

流式细胞术在果树中的应用及前景

闫爱玲, 王慧玲, 孙磊, 王晓玥, 张国军, 任建成, 徐海英*

北京市林业果树科学研究所, 北京市落叶果树工程技术研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京

Email: lgsyal@sina.com, *haiyingxu63@sina.com

收稿日期: 2021年8月2日; 录用日期: 2021年9月13日; 发布日期: 2021年9月22日

摘要

流式细胞术是一种具有操作简单、方便快捷、灵敏、多参数同步检测优点的细胞分析技术, 目前已经广泛地应用于细胞学、发育生物学、生理学、免疫学、分子生物学等诸多研究领域。本文简单介绍了流式细胞仪的工作原理, 并对近年来流式细胞术在果树研究中的应用、关键点及应用前景进行了综述。

关键词

流式细胞仪, 果树, 细胞参数测定, 倍性分析, 染色体分析, 综述

Application and Prospect of Flow Cytometry in Fruit

Ailing Yan, Huiling Wang, Lei Sun, Xiaoyue Wang, Guojun Zhang, Jiancheng Ren, Haiying Xu*

Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing Engineering Research Center for Deciduous Fruit Trees, Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences, Beijing

Email: lgsyal@sina.com, *haiyingxu63@sina.com

Received: Aug. 2nd, 2021; accepted: Sep. 13th, 2021; published: Sep. 22nd, 2021

Abstract

Flow cytometry is a simple, convenient, sensitive and multi-parameter simultaneous detection of cell analysis technology, which has been widely used in cytology, developmental biology, physiology, immunology, molecular biology and many other research fields. This paper briefly introduces

*通讯作者。

the principle of flow cytometry, and summarizes the application, key points and prospect of flow cytometry in fruit crop research in recent years.

Keywords

Flow Cytometry, Fruit Crop, Determination of Cell Parameters, Ploidy Analysis, Chromosome Analysis, Review

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)是流式细胞仪快速、准确地分析或分选细胞或亚细胞群体,并对细胞的基本特性,如细胞种类、大小、内部结构及 DNA、RNA、蛋白质、抗原等生物大分子进行快速检测或分类收集的一种细胞分析技术。具有速度快、分辨率高、数据的可重复性好,准确性高且样品制备简单等优点,是当代最先进的细胞分析技术。已在细胞生物学、发育生物学、细胞动力学、生理学、免疫学、分子生物学等生命科学诸多研究领域广泛应用[1]。

2. 流式细胞术的工作原理及操作程序

2.1. 基本原理

待测生物颗粒被制成单细胞悬浮液,排列成单列的由流动室的喷嘴喷出,成为细胞液柱;细胞液柱中的分散生物颗粒逐个依次通过测量区;本身具有天然荧光物(如叶绿素)或已用荧光染料染色的生物颗粒暴露于相应波长光束时,荧光物质受到激发,产生特异的荧光信号和非特异的散射信号;这些信号被转化为电信号,再进一步被测量、存储、分析,最终显示生物颗粒的某些重要的物理及生化特性,如颗粒尺寸、DNA 含量、抗原类型等[2]。

2.2. 基本程序包括

完整细胞悬液的制备、荧光染料染色、使用流式细胞仪分析染色的细胞待检物的荧光强度,并根据荧光强度对细胞待检物进行分析、分类[3]。

常用的操作过程如下:取 0.5 cm² 待测材料,加入 0.5 ml 萃取液,如果是叶片等材料先用解剖刀或薄刀片切碎并浸泡 2~3 min,加入特异性的荧光染料或缓冲液染色几分钟,使用 30 um 或者其他尺寸滤网过滤到样品管,上机检测。操作者可根据情况调整进样速度、gain、1-1 等值,再经仪器自动分析。

FCM 在植物生物学研究中的应用始于 20 世纪 70 年代初。目前,已广泛应用于植物生理学、遗传学等多个研究领域。在果树上的应用早期是 20 世纪 90 年代初在猕猴桃[4]的倍性检测和桃[5]的核 DNA 含量估测等方面的研究;现在已大量应用在果树种质资源和遗传育种研究中。

