

DNA流式细胞术在植物遗传及育种中的应用

金亮^{1*} 徐伟伟² 李小白³ 刘建新¹ 田丹青¹ 葛亚英¹ 潘晓韵¹ 王炜勇¹

¹浙江省农业科学院花卉研究开发中心, 浙江省萧山棉麻研究所, 杭州 311202;

²慈溪市农业技术推广中心, 慈溪 315300; ³浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘要 DNA流式细胞术是一种分析和测定分离细胞核DNA含量的方法。该方法的关键技术包括制备完整细胞核悬浮液、核酸荧光染料染色、根据相对荧光密度(DNA含量)对细胞核进行分类。由于样品制备及分析方便快捷, 该技术已成为植物倍性鉴定、基因组大小测定、生殖途径鉴定等研究的重要工具。该文在对DNA流式细胞术基本原理简要介绍的基础上, 对其在植物遗传和育种中的应用进行了综述。

关键词 流式细胞术; 植物; 基因组大小; 细胞核DNA含量; 遗传; 育种

Application of DNA Flow Cytometry to Plant Genetics and Breeding

Jin Liang^{1*}, Xu Weiwei², Li Xiaobai³, Liu Jianxin¹, Tian Danqing¹, Ge Yaying¹, Pan Xiaoyun¹, Wang Weiyong¹

¹Research & Development Centre of Flower, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Zhengjiang Xiaoshan Cotton and Flax Research Institute, Hangzhou 311202, China; ²Cixi Agricultural Technology Extension Center, Cixi 315300, China;

³Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract DNA flow cytometry is a method for analysis and estimation of DNA content of isolated cell nuclei. The keys to this method include preparation of aqueous suspensions of intact nuclei, staining the nuclei with a nucleic acid fluorochrome, and classification of the stained nuclei based on their relative fluorescence intensity or DNA content. Because the sample preparation and analysis is convenient and rapid, DNA flow cytometry has become an important tool for plant ploidy screening, estimation of genome size and determination of reproductive pathway and so on. In this review we gave a brief introduction of the basic principles of DNA flow cytometry, and reviewed its applications in plant genetics and breeding.

Keywords flow cytometry; plant; genome size; nuclear DNA content; genetics; breeding

流式细胞术(flow cytometry)是20世纪六、七十年代发展出的一种用于生物医学中对血细胞进行快速计数与分析的技术^[1]。其广泛的定义是利用流式细胞仪(flow cytometer)对处于快速流动中的微小生物颗粒(细胞、细胞核、染色体等)进行多参数、快速的定量分析和分选的技术^[1-3]。其基本原理是: 悬

液中的生物颗粒在鞘液的水力聚焦下排列成单列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(光源器件产生的光束与细胞液柱垂直相交处); 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

收稿日期: 2015-09-25 接受日期: 2015-12-11

浙江省农业科学院科技创新能力提升工程协同创新项目(批准号: 2014CX014)、浙江省农业科学院青年科技人才培养项目(批准号: 2015R25R08E04)和杭州市种子种苗专项(批准号: 20140932H19)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-83713882, E-mail: zjulab@163.com

Received: September 25, 2015 Accepted: December 11, 2015

This work was supported by the Science and Technology Innovation Ability Promoting Project of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2014CX014), Young Scientific and Technological Talents Training Project of Zhejiang Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2015R25R08E04) and the Seeds and Seedlings of Special Project of Hangzhou City (Grant No.20140932H19)

*Corresponding author. Tel: +86-571-83713882, E-mail: zjulab@163.com

网络出版时间: 2016-02-01 16:59:53 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160201.1659.002.html>

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。而具有分选功能的流式细胞仪还能物理分离特定的生物颗粒, 用于进一步的分析^[2]。

毫无疑问, 流式细胞术是生物医学领域重要的研究工具, 随着流式细胞仪的发展、新型荧光染料的应用, 这项技术已经扩展到多种生物科学领域中, 如植物科学。其中, 使用流式细胞术分析测定细胞核DNA含量被称为DNA流式细胞术^[4]。目前, DNA流式细胞术在植物遗传及育种研究中有着广泛的应用, 如植物倍性鉴定、基因组大小测定、生殖途径鉴定等^[2,4-7]。本文在对植物DNA流式细胞术基本原理介绍的基础上, 对其在植物遗传及育种中的应用作一综述。

1 植物DNA流式细胞术关键技术

尽管最早使用流式细胞术进行植物细胞核分析的文章发表于1973年^[2,8], 但该文几乎被忽视, 主要原因是该文使用德文发表, 且制备细胞核悬液的方法十分复杂^[2]。直到1983年, 流式细胞术在植物中的应用才有了重大突破: 在盛有分离缓冲液的培养皿中, 用锋利的剃须刀片切割植物组织, 可以简单、快速地制备适合流式细胞术分析的植物细胞核悬液^[9]。此后, 植物DNA流式细胞术的基本程序被逐步完善。该程序包括: 完整细胞核悬液的制备、核酸荧光染料染色、使用流式细胞仪分析染色细胞核的荧光强度并根据荧光强度对细胞核进行分析、分类^[4]。

1.1 细胞核悬液的制备

制备细胞核单颗粒悬液是DNA流式细胞术分析的关键。目前最常用的方法仍是使用锋利的刀片在细胞核分离缓冲液中切碎少量的植物组织, 如叶片(最常用的是幼嫩叶片)、茎、根、花粉和种子等^[10-12]。一般使用幼嫩的植物组织主要是避免老组织中的高浓度淀粉、多糖、多酚或其他代谢产物对分析的影响^[4,7]。除了植物材料的选择, 分离缓冲液对细胞核单颗粒悬液的制备也是十分关键。目前常用的几种细胞核分离缓冲液见表1。此外, 也有相关流式细胞仪公司开发出了针对植物使用的细胞核分离缓冲液。对于细胞核分离缓冲液的基本要求是:

抑制核酸酶、维持细胞核的完整性并能提供核酸染料染色最佳条件。目前还没有一种通用的植物细胞核分离缓冲液, 不同植物甚至植物不同部位使用同一种分离缓冲液的提取效果都可能不同, 因此需要尝试不同的细胞核分离缓冲液, 甚至要改进缓冲液的成分以期获得最佳的细胞核分离效果^[5,7]。有报道表明, 细胞核分离缓冲液中试剂的品牌、用途都会对分离效果产生影响^[5]。除了切碎的方法, 使用超声波处理也可以有效地分离油菜花粉细胞核^[13]。

1.2 荧光染料染色

细胞核悬液制备好后, 使用核酸荧光染料进行染色。荧光染料的选择与DNA流式细胞术分析的目的及流式细胞仪装备的光源相关。常用的核酸荧光染料见表2。根据荧光染料与核酸结合方式, 可将其分为3类: 插入双链(intercalation)、AT-特异结合(AT-specific)和GC-特异结合(GC-specific)。插入双链的荧光染料溴化乙锭(ethidium bromide, EB)和碘化丙锭(propidium iodide, PI)光谱特性相似, 可用于装备488 nm激光或532 nm激光的流式细胞仪, 主要用于基因组大小测定及倍性分析。这类染料除了能与双链DNA结合, 同样也能与双链RNA结合, 因此在使用时还要同时使用核糖核酸酶(RNAase)。插入双链荧光染料最终浓度应高于饱和水平(推荐50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。与EB相比, 由于PI具有较高的分辨率及较低的毒性, 目前相关DNA流式细胞术中普遍使用PI。近年来, 一种新型的插入双链荧光染料SYBR Green I可能会替代PI^[2]。有报道表明, 在2种咖啡的基因组大小测定中, SYBR Green I与PI染色测定的结果是一致的, 但前者的分辨率较高^[4]。此外, SYBR Green I安全性也高于PI。与PI相比, SYBR Green I的最大激发波长(498 nm)接近488 nm(目前流式细胞仪中最普遍的光源波长), 荧光的激发会更充分^[4]。

AT-特异结合荧光染料主要用于倍性分析、基因组碱基组成分析。它们具有相似的光谱特性, 在UV(如汞弧灯或UV LED)下激发, 发出蓝色光。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)用于倍性水平分析的效果最佳(通常浓度为4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。GC-特异结合荧光染料是一类抗生素, 如色霉素A3(chromomycin A3, CMA3)主要用于碱基组成分析, 但目前鲜有使用。

染色效果与细胞核分离缓冲液的成分以及胞质

成分等因素有关^[4]。有研究表明, 向日葵(*Helianthus annuus*)叶片中某种成分能降低PI荧光^[15]。

1.3 流式细胞仪分析

经荧光染料染色的细胞核悬浮液使用流式细

表1 常用的细胞核分离缓冲液
Table 1 List of nuclear isolation buffers

缓冲液 Buffer	成分 Composition	酸碱度 pH	参考文献 References
Galbraith's buffer	45 mmol/L MgCl ₂ , 30 mmol/L sodium citrate, 20 mmol/L MOPS, 0.1% (w/v) Triton X-100	pH7.0	[9]
LB01 buffer	15 mmol/L TRIS, 2 mmol/L Na ₂ EDTA, 0.5 mmol/L spermine·4HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L β-mercaptoethanol, 0.1% (v/v) Triton X-100	pH7.5	[16]
MgSO ₄ buffer	9.53 mmol/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 47.67 mmol/L KCl, 4.77 mmol/L HEPES, 6.48 mmol/L DTT, 0.25 % (w/v) Triton X-100	pH8.0	[17]
Marie's buffer	50 mmol/L glucose, 15 mmol/L KCl, 15 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Na ₂ EDTA, 50 mmol/L sodium citrate, 0.5 % (v/v) Tween 20, 50 mmol/L HEPES, 0.5% (v/v) β-mercaptoethanol	pH7.2	[18]
Otto's buffers ^a	Otto I buffer: 100 mmol/L citric acid, 0.5%(v/v) Tween 20 [(cell culture tested grade of Tween 20 from Sigma-Aldrich (cat. no. P2287)] Otto II buffer: 400 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	pH approximate 2.3 pH approximate 8.9	[5,19-20]
Tris-MgCl ₂ buffer	200 mmol/L TRIS, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.5% (v/v) Triton X-100	pH7.5	[21]
Seed buffer	5 mmol/L MgCl ₂ , 85 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris, 0.1% (v/v) Triton X-100	pH7.0	[22]
General purpose buffer (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	pH7.0	[23]
Woody plant buffer (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 sodium metabisulfite, 1% PVP-10, 1% (v/v) Triton X-100	pH7.5	[23]

a: 细胞核在Otto I buffer中提取, DNA染色在Otto I和Otto II的混合液(1:4)中进行, 终pH约为7.3。

a: the nuclei are isolated in Otto I buffer; DNA staining is done in a mixture of Otto I and Otto II buffers (1:4) with the final pH approximate 7.3.

