

DOI: 10.13376/j.cbils/2025023

文章编号: 1004-0374(2025)02-0223-10

· 技术与应用 ·

微流控技术在植物研究中的应用与进展

朱思雨¹, 林龙晖², 赵薇薇¹, 刘雨佳¹, 李亮², 赵兵举¹, 邹春静^{1,2*}

(1 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830017;

2 华东师范大学生命科学院, 上海市城市化生态过程与生态恢复重点实验室, 上海 200241)

摘要: 微流控技术作为一种新兴的技术手段, 在植物研究领域正展现出巨大的应用潜力。随着技术的不断发展, 微流控技术与其他先进技术的融合进一步拓展了其在植物研究中的应用范围, 为植物科学的发展带来新的机遇和突破, 有望对农业、生态等领域产生重要影响。本文概括了微流控芯片的产生历程及其制作材料与方法, 总结了用于植物研究的微流控芯片类型, 全面综述了近年来微流控芯片技术在植物细胞、植物的根、植物的根与外界环境的相互作用、植物花粉管等方面的应用, 并对其应用前景进行了展望。

关键词: 微流控; 植物芯片; 根; 植物细胞; 根周环境

中图分类号: Q94; TN492 **文献标志码:** A

Exploring the potential of microfluidic chips in plant research

ZHU Si-Yu¹, LIN Long-Hui², ZHAO Wei-Wei¹, LIU Yu-Jia¹, LI Liang², ZHAO Bing-Ju¹, ZOU Chun-Jing^{1,2*}

(1 Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science & Technology, Xinjiang University, Urumqi 830017, China; 2 Shanghai Key Lab for Urban Ecological Processes and Eco-Restoration, School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China)

Abstract: Microfluidic technology, a rapidly advancing field, is poised to revolutionize plant research. Recent technological progress, particularly the integration of microfluidic technology with other cutting-edge technologies, has expanded the horizons of plant research. This integration has not only opened up new avenues but also led to significant breakthroughs in plant science. These developments are anticipated to have far-reaching implications for agriculture, ecology, and various other disciplines. This review provides a comprehensive overview of the developmental process of microfluidic chips, including the materials and methodologies employed in the production. We also present an overview of the various types of microfluidic chips used in plant research and their recent applications in the examination of plant cells, roots, pollen tubes, and interactions between roots and the external environment. Lastly, we discuss the potential future applications of microfluidic chips in plant research, emphasizing the profound impact of this technology on agriculture, ecology, and related fields.

Key words: microfluidic; plant chip; roots; plant cells; external environment

随着生命科学的蓬勃发展, 人们对生命科学的研究已逐步从宏观深入到微观, 从群体走向了个体, 甚至单细胞水平。传统植物细胞分析方法是将种子或者植物细胞培养在土壤或者琼脂平板上, 然后观察植物的表型。这些方法简单、易于操作, 但是也有一些弊端。首先, 传统方法成本高, 实验周期长, 也很难量化; 其次, 植物细胞在固体培养基上的生长行为具有无规律性, 以致很难从一个特定的角度观察植物; 另外, 传统研究方法的时间和空间分

辨率低, 可能会导致观察植物表型变化过程时信息丢失; 最后, 根据植物在固体培养基上无序的生长行为也很难详尽地分析其生长情况^[1]。近年来, 微

收稿日期: 2024-07-21; 修回日期: 2024-09-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区区域协同创新专项
(上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划)
(2023E01010)

*通信作者: E-mail: cjzou@bio.ecnu.edu.cn

流控 (microfluidic) 技术的飞速发展促生了各种微流控芯片。微流控指的是使用微管道 (尺寸为数十到数百微米) 处理或操纵微小流体 (体积为微升、纳升甚至阿升) 的系统。微流控芯片则融合了多学科技术, 涉及生物学、化学、医学、流体物理、微电子和新材料等多个学科领域, 把分子生物学、医学、化学分析等实验过程中的处理、分离、反应、检测等实验操作集中到一张极小的芯片上, 实现了系列实验的微量、自动、集成技术, 因此又被称为芯片实验室 (lab-on-a-chip, LoC)^[2]。自 20 世纪 90 年代初蓬勃发展以来, 微流控技术已在各种研究领域得到应用, 包括化学合成、基因组分析、蛋白质组学、单细胞分析、组织工程、高通量筛选、环境分析和医学诊断等领域, 而在植物研究领域, 微流控芯片技术也逐渐趋于成熟^[3]。微流控方法刚刚出现在植物领域时, 就被用于跟踪不同生长条件下的根系生长和基因表达^[4-6], 用于表型分析^[7]或跟踪根系与病原体的相互作用^[8-9]。通过单细胞分析微流控芯片, 可以跟踪原生质体发育 (分裂和生长) 或对根毛 (root hair, RH) 进行生长分析, 如评估和量化在响应环境胁迫时 RH 的形态变化^[10]以及胁迫因子如激素^[11]或磷酸盐的供应状态^[12]。本文概括了制作微流控芯片的材料和方法, 全面综述了近年来微流控芯片技术在植物细胞、植物的根、植物根与周围环境的相互作用以及植物花粉管等方面的应用, 并对其应用前景进行了展望。