3. 流式细胞术在果树中的应用

3.1. 果树树种的基因组大小和 C 值测定

每一种植物的单倍体基因组的 DNA 总量是特异的,被称为 C 值,C 值代表该生物单倍体基因组中

DNA 碱基对的数目。C 值与植物的种群进化、物种分类与分布、遗传信息总量等有密切关系，是各种植物的一项重要特征参数。孚尔根染色法和 FCM 是目前测定基因组大小和 C 值最常用的两种方法，其中 FCM 以其简单便捷、分析速度快、灵敏度高、可靠性好等优点被广泛应用于果树研究中。柳颢[6]运用流式细胞术对澳洲坚果基因组 C 值进行了测定，并认为运用流式细胞术进行澳洲坚果基因组 C 值测定准确可靠，可为其他物种基因组 C 值测定提供参考。她[7]还改进了细胞核提取缓冲液配方，优化了芒果细胞核提取方法，首次建立了适合于芒果的流式细胞术基因组 C 值测定方法，为芒果的基因组学研究、细胞生物学研究和种质资源研究提供重要依据。之后更多的果树树种如樱桃、荔枝等利用 FCM 结合其它分子方法测定基因组大小。李祯[8]以 13 种樱属植物为研究对象，通过流式细胞术对其倍性及基因组大小进行了分析研究，首次确定了东京樱花、山樱花、樱桃等 13 种樱属植物的基因组大小。为该属起源及演化提供细胞学证据和全基因组测序提供参考。陈哲[9]通过流式细胞仪和 SCoT 分子标记分别鉴定了 14 个荔枝品种的基因组大小及亲缘关系，说明荔枝品种间亲缘关系与嫁接亲和性具有一定的相关性。为荔枝砧木的筛选及嫁接亲和力早期鉴定提供理论依据。

3.2. 流式细胞仪在果树倍性鉴定上的应用

作为倍性鉴定的传统方法，形态学鉴定法及细胞法简便易行，但准确性不高。染色体计数法准确性高，但其操作繁杂，所需材料较多，可用样品范围较小，一般选取具备强大分生能力的组织，如，根尖、茎尖等；采用流式细胞仪进行倍性鉴定，在短时间内可以检测大量样品且部位及细胞所处时期无特殊要求，操作简单，方便快捷，且数据分析结果较为准确，目前已成为现在的倍性鉴定的主流方法之一。

3.2.1. 果树种质资源评价和鉴定

FCM 目前已被广泛的运用在果树各种树种中，例如樱桃[10]、梨[11] [12] [13] [14]、香蕉[15] [16] [17]、山楂[18]、葡萄[19]、蓝莓[20]、桑树[21] [22]、猕猴桃[23] [24]、枣[25] [26]、越桔属[27]植物、荔枝[28]等树种批量的种质资源评价和鉴定。如 Postman J [11]等利用流式细胞术对 1284 份基因库的梨种质幼叶组织进行倍性鉴定，研究发现其中有一个欧洲品种是四倍体，有三个亚洲品种是三倍体。这项研究明确了梨种质的倍性，不仅可以有效的帮助种植者避免使用三倍体不育花粉，提高了育种的效率，而且还有助于该种质资源遗传图谱的建立以及今后的开发利用。张靖国[12]等采用流式细胞术较为系统全面地对国家果树种质武昌砂梨圃中收集保存的 466 份砂梨种质进行倍性鉴定，明晰了中国砂梨基于染色体水平的多样性，为砂梨多倍体育种和起源进化等研究提供依据。闫佼[15]利用流式细胞术完成了国家香蕉种质资源圃内 183 份香蕉种质的倍性分析。