表2 植物DNA流式细胞术荧光染料基本特性

Table 2 Basic characteristics of DNA-selective fluorochromes used in plant flow cytometry

荧光染料 Fluorochrome	使用浓度(μg/mL) Concentration used (μg/mL)	与核酸结合方式 Binding mode	激发波长 ^a (nm) Excitation wavelength (nm)	发射波长 ^a (nm) Emission wavelength (nm)	适用的光源 Suitable excitation source	主要用途 Application
Ethidium bromide	50~100	Intercalation	523	604	Laser (488 nm, 532 nm)	Genome size estimation, ploidy analysis
Propidium iodide	50~100	Intercalation	538	617	Laser (488 nm, 532nm)	Genome size estimation, ploidy analysis
SYBR Green I	10 ^{×b}	Intercalation	498	522	Laser (488 nm)	Genome size estimation, ploidy analysis
DAPI	4	AT-specific	358	461	Arc lamp (UV band), UV LED (365 nm)	Ploidy analysis, base composition analysis
Hoechst 33258	2~4	AT-specific	352	455	Arc lamp (UV band), UV LED (365 nm)	Base composition analysis
Hoechst 33342	2~4	AT-specific	348	455	Arc lamp (UV band), UV LED (365 nm)	Base composition analysis
CMA	50~100	GC-specific	445	570	Laser (457 nm)	Base composition analysis

a: 光谱数据来自<http://www.fluorophores.tugraz.at/>; 实际的光谱特性与包括DNA/染料浓度、离子强度、pH等许多因素有关。b: 通常商业化的产品浓度为10 000×, 推荐的使用浓度为10×。

a: excitation and emission spectra of fluorochromes were obtained from <http://www.fluorophores.tugraz.at/>; Actual spectral properties (exact wavelengths) depend on several factors, including DNA/dye ratio, ionic strength and acidity of the staining solution. b: the stock solution provided by the manufacturer is usually 10 000× concentrate, and manufacturers recommend a working concentration of 10×.

胞仪进行分析检测。流式细胞术分析细胞核DNA含量是基于分析荧光染料染色的一定数量(可以设定分析几千甚至上万个)细胞核的相对荧光强度,结果以相对DNA含量(荧光强度)的二维直方图显示(图1)。分析的准确性即直方图的分辨率一般以变异系数(coefficient of variation, $CV = \text{标准差} / \text{平均峰值} \times 100\%$)来表示^[2]。CV值越小, DNA含量分析就越准确。通常, $CV < 5\%$ 是可以接受的, 而 $CV < 3\%$ 表示分析结果准确^[5]; 在特定的条件下, CV可以小于 1% ^[7,20]。而分析一些特殊的植物材料, CV可能很难小于 5% , 如富含多酚物质的植物、基因组极小的植物等^[5]。还需注意的是, CV只能在线性标尺(linear scale)模式下计算, 而对于对数标尺(logarithmic scale)模式下的测定则没有意义^[5]。DNA流式细胞术分析产生的直方图中的主峰与细胞核的细胞周期 G_1 期对应, 而小峰与 G_2 期对应(图1)。不过, 幼嫩叶片中分离细胞核的 G_2 期峰一般不明显或检测不到。在DNA流式细胞术分析过程中, 如果对照与样品分别分析, 即对照与样品在不同的直方图中显示出来称为使用外标(external standard)的DNA流式细胞术分析; 而同时测定对照与样品, 即在同一直方图中显示对照与样品的则称为使用内标(internal standard)的DNA流式细胞术分析。使用内标的分析能够降低样品制备以及仪器自身的引起误差, 因此更适用于精确的分析^[1]。

2 植物DNA流式细胞术的应用

2.1 基因组大小与C值测定

核基因组大小(单套染色体组DNA的含量)是每一个真核细胞固有的、独特的属性, 其信息是许多领域研究的基础参数, 如分类学、生态学和进化生物学等^[3]。基因组大小的数据对于基因组的研究是必不可少的, 如在测序项目中需要这个信息来估计实验的成本和应对个别项目的复杂性^[24]。生物体不复制的单倍体细胞核(无论倍性水平)所含DNA数量称为C值^[25], 因此, 具有两套不复制基因组处于细胞周期 G_1 期的细胞核具有2C DNA, 而 G_2 期的细胞核具有4C DNA(图1)。每种生物各有其特定的C值, 不同物种的C值之间有很大差别。在二倍体生物($2n=2X$)中C值与基因组大小相等, 但在多倍体中C值大于基因组大小。Greilhuber等^[26]提出了“1C值”和“1Cx值”的概念: 1C值代表体细胞DNA含量(2C)的一半; 1Cx值指生物体2C值除以相应的倍性水平。

1C值和1Cx值分别与整倍体(holoploid)和一倍体(monoploid)基因组大小对应。对于二倍体生物, 1C值和1Cx值相同, 但对于多倍体, 1Cx值小于1C值, 如对于四倍体($2n=4X$), 其 $1Cx=1/2 1C$, 而对于六倍体, 其 $1Cx=1/3 1C$ ^[3,26]。基因组大小和C值都可用pg(10^{-9} g)或bp(base pairs, 1 pg DNA=978 Mbp)表示^[27]。

尽管基因组大小、C值是十分重要的遗传信息, 但目前只了解一小部分植物的C值, 例如, 到2012年, 也只有8 510种植物的C值被测定, 其中被子植物7 542种(约占被子植物的3.7%)^[28-30]。因此, 需要一种高通量的方法来测定植物基因组大小。而使用DNA流式细胞术可以方便、快速地进行基因组大小

