而减轻水分亏缺对细胞大小的影响, 帮助植物减缓所受到的胁迫伤害^[97]。然而, 目前干旱胁迫下细胞周期调控如何影响作物种子发育尚缺乏全面、系统的认识。利用流式细胞技术快速准确地分析种子不同组织, 如胚或胚乳中细胞核 DNA 含量, 可了解细胞分裂活性的分布, 从而了解种子的生理状态及活力。此外, 分析不同环境下的种子核 DNA 细胞周期, 亦可为筛选及培育优良耐逆品种提供技术支持。

REFERENCES

- [1] LICHTMAN M, SPIVAK J, BOXER L, SHATTIL S, HENDERSON E. Commentary on and reprint of Coulter WH, high speed automatic blood cell counter and cell size analyzer[A]. Proceedings of the National Electronics Conference[C]. 1956.
- [2] HALLERMANN L, THOM R, GERHARTZ H. Electronic differential counting of granulocytes and lymphocytes after intravital fluorochrome staining with acridine orange[J]. Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Fur Innere Medizin, 1964, 70: 217-219.
- [3] SHAPIRO H. Cytometry and cytometers: development and growth. Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes[M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007: 1-17.
- [4] MULLANEY PF, Van DILLA MA, COULTER JR, DEAN PN. Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination[J]. The Review of Scientific Instruments, 1969, 40(8): 1029-1032.
- [5] STEINKAMP JA, FULWYLER MJ, COULTER JR, HIEBERT RD, HORNEY JL, MULLANEY PF. A new multiparameter separator for microscopic particles and biological cells[J]. The Review of Scientific Instruments, 1973, 44(9): 1301-1310.
- [6] ADAN A, ALIZADA G, KIRAZ Y, BARAN Y, NALBANT A. Flow cytometry: Basic principles and applications[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(2): 163-176.
- [7] IBRAHIM SF, Van DEN ENGH G. Flow cytometry and cell sorting[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2007, 106: 19-39.
- [8] PIYASENA ME, AUSTIN SUTHANTHIRARAJ PP, APPLGATE RW Jr, GOUMAS AM, WOODS TA, LÓPEZ GP, GRAVES SW. Multinode acoustic focusing for parallel flow cytometry[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(4): 1831-1839.
- [9] BARTENEVA NS, FASLER-KAN E, VOROBYEV IA. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems[J]. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, 60(10): 723-733.
- [10] ATKURI KR, STEVENS JC, NEUBERT H. Mass cytometry: a highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development[J]. Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals, 2015, 43(2): 227-233.
- [11] ROBINSON JP. Spectral flow cytometry-Quo vadimus? [J]. Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2019, 95(8): 823-824.
- [12] JACOBSON JW, OLIVER KG, WEISS C, KETTMAN J. Analysis of individual data from bead-based assays ("bead arrays")[J]. Cytometry Part A, 2006, 69(5): 483-491.

- 384-390.
- [13] MCKINNON KM. Flow cytometry: an overview[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2018, 120: 5.1.1-5.1.5.1.11.
- [14] LI WJ, SU HN, PU Y, CHEN J, LIU LN, LIU Q, QIN S. Phycobiliproteins: molecular structure, production, applications, and prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(2): 340-353.
- [15] JAMIESON T, BAKHSHI R, PETROVA D, POCOCK R, IMANI M, SEIFALIAN AM. Biological applications of quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4717-4732.
- [16] JOHANSSON U, MACEY M. Tandem dyes: stability in cocktails and compensation considerations[J]. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*, 2014, 86(3): 164-174.
- [17] SHANER NC, PATTERSON GH, DAVIDSON MW. Advances in fluorescent protein technology[J]. *Journal of Cell Science*, 2007, 120(Pt 24): 4247-4260.
- [18] SPIDLEN J, MOORE W, PARKS D, GOLDBERG M, BLENMAN K, CAVERNAUGH JS. ISAC Data Standards Task Force, BRINKMAN, R. ISAC Data Standards Task Force, Brinkman R. Data file standard for flow cytometry, version FCS 3.2[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(1): 100-102.
- [19] ANCHANG B, HART TDP, BENDALL SC, QIU P, BJORNSEN Z, LINDERMAN M, NOLAN GP, PLEVITIS SK. Visualization and cellular hierarchy inference of single-cell data using SPADE[J]. *Nature Protocols*, 2016, 11(7): 1264-1279.
- [20] CIESLAK MC, CASTELFRANCO AM, RONCALLI V, LENZ PH, HARTLINE DK. T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE): a tool for eco-physiological transcriptomic analysis[J]. *Marine Genomics*, 2020, 51: 100723.