3.2.2. 果树多倍体育种

在现代育种中，体外诱导多倍体是研究的热点。FCM 还经常被用于鉴定果树染色体倍性异常及染色体加倍。李斌等[29]、陈绪中[30]、马爱红[31]等利用流式细胞仪分别检测了诱变的苹果、鄂柿和葡萄植株细胞核 DNA 含量，在短时间内检测了成千上万个细胞，且检测速度快，结果可靠全面，并具有一定的代表性。张敏[32]从 50 个果实扇形嵌合体再生的 600 棵苗中，检测到纽荷尔脐橙四倍体 3 棵，“蔡维林娜”脐橙四倍体 4 棵和“纽荷尔”脐橙混倍体植株 2 棵。Roux 等[33]使用 DNA 流式细胞术在三倍体香蕉中快速地鉴定出非整倍体，且通过染色体计数证实了该鉴定结果。FCM 在非整倍体、多倍体、正常或非正常细胞类型研究中的应用，极大地推动了现代果树育种的发展[24] [26] [34]。

3.2.3. 果树杂交后代、育种及新种质的鉴定

FCM 可以快速准确地鉴定杂交后代和新种质、筛选变异材料，测定杂种的基因组大小；并在分子水

平筛选特定优良基因,使导入优良基因,改造物种成为了可能。在提高果树品种的品质、产量和抗逆性、培育优良的品种等方面都有着重要的研究意义。Hirsch [35]等对猕猴桃属中的几个品种的杂交后代进行鉴定,快速而又准确地鉴定出了超二倍体、三倍体、四倍体和六倍体猕猴桃。吴雅琴[36]利用流式细胞术对110个葡萄杂交后代进行了倍性鉴定,并从中筛选出了3棵三倍体植株。Roux [33]等采用流式细胞仪测定香蕉茎尖 γ 辐射材料,检出了非整倍体,为辐射诱变育种的检测提供了快速又准确的方法。闫佼[15]利用流式细胞术完成了183份栽培香蕉和野生香蕉以及杂交后代的倍性分析,有69个二倍体,91个三倍体,23个四倍体,为品种选育工作提供分子鉴定依据。胡磊[37]利用流式细胞技术对属间杂交群体的基因组大小测量,发现远缘杂种的基因组大小差异很大,低于低亲和高于高亲的远缘杂种所占比例很大,超倍体和亚倍体都为非整倍体;对龙眼荔枝遗传育种具有重大意义。Lysák MA [38]通过多倍体基因组分析发现二倍体香蕉中基因可分为AA和为BB。A、B基因组大小不同;通过比较分析二倍体与三倍体基因组大小,能确定三倍体的基因组组成,并能有助于确定其二倍体祖先;因此,通过分析异源多倍体基因组的组成,可以有助于阐明异源多倍体植物的进化关系。

3.3. 分析细胞周期

FCM分析细胞周期是将细胞分离成单个细胞后,用荧光标记细胞的DNA或细胞周期特异蛋白,经标记后的细胞随流体一起通过流式细胞仪的荧光检测器,根据细胞在不同时期DNA或细胞周期特异蛋白含量的变化区分细胞所在的周期。是目前应用最广的细胞周期分析实验技术。Pozarowski [39]等通过流式细胞仪同时检测DNA含量和4种细胞周期蛋白,用于精确区分G₀期、G₁期与M期的细胞。张俊娥[40]以“暗柳橙”、“长沙橘”、“澳洲指橘”、“纳维来特脐橙”等几种培养多年的柑橘愈伤组织为试材,使用流式细胞仪分析其特定时间段的细胞周期,进而找到柑橘愈伤组织理化诱变的最佳时期即分裂最旺盛时期;为研究柑橘愈伤组织理化诱变提供依据。随着人工智能技术的快速发展,将它与FCM相结合,细胞周期分析技术也将获得新的发展动力与空间。

4. 流式细胞术在果树应用中的几个关键节点

FCM在测定果树时会遇到许多问题,如适宜的实验材料、染色液、裂解液、定参样本的选取等;而且不同果树树种的特殊性如粘液分泌、褐化等现象,都会影响工作的顺利开展。吴志娟[20]在分析蓝莓种质的染色体倍性时发现试验材料、染色液和裂解液是影响流式细胞仪结果的主要因素,不同部位细胞DNA含量不稳定且细胞内含有大量酚类、酮类、色素等物质会干扰流式细胞仪鉴定结果。Kulithinee [41]等在流式细胞仪对猕猴桃做倍性鉴定时加入了体积浓度为1%的PVP,解决了猕猴桃叶片含有大量的粘性物质的问题,准确地测出了当地猕猴桃多个品种的倍性。