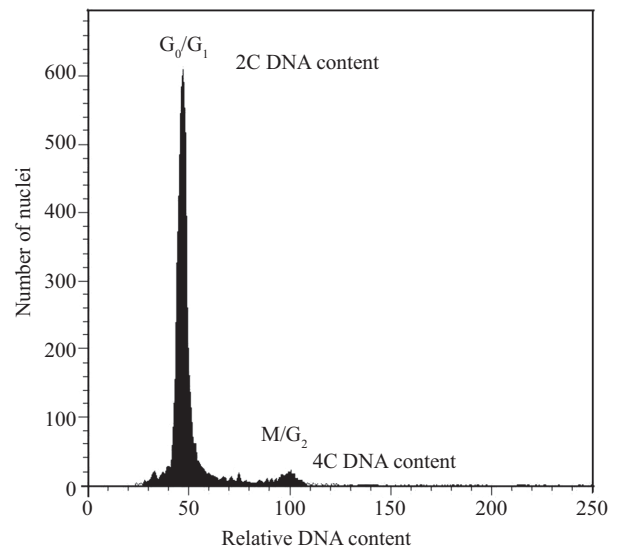


图1 典型的细胞核相对DNA含量直方图

Fig.1 Typical histogram of nuclear relative DNA content

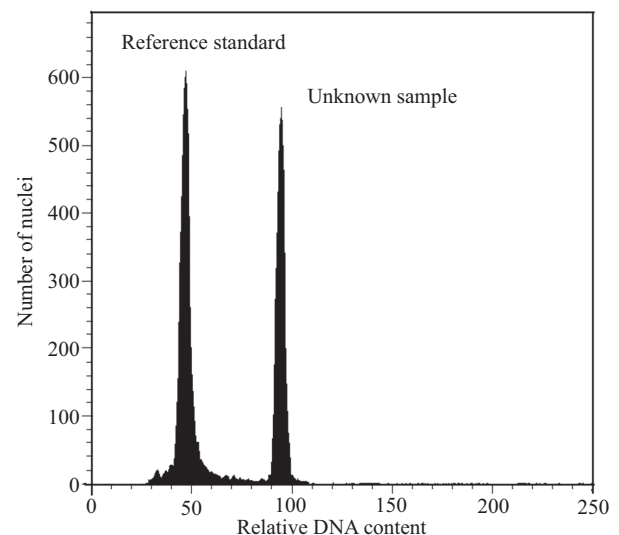


图2 基因组大小测定示意图

Fig.2 Schematic view of estimation of genome size

和C值的测定,是目前主要的测定方法。其测定方法是:同时测定已知2C DNA含量(基因组大小)的参考标准材料与样品,通过染色细胞核的相对荧光密度比值来计算出样品的绝对DNA含量^[2](图2)。样品绝对DNA数量的计算是基于G₁平均峰值的比值,计算公式如下:

未知样品2C DNA含量=[(未知样品G₁平均峰值)/(参考标准G₁平均峰值)]×参考标准2C DNA含量(pg)

从测定的方法原理上看,参考标准的选择对于测定的结果影响较大。早期研究使用过鸡红细胞作为参考标准,但现在动物细胞已不再被推荐使用^[5]。目前已知高等植物中基因组最小的来自一种食虫植物螺旋狸藻(*Genlisea margaretae*),其1C基因组大小为0.064 8 pg(63.4 Mbp)^[31];而最大的为152.23 pg(148 880.9 Mbp),来自重楼百合(*Paris japonica*)^[32],其大小相差近2 350倍,因此不可能只使用一个标准去测定大部分植物。理想的参考标准应该是准确了解其1C值。但是由于基因组重复部分组装的问题,目前还是无法准确获得已测序动、植物的基因组大小数据^[33]。因此,一些测序的模式植物也不适合用于参考标准^[28,33]。目前选择参考标准的条件是^[4-5,34-36]:已知基因组大小的植物,其基因组大小与测试的样品的基因组大小接近,但也不能太近,避免同时测定时标准与样品的细胞核G₁峰重合;其细胞学稳定,不含有或含有较少的次级代谢产物;常见易得。捷克共和国实验植物学研究所分子细胞遗传学及细胞术实验室Doležel等^[5]推荐了“一套标准”(2C基因组大小1.10~34.89 pg)用于植物基因大小

测定^[5,37]。这套标准包括8种植物(表3),其基因组大小由人白血球(2C=7.0 pg)测定^[37]。Doležel等^[5]的实验室以种子的形式向世界各地科研机构免费提供这套标准。

对于想要了解某种植物的基因组大小或C值,可以查询植物DNA C值数据库(Plant DNA C-values Database; <http://data.kew.org/cvalues/>)^[29]、植物DNA流式细胞术数据库(FLOWer: A Plant DNA Flow Cytometry Database; <http://botany.natur.cuni.cz/flower/>、<http://flower.web.ua.pt/>)^[38];如果该植物属于菊科(Asteraceae),还可查询菊科基因组大小数据库(GSAD: Genome Size in Asteraceae Database; <http://www.asteraceae-genomesize.com/>)^[39]。以上数据库中还可查询相关文献、相关细胞核提取缓冲液、提取方法以及相关研究的注意事项。若以上数据库或学术文献都都没有查到相关数据,就可选取合适的“参考标准”,采用DNA流式细胞术法进行相关植物的基因大小测定。

2.2 异源多倍体基因组组成分析

许多重要的作物,如小麦、燕麦、棉花、香蕉等都是异源多倍体。例如,小麦基因组是由A、B、D,这3种基因组组成的。D基因组(2C=5.05 pg)的DNA含量明显低于A(2C=6.15 pg)和B(2C=6.09 pg)基因组的DNA含量^[42]。二倍体香蕉中的尖苞蕉(*Musa acuminata*)的基因组为AA,而野蕉(*M. balbisiana*)的基因组为BB。A、B基因组大小不同,其中B基因组比A基因组小12%^[43]。比较分析二倍体与三倍体基因组大小,能确定栽培香蕉(三倍体)的基因组组成(AAA、AAB、ABB)并能有助于确定其二倍

表3 适合于测定植物基因大小的参考标准(根据参考文献[6]修改)

Table 3 List of DNA standards suitable for plant DNA flow cytometry (modified from reference [6])