1 微流控芯片概述

微流控芯片的概念出自 20 世纪 90 年代初, 世界范围内的研究始于 90 年代中后期, 其发展大体经历了三个阶段。第一阶段: 整个 90 年代, 微流控芯片被认为仅仅是一种分析化学平台, 并往往和“微全分析系统”概念混用。第二阶段: 21 世纪的最初六七年, Whiteside 小组^[13]研究的关于聚二甲基硅氧烷软刻蚀的方法在 *Electrophoresis* 上发表, Thorsen 等^[14]以微泵微阀为特征的“微流控芯片大规模集成”文章在 *Science* 上发表, 2004 年美国 *Business 2.0* 杂志将芯片实验室列为“改变未来的七种技术之一”。第三阶段: 2006 年至今。2006 年 7 月, *Nature* 杂志发表了一期题为“芯片实验室”的专辑, 从不同角度阐述芯片实验室的研究历史、现状和应用前景, 并在编辑部社评中指出, “芯片实验室可能成为‘这一世纪的技术’”。至此, 芯片实验室所显示的战略意义, 已在更高层次和更大范围内被

学术界和产业界所认同。

常用于制作微流控芯片的材料有单晶硅片、石英、玻璃和有机聚合物如聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate, PMMA)、聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS)、聚碳酸酯 (polycarbonate, PC) 以及水凝胶等^[15]。硅具有良好的化学惰性和热稳定性, 使用光刻和蚀刻方法可以高精度地复制出二维图形或者复杂的三维结构。硅材料的不足之处是易碎、价格偏高、不透光, 电绝缘性较差, 表面化学行为也较为复杂, 因此在微流控芯片中的应用受到限制。石英和玻璃有很好的电渗和优良的光学特性, 它们的表面吸附和表面反应能力都有利于对表面改性, 但是价格相对较高, 尤其是石英。采用与硅片类似的光刻和蚀刻技术可以将微结构刻在石英和玻璃上, 因此, 石英和玻璃材料已被广泛应用于制作微流控芯片。石英尤其适合于用紫外分光光度法检测的微流控芯片制作。高分子聚合物具有种类多、加工成型方便、原材料价格较低等特点, 非常适合于大批量制作, 物料成本很低。用于微流控芯片制作的高分子聚合物主要有三类: 热塑性聚合物、固化型聚合物和溶剂挥发型聚合物。热塑性聚合物有 PMMA、PC 和聚乙烯等; 固化型聚合物有 PDMS、环氧树脂和聚氨酯等, 它们与固化剂混合后, 经过一段时间的固化变硬即可得到芯片; 溶剂挥发型聚合物有丙烯酸、橡胶和氟塑料等, 制作时将它们溶于适当的溶剂, 再通过缓慢挥发溶剂而得到芯片。弹性体 PDMS 材料, 又称硅橡胶, 是众多聚合物中用得较多的一种: 它能透过 250 nm 以上的紫外与可见光; 耐用, 有一定的化学惰性; 生物相容性好, 廉价; 能可逆和重复变形而不发生永久性破坏; 能用模塑法高保真地复制微流控芯片; 芯片微通道表面可进行多种改性修饰; 不仅能与自身可逆结合, 还能与玻璃、硅、二氧化硅和氧化型多聚物可逆结合^[16]。

近年来, 研究人员提出可直接用 3D 法打印芯片, 并做了相关研究。通过普通 3D 打印技术即可获得微流控芯片模板, 不需要清洗基底、甩胶、曝光、显影等烦琐的过程, 能够在非常短的时间内以非常高的重现性打印复杂的 3D 微芯片, 而不涉及很多的手动步骤^[17-18]。但在现阶段, 能够用于三维打印的材料受到限制, 远不如微流控芯片常用的 PDMS 那样普遍。例如, Cronin3D 打印的反应器是完全不透明的, 这阻碍了芯片上的直接观察。然而, 随着 3D 打印技术的迅速发展, 越来越多的材料正在被

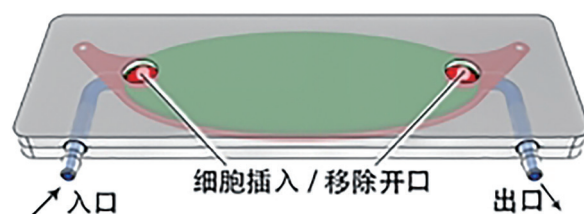
开发利用, 如 PDMS、聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 以及透明树脂等半透明或透明材料。其中, 使用居多的为 PLA 材料, 其具有半透明色和光泽质感, 是当前 3D 打印芯片最好的原材料^[19]。Comina 等^[20]应用立体光固化成型法 (stereo lithography apparatus, SLA) 3D 打印机在光敏树脂上激光刻蚀得到疏水性芯片, 与 PDMS 薄膜密封在一起, 得到了含有混合器结构的微流控芯片。3D 打印技术从计算机模型一步到位地制造完整的微流控装置有着明显的优势, 而创造真正的三维结构将为微流控芯片制造技术注入新动能^[21]。