- [21] LUGLI E, PINTI M, NASI M, TROIANO L, FERRARESI R, MUSSI C, SALVIOLI G, PATSEKIN V, ROBINSON JP, DURANTE C, COCCHI M, COSSARIZZA A. Subject classification obtained by cluster analysis and principal component analysis applied to flow cytometric data[J]. *Cytometry Part A*, 2007, 71(5): 334-344.
- [22] HELLER FO. DNS-bestimmung an keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit hilfe der impulszytometrie[J]. *Plant Biology*, 1973, 86(5/6/7/8/9): 437-441.
- [23] GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, AYRES NM, SHARMA DP, FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. *Science*, 1983, 220(4601): 1049-1051.
- [24] DELAAT AMM, GOHDE W, VOGELZAKG MJDC. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry[J]. *Plant Breeding*, 1987, 99(4): 303-307.
- [25] JAYAT C, RATINAUD MH. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications[J]. *Biology of the Cell*, 1993, 78(1/2): 15-25.
- [26] VRÁNA J, CÁPÁL P, ŠIMKOVÁ H, KARAFIÁTOVÁ M, ČÍŽKOVÁ J, DOLEŽEL J. Flow analysis and sorting of plant chromosomes[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2016, 78: 5.3.1-5.3.5.3.43.
- [27] GREILHUBER J, TEMSCH EM, LOUREIRO JC. Nuclear DNA content measurement[A]// *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*[M]. Wiley, 2007: 67-101.
- [28] DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(9): 2233-2244.
- [29] PELLICER J, LEITCH IJ. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1115: 279-307.
- [30] 赖彪, 吴传龙, 秦永华, 刘成明, 冯奇瑞, 叶自行, 胡桂兵, 王惠聪. 流式细胞仪测定荔枝倍性和基因组大小的细胞核提取液筛选与应用[J]. *果树学报*, 2019, 36(7): 939-946.
- LAI B, WU CL, QIN YH, LIU CM, FENG QR, YE ZX, HU GB, WANG HC. Nuclear isolation buffer optimization and the determination of ploidy level and genome size of litchi using flow cytometry[J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(7): 939-946 (in Chinese).
- [31] CHUNG J, LEE JH, ARUMUGANATHAN K, GRAEF GL, SPECHT JE. Relationships between nuclear DNA content and seed and leaf size in soybean[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96(8): 1064-1068.
- [32] 曾民环, 许德阳, 薛景石, 袁振环, 黄海, 崔晓峰. 利用流式细胞仪研究拟南芥叶发育过程中细胞周期的调控[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(9): 922-927.
- ZENG MH, XU DY, XUE JS, YUAN ZH, HUANG H, CUI XF. Study on the cell cycle regulation during leaf development in *Arabidopsis thaliana* by flow cytometry[J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(9): 922-927 (in Chinese).
- [33] 李思璐. 玉米细胞内多倍化的发生规律研究[D]. 杨

- 凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
- LI SL. Study on the emerging and development of endopolyploidy in maize[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [34] BERGOUNIOUX C, PERENNES C, BROWN SC, SARDA C, GADAL P. Relation between protoplast division, cell-cycle stage and nuclear chromatin structure[J]. *Protoplasma*, 1988, 142(2/3): 127-136.
- [35] BASHIR A, BIRADAR DP, RAYBURN AL. Determining relative abundance of specific DNA sequences in flow cytometrically sorted maize nuclei[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1995, 46(4): 451-457.
- [36] 陈林, 潘贞志, 戴毅, 宋丽. 适合流式细胞仪分析的大豆细胞核解离液的筛选与应用[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(11): 230-237.
- CHEN L, PAN ZZ, DAI Y, SONG L. Screening and application of the nuclear dissociation solutions of soybeans suitable for flow cytometry analysis[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(11): 230-237 (in Chinese).
- [37] LEE HC, LIN TY. Isolation of plant nuclei suitable for flow cytometry from recalcitrant tissue by use of a filtration column[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23(1): 53-58.
- [38] 刘凤霞, 李京一, 王志刚, 徐凌飞. 适合流式细胞仪分析的梨叶片细胞核提取缓冲液筛选[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(6): 1034-1042.
- LIU FX, LI JY, WANG ZG, XU LF. The screening of the optimum buffer to produce pear (*Pyrus*) leaf nuclear suspensions for flow cytometry analysis[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(6): 1034-1042 (in Chinese).
- [39] 张琳琳, 曹博, 白成科. 应用流式细胞术测定药用植物黄芩基因组大小[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(25): 130-135.