植物材料 Plant species and cultivar	2C DNA含量(pg) 2C DNA content (pg)	1C基因组大小(Mbp) 1C genome size (Mbp)	参考文献 Reference
<i>Raphanus sativus</i> L. 'Saxa'	1.11	543	[37]
<i>Lycopersicon esculentum</i> L. 'Stupické polní rané'	1.96	958	[34]
<i>Glycine max</i> L. 'Polanka'	2.50	1 223	[40]
<i>Zea mays</i> L. 'CE-777'	5.43	2 655	[41]
<i>Pisum sativum</i> L. 'Ctirad'	9.09	4 445	[37]
<i>Secale cereale</i> L. 'Daňkovské'	16.19	7 917	[37]
<i>Vicia faba</i> L. 'Inovec'	26.90	13 154	[34]
<i>Allium cepa</i> L. 'Alice'	34.89	17 061	[37]

体祖先^[43]。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。

2.3 基因组碱基组成分析

除了基因组大小,基因组碱基的组成(AT/GC碱基对的比例)能产生了解基因组构成更多的信息,其不同物种间具有一定的差异,可能具有生物相关性,可以作为分类研究的附加参数^[2]。尽管可以使用色谱分析、密度梯度离心、DNA溶解温度分析以及全基因组测序等方法来测定碱基组成^[44-45],但与之相比,采用DNA流式细胞术仍是目前更快速、更经济的方法。

尽管AT-或GC-特异性结合荧光染料不适用于基因组大小的测定,但可以利用它们进行碱基组成分析。Godelle等^[46]假设一个染料分子结合一定数目同样的连续碱基(如DAPI是3~4个碱基, Hoechst 33342是5个碱基),最终AT碱基含量比例可以按以下计算公式求出:

$$\text{样品AT(\%)} = \text{标准AT(\%)} \times (\text{DAPI/PI})^{1/n}$$

式中, DAPI代表DAPI染色标准/样品峰值比; PI代表PI染色标准/样品峰值比; n代表连续碱基数,通常设为4。

然而,这种碱基成分分析方法存在着先天的不足:碱基特异性结合荧光染料的荧光强度与碱基组成并不成线性关系,且荧光染料与DNA的结合受结合长度及长DNA分子上碱基的偏好分布影响^[46-47]。因此,根据此方法测的AT/GC比例只能是个近似值。Barow等^[7]测定了54种植物的基因组大小及碱基组成,并发现在高等植物中基因组大小与AT/GC比例没有相关性。目前,只有大概300多种植物的碱基组成被测定^[44-45,48-49]。这个数量远低于用于测定基因组大小的植物数量。造成碱基组成测定较少的主要原因有:较高的工作量(需要连续测量两种不同的染料);需要已知基因组大小和AT/GC比例的内参标准;不确定的设定参数(与染料结合的长度、非随机的碱基分布)^[2]。一些研究试图找到碱基组成与其他生物参数的相关性。例如,有研究表明,在被子植物中GC含量与基因组大小高度相关^[50]。不过其他研究并没有证实这个结果^[51],甚至还发现了相反的关系^[47]。

2.4 倍性水平分析

倍性水平的分析、鉴定对于植物分类及育种具有重要意义^[1,6]。确定倍性水平的最可靠的方法是染

色体计数。然而,这项工作费时费力,且需具有一定的细胞生物学经验才能完成^[2,6]。而对于一些染色体较多、较小的物种来说,染色体计数更为困难。同时,染色体计数需要分裂中的细胞。除了染色体计数,还有些间接的方法可以确定倍性水平,如测定叶片气孔大小、保卫细胞中叶绿体数、花粉直径等^[2,6]。不过这些间接方法并不可靠。DNA流式细胞术为植物的倍性水平分析、鉴定提供了可靠、快速的方法。因为G₁期的细胞核DNA含量与倍性水平对应,用已知倍性植物(已知染色体数)的G₁期的峰值的位置(即相对DNA含量)作为对照标准进行比较分析,就能鉴定测试样品的倍性^[52]。

自从1987年da Laat等^[53]首次报道了使用DNA流式细胞术来测定植物倍性水平以来,该方法已成为植物倍性水平分析、鉴定的常用方法^[1-2,6]。这种倍性分析、鉴定方法比染色体计数等方法,具有以下优点^[1]:方便(样品制备简单)、快速(一个工作日可以分析几百个样品)、精确(每次测定几千个及以上的细胞核,更具有统计学意义)、不需要分裂中的细胞、适合组培材料的鉴定(可以早期鉴定筛选)、对植株基本无破坏性(只需少量的组织,一般只需几十毫克)。需要注意的是,利用DNA流式细胞术进行的倍性分析是基于分析相对DNA含量,因此应准确地称为“DNA倍性”,这应与基于染色体计数的“染色体倍性”分析区分开来^[1]。

在育种中,加倍单倍体(双单倍体)植株能缩短育种周期,是重要的育种材料。利用DNA流式细胞术可以快速高效地鉴定、筛选出花药、小孢子培养产生的单倍体用于加倍,并最终确定加倍单倍体^[54-55]。多倍体育种也是植物重要的育种方法,如四倍体(同源多倍体)一般具有比亲本二倍体更大的花和果实。而利用四倍体与二倍体杂交可以产生三倍体。三倍体通常是低育性、果实无核或少核,这些特点在一些经济作物中受到欢迎,如三倍体柑橘^[56]。同样,利用DNA流式细胞术可以在早期快速高效地鉴定、筛选出目标倍性水平植株材料以用于相关育种应用。

在种间杂交育种中,如果父母本的基因组大小、倍性水平相对差异较大,即可利用DNA流式细胞术来筛选种间杂种,如鉴定咖啡种间杂种(*Coffea pseudozanguebariae* × *C. liberica*)^[57]、榨菜(*Brassica juncea*)和紫甘蓝(*B. oleracea*)种间杂种^[58]。而在种