2 微流控芯片技术在植物研究中的应用

2.1 植物细胞的研究

原生质体是植物的基本细胞单位, 其果胶质细胞壁被去除, 但质膜是完整的。微流控装置已应用于植物原生质体的收集和裂解^[22]、培养^[23]、融合^[24]、再生^[25]和发育表征^[26]。为在单细胞水平上研究植物细胞独特的生物学和生理学特性, 有研究者提出了一种方法, 将微孔设计和基于电阻抗的流式细胞仪相结合, 用于识别和表征干细胞的分化状态^[27]。数字微流控 (digital microfluidic, DMF) 芯片技术拥有在单细胞分辨率下对悬浮细胞进行分析的潜力。Kumar 等^[28]应用 DMF 芯片技术对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的一组单个原生质体进行了分析: 这些原生质体被磁性颗粒标记并通过磁力固定在 DMF 芯片上, 通过将具有不同渗透条件的液滴输送到细胞被固定的位置, 可用摄像机动态监测被固定细胞的反应。朱晓翠等^[29]通过在微流控芯片上设计适合原生质体尺寸的微孔阵列和微通道流路, 实现了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 原生质体的在线纯化和单细胞阵列捕获。利用电穿孔技术将能特异性检测 3' 核酸外切酶的核酸探针导入原生质体, 实现了单个原生质体内 3' 核酸外切酶的成像。该研究为开展单细胞内多种核酸酶的高通量原位检测以及相关调控过程研究提供了重要的方法学手段。张潇丹等^[30]将微流控芯片与细胞抗氧化活性 (cellular antioxidant activity, CAA) 测试方法结合, 搭建了一个 CAA 芯片分析平台, 此芯片可以很好地对体外药物活性进行评价。在 PDMS 微流控装置中培养活样本有助于研究微小的发育事件。Bascom 等^[25]的研究表明, 一种早期分化的陆地植物小立碗藻 (*Physcomitrella patens*) 可以在 PDMS 微流控室中连续培养, 因此可在长时间内对 *P. patens* 的生长发育历程进行高分

辨率成像。Sakai 等^[31]设计了一个全面的、生理学相关的、易于使用的、低成本的微流控显微镜装置, 用于长期监测小立碗藻的生长和发育。原代细胞壁 (primary cell wall, PCW) 是植物细胞周围坚硬而又灵活的细胞壁, 在植物生长、细胞分化、细胞间通讯、水分运动和防御等方面起着关键作用, 而微流控芯片可以成为一种高分辨率原位研究植物细胞壁再生或其他行为的有效工具^[32]。微流控阻抗流式细胞术可以在单细胞分辨率下同时表征力学和电学特性。研究表明, 在 PCW 再生过程中, 原生质体外的细胞外层在机械和电学特性方面产生了巨大的变化, 植物激素生长素对 PCW 重组具有调控作用^[33]。电阻抗谱 (electrical impedance spectroscopy, EIS) 作为一种广泛应用于哺乳动物细胞特性研究的技术, 在植物科学中应用较少。有研究者设计并制作了一种基于 EIS 的生物传感器, 结合微流控平台, 在单细胞水平上研究 PCW 的形成过程, 发现完全再生 PCW 的拟南芥叶肉细胞的阻抗值明显高于未再生 PCW 的拟南芥叶肉细胞, 表明 PCW 的形成引起了细胞电学特性的巨大变化^[34]。植物的次生代谢可产生许多具有药物活性的化合物, 这些化合物通常是由不同的和专门的细胞合成的, 这些细胞之间的相互作用构成了代谢链, 而这种相互作用阻碍了次生代谢产物的生物技术生产。研究人员提出了一种新的策略解除这一限制: 使用仿生方法, 通过微流控系统模拟真实组织中的情况。该系统可成功培养烟草 BY-2 细胞, 并可保持其正常的生理参数达数天。结果表明, 培养植物细胞的微流控系统可以模拟真实植物组织中的代谢流^[35]。有一种用于植物细胞培养的微流控生物反应器 (图 1), 使用该芯片研究发现悬浮的烟草 BY-2 细胞根据增殖细胞分泌的“群体感应因子”进行分裂, 同时发现两种具有互补代谢效力的长春花细胞株的组合可以获得一种抗肿瘤化合物长春新碱的前体^[36]。此外, 人们利用微



黑色箭头表示营养液的流向。改编自 Finkbeiner 等 (2021), 经知识共享 CC BY 许可^[36]。

图1 植物细胞培养的微流控生物反应器透视图

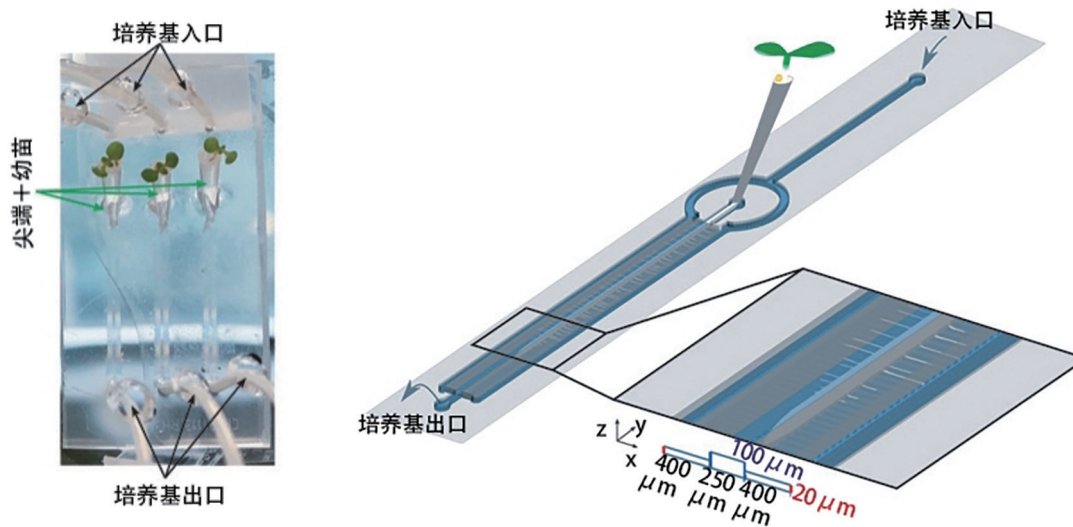
流控装置可以捕获 BY-2 细胞并固定其位置, 以监测细胞的生理活动^[37]。使用微流控装置和 BY-2 细胞证实, 可以在可控条件下实时观察胞间连丝^[38]。有研究人员提出了一种纳米无标记成像技术, 使用微流控采样网络来跟踪生物微环境中化学信息的产生和分布。通过设定采样孔径的大小和纳米孔特性, 可以预测小分子和大分子通过膜的扩散通量, 通过该膜收集的代谢物可以直接通过质谱法进行分析, 从而检测生物相关的代谢物浓度^[39]。植物气孔可以有效地监测植物的水力学、光敏性和气体交换, 目前测量单个气孔孔径的方法有铸模或荧光测量技术, 但这些方法不能在长期的植物生理过程中实时或持续监测气孔功能。有研究者利用一种能保留气孔功能的基于纳米颗粒的导电油墨, 在 1 周以上的时间内, 可重复可逆地打印出由气孔本身驱动的高度稳定的电导传感器。该气孔机电孔径传感器 (stomatal electro-mechanical pore size sensor, SEMPSS) 允许实时跟踪植物中单个气孔打开和关闭的时间, 在单个气孔水平上长期监测气孔功能可使我们更加深入地理解植物对环境的生理反应^[40]。

