

# 流式细胞术在植物生物学研究中的应用进展

韩 鸿 鹏<sup>1,2</sup>, 宋 纯 鹏<sup>1</sup>

(1. 河南大学 生命科学院, 棉花生物学国家重点实验室, 植物逆境生物学重点实验室, 河南 开封 475004;

2. 河南教育学院 生命科学系, 河南 郑州 450046)

**摘 要:**流式细胞术是一种对细胞基本特性进行快速检测并可根据细胞特性对其进行分类收集的综合性技术。它可以同时定量检测多种物理、生物学参数。目前,该技术已在医药、环保、农业生产、科研等领域广泛应用。作为一种新出现的技术,体内流式细胞术在植物营养、光合产物和代谢产物以及纳米粒子等在植物脉管系统中运输等方面应用前景广阔。在对流式细胞术原理及特点进行介绍的同时,文章对其在植物生物学研究领域及体内流式细胞术的应用进展加以综述。

**关键词:**流式细胞术;染色体倍性分析;原生质体分选;体内流式细胞术

**中图分类号:**S 184 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0178-04

流式细胞术(Flow cytometry, FCM)是一种对细胞的理化等基本特性,如细胞种类、大小、内部结构及核酸、蛋白质等生物大分子进行快速检测并可分类收集的综合技术。该技术产生于 20 世纪 70 年代,是一种集激光、光电测量、计算机等技术及流体力学、细胞免疫荧光化学等于一体的细胞分析技术。FCM 能够根据相应参数,快速、准确地分析或分选细胞群体或亚细胞群体。FCM 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<sup>[1]</sup>。FCM 在植物生物学研究中的应用始于 20 世纪 70 年代初。目前,FCM 已广泛应用于植物生理学、植物遗传学等多个研究领域。

## 1 流式细胞术的原理及特点

FCM 是伴随着流式细胞仪的改进而逐步完善起来的细胞分析技术。20 世纪 70 年代,美国 Becton-Dickinson (BD) 公司最早生产商用流式细胞仪,但价格昂贵,体积大,维持费用高,而且需要专业人员操作。20 世纪 80 年代中期,该公司推出便携式流式细胞仪,随后,流式细胞仪得到了迅速发展,Beckman-Coulter 公司和 Partec 公司(德)等也相继推出了具有体积小,造价低,易操作等优点的产品。目前,这些新型产品已在许多大型实验室和

科研机构广泛应用<sup>[2]</sup>。目前,Partec 公司生产的流式细胞仪在植物生物学研究领域应用最多<sup>[3]</sup>。流式细胞仪由以下 5 部分组成:流动室液流驱动系统,激光光源及光束形成系统,光学系统,信号检测与存储、显示、分析系统和细胞分选系统。首先,要将待测样品制成单细胞悬液,并使用特异性荧光染料对上述细胞进行染色(若待测样品本身具有自发荧光,则可省略此步)。然后将上述细胞悬液转移至样品管中,样品在液流驱动系统的压力下进入流动室,鞘液充满流动室,鞘液产生的压力使得细胞悬液排成单列细胞由喷嘴喷出,在通过检测区时,细胞受到强烈的激光照射而发生散射和折射,产生散射光和荧光 2 种信号,二者分别为光电二极管和光电倍增管(PMT)所接收。散射光含有 2 种:前向散射光(Forward scatter, FSC)和侧向散射光(Side scatter, SSC)。FSC 反映样品细胞的体积大小,SSC 则主要反映样品细胞的细胞质、细胞膜、核被膜的折射及胞内成分的性状等。荧光信号通过通透性滤片后,由光电倍增管吸收,随后转变为电信号,再经数/模转换器转换为可被计算机识别的数学信号,以图表或图形形式显示出来。

流式细胞术有以下特点:①速度快。1 s 内即可对数万个细胞进行检测;②参数多。可同时测定同一个细胞的理化特性等的多个参数;③综合性。它集合了激光、计算机、图像等多项技术以及流体力学、细胞化学等多个领域的知识和成果;④用途广。既能分析细胞,又能分选细胞<sup>[4]</sup>。