- ZHANG LL, CAO B, BAI CK. The detection of genome size of medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi by flow cytometry[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(25): 130-135 (in Chinese).
- [40] SUDA J, TRÁVNÍČEK P. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry: new prospects for plant research[J]. *Cytometry Part A*, 2006, 69(4): 273-280.
- [41] BAINARD JD, FAZEKAS AJ, NEWMASER SG. Methodology significantly affects genome size estimates: quantitative evidence using bryophytes[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(8): 725-732.
- [42] SLIWINSKA E. Nuclear DNA content analysis of plant seeds by flow cytometry[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2006, 35(1): 7.29.1-7.29.13.
- [43] GALBRAITH DW. Flow cytometric analysis of plant genomes[J]. *Methods in Cell Biology*, 1990, 33: 549-562.
- [44] ROBERTS AV. The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen[J]. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2007, 71(12): 1039-1044.
- [45] ROBERTS AV, GLADIS T, BRUMME H. DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels[J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28(1): 61-71.
- [46] SCHOFT VK, CHUMAK N, BINDICS J, SLUSARZ L, TWELL D, Köhler C, Tamaru H. SYBR green-activated sorting of *Arabidopsis* pollen nuclei based on different DNA/RNA content[J]. *Plant Reproduction*, 2015, 28(1): 61-72.
- [47] SANTOS MR, BISPO C, BECKER JD. Isolation of *Arabidopsis* pollen, sperm cells, and vegetative nuclei by fluorescence-activated cell sorting (FACS)[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2017, 1669: 193-210.
- [48] TAKAHIRA J, COUSIN A, NELSON MN, COWLING WA. Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: PCTOC*, 2011, 104(1): 51-59.
- [49] KUO LY, HUANG YJ, CHANG J, CHIOU WL, HUANG YM. Evaluating the spore genome sizes of ferns and lycophytes: a flow cytometry approach[J]. *The New Phytologist*, 2017, 213(4): 1974-1983.
- [50] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEŽEL J, SANTOS C. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry[J]. *Annals of Botany*, 2006, 98(3): 679-689.
- [51] LOUREIRO J, SUDA J, DOLEŽEL J, SANTOS C. Flower: a plant DNA flow cytometry database[M]. *Flow Cytometry With Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, 2007: 423-438.
- [52] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEZEL J, SANTOS C. Two new nuclear isolation buffers for

- plant DNA flow cytometry: A test with 37 species[J]. *Annals of Botany*, 2007, 100(4): 875-888.
- [53] ARUMUGANATHAN K, EARLE ED. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1991, 9(3): 229-241.
- [54] DPOOLEŽEL J, BINAROVÁ P, LCRETI S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry[J]. *Biologia Plantarum*, 1989, 31(2): 113-120.
- [55] OTTO FJ, OLDIGES H, GÖHDE W, JAIN VK. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test[J]. *Cytometry*, 1981, 2(3): 189-191.
- [56] KAPUSCINSKI J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe[J]. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1995, 70(5): 220-233.
- [57] DOLEŽEL J, BARTOŠ J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 99-110.
- [58] 金亮, 徐伟伟, 李小白, 刘建新, 田丹青, 葛亚英, 潘晓韵, 王炜勇. DNA 流式细胞术在植物遗传及育种中的应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(2): 225-234.
- JIN L, XU WW, LI XB, LIU JX, TIAN DQ, GE YY, PAN XY, WANG WY. Application of DNA flow cytometry to plant genetics and breeding[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38(2): 225-234 (in Chinese).
- [59] LOUREIRO J, KRON P, TEMSCH EM, KOUTECKÝ P, LOPES S, CASTRO M, CASTRO S. Isolation of plant nuclei for estimation of nuclear DNA content: overview and best practices[J]. *Cytometry Part A*, 2021, 99(4): 318-327.
- [60] 舒英杰, 黄丽燕, 陈明, 陶源, 王占奎, 麻浩. 基于亚细胞定位的大豆和鹰嘴豆原生质体分离体系的建立与优化[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(6): 976-985.
- SHU YJ, HUANG LY, CHEN M, TAO Y, WANG ZK, MA H. Establishment and optimization of systems for protoplasts isolation of soybean and chickpea that used in subcellular location[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(6): 976-985 (in Chinese).
- [61] GALBRAITH DW, JANDA J, LAMBERT GM. Multiparametric analysis, sorting, and transcriptional profiling of plant protoplasts and nuclei according to cell type[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2011, 699: 407-429.
- [62] NAILL MC, ROBERTS SC. Flow cytometric analysis of protein content in *Taxus* protoplasts and single cells as compared to aggregated suspension cultures[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23(8): 528-533.