2.2 植物根的研究

植物根系在吸收植物生长发育所需的养分和适应不同环境方面起着至关重要的作用。有研究表明, 在土壤复合胁迫下, 根毛是植物生长和养分获取的重要性状, 选择具有优良根毛性状的植物对提高磷素吸收效率和农业系统的可持续性具有重要意义^[41]。根毛增加根表面积, 使植物更好地吸收水分和养分, 由于它们的体积小, 且经常被自然环境所遮蔽, 因此很难研究根毛的形态和功能; 而微流控平台提供了一种高分辨率可视化根系的方法, 在转移到成像系统时不会干扰根系^[42]。研究者设计了一种被称为 RootChip 的微流控芯片平台, 该平台集成了拟南芥根系生长和代谢活细胞成像技术。RootChip 具有独立的腔室, 用于平行调节来自多个幼苗的多个根的微环境。通过基因编码的葡萄糖和半乳糖荧光传感器在亚细胞分辨率下监测植物的各时段生长和胞质糖水平, 证明了 RootChip 的实用性。RootChip 可以通过调整腔室的几何形状用于其他植物的根成像, 并有助于对多个幼苗的根生长和代谢进行系统分析, 为大规模的根代谢表型分析开辟了道路^[43]。Busch 等^[4]设计了一种微流控设备 RootArray, 在无需人工干预的情况下, 可以在其中生长 64 株拟南芥幼苗, 并在几天内通过共聚焦显微镜对其根系进行成像。Jiang 等^[7]设计了一种用于拟南芥高通

量表型分析的垂直透明微流控芯片, 多个拟南芥种子可以在芯片中水培发芽和生长超过 2 周, 从而实现了大规模的植物表型监测和定量分析。植物在该装置中的生长发育时间表与在传统琼脂板中高度相似, 这种原型植物芯片技术有望为高通量和精确的植物表型分析搭建强大的实验平台。在植物根的研究中使用的芯片多为 RootChip, 将拟南芥种子培养发芽并在传统移液管中生长数天, 再转移到 RootChip 中进行高通量植物基因表达分析。这些研究要么集中在种子发芽, 要么集中在幼苗发育, 尚未将微流控设备应用于研究从种子发芽到幼苗原位发育的整个过程^[44-48]。研究者在以往植物芯片研究的基础上设计了一种微流控平台, 通过结合一个双层装置将拟南芥主根限制在与根毛相同的光学平面上, 这种设计能够在细胞和细胞器水平上对根毛进行量化, 光学成像结束后可将器件拆开, 作为原子力或扫描电子显微镜的衬底, 同时保持细根结构的完整^[10]。Song 等^[49]设计并制作了一种可折叠的微流控芯片阵列, 用于对种子发芽和随后的幼苗原位发育进行无损和连续的监测。植物阵列芯片能够通过简单地改变阵列中固体介质的成分来研究各种化学物质和其他环境条件对植物的影响, 通过测定 Murashige 和 Skoog (MS) 培养基以及脱落酸 (abscisic acid, ABA) 对植物种子萌发和幼苗生长的浓度效应, 来证明阵列芯片应用的有效性^[50]。Sun 等^[11]利用一种简单的交叉微通道微流控装置对拟南芥原位根进行了显微观察, 发现将微流控系统 with 显微镜相结合可以方便地在几分钟内定量测定原生根和根毛的微米级变化, 同时还可以研究高盐胁迫对根的不同部位 (例: 根冠、分生区、伸长区、成熟区和根毛) 的影响。该研究是从数量而非质量的角度研究植物根系与环境条件的关系, 表明微流控系统将成为拟南芥根系定量研究的有力工具。根毛具有快速的顶端生长, 其构成了一个独特的单细胞模型系统, 可用于分析细胞形态动力学。Singh 等^[51]设计了一种基于盖玻片的微流控设备 (coverslip based microfluidic device, CMD)(图 2), 能够通过实时监测核运动和形状变化来捕获拟南芥根毛发育的高分辨率共聚焦成像。

在自然界中, 根生长在黑暗中, 而在传统的琼脂平板培养条件下, 植物的茎和根都暴露在光照下, 这不符合根生长的自然环境, 可能会导致不可控的生物响应^[52]。根系暴露在光照下可能会因激素信号转导、细胞骨架组织、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 或类黄酮积累等因素的改变影响根系的发育。