4.1. 适宜的实验材料的选择

一般取材需要考虑样品易获性、细胞核型的稳定性和保存性等一系列问题[42]。果树样品最好选取幼嫩的组织如叶片[19] [25] [28]、根或茎的分生组织等,或幼嫩的花穗和果皮[43]等,但也有使用愈伤组织的细胞的[40]。王晓庆[44]以梨树叶片为试材,系统优化了FCM各个关键实验节点;结果表明:实验材料选取当年春季新梢第3~5片梨树嫩叶,尤其是大棚新梢嫩叶最好;叶片前处理时用蒸馏水、去离子水依次洗净叶片表面后,再用去离子水浸泡10 min;使用WPB解离液对梨叶片细胞核进行提取后,用500 mm滤膜过滤2次,离心1次后用流式细胞仪进行检测可得到理想的实验结果。张俊娥[45]使用倍性分析仪,对48种培养多年不同基因型的柑橘愈伤组织的细胞DNA含量进行了测定。结果发现有93.8%的基因型的愈伤组织的细胞均出现了DNA含量加倍的细胞。

4.2. 适宜缓冲液筛选与使用

流式细胞仪之所以可以准确检测细胞的关键之一是用适宜的细胞解离缓冲液制备拥有单个的、完整的细胞悬浮液。目前虽然有多种解离液，但因为植物细胞不仅具有细胞壁，还含有大量次生代谢物、且不同植物基因型不同，导致在组织和结构成分、含量等方面均有差异，因此降解各种成分所需的化学物质含量也不同；当选取的解离缓冲液不能有效地降解或消除细胞内的多余成分时，有可能会影响细胞核 DNA 含量的准确分析。许多研究者[8] [37] [46]会事先通过实验筛选适宜该研究物的解离液。胡磊[37]比较了 Otto、WPB 和 LB01 3 种细胞核提取液对属间杂种的提取效果，发现 LB01 提取的属间杂种细胞核稳定、杂质较少、分辨率高，并通过流式细胞术测定属间杂种的基因组大小，对龙眼荔枝遗传育种具有重大意义。李彩琴[43]在检测荔枝幼果时，比较 5 种常用细胞核分离缓冲液对制备样品 DNA 分辨率效果的影响，发现在 Otto 缓冲液的基础上进行适当增加还原剂种类和含量，把 RNaseA 直接加入缓冲液，降低离心力，可获得最佳的提取效果，分辨率高，细胞 G1/G0 峰产生的变异系数低。目前常用的 9 种解离缓冲液(见下表 1 [42] [43])。

Table 1. Most popular isolation buffer and compositions

表 1. 常用解离液及组分

序号 No.	解离液 Isolation buffer	组分 Component
1	Li	100 mmol/L citric acid; 0.2% Triton X-100; pH 2.0~3.0
2	OTTO1	OTTOA:100 mmol/L citric acid; 0.5% Tween 20; 20 mmol/L β-mercaptoethanol; pH 2~3 OTTOB: 400 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O; 20 mmol/L β-mercaptoethanol; pH 8~9
3	Pfossier	200 mmol/L Tris; 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O; 0.5% Triton X-100; 20 mmol/L β-mercaptoethanol; pH 7.5
4	Galbraith	45 mmol/L MgCl ₂ , 30 mmol/L Sodium citrate, 20 mmol/L MOPS, 0.1% (V/V) Triton X-100, pH 7.0
5	Hepes	10 mmol/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L Hepes (pH 8), 6.5 mmol/L DTT, 0.25% Triton X-100
6	WPB	0.2 mmol/L Tris·HCl, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mmol/L Na ₂ EDTA·2H ₂ O, 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Na ₂ S ₂ O ₅ , 1% PVP-10, 1% Triton X-100, pH 7.5
7	LBO1	15 mmol/L Tris, 2 mmol/L Na ₂ EDTA, 0.5 mmol/L Spermine·4HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.1% (V/V) Triton X-100, 15 mmol/L β-巯基乙醇, pH8.0
8	MGB	45 mmol/L MgCl ₂ , 20 mmol/L MOPS, 30 mmol/L Sodium citrate, 1% (W/V) PVP-40, 0.2% (V/V) Triton X-100, 10 mmol/L Na ₂ EDTA, 20 mmol/L β-巯基乙醇, pH 7.0
9	GPB	0.5 mmol/L Spermine·4HCl, 30 mmol/L Sodium citrate, 20 mmol/L MOPS, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.5% (V/V) Triton X-100, pH 7.0