## 2 流式细胞术在植物生物学研究领域的应用

从 1974 年世界上首台商用流式细胞仪在 BD

**第一作者简介:**韩鸿鹏(1980-),男,河南漯河人,博士研究生,副教授,现主要从事植物逆境生物学及分子生物学等研究工作。E-mail:hanhongpeng@163.com.

**基金项目:**河南省科技计划资助项目(122102110189,142102110123);河南省 973 重大研究计划资助项目(2012CB114300)。

**收稿日期:**2015-05-18

(Becton Dickinson)公司诞生以来,FCM在生命科学(尤其是动物生物学)、医学等相关领域的应用便拉开了序幕。尽管FCM在植物生物学领域的应用稍有滞后,主要是由于植物细胞本身的一些特性,如细胞粘连、细胞壁等。然而,目前FCM在植物育种、生理、发育、进化、分类等方面的应用均以取得丰硕研究成果<sup>[5-6]</sup>。

在植物生物学研究领域,FCM最早用于浮游植物细胞的分析<sup>[7]</sup>。这主要是由于大多数微型浮游植物细胞本身就是单细胞生物,无需特殊处理,其细胞直径小于20  $\mu\text{m}$ ,小于激光光斑大小,同时也不会造成进样口的堵塞。在高等植物研究中,FCM应用较晚,主要是因为高等植物细胞的细胞壁影响单细胞悬液的制备。目前,这一问题的解决方案主要是酶解法。该方法是在保持渗透压恒定条件下,用相应的酶(如纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶等)降解细胞壁,从而制备出原生质体。然而,相对于动物细胞质膜,植物细胞质膜更加脆弱,制备难度较大。DOLEZEL等<sup>[8]</sup>研究发现,相对植物其它部位而言,幼嫩叶片或根尖分生组织更易制备单细胞悬液。

## 2.1 植物细胞核及染色体倍性分析

植物细胞核及染色体倍性分析的传统方法是核型分析。材料要求需是处于分裂中期的细胞方能够统计分析,通常选择根尖组织,费时费力,而且技术要求高,需要丰富的试验经验。另外,分裂中期细胞的获取难度也很大。FCM的应用在很大程度上简化了植物染色体倍性分析方法,由于细胞核内DNA的含量与细胞染色体倍性密切相关,因此,无需分选分裂活跃期细胞,即可实现染色体倍性分析<sup>[9]</sup>。

由于试验方法方便、快捷且准确率高,FCM在植物细胞核分析领域的应用范围相当广泛,主要涉及核酸、蛋白质等生物大分子定量分析、染色质结构变化<sup>[10-14]</sup>、细胞周期<sup>[15-16]</sup>、染色体倍性分析和基因稳定性检测中广泛应用。de LAAT等<sup>[17]</sup>首次用FCM识别和分选植物染色体。目前,FCM已在许多植物中被用作染色体分析及分选的工具,例如玉米<sup>[18]</sup>、小麦<sup>[19]</sup>、大麦<sup>[20]</sup>、黑麦<sup>[21]</sup>等。MACAS等<sup>[22]</sup>利用FCM对豌豆(*Vicia faba* L.)进行核型分选,并结合PCR技术对其USP(Unknown seed protein genes)等数个基因进行物理定位。LOUREIRO等<sup>[23]</sup>利用FCM对豌豆(*Pisum sativum* ‘Ctirad’)等37个物种的核DNA含量进行了分析,分别采用了通用缓冲液(General purpose buffer,GPB)和木本植物缓冲液(Woody plant buffer,WPB)来悬浮细胞核,结果表明,尽管GPB在少数物种中不甚理想,但总的来看,在进行FCM分析过程中,2种缓冲液均适合用来悬浮各种植物细胞核。在利用FCM进行细胞核DNA含量分析时,需要有一个已知物种作为参照,即所谓基准标准(primary standard),为了获得最好的基准标准(best primary standards),PRACA-FONTES等<sup>[24]</sup>重新分析了包括拟南芥在内的8个公认的标准,结果表明,8个公认的标准中,萝卜(*Raphanus sativus*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)最不适合,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)和豌豆(*Pisum sativum*)则是最适合的基准标准。另外,FCM还可用于定染色体的分选,以建立染色体DNA文库,在植物中,例如番茄<sup>[25]</sup>、蚕豆<sup>[26]</sup>、小麦<sup>[18]</sup>等均有相关研究的报道。