间杂交育种中,也有利用DNA流式细胞术鉴定榨菜和紫甘蓝种间嵌合体的报道^[59]。

DNA流式细胞术可以评估种子倍性的纯度比例,如快速测定多年生黑麦草(*Lolium perenne*)四倍体和二倍体种子混播的比例,且误差小于5%^[60]。

利用植物组织培养技术,在离体条件下对植物进行营养繁殖,可以快速提供种苗。但在组培过程中,相关材料遗传不稳定,易产生体细胞无性系变异。而对于生长周期较长的木本植物来说,筛选出变异材料更是具有重要意义。DNA流式细胞术可以在组培、快繁中鉴定、筛选倍性变异的植株^[61-62]。

与常规的倍性改变鉴定相比,非整倍体(特别是只缺失一条染色体)的鉴定更是艰巨的工作。不过已有报道, DNA流式细胞术的灵敏度足以鉴定出小麦-黑麦附加系^[63]、小麦^[21]中的非整倍体。使用DNA流式细胞术也成功地在啤酒花(*Humulus lupulus*)中鉴定出了单体和三体^[64]。Roux等^[65]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。

在许多种植物中,不同组织含有高于2C DNA含量(如4C、8C、16C)的细胞。这种现象被称为核内多倍性(endopolyploidy)。核内多倍性通常是由核内再复制(endoreduplication)引起的^[2,66],即细胞没有经历有丝分裂而形成特殊的多倍体核。利用DNA流式细胞术可以方便地测定植物中不同DNA倍性水平细胞核的分布。在DNA流式细胞术分析中,核内多倍性由具有一系列特殊峰的DNA含量直方图显示,而这些峰与核内再复制的不同水平对应^[2,66]。核内多倍性现象在被子植物^[67]和蕨纲^[68]中普遍,但在裸子植物和蕨类^[69]中很少,在苔纲中未被发现^[68]。虽然对核内再复制的生物学意义缺乏了解,但推测其在植物细胞、组织生长和分化中起重要作用^[70]。利用DNA流式细胞术分析和分选不同倍性水平(2C~128C)的番茄果皮细胞核用于进一步的基因表达分析,结果表明,核内多倍性水平的增加与rRNA和mRNA转录增强正相关^[71]。

2.5 雌雄异株植物性别鉴定

一些雌雄异株植物具有异形性染色体,这给在生长早期鉴定、分离雌株和雄株提供了可能。而早期鉴定雌、雄株对于一些雌雄异株植物的育种研究及应用具有重要意义。Costich等^[72]通过DNA流式细胞术分析分别测定白花蝇子草(*Silene latifolia*,

异名: *Melandrium album*)雄株和雌株的细胞核DNA含量,结果表明,雄株的核DNA含量高于雌株^[72]。Doležel等^[20]通过DNA流式细胞术发现,白花蝇子草及红石竹(*Silene dioica*,异名: *Melandrium rubrum*)的雌株细胞核DNA含量比雄株的少;但是,由于它们性染色体之间DNA数量差异极小,因此只有高分辨率(CV<1%)的DNA流式细胞术同时分析测定雌株与雄株的细胞核,才能够获得可以区分雌、雄株而不重叠峰(相对DNA含量)的直方图^[20]。除了对生长早期的植株,甚至对于花粉都能测定其性别属性。有研究表明,叶蓼(*Rumex nivalis*)雌性性别决定花粉细胞核DNA含量明显低于雄性^[73]。对来自墨西哥的四种棕榈科(Arecaceae)竹节椰属(*Chamaedorea*)植物的DNA流式细胞术分析表明, *C. ernesti-augusti*和*C. pinnatifrons*的雄株细胞核DNA含量高于雌株,但差异极小(<1%);而*C. alternans*和*C. tepejilote*则是雌株细胞核DNA含量高于雄株(差异分别为2.4%、3.3%)^[74]。而对于雌雄异株植物海枣(*Phoenix dactylifera*),有研究表明,其基因组AT/GC含量可以区分雌、雄株^[75]。

2.6 生殖途径鉴定

Matzk等^[22,76]研究表明,使用DNA流式细胞术能够有效地对植物生殖途径进行鉴定。有性生殖产生的种子中胚和胚乳DNA含量比为2C:3C,而无融合生殖产生的比例则为2C:4C。在兼性无融合生殖的情况下,可以观察到更复杂的代表不同C值的多峰直方图。从叶片中分离的二倍体细胞核通常用于这些测量的参照。这项技术已成为无融合生殖鉴定的一种有效方法。相关改进的方法可以精确地测定雄性和雌性基因组对胚和胚乳的贡献而无论配子体的模式和父母本植株的倍性^[77]。

3 问题与展望

如上所述, DNA流式细胞术在植物遗传与育种中已有了广泛的应用。尽管通过测定相对DNA含量进行倍性水平分析的技术日趋成熟,但用于测定基因组大小仍然存在较多问题,因为影响测定结果的因素太多。样品制备、染色,参考标准的选择甚至流式细胞仪的激发光源种类都会对结果产生影响,因此,使用DNA流式细胞术测定植物基因组大小的方法需要规范化,最好能制定统一的标准^[5]。此外,测定具有核内多倍性的植物以及具有渐进式局部核

内再复制(progressively partial endoreplication)的植物(如兰花)基因组大小时,其技术上也存在巨大挑战和问题^[78-79]。而碱基组成测定中,理论上先天的不足,极大地影响测定结果的准确性。此外样品(如幼嫩叶片)的保存、没有普遍适用的植物细胞核分离缓冲液可能也是限制植物DNA流式细胞术发展的因素。

将来植物DNA流式细胞术的发展将有赖于流式细胞仪的发展、新型荧光染料的应用、高通量、普遍适用的细胞核提取方法的发明等,其应用范围会向植物分类学、群体生物学、生态学、基因组学等领域逐步扩展。

参考文献 (References)