(a)在装有 $\frac{1}{2}$ MS培养基的微流管尖端中生长的9天大的拟南芥幼苗的俯视图。移液管尖端插入CMD芯片。(b) CMD设计3D示意图,标注了主通道和侧通道中的根部和根毛。浅蓝色表示主通道的宽度和横向通道的长度,而主通道和横向通道的深度分别用蓝色和红色表示。改编自Singh等(2021),经约翰·威利父子出版公司许可^[51]。

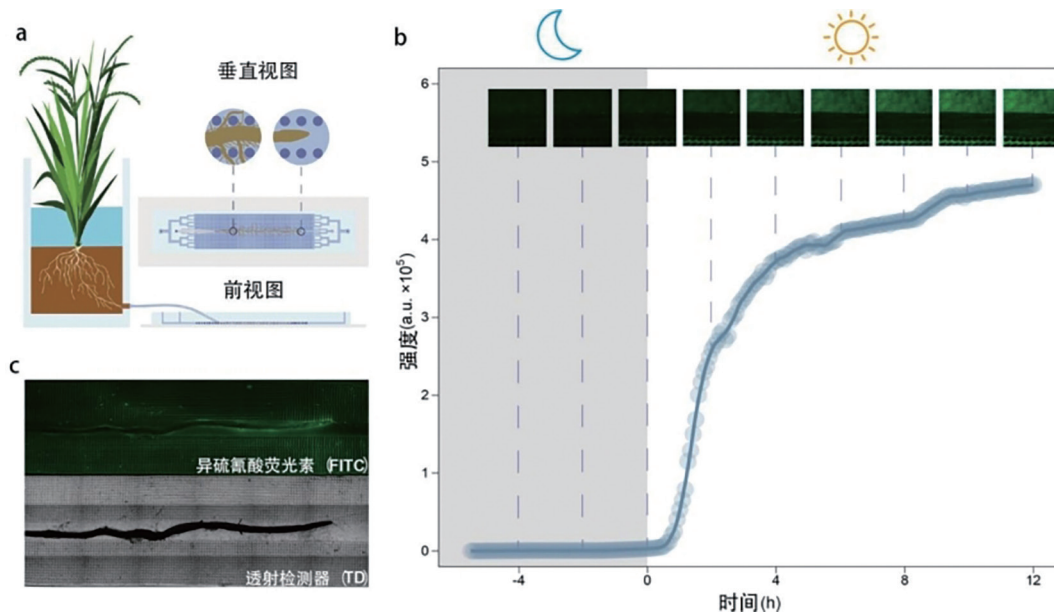
图2 CMD芯片设计

光照会改变根系对营养物质或水分的吸收,也会影响根系对非生物胁迫的反应以及根系与微生物群的相互作用^[53]。研究人员设计了一种名为 Dark-Root (D-Root) 的装置,将植物的地面部分暴露在正常的光/暗光周期中,而根部则处于黑暗中或暴露在特定的波长或光强度下。研究表明光照改变了拟南芥根系对激素、非生物胁迫(如盐或渗透胁迫)和营养饥饿的响应,增强了对根系生长的抑制。D-Root 为拟南芥提供了更接近自然生长的条件,有助于更好地探究根系发育、激素信号转导和胁迫反应的机制^[54]。Grossmann 等^[55]开发了一种基于 PDMS 的微流控设备,能够对拟南芥幼苗根系成像,同时能够避免在成像准备过程中对根系产生任何物理压力。该系统具有广泛的应用潜力,在化学物质存在或不存在的条件下都能进行根生长分析、基于荧光的基因表达分析以及生物传感器分析,例如荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 纳米传感器分析。锌在所有活细胞中起着核心作用,是酶的辅因子,也是实现蛋白质充分折叠的结构元素。研究人员将基因编码的 FRET 传感器与 RootChip 结合使用,以监测拟南芥根细胞中胞浆 Zn^{2+} 浓度的动态变化。研究表明,基因编码的 FRET 传感器与 RootChip 的结合为监测根细胞中金属离子浓度状态提供了一种有利的工具^[56]。为了研究具有细分枝结构的根系(即纤维根系)的发育,Chai 等^[57]设计了一种多室花瓣状根系生长芯片。

该透明装置能够无损地观察根系的发育和微观结构特征,如根尖、根边界细胞和根毛;通过控制五个根系生长室中每一种微环境的条件可研究单个水稻 (*Oryza sativa*) 幼苗纤维根生长对不同胁迫的特定适应,如单个幼苗的根系生长反应和根系微观结构适应。因此,花瓣状根系生长微流控芯片可以消除不同发育时期的影响,更客观地揭示植物对不同环境条件的反应,同时允许以非常高的空间和时间分辨率进行无损观测。湿地植物的根际是氧和电子交换的高度动态界面,为 ROS 的产生提供了前提,但细胞外 ROS 是否在根际产生尚不清楚。Dai 等^[58]设计了一种微流控芯片装置(图 3),以空间和时间分辨率监测水稻根际 ROS 的原位产生,通过荧光成像清楚地显示了根际 ROS 产生的位点。植物微流控平台的制造和操作的复杂性限制了其应用范围,因此 Moussus 等^[59]设计了一个 3D 打印开放式微流控平台,通过不同材质的芯片与拟南芥根之间的生物相容性测试研究确定了一种合适的芯片制作材料,通过拟南芥干旱耐力研究验证了基于 SLA 的 RootChip 的可用性,可方便地制作符合需求的根芯片。

2.3 植物根与周围环境相互作用的研究

植物根在植物与微生物的相互作用中发挥着重要作用,驱动着微环境的动态变化,近些年的研究揭示了根相关细菌的多种有益作用,强调了根际相互作用的重要性,以高时空分辨率跟踪这些相互作用