FCM在植物染色体加倍或染色体倍性异常方面应用的报道也很多。主要包括FCM进行DNA含量和染色体倍性分析等在许多植物中的应用,例如:香蕉<sup>[27]</sup>、黑麦<sup>[28]</sup>、芦笋<sup>[29]</sup>、蛇麻草<sup>[30]</sup>、苜蓿<sup>[31]</sup>等,在此基础上,SUDA等<sup>[32]</sup>认为若将流式细胞术与传统细胞核技术结合起来进行细胞倍性分析,结果将会更加准确可信。显然,在进行上述研究时,需对大量的试验材料进行处理和分析,这些非传统染色体分析技术方法所能及。特别值得一提的是:体外诱导多倍体是现代育种中的研究热点,而FCM在多倍体、非整倍体、正常或异常细胞研究领域的应用,很大程度上加速了育苗的商业进程。此外,在植物种质资源鉴定等相关研究中,FCM同样有着得天独厚的优势。KATHLEEN等<sup>[33]</sup>以豌豆根尖为材料,利用FCM与染色体压片相结合的方法,分析了45个长柔毛野豌豆标本的染色体倍性差异,并从中鉴定出2个褐毛野豌豆。由于FCM具有检测速度快、周期短、无污染、信息量大、数据准确可靠等特点,现已广泛应用于细胞动力学及细胞周期等研究领域。

2.2 植物原生质体分析

如前所述,植物细胞的细胞壁影响FCM的应用,流式细胞仪只能用于植物细胞原生质体的结构和功能的研究。而在原生质体方面,主要是利用FCM对原生质体进行分析,进而研究植物细胞结构和功能,研究原生质体及其融合产物检测和分选、原生质体与微生物的互作、细胞膜表面抗原的表达<sup>[34]</sup>、植物激素等在原生质体表面结合位点的分布<sup>[35]</sup>以及作物改良或育种等<sup>[36-37]</sup>。例如,应用FCM分选活的原生质体,进而再生出新的植株,其中最值得关注的就是分选出由不同来源的原生质体融合而形成的异核体<sup>[38]</sup>。LIU等<sup>[39]</sup>利用FCM对酸橙(*Citrus aurantium* L.)叶肉细胞原生质体和甜橙(*C. sinensis* cv. Shamouti)胚性愈伤组织细胞原生质体融合后的产物进行了分析,结果显示,杂合体植株细胞来自二者原生质体的融合。

## 3 体内流式细胞术分析的研究进展

FCM作为一种强有力的分析工具已经应用多年,然而,由于FCM分析的前提是必须将细胞从机体或组织中分离出来并制备成单细胞悬液,分离过程本身以及

细胞离体状态会导致细胞许多特性发生改变,进而不能反映体内天然状态。而今,随着体内 FCM(*in vivo* FCM)的出现<sup>[40-42]</sup>,这些问题已经得到解决。在动物生物学研究中,*in vivo* FCM 可以对血液或淋巴中的细胞进行检测或成像<sup>[42]</sup>,主要在医学领域广泛应用<sup>[43-49]</sup>。在植物生物学研究中应用较少,与动物不同,植物中 *in vivo* FCM 的应用主要基于其脉管系统<sup>[41]</sup>。NEDOSEKIN 等<sup>[41]</sup>利用 *in vivo* FCM 对番茄进行了相关研究,结果表明,*in vivo* FCM 在植物营养、光合产物和代谢产物,以及纳米粒子等在植物脉管系统中的运输等研究领域具有很大的价值。