4.3. 适宜的标准品的选取

在使用流式细胞仪进行检测前需找到合适的标准品做为内标或外标。要求标准品的倍性本身是已知的且需要接近被测植物的基因组大小[47]；也可以与待测样同种植物或是其亲本；因为未知待测样本是根据标准品比较后得出结果的。目前许多植物细胞核 DNA 含量的研究中仍采用鸡血红细胞用作植物材料的内参标准品，鸡血红细胞来源多，测定结果稳定[42]。李斌[29]等利用流式细胞仪鉴定苹果倍性研究时，就是以已知细胞核 DNA 含量的鸡血红细胞核作测量标准的。但也有许多使用别的植物做内标的：赖彪等[28]在测定荔枝基因组大小时，检测比较了六种裂解液；并以番茄为内标植物测定了 14 个荔枝品种的基因组大小。李春兰等[14]，将三种已知不同倍性的新疆梨(二倍体“库尔科梨”、三倍体“黑酸梨”、四倍体“沙梨 01 号”)作为内参，对新种质“棉梨”进行了倍性测定。

5. FCM 在果树中的应用前景

5.1. 染色体分析

FCM 在果树染色体分析方面的应用主要包括：鉴定性染色体和染色体分选。性染色体的鉴定是通过流式细胞仪检测核 DNA 的含量，在图谱中两种不同性别的植株会出现互不重合的 DNA 峰，进而确定植株的性别。使用 FCM 区分植株性别在果树育种方面具有重要的意义，特别是对于异花授粉或者雌雄异体的树种，以及具有新颖的基因型的果树树种。目前，这方面的应用比较少，但是已经有成功的例子，如通过使用流式细胞仪，研究者已经得到芦笋的雄性植株和二倍体的超级雄性植株[48]。

染色体分选技术在果树方面研究很少。但随着高质量的植物染色体悬浮液的成功制备，果树染色体分选技术的研究将获得快速发展[49]。而且现代高端流式细胞分选仪每秒可以实时检测定量分析、分选数万个细胞，仪器可选配 3~9 根激光管，最多可检测 18 个荧光参数，从而满足日益多元化的前沿科学研究的需要[50]。流式细胞仪的染色体分选技术可以分选出目标的染色体，用来构建染色体的 BAC 文库[51]，将分选出的染色体作为模板来定位基因或遗传标记在染色体中的位置，从而构建分选染色体的物理图谱和遗传图谱。

利用染色体分选技术与测序技术结合还可以开发大量的染色体特异性标记[52]：Shatalina 等[53]利用分选出的 2 个六倍体冬小麦 Arina 和 Forno 的 3B 染色体测序开发出 70 多个 SNPs 标记。染色体分选技术的出现使得研究人员可以将果树复杂的基因组拆分为染色体组，通过分选单条染色体或染色体臂进行深入研究，可解决多倍体植物测序和组装困难的问题[52]。Vrána 等[54]通过流式分选的方法得到了高质量的单个染色体，该方法可同时纯化大量染色体，为后续试验，如基因组测序等提供方便。Akpinar 等[55]报道了利用流式分选染色体技术分选出野生二粒小麦的 5B 染色体，然后进行测序，通过研究蛋白编码基因、重复元件和假定的 micro RNA 和 t RNA 编码序列，揭示其基因组的结构、组织和功能，助力小麦的遗传改良。