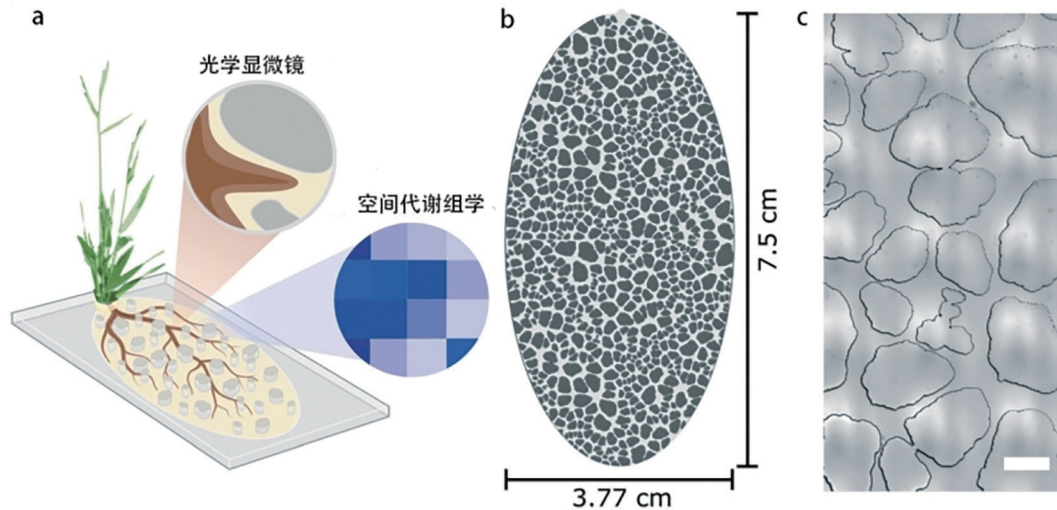


(a)用于根际ROS产生和原位观察的微流控芯片设置。(b)黑暗和光照条件下ROS产生的时间序列。(c)异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC)和透射检测器(transmitted detector, TD)通道下的水稻根共聚焦激光扫描显微镜图像。ROS探针发出的绿色荧光显示了根际ROS的空间分布。改编自Dai等(2022), 经美国化学学会许可^[58]。

图3 根际ROS产生和原位观察微流控芯片

用是一项具有挑战性的任务^[60-62]。研究人员研究了活体拟南芥根在微流控装置中的生物相容性和存活率,通过一系列实验证实了层流技术在局部化学刺激和环境控制方面的优势^[63]。土壤在空间和时间上的复杂性和动态特性对研究根系代谢、生长和发育的机制以及根际组织间网络形成了重大技术挑战,“Soil-on-a-Chip”技术通过实验和环境控制对细菌、线虫、真菌、植物以及生物体间的相互作用研究做出了重大贡献^[64]。近年来,微装置设计越来越多地被应用于反映土壤中复杂的生长条件^[65-66]。洪炎等^[67]设计了一种非接触电导微流控芯片用于快速测定土壤中的氮钾含量。Aufrecht等^[68]使用微流控平台与有益细菌一起培养植物,可以在植物发育的早期阶段对这些相互作用的空间动力学进行可视化和量化。Aufrecht等^[69]还开发了一种模拟土壤物理结构的根球芯片(rhizosphere-on-a-chip)(图4),应用此芯片对二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)进行长期培养,使用液体微结表面采样探针质谱法(LMJ-SSP-MS)验证了芯片上根际孔隙空间内渗出物位点的存在,此芯片可探究模拟土壤是如何影响植物分泌天然碳化合物的。大多数根系分泌物,包括初级代谢产物(糖、氨基酸和有机酸),被认为是被动从根系流失的,并被根际微生物利用^[70]。研究人员设计了一种带有集成色度传感器的纸基微

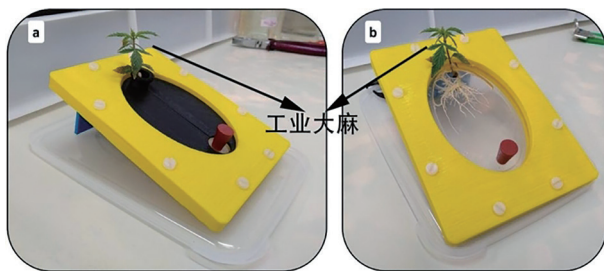
流控装置,用于连续提取和分析植物根部的根系分泌物,并验证了低成本技术对根系渗出物生化成分进行高精度筛选和诊断的可行性^[71]。Massalha等^[72]设计了一款微流控设备,称为“跟踪根部相互作用系统”(tracking root interactions system, TRIS),可以实时成像根-细菌的相互作用。研究人员组装了一个双通道TRIS设备,该设备允许在一个腔室中同时跟踪两个根系,可实时监测野生型根系和突变型根系的细菌偏好;该设备能够精确控制系统内的环境参数,同时允许以高空间和时间分辨率直接观察动态生物过程;在该设备中研究根与微生物的相互作用,可以使用多种荧光报告基因检测细菌菌株和植物基因型的无限组合。与先前报道的RootChip平台相比,基于显微镜的TRIS设备为根系与微生物相互作用研究提供了一个强大的平台^[73]。为研究根系对水或营养物质的利用情况、对生物或非生物胁迫条件和机械刺激的反应机制,Guichard等^[6]设计了一种微流控设备RootChip-8S,该装置适用于对灌注培养条件下生长数天的拟南芥根系成像。Stanley等^[74]提出了双流RootChip(dual-flow-RootChip, dfRootChip),一种不对称灌注培养拟南芥根系的微流控平台,用于研究根系营养、根系与微生物的相互作用以及在受控不对称条件下的根系信号转导和发育。人造生态系统(ecosystem fabrication, EcoFAB)