#### 4 结语

FCM 在生命科学、医学等领域应用日新月异。目前,FCM 的应用已经不再局限于植物细胞计数、基因组大小测量,已经从细胞周期分析、流式核型分析发展到了染色体分选、染色体文库构建等。此外,通过 FCM 分选获得的高纯度、高特异性的细胞或染色体已经在后续的分子生物学研究领域得到应用<sup>[50]</sup>,同时,由 FCM 衍生出的相关技术也有了长足的发展<sup>[51-54]</sup>。

尽管 FCM 已在植物生物学的诸多研究领域日趋成熟,但是,FCM 仍然存在些许不足,如昂贵的价格、对操作者的技术要求较高、复杂的样品预处理过程等,这些均使 FCM 的应用受到很大限制。然而,随着技术革新、分析软件的研发等,相信在不久的将来,FCM 的应用会取得新的突破。

#### 参考文献

- [1] NUNEZ R, ACKERMANN M, SAEKI Y, et al. Flow cytometric assessment of transduction efficiency and cytotoxicity of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors [J]. Cytometry, 2001, 44(2): 93-99.
- [2] 杨蕊, 邹明强. 流式细胞术的最新进展[J]. 分析测试学报, 2004, 23(6): 124-128.
- [3] 赵泓, 刘凡. 流式细胞仪[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(12): 39-41.
- [4] 赵现方, 陈林海, 李宗义, 等. 流式细胞术及其在微生物学中的应用[J]. 河南农业科学, 2005, 34(6): 5-9.
- [5] LOUREIRO J, DOLEZEL J, GREIHUBER J, et al. Plant flow cytometry-far beyond the stone age [J]. Cytometry Part A, 2008, 73(7): 579-580.
- [6] OCHATT S J, ABIRACHED-DARMENCY M, MARGET P, et al. The Lathyrus paradox: "poormen's diet" or a remarkable genetic resource for protein legume breeding? [M]. Plymouth, UK: Science Press, 2007, 1: 41-60. ISBN 978-1-57808-0.
- [7] DORSEY J, YENTSCH C M, MAYO S, et al. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in the marine microalgae [J]. Cytometry, 1989, 10: 622-628.
- [8] DOLEZEL J, CIHALIKOVA J, LUCRETTI S. A high yield procedure for isolation of metaphase chromosome from root tips of *Vicia faba* L [J]. Planta, 1992, 188: 93-98.
- [9] OCHATT S J. Flow cytometry in plant breeding [J]. Cytometry part A, 2008, 73A: 581-698.
- [10] VAN 'T HOF J. Increased nuclear DNA content in developing cotton fiber cells [J]. Amer J Bot, 1999, 86: 776-779.
- [11] RAYBURN A L, PRICE H J, SMITH J D, et al. C-band heterochromatin and DNA content in *Zea mays* [J]. Amer J Bot, 1985, 72: 1610-1617.
- [12] WANG M, FARNHAM M W, NANNES J S P. Ploidy of broccoli regenerated from microspore culture versus anther culture [J]. Plant Breeding, 1999, 118(3): 249-252.
- [13] RIBALTA F M, CROSER A J S, OCHATT S J. Flow cytometry enables identification of sporophytic eliciting stress treatments in gametic cells [J]. J Plant Physiol, 2012, 169: 104-110.
- [14] ROWAN B A, OLDENBURG D J, BENDICH A J. A high-throughput method for detection of DNA in chloroplasts using flow cytometry [J]. Plant Methods, 2007, 3: 5.
- [15] 李涛, 侯月霞, 蔡国友, 等. 流式细胞术分析强声波对植物细胞周期的影响[J]. 生物物理学报, 2001, 17(1): 195-198.