5.2. FCM 可用于果树生理学研究中

FCM 可用于原生质体分析：可以用来测定原生质体大小、细胞壁生物合成、原生质体与微生物的相互作用、原生质体融合产物分选、被膜抗原的表达等[56]。刘继红[57]采用流式细胞术，对酸橙(*Citrus aurantium* L.)叶肉原生质体和甜橙(*C. sinensis* cv. Shamouti)胚性愈伤组织原生质体电融合后再生的体细胞杂种进行分析。结果表明，所有的体细胞杂种植株荧光强度是二倍体对照的两倍，这说明两者的原生质体已经融合。随着流式细胞仪性能的不断改进，果树样品测定方法与技术的快速发展，FCM 可以被广泛应用于检测原生质的各项指标：如检测叶绿素的含量、DNA 含量和原生质体的死活、质膜流动性研究及细胞凋亡，甚至于可以定量检测次生代谢生物碱和花青素[58]。

随着新型细胞检测和分选技术、新染料和探针、新数据分析算法、新型图像采集、图像数据分析算法等各个方面的新技术的大量涌现；大数据分析技术和人工智能技术开始在流式细胞术中应用[52]；流式技术已在科研、临床检测获得广泛应用，进入快速增长期。流式在果树的染色体分析、原生质体分析及 DNA 标记的开发利用及基因组测序和基因组学等方面的研究会取得实质性的进展，有望在不远的将来成为这些方面研究的必备技术。

基金项目

国家现代农业产业技术体系资助(CARS-29-yc-4)。

参考文献

- [1] Nunez, R. (2001) Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and Applications. Horizon Scientific Press, London, 1-3.