(a)片上根球培养植物的示意图, 实现了根系的动态成像, 并允许对根系的化学微环境进行空间采样。(b)整体合成土壤设计尺寸为7.5 cm × 3.77 cm, 适合长期植物培养。(c)显微拼接图像显示了片上根球内的合成土壤颗粒区域, 该区域模拟了沙子的形状特征(比例尺=1 mm)。改编自Aufrecht等(2022), 经知识共享CC BY 3.0 Unported许可^[69]。

图4 芯片上的根球设计模仿了天然沙子的结构

是一种无菌植物生长平台, 包括两个主要组件: EcoFAB 装置和一个无菌植物大小的透明容器^[75], 其中 EcoFAB 可以通过设置较大的根室来支持各种模式植物生长 3~4 周^[76]。受 EcoFAB 模型的启发, 研究者开发了一种新设备 Root-TRAPR (图 5), 其可以作为一种便捷的测试平台, 用于验证激发子对大麻 (*Cannabis sativa*) 的刺激作用, 有助于研究受控条件下 *C. sativa* 的根系形态和根系分泌物^[77]。Noirot-Gros 等^[78]设计了一种根与微生物相互作用芯片 (root-microbe interaction chip, RMI-chip), 美洲山杨 (*Populus tremuloides*) 幼苗可在此装置中生长一个多月, 从而可在显微镜下连续观察其活根和根瘤菌之间的相互作用。RMI-chip 可用于长时间观察缓慢生长的植物, 也可以被设计修改以研究生长较快的植物。



改编自Suwanchaikasem等(2022), 经知识共享CC BY许可^[77]。

图5 显示内部生长有工业大麻的完整的Root-TRAPR 系统图片(a和b)

2.4 植物花粉管的研究

花粉管是植物形态发生、细胞分化、生物力学、细胞内和细胞间信号传递等研究的重要模型。为了系统地了解花粉管中尖端极化生长的生化力学, 需要一个通用的实验分析平台来进行定量数据的收集和分析。LoC 可将大量生长的花粉管定位在一个聚焦平面上, 从而实现高分辨率的显微镜定量成像, 因此可作为一个通用的高通量表型组学平台, 以花粉管为模型进行植物的生殖和发育生物学研究^[79-80]。为了研究电场对花粉管生长的影响并创造可重复的实验条件, Agudelo 等^[81]开发了一种电气实验室芯片 (electrical lab-on-chip, ELoC), 发现在不同的交流电频率下, 花粉管的生长反应与生长介质的电导率相关。顶端生长的植物细胞力学性能研究通常涉及细胞顶端区域的膨压和硬度的测量^[82]。人们研制了一种用于百合 (*Lilium longiflorum*) 花粉管生物力学特性定量测量的 LoC 装置。单个花粉管以特定方向固定在微流控芯片内, 并受到软膜的压缩, 通过比较模拟外载荷 (压缩率) 下花粉管的变形和膨胀压力对管径 (拉伸比) 的影响, 确定花粉管的力学性能。随着花粉管初始直径的增大, 花粉管膨胀压力和壁刚度明显减小, 由此表明尖端生长是由膨胀压力和壁面刚度之间的微妙平衡所调节的。LoC 装置是模块化的, 适用于各种表现出尖端生长的细胞, 可直接测量其机械性能^[83]。也有研究人员开发了一种名为 TipChip 的微流控装置来研究花粉管的穿透

力^[84]。一些花粉管生长方向的改变表明它们能够感知局部质子梯度并对其作出反应,并且生长速度与尖端区域的细胞外 pH 值直接相关。Hu 等^[85]设计了一种微电极装置,通过水电解产生局部质子梯度和质子通量,证实了花粉管细胞质 pH 随环境 pH 的变化而变化。微电极方法提供了一种简单的方法来产生质子,并研究它们对植物细胞生长的影响。在植物体内,尖端生长的植物细胞需要克服一系列物理障碍,Yanagisawa 等^[86]开发了一种用于尖端生长的植物细胞的生长室,可在限制条件下对细胞行为进行可视化。利用该实验平台,研究人员观察了花粉管穿过微间隙时的形态变化,捕捉到了花粉管中荧光标记的营养细胞核和精子细胞形状的动态变化,探究了根毛和苔藓原体穿透 1 μm 缝隙的能力。该平台可用于研究单个细胞对受限物理空间的反应,并为尖端生长机制研究提供新思路。

3 展望

微流控技术为植物研究提供了一种全新的方法,具有微量、高效、自动化等优点,在植物细胞培养、植物基因表达分析、植物代谢物分析和植物生理过程研究等方面具有广阔的应用前景。然而,微流控技术在植物研究中仍面临着一些挑战:第一,植物细胞和组织的复杂性给微流控芯片的设计和制造带来了困难,需要更加精细和针对性的设计;第二,将植物样本引入微流控系统并保持其活性和生理状态并非易事;第三,技术的成本较高以及专业知识和技能的要求也限制了其更广泛的应用。这些挑战都是在未来的研究中需要克服的。

微流控技术与成像技术、传感器技术等融合,将进一步提升其在植物研究中的应用价值。通过与基因编辑等现代生物技术相结合,微流控技术或许能够为植物品种改良和农业可持续发展提供新的研究思路和方法。微流控芯片技术具有试剂消耗少、检测速度快、检测通量高、操作简便等优势,可针对某种植物或植物产品中的所有危险性有害生物开展高通量检测,有十分广阔的发展空间和应用前景。未来可能会开发出更多针对植物研究的专用微流控芯片,从而实现对植物生理过程更全面、更深入的分析。