- Doležel J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J Appl Genet* 1997; 38(3): 285-302.
- Vrána J, Cápál P, Bednářová M, Doležel J. Flow cytometry in plant research: A success story. *Applied Plant Cell Biology, Plant Cell Monographs*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2014; 22: 395-430.
- Loureiro J, Trávníček P, Rauchová J, Urfus T, Vít P, Štech M, *et al.* The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants. *Preslia* 2010; 82: 3-21.
- Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot-London* 2005; 95(1): 99-110.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* 2007; 2(9): 2233-44.
- Ochatt SJ. Flow cytometry in plant breeding. *Cytom Part A* 2008; 73A: 581-98.
- Pellicer J, Leitch IJ. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants. *Methods Mol Biol* 2014; 1115: 279-307.
- Heller F. DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impulscytophotometrie (DNA estimation on radicles of *Vicia faba* L. using pulse cytophotometry). *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 1973; 86: 437-44.
- Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 1983; 220(4601): 1049-51.
- Sliwinska E, Zielinska E, Jedrzejczyk I. Are seeds suitable for flow cytometric estimation of plant genome size? *Cytom Part A* 2005; 64A(2): 72-9.
- Kron P, Husband BC. Using flow cytometry to estimate pollen DNA content: Improved methodology and applications. *Ann Bot-London* 2012; 110(5): 1067-78.
- Sliwinska E, Pisarczyk I, Pawlik A, Galbraith DW. Measuring genome size of desert plants using dry seeds. *Botany* 2009; 87(2): 127-35.
- Pan G, Zhou Y, Fowke LC, Wang H. An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. *Plant Cell Rep* 2004; 23(4): 196-202.
- Clarindo WR, Carvalho CR. Flow cytometric analysis using SYBR Green I for genome size estimation in coffee. *Acta Histochem* 2011; 113(2): 221-5.
- Pricea HJ, Hodnetta G, Johnston JS. Sunflower (*Helianthus annuus*) leaves contain compounds that reduce nuclear propidium iodide fluorescence. *Ann Bot-London* 2000; 86(5): 929-34.
- Doležel J, Binarová P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plantarum* 1989; 31: 113-20.
- Arumuganathan K, Earle ED. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* 1991; 9(3): 208-18.
- Marie D, Brown SC. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol Cell* 1993; 78(1/2): 41-51.
- Otto FJ, Oldiges H, Göhde W, Jain VK. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test. *Cytometry* 1981; 2(3): 189-91.
- Doležel J, Göhde W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 1995; 19(2): 103-6.
- Pfossner M, Heberle-Bors E, Amon A, Lelley T. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* 1995; 21(4): 387-93.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant J* 2000; 21(1): 97-108.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann Bot-London* 2007; 100(4): 875-88.
- Cardoso DC, Carvalho CR, Cristiano MP, Soares FAF, Tavares MG. Estimation of nuclear genome size of the genus *Mycetophylax emery*, 1913: Evidence of no whole-genome duplication in Neotattini. *C R Biol* 2012; 335: 619-24.
- Swift H. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 1950; 36: 643-54.
- Greilhuber J, Doležel J, Lysák MA, Bennett MD. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot-London* 2005; 95(1): 255-60.
- Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 2003; 51A(2): 127-8.
- Bennett MD, Leitch IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Targets, trends and tomorrow. *Ann Bot-London* 2011; 107(3): 467-590.
- Bennett M, Leitch I. Plant DNA C-values Database (Release 6.0, Dec. 2012) <http://data.kew.org/cvalues/>. 2012.
- Bennett MD, Leitch IJ. Plant genome size research: A field in focus. *Ann Bot-London* 2005; 95(1): 1-6.
- Greilhuber J, Borsch T, Müller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. Smallest angiosperm genomes found in *Lentibulariaceae*, with chromosomes of bacterial size. *Plant Biol* 2006; 8(6): 770-7.
- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ. The largest eukaryotic genome of them all? *Bot J Linn Soc* 2010; 164(1): 10-5.