- [2] 金亮, 徐伟伟, 李小白, 等. 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.
- [3] Dolezel, J. and Bartos, J. (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, **95**, 99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- [4] Friderique, O., Legave, J.M., et al. (1994) Use of Flow Cytometry for Rapid Determination of Ploidy Level in the Genus *Actinidia*. *Scientia Horticulturae*, **57**, 303-313. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(94)90113-9)
- [5] Vance, B.W., Estager, A., Genes, S., et al. (1994) Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization. *Horticultural Science*, **119**, 1312-1316. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.6.1312>
- [6] 柳颀, 孔广红, 倪书邦, 等. 基于流式细胞术的澳洲坚果基因组 C 值测定[J]. 中国农学通报, 2013, 29(34): 96-101.
- [7] 柳颀, 孔广红, 李开雄, 等. 基于流式细胞术的芒果基因组 C 值测定[J]. 热带作物学报, 2015, 36(9): 1626-1630.
- [8] 李祯. 樱属部分种倍性及基因组大小研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2015: 1-50.
- [9] 陈哲, 胡福初, 范鸿雁, 等. 荔枝品种间亲缘关系与嫁接亲和相关性分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(24): 8111-8120.
- [10] 吴雅琴, 周锡明, 陈龙, 等. 利用流式细胞术鉴定甜樱桃砧木细胞核 DNA 含量和染色体倍性[J]. 果树学报, 2014, 31(增刊): 48-52.
- [11] Postman, J., Bassil, N. and Bell, R. (2015) Ploidy of USDA Word Pear Germplasm Collection Determined by Flow Cytometry. *Acta Horticulturae*, No. 1094, 75-77. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1094.6>
- [12] 张靖国, 范净, 陈启亮, 等. 中国砂梨多倍体种质资源发掘及其花粉育性分析[J]. 果树学报, 2016, 33(S1): 71-74.
- [13] 田路明, 齐丹, 曹玉芬, 等. 利用流式细胞仪鉴定梨种质资源染色体倍性[J]. 中国果树, 2018(3): 29-32.
- [14] 李春兰, 牛莹莹, 吴玉霞, 等. “棉梨”染色体倍性鉴定[J]. 山东农业科学, 2020, 52(5): 16-20.
- [15] 闫佼. 香蕉种质资源基因组类型的分子标记及倍鉴定[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 江西农业大学, 2016: 1-65.
- [16] 吕顺, 任毅, 王芳, 等. 利用流式细胞术快速鉴定 169 份香蕉种质资源的染色体倍性[J]. 果树学报, 2018, 35(6): 668-684.
- [17] 郭计华, 李绍鹏, 周丽, 等. 基于 FCM 测定的香蕉种质倍性分析[J]. 果树学报, 2017, 34(1): 12-18.
- [18] 崔金鑫, 李月梅, 张蕊婧, 等. 利用流式细胞仪鉴定山楂种质资源的倍性[J]. 北方园艺, 2016(1): 84-86.
- [19] 裴丹, 葛孟清, 董天宇, 等. 208 个葡萄品种染色体倍性的流式细胞分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019(5): 21-28.
- [20] 吴志娟. 蓝莓不同种质资源评价的研究[D]: [硕士学位论文]. 金华: 浙江师范大学, 2018: 1-82.
- [21] 李晓双, 王青, 孟钰程, 等. 野生长穗桑种质资源云 7 的多倍体诱导和鉴定[J]. 蚕业科学, 2017, 43(3): 369-373.
- [22] 黎月娟, 邱长玉, 林强, 等. 应用流式细胞技术鉴定桑树倍性的样品选择[J]. 蚕业科学, 2019, 45(1): 9-16.
- [23] 施春晖, 徐兰兰, 王晓庆, 等. 流式细胞仪鉴定猕猴桃倍性技术研究[J]. 植物研究, 2014, 34(6): 845-849.
- [24] 朱道圩, 杨宵, 鄧玉宝, 等. 用流式细胞仪鉴定中华猕猴桃的多倍体[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 905-908.
- [25] 王利虎, 吕晔, 罗智, 等. 流式细胞术估测枣染色体倍性和基因组大小方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 511-520.
- [26] 罗智, 郑兴娟, 王利虎. 冬枣的五个自然变异材料评价[J]. 北方园艺, 2019(1): 74-78.
- [27] 闫东玲, 赵丽娜, 王贺新, 等. 利用流式细胞术鉴定东北地区主要越桔属植物染色体倍性[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1257-1263.
- [28] 赖彪, 吴传龙, 秦永华, 等. 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.
- [29] 李斌, 石荫坪, 束怀瑞, 等. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究[J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 499-504.
- [30] 陈绪中, 罗正荣. 鄂柿 1 号离体叶片秋水仙素诱导和再生植株倍性鉴定[J]. 果树学报, 2005, 22(5): 554-556.
- [31] 马爱红, 范培格, 孙建设, 等. 四倍体葡萄诱导技术的研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1645-1651.
- [32] 张敏. 柑橘果实扇形嵌合体的分离及两组嫁接嵌合体的遗传研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 1-107.
- [33] Roux, N., Toloza, A., Radecki, Z., et al. (2003) Rapid Detection of Aneuploidy in *Musa* Using Flow Cytometry. *Plant Cell Reports*, **21**, 483-490. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0512-6>