- [63] BEARD KM, BOLING AWH, BARGMANN BOR. Protoplast isolation, transient transformation, and flow-cytometric analysis of reporter-gene activation in *Cannabis sativa* L.[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 164: 113360.
- [64] ZHONG YY, LI YB, QU JZ, ZHANG XD, SEYTAHMETOVNA SA, BLENNOW A, GUO DW. Structural features of five types of maize starch granule subgroups sorted by flow cytometry[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129657.
- [65] ZHANG XD, FENG JJ, WANG H, ZHU JC, ZHONG YY, LIU LS, XU ST, ZHANG RH, ZHANG XH, XUE JQ, GUO DW. Bivariate flow cytometric analysis and sorting of different types of maize starch grains[J]. *Cytometry Part A*, 2018, 93(2): 213-221.
- [66] XU XS, CROW M, RICE BR, LI F, HARRIS B, LIU L, DEMESA-AREVALO E, LU ZF, WANG LY, FOX N, WANG XF, DRENKOW J, LUO AD, CHAR SN, YANG B, SYLVESTER AW, GINGERAS TR, SCHMITZ RJ, WARE D, LIPKA AE, et al. Single-cell RNA sequencing of developing maize ears facilitates functional analysis and trait candidate gene discovery[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(4): 557-568.e6.
- [67] THIBIVILLIERS S, ANDERSON D, LIBAULT M. Isolation of plant root nuclei for single cell RNA sequencing[J]. *Current Protocols in Plant Biology*, 2020, 5(4): e20120.
- [68] CONDE D, TRIOZZI PM, BALMANT KM, DOTY AL, MIRANDA M, BOULLOSA A, SCHMIDT HW, PEREIRA WJ, DERVINIS C, KIRST M. A robust method of nuclei isolation for single-cell RNA sequencing of solid tissues from the plant genus *Populus*[J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0251149.
- [69] HEIDMANN I, DI BERARDINO M. Impedance flow cytometry as a tool to analyze microspore and pollen quality[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2017, 1669: 339-354.
- [70] DESLAURIERS C, POWELL AD, FUCHS K, PAULS KP. Flow cytometric characterization and sorting of cultured *Brassica napus* microspores[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991, 1091(2): 165-172.
- [71] DOLEZEL J, KUBALÁKOVÁ M, BARTOS J,

- MACAS J. Flow cytogenetics and plant genome mapping[J]. Chromosome Research, 2004, 12(1): 77-91.
- [72] DOLEŽEL J, KUBALÁKOVÁ M, ČÍHALÍKOVÁ J, SUCHÁNKOVÁ P, ŠIMKOVÁ H. Chromosome analysis and sorting using flow cytometry[J]. Methods Mol Biol, 2011, 701: 221-238.
- [73] VRÁNA J, ČÁPAL P, ČÍHALÍKOVÁ J, KUBALÁKOVÁ M, DOLEŽEL J. Flow sorting plant chromosomes[J]. Methods in Molecular Biology: Clifton, N J, 2016, 1429: 119-134.
- [74] LEE JH, ARUMUGANATHAN K, KAEPLER SM, PAPA CM, KAEPLER HF. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting[J]. Genome, 1996, 39(4): 697-703.
- [75] CONIA J, BERGOUNIOUX C, PERENNES C, MULLER P, BROWN S, GADAL P. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts[J]. Cytometry, 1987, 8(5): 500-508.
- [76] KOVÁŘOVÁ P, NAVRÁTILOVÁ A, MACAS J, DOLEŽEL J. Chromosome analysis and sorting in *Vicia sativa* using flow cytometry[J]. Biologia Plantarum, 2007, 51(1): 43-48.
- [77] LEE JH, ARUMUGANATHAN K. Metaphase chromosome accumulation and flow karyotypes in rice (*Oryza sativa* L.) root tip meristem cells[J]. Molecules and Cells, 1999, 9(4): 436-439.
- [78] ARUMUGANATHAN K, SLATTERY JP, TANKSLEY SD, EARLE ED. Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato[J]. TAG Theoretical and Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik, 1991, 82(1): 101-111.
- [79] WOLF PG, KAROL KG, MANDOLI DF, KUEHL J, ARUMUGANATHAN K, ELLIS MW, MISHLER BD, KELCH DG, OLMSTEAD RG, BOORE JL. The first complete chloroplast genome sequence of a lycophyte, *Huperzia lucidula* (Lycopodiaceae)[J]. Gene, 2005, 350(2): 117-128.