[参 考 文 献]

[1] 王伟轩,孙静弈,刘伟娜,等.微流控芯片在植物细胞研究中的应用进展.生物技术通报,2016,32: 19-29

- [2] 王一淳,卢小雨,高瑞芳,等.微流控芯片检测技术及其在植物检疫领域的应用前景展望.植物检疫,2024,38: 18-22
- [3] Scheler O, Postek W, Garstecki P. Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 55: 60-7
- [4] Busch W, Moore BT, Martsberger B, et al. A microfluidic device and computational platform for high-throughput live imaging of gene expression. *Nat Methods*, 2012, 9: 1101-6
- [5] Fendrych M, Akhmanova M, Merrin J, et al. Rapid and reversible root growth inhibition by TIR1 auxin signalling. *Nat Plants*, 2018, 4: 453-9
- [6] Guichard M, Bertran Garcia de Olalla E, Stanley CE, et al. Microfluidic systems for plant root imaging. *Methods Cell Biol*, 2020, 160: 381-404
- [7] Jiang H, Xu Z, Aluru MR, et al. Plant chip for high-throughput phenotyping of *Arabidopsis*. *Lab Chip*, 2014, 14: 1281-93
- [8] Massalha H, Korenblum E, Malitsky S, et al. Live imaging of root-bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 4549-54
- [9] Parashar A, Pandey S. Plant-in-chip: microfluidic system for studying root growth and pathogenic interactions in *Arabidopsis*. *Appl Phys Lett*, 2011, 98: 263703
- [10] Aufrecht JA, Ryan JM, Hasim S, et al. Imaging the root hair morphology of *Arabidopsis* seedlings in a two-layer microfluidic platform. *J Vis Exp*, 2017, 126: 55971
- [11] Sun L, Liu L, Lin X, et al. Microfluidic devices for monitoring the root morphology of *Arabidopsis thaliana* *in situ*. *Anal Sci*, 2021, 37: 605-11
- [12] Stanley CE, Shrivastava J, Brugman R, et al. Fabrication and use of the dual-flow-RootChip for the imaging of *Arabidopsis* roots in asymmetric microenvironments. *Bio Protoc*, 2018, 8: e3010
- [13] McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21: 27-40
- [14] Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298: 580-4
- [15] Convery N, Gadegaard N. 30 years of microfluidics. *Micro Nano Eng*, 2019, 2: 76-91
- [16] 林炳承,罗勇,刘婷姣,等.器官芯片[M].北京:科学出版社,2019: 3-338
- [17] Ho CM, Ng SH, Li KH, et al. 3D printed microfluidics for biological applications. *Lab Chip*, 2015, 15: 3627-37
- [18] Bhattacharjee N, Urrios A, Kang S, et al. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab Chip*, 2016, 16: 1720-42
- [19] Battat S, Weitz DA, Whitesides GM. An outlook on microfluidics: the promise and the challenge. *Lab Chip*, 2022, 22: 530-6
- [20] Comina G, Suska A, Filippini D. Low cost lab-on-a-chip prototyping with a consumer grade 3D printer. *Lab Chip*, 2014, 14: 2978-82
- [21] Helal SH, Seder I, Téllez RC, et al. Metabolic engineering on a 3D-printed microfluidic platform: a new

- approach for modular co-metabolic pathways. *Chem Eng J*, 2024, 484: 149318
- [22] Hung M, Chang J. Developing microfluidics for rapid protoplasts collection and lysis from plant leaf. *Proc Inst Mech Eng N*, 2012, 226: 15-22
- [23] Ko JM, Ju J, Lee S, et al. Tobacco protoplast culture in a polydimethylsiloxane-based microfluidic channel. *Protoplasma*, 2006, 227: 237-40
- [24] Seidel T, Artmann PJ, Gkekakos I, et al. Microfluidic single-cell study on *Arabidopsis thaliana* protoplast fusion-new insights on timescales and reversibilities. *Plants (Basel)*, 2024, 13: 295
- [25] Bascom CS Jr, Wu SZ, Nelson K, et al. Long-term growth of moss in microfluidic devices enables subcellular studies in development. *Plant Physiol*, 2016, 172: 28-37
- [26] Zaban B, Liu W, Jiang X, et al. Plant cells use auxin efflux to explore geometry. *Sci Rep*, 2014, 4: 5852
- [27] Song H, Wang Y, Rosano JM, et al. A microfluidic impedance flow cytometer for identification of differentiation state of stem cells. *Lab Chip*, 2013, 13: 2300-10
- [28] Kumar PT, Toffalini F, Witters D, et al. Digital microfluidic chip technology for water permeability measurements on single isolated plant protoplasts. *Sensor Actuat B Chem*, 2014, 199: 479-87
- [29] 朱晓翠, 徐安沁, 苏昕, 等. 微流控阵列芯片上植物单细胞内3'核酸外切酶的荧光成像检测. *分析科学学报*, 2014, 30: 662-6
- [30] 张潇丹, 徐溢, 张涛, 等. 基于阵列微流控细胞芯片的植物组分抗氧化活性分析. *分析化学*, 2016, 44: 604-9
- [31] Sakai K, Charlot F, Le Saux T, et al. Design of a comprehensive microfluidic and microscopic toolbox for the ultra-wide spatio-temporal study of plant protoplasts development and physiology. *Plant Methods*, 2019, 15: 79
- [32] Xu SZ, Sun ZH, Liu LL, et al. The cell wall regeneration of tobacco protoplasts