- [34] 韩莎, 李四军, 许晓东. 利用流式细胞仪快速鉴定桑树细胞的染色体倍数性[J]. 蚕业科学, 2013, 39(6): 1042-1048.
- [35] Hirsch, A.M., Testolin, R., Brown, S., *et al.* (2001) Embryo Rescue from Interspecific Crosses in the Genus *Actinidia* (Kiwifruit). *Plant Cell Reports*, **20**, 508-516. <https://doi.org/10.1007/s002990100340>
- [36] 吴雅琴, 赵艳华, 程和禾, 等. 流式细胞术检测葡萄倍性的研究[C]//中国园艺学会第七届青年学术讨论会. 泰安: 中国农业出版社, 2006: 182-185.
- [37] 胡磊. 龙眼荔枝有性杂交、杂种流式细胞术鉴定及优株选育[D]: [硕士学位论文]. 广州: 华南农业大学, 2016: 1-33.
- [38] Lysuk, M.A., Doleze, L.M., Horry, J.P., *et al.* (1999) Flow Cytometric Analysis of Nuclear DNA Content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 1344-1350. <https://doi.org/10.1007/s001220051201>
- [39] Pozarowski, P. and Darzynkiewicz, Z. (2004) Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, **281**, 301-311.
- [40] 张俊娥, 邓秀新. 采用流式细胞仪分析柑橘愈伤组织的细胞周期[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 741-743.
- [41] Kulithinee, P., Ken, J.B., Takejiro, T., *et al.* (2005) Flow Cytometric Assessment of Ploidy in Native Resources of *Actinidia* in Japan. *American Pomological Society*, **59**, 44-49.
- [42] 汪艳, 肖媛, 刘伟, 等. 流式细胞仪检测高等植物细胞核 DNA 含量的方法[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 126-131.
- [43] 李彩琴, 王泽槐, 徐咏珊, 等. 流式细胞术细胞核分离缓冲液的改良及大、小果型荔枝幼果和果皮细胞分裂活性比较[J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1781-1790.
- [44] 王晓庆, 骆军, 施春晖, 等. 一种利用流式细胞术鉴定梨倍性的方法[J]. 中国农学通报, 2014, 30(31): 46-51.
- [45] 张俊娥, 刘继红, 邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J]. 遗传学报, 2003, 30(2): 169-174.
- [46] 刘凤霞, 李京一, 王志刚, 等. 适合流式细胞仪分析的梨叶片细胞核提取缓冲液筛选[J/OL]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1034-1042.
- [47] 齐嫣然, 王英平, 郝小丽, 等. DNA 流式细胞术及其在植物基因组大小与倍性检测中的研究与应用[J/OL]. 分子植物育种, 2020: 11-16. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20201116.1554.008.html>, 2021-05-10.
- [48] Delaitre, C., Ochatt, S.J. and Deleury, E. (2001) Electroporation Modulates the Embryogenic Responses of *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.) Microspores. *Protoplasma*, **216**, 39-46. <https://doi.org/10.1007/BF02680129>
- [49] Dolezel, J., Cihalikova, J. and Lucretti, S. (1992) A High-Yield Procedure for Isolation of Metaphase Chromosomes from Root Tips of *Vicia faba* L. *Planta*, **188**, 93-98. <https://doi.org/10.1007/BF00198944>
- [50] 石亚萍, 种银保, 王晴. 高端流式细胞分选仪的选型评价[J]. 医疗卫生装备, 2010, 31(10): 122-124.
- [51] Biradar, S.S., Nie, X.J., Feng, K.W., *et al.* (2014) Replication of High Molecular Weight gDNA and Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Libraries in Plants. *Methods in Molecular Biology*, **1099**, 41-63. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-715-0_6
- [52] 钱旺, 王秋松, 杨善, 等. 染色体分选技术在植物学研究中的应用[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(2): 221-228.
- [53] Shatalina, M., Wicker, T., Buchmann, J.P., *et al.* (2013) Genotype-Specific SNP Map Based on Whole Chromosome 3B Sequence Information from Wheat Cultivars Arina and Forno. *Plant Biotechnology Journal*, **11**, 23-32. <https://doi.org/10.1111/pbi.12003>
- [54] Vrana, J., Jimkoyu, H., Kubalukoyu, M., *et al.* (2012) Flow Cytometric Chromosome Sorting in Plants: The Next Generation. *Methods*, **57**, 331-337. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.006>
- [55] Akpınar, B.A., Yuca, M., Lucas, S., *et al.* (2015) Molecular Organization and Comparative Analysis of Chromosome 5B of the Wild Wheat Ancestor *Triticum dicoccoides*. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 10763. <https://doi.org/10.1038/srep10763>
- [56] 焦旭雯, 赵树进. 流式细胞术在高等植物研究中的应用[J]. 热带亚热带植物学报, 2006, 14(4): 354-358.
- [57] Liu, J.H. (2004) Characterization of Nuclear and Cytoplasmic Compositions of Somatic Hybrid Plants between Sweet Orange and Sour Orange. *Acta Botanica Sinica*, **46**, 1206-1211.
- [58] 姚丽萍, 高银祥, 祖元刚. 流式细胞术在植物学研究中的应用[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(9): 55-57.