- [80] ROWAN BA, OLDENBURG DJ, BENDICH AJ. A high-throughput method for detection of DNA in chloroplasts using flow cytometry[J]. Plant Methods, 2007, 3: 5.
- [81] YOU MK, LIM SH, KIM MJ, JEONG YS, LEE MG, HA SH. Improvement of the fluorescence intensity during a flow cytometric analysis for rice protoplasts by localization of a green fluorescent protein into chloroplasts[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 16(1): 788-804.
- [82] DOHERTY E, PERL A. Measurement of mitochondrial mass by flow cytometry during oxidative stress[J]. Reactive Oxygen Species: Apex, N C, 2017, 4(10): 275-283.
- [83] MONTEIRO LB, DAVANZO GG, de AGUIAR CF, Moraes-Vieira PMM. Using flow cytometry for mitochondrial assays[J]. MethodsX, 2020, 7: 100938.
- [84] HU CF, SUN QP, PENG XJ, HUANG Q, WANG MF, LI SQ, ZHU YG. Flow cytometric analysis of mitochondrial populations in HL-CMS systems of rice under H₂O₂ stress[J]. Protoplasma, 2010, 241(1/2/3/4): 91-98.
- [85] D'HONDT L, HÖFTE M, Van BOCKSTAELE E, LEUS L. Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(8): 815-828.
- [86] CHITARRA LG, Van DEN BULK RW. The application of flow cytometry and fluorescent probe technology for detection and assessment of viability of plant pathogenic bacteria[J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109(5): 407-417.
- [87] BIGGS TEG, ALVAREZ-FERNANDEZ S, EVANS C, MOJICA KDA, ROZEMA PD, VENABLES HJ, POND DW, BRUSSAARD CPD. Antarctic phytoplankton community composition and size structure: importance of ice type and temperature as regulatory factors[J]. Polar Biology, 2019, 42(11): 1997-2015.
- [88] DOUCETTE GJ, MEDLIN LK, MCCARRON P, HESS P. Detection and surveillance of harmful algal bloom species and toxins[A]//Harmful Algal Blooms: A Compendium Desk Reference[M]. New York: John Wiley & Sons, 2018: 39-114.
- [89] SLIWINSKA E, LOUREIRO J, LEITCH IJ, ŠMARDÁ P, BAINARD J, BUREŠ P, CHUMOVÁ Z, HOROVÁ L, KOUTECKÝ P, LUČANOVÁ M, TRÁVNÍČEK P, GALBRAITH DW. Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry[J]. Cytometry Part A, 2022, 101(9): 749-781.
- [90] DUNKER S, BOYD M, DURKA W, ERLER S, HARPOLE WS, HENNING S, HERZSCHUH U, HORNICK T, KNIGHT T, LIPS S, MÄDER P, ŠVARA EM, MOZAROWSKI S, RAKOSY D, RÖRMERMANN

- C, SCHMITT-JANSEN M, STOOF-LEICHSENRING K, STRATMANN F, TREUDLER R, VIRTANEN R, et al. The potential of multispectral imaging flow cytometry for environmental monitoring[J]. Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2022, 101(9): 782-799.
- [91] NELSON BK, CAI X, NEBENFÜHR A. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2007, 51(6): 1126-1136.
- [92] DANGOL S, SINGH R, CHEN YF, JWA NS. Visualization of multicolored *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Oryza sativa*[J]. Molecules and Cells, 2017, 40(11): 828-836.
- [93] FORD K, MCDONALD D, MALI P. Functional genomics via CRISPR-Cas[J]. Journal of Molecular Biology, 2019, 431(1): 48-65.
- [94] YANG FY, ZHANG H, CAI S, IMTIAZ K, LI MC, WANG M, LIU YC, XUE FQ, ZHANG LF, GU F. Green fluorescent protein tagged polycistronic reporter system reveals functional editing characteristics of CRISPR-Cas[J]. The CRISPR Journal, 2022, 5(2): 254-263.
- [95] RAHMAN ML, HYODO T, HASAN MN, MIHARA Y, KARNAN S, OTA A, TSUZUKI S, HOSOKAWA Y, KONISHI H. Correction of a CD55 mutation to quantify the efficiency of targeted knock-in via flow cytometry[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(7): 6241-6248.
- [96] ZHAO BB, ZHOU MY, REN W, LI HS, ZHANG Q, HE GM, LIU Y, HE HH. The B-type cyclin CYCB₁-1 regulates embryonic development and seed size in maize[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(11): 5907.
- [97] YU H, LI JY. Short- and long-term challenges in crop breeding[J]. National Science Review, 2021, 8(2): nwab002.

(本文责编 陈宏宇)