- [16] VECSLER M, LAZAR I, TZUR A. Using standard optical flow cytometry for synchronizing proliferating cells in the G1 phase [J]. Plos One, 2013, 8(12): e83935.
- [17] de LAAT A M, BLASS J. Flow cytometric characterization and sorting of plant chromosomes [J]. Theor Appl Genet, 1984, 67: 463-467.
- [18] LI L J, ARUMUGANATHAN K, GILL K S, et al. Flow sorting and micro-cloning of maize chromosome [J]. Hereditas, 2004, 141: 55-60.
- [19] VRÁNA J, KUBALÁKOVÁ M, SIMKOVA H, et al. Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Genetics, 2000, 156: 2033-2041.
- [20] LEE J H, ARUMUGANATHAN K, CHUNG Y S, et al. Flow cytometric analysis and chromosome sorting of Barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Mol Cells, 2000, 10(6): 619-625.
- [21] LEE J H, MA Y, WAKO T, et al. Flow karyotypes and chromosomal DNA contents of genus *Triticum* species and rye (*Secale cereale*) [J]. Chrom Res, 2004, 12: 93-102.
- [22] MACAS J, DOLEZEL J, LUCRETTI S, et al. Localization of seed protein genes on flow sorted field bean chromosomes [J]. Chrom Res, 1993, 1: 107-115.
- [23] LOUREIRO J, ELEAZAR R E, DOLEZEL J, et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species [J]. Annals of botany, 2007, 100: 875-888.
- [24] PRAÇA-FONTES M M, CARVALHO C R, CLARINDO W R, et al. Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the "best primary standards" [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(7): 1183-1191.
- [25] ARUMUGANATHAN K, MARTIN G B, TELENUS H, et al. Chromosome specific DNA clones from flow sorted chromosomes of tomato [J]. Mol Gen, 1994, 242: 551-558.
- [26] MACAS J, GUALBERTI G, NOUZOVA M, et al. Construction of chromosome specific DNA libraries covering the whole genome of field bean (*Vicia faba* L.) [J]. Chrom Res, 1996, 4: 531-539.
- [27] ROUX N, TOLOZA A, RADECKI Z, et al. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry [J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 483-490.
- [28] BARKER R E, KILGORE J A, COOK R L, et al. Use of flow cytometry to determine ploidy level of ryegrass [J]. Seed Sci Technol, 2001, 29: 493-502.
- [29] OZAKI Y, NARIKIYO K, FUJITA C, et al. Ploidy variation of progenies from intra- and inter-ploidy crosses with regard to trisomic production in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. Sex Plant Reprod, 2004, 17: 157-164.