- 33 Doležel J, Greilhuber J. Nuclear genome size: Are we getting closer? *Cytom Part A* 2010; 77(7): 635-42.
- 34 Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol Plantarum* 1992; 85: 625-31.
- 35 Bennett MD, Leitch IJ, Price HJ, Johnston JS. Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125 Mb. *Ann Bot-London* 2003; 91(5): 547-57.
- 36 Suda J, Leitch IJ. The quest for suitable reference standards in genome size research. *Cytom Part A* 2010; 77(8): 717-20.
- 37 Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, *et al.* Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Ann Bot-London* 1998; 82(Supplement A): 17-26.
- 38 Loureiro J, Rodriguez E, Santos C, Doležel J, Suda J. Flower: A plant DNA flow cytometry database (release 1.0, May 2008). <http://flower.web.ua.pt/>. 2008.
- 39 Garnatje T, Canela MÁ, Garcia S, Hidalgo O, Pellicer J, Sánchez-Jiménez I, *et al.* GSAD: A genome size in the *Asteraceae* database. *Cytom Part A* 2011; 79(6): 401-4.
- 40 Doležel J, Doleželová M, Novák FJ. Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biol Plantarum* 1994; 36: 351-7.
- 41 Lysák MA, Doležel J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 1998; 52: 123-32.
- 42 Lee JH, Yen Y, Arumuganathan K, Baenziger PS. DNA content of wheat monosomics at interphase estimated by flow cytometry. *Theor Appl Genet* 1997; 95: 1300-4.
- 43 Lysák MA, Doleželová M, Horry JP, Swennen R, Doležel J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor Appl Genet* 1999; 98: 1344-50.
- 44 Meister A, Barow M. DNA base composition of plant genomes. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes, and genomes, Weinheim: Viley-VCH 2007; 177-215.
- 45 šmarda P, Bureš P, Horová L, Foggi B, Rossi G. Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Ann Bot-London* 2008; 101(3): 421-33.
- 46 Godelle B, Cartier D, Marie D, Brown SC, Siljak-Yakovlev S. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 1993; 14(6): 618-26.
- 47 Barow M, Meister A. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. *Cytometry* 2002; 47(1): 1-7.
- 48 šmarda P, Bureš P, šmarda J, Horová L. Measurements of genomic GC content in plant genomes with flow cytometry: A test for reliability. *New Phytol* 2012; 193(2): 513-21.
- 49 Veleba A, Bureš P, Adamec L, šmarda P, Lipnerová I, Horová L. Genome size and genomic GC content evolution in the miniature genome-sized family *Lentibulariaceae*. *New Phytol* 2014; 203: 22-8.
- 50 Vinogradov AE. Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size. *Cytometry* 1994; 16(1): 34-40.
- 51 Ricoch A, Yockteng R, Brown SC, Nadot S. Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome* 2005; 48(3): 511-20.
- 52 Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Krahulec F. Ploidy level versus DNA ploidy Level: An appeal for consistent terminology. *Taxon* 2006; 55(2): 447-50.
- 53 de Laat AMM, Gohde W, Vogelzakg MJ. Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding* 1987; 99(4): 303-7.
- 54 Germanà MA. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ* 2011; 104(3): 283-300.
- 55 Ferrie AMR, Caswell KL. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Organ* 2011; 104(3): 301-9.
- 56 Aleza P, Juárez J, Hernández M, Ollitrault P, Navarro L. Implementation of extensive citrus triploid breeding programs based on 4x × 2x sexual hybridisations. *Tree Genet Genomes* 2012; 8(6): 1293-306.
- 57 Barre P, Layssac M, Hont AD, Louarn J, Charrier A, Hamon S. Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the coffee interspecific hybrid *C. pseudozanguebariae* × *C. liberica* var 'dewevrei'. *Theor Appl Genet* 1998; 96: 301-5.
- 58 Li J, Rao L, Meng Q, Ghani MA, Chen L. Production of Brassica tri-genomic vegetable germplasm by hybridisation between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*B. oleracea*). *Euphytica* 2015; 204(2): 323-33.
- 59 Chen L, Ge Y, Zhu X. Artificial synthesis of interspecific chimeras between tuber mustard (*Brassica juncea*) and cabbage (*Brassica oleracea*) and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 2006; 25(9): 907-13.
- 60 Baert J, Reheul D, Bockstaele E, Loof A. A rapid method by flow cytometry for estimating persistence of tetraploid perennial ryegrass in pasture mixtures with diploid perennial ryegrass. *Biol Plantarum* 1992; 34(5/6): 381-5.
- 61 Neelakandan AK, Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* 2012; 31(4): 597-620.
- 62 Loureiro J, Pinto G, Lopes T, Doležel J, Santos C. Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta* 2005; 221: 815-22.
- 63 Bashir A, Auger JA, Rayburn LA. Flow cytometric DNA analysis of wheat-rye addition lines. *Cytometry* 1993; 14(8): 843-7.
- 64 šesek P, šuštar-Vozlič J, Bohanec B. Determination of aneuploids in hop (*Humulus lupulus* L.) using flow cytometry. *Pflügers Archiv* 2000; 439(1): r16-8.
- 65 Roux N, Toloza A, Radecki Z, Zapata-Arias FJ, Doležel J. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Rep* 2003; 21: 483-90.
- 66 Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1991; 96(3): 985-9.
- 67 Barow M. Endopolyploidy in seed plants. *Bio Essays* 2006; 28: 271-81.
- 68 Bainard JD, Newmaster SG. Endopolyploidy in bryophytes: Widespread in mosses and absent in liverworts. *J Bot* 2010; doi: org/10.1155/2010/316356.
- 69 Barow M, Meister A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. *Plant Cell Environ* 2003; 26: 571-84.

- 70 Chevalier C, Nafati M, Mathieu-Rivet E, Bourdon M, Frangne N, Cheniclet C, *et al.* Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann Bot-London* 2011; 107(7): 1159-69.
- 71 Bourdon M, Pirrello J, Cheniclet C, Coriton O, Bourge M, Brown S, *et al.* Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth. *Development* 2012; 139(20): 3817-26.
- 72 Costich DE, Meagher TR, Yurkow EJ. A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* 1991; 9(4): 359-70.
- 73 Stehlik I, Kron P, Barrett SCH, Husband BC. Sexing pollen reveals female bias in a dioecious plant. *New Phytol* 2007; 175: 185-94.
- 74 Cepeda-Cornejo V, Palominob G, Méndezc I, Dirzod R. Intersexual comparison of DNA content by flow cytometry, and chromosome number in four dioecious *Chamaedorea* palms from Mexico. *Caryologia* 2012; 65(4): 263-70.
- 75 Siljak-Yakovlev S, Benmalek S, Cerbah M, Coba De La Peña T, Bounaga N, Brown SC, *et al.* Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sex Plant Reprod* 1996; 9: 127-32.
- 76 Matzk F, Meister A, Brutovska R, Schubert I. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *Plant J* 2001; 26(3): 275-82.
- 77 Dobeš C, Lückl A, Hülber K, Paule J. Prospects and limits of the flow cytometric seed screen-insights from *Potentilla sensu lato* (Potentilleae, Rosaceae). *New Phytol* 2013; 198(2): 605-16.
- 78 Trávníček P, Ponert J, Urfus T, Jersáková J, Vrána J, Hřibová E, *et al.* Challenges of flow-cytometric estimation of nuclear genome size in orchids, a plant group with both whole-genome and progressively partial endoreplication. *Cytom Part A* 2015; 87(10): 958-66.
- 79 Kron P. Endopolyploidy, genome size, and flow cytometry. *Cytom Part A* 2015; 87(10): 887-9.