- [30] SĚSEK P, SUSTAR-VOZLIC J, BOHANEK B. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry [J]. Pflü Gers Arch, 2000, 439 (3 Suppl): R16-R18.
- [31] OCHATT S J. Flow cytometry: ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus [M]. In: Medicago truncatula Handbook, version November 2006, 1-13.
- [32] SUDA J, KRAHULCOVÁ A, TRÁVNÍBEK P, et al. Ploidy level versus DNA ploidy level: an appeal for consistent terminology [J]. Taxon, 2006, 55: 447-450.
- [33] KATHLEEN M Y, GERMÁN A B, DONALD G B, et al. Flow cytometric analysis for ploidy level differentiation of 45 hairy vetch accessions [J]. Ann Appl Biol, 2004, 145(1): 123-127.
- [34] GUZZO F, PORTALUPPI P, GRISI R, et al. Reduction of cell size induced by enod40 in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Exper Bot, 2005, 56(412): 507-513.
- [35] YAMAZAKI D, YOSHIDA S, ASAMI T, et al. Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells [J]. Plant J, 2003, 35(1): 129-139.
- [36] 耿慧霞, 王来, 王强. 流式细胞仪在生物学中的应用[J]. 生物学杂志, 2005, 22(4): 44-51.
- [37] GALBRAITH D W. Cytometry and plant sciences: a personal retrospective [J]. Cytometry Part A, 2003, 58A: 37-44.
- [38] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 1-51, 108-207.
- [39] LIU J H, XU X Y, DENG X X. Characterization of nuclear and cytoplasmic compositions of somatic hybrid plants between sweet orange and sour orange [J]. Acta Bot Sin, 2004, 46(10): 1206-1211.
- [40] GALANZHA E I, SARIMOLLAOGLU M, NEDOSEKIN D A, et al. *In vivo* flow cytometry of circulating clots using negative photothermal and photoacoustic contrasts [J]. Cytometry A, 2011, 79(10): 814-824.
- [41] NEDOSEKIN D A, KHODAKOVSKAYA M V, BIRIS A S, et al. *In vivo* plant flow cytometry: a first proof-of-concept [J]. Cytometry A, 2011, 79(10): 855-865.
- [42] TUCHIN V V, TÁRNOK A, ZHAROV V P. *In vivo* flow cytometry: A horizon of opportunities [J]. Cytometry A, 2011, 79(10): 737-745.
- [43] GOLAN L, YEHESEKELY-HAYON D, MINAI L, et al. Noninvasive imaging of flowing blood cells using label-free spectrally encoded flow cytometry [J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(6): 1455-1464.
- [44] LU W, MELANCON M P, XIONG C, et al. Effects of photoacoustic imaging and photothermal ablation therapy mediated by targeted hollow gold nanospheres in an orthotopic mouse xenograft model of glioma [J]. Cancer Research, 2011, 71(19): 6116-6121.
- [45] GALANZHA E I, ZHAROV V P. Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry *in vivo* and *ex vivo* [J]. Cancers (Basel), 2013, 5(4): 1691-1738.
- [46] WEI C W, XIA J, PELIVANOV I, et al. Trapping and dynamic manipulation of polystyrene beads mimicking circulating tumor cells using targeted magnetic/photoacoustic contrast agents [J]. Journal of Biomedical Optics, 2003, 17(10): 101517.
- [47] MEHRMOHAMMADI M, YOON S J, YEAGER D, et al. Photoacoustic imaging for cancer detection and staging [J]. Curr Mol Imaging, 2013, 2(1): 89-105.
- [48] NEDOSEKIN D A, SARIMOLLAOGLU M, GALANZHA E I, et al. Synergy of photoacoustic and fluorescence flow cytometry of circulating cells with negative and positive contrasts [J]. J Biophotonics, 2013, 6(5): 425-434.
- [49] SHAO J, GRIFFIN R J, GALANZHA E I, et al. Photothermal nano-drugs: potential of TNF-gold nanospheres for cancer theranostics [J]. Science Reports, 2013, 3: 1293.
- [50] NEUMANN P, POZÁRKOVÁ D, VRÁNA J, et al. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Chromosome Res, 2002, 10(1): 63-71.
- [51] ZHANG C, GONG F C, LAMBERT G M, et al. Cell type-specific characterization of nuclear DNA contents within complex tissues and organs [J]. Plant Methods, 2005, 1: 7.
- [52] BARGMANN B O, BIRNBAUM K D. Fluorescence activated cell sorting of plant protoplasts [J]. J Vis Exp, 2010, 36: 1673.
- [53] GRÖNLUND J T, EYRES A, KUMAR S, et al. Cell specific analysis of *Arabidopsis* leaves using fluorescence activated cell sorting [J]. J Vis Exp, 2012, 68: 4214.
- [54] ZHANG C, BARTHELSON R A, LAMBERT G M, et al. Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei [J]. Plant Physiology, 2008, 147(1): 30-40.

## Application Progress of Flow Cytometry in Botany Biology

HAN Hongpeng<sup>1,2</sup>, SONG Chunpeng<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Henan University, Institute of Plant Stress Biology, State Key Laboratory of Cotton Biology, Kaifeng, Henan 475004; 2. Department of Life Science, Henan Institute of Education, Zhengzhou, Henan 450046)

**Abstract:** Flow cytometry (FCM) is a comprehensive technology to analyze properties of cells rapidly. FCM can be used to sort cells according their properties. FCM can simultaneously detect various physical and biological parameters quantitatively. At present, FCM is widely applied in medicine, environmental protection, agricultural production, scientific research and other fields. As a new emerging technology, *in vivo* flow cytometry is a broad application prospects in the transportation of plant nutrients, photosynthetic products and metabolites and nanoparticles in plant vasculature. The principle, characteristics of FCM and its application of research in plant biology were introduced in this paper, and moreover, and the progress in application of *in vivo* flow cytometry was reviewed.

**Keywords:** flow cytometry; analysis of chromosome ploidy; sorting of protoplasts; *in vivo* flow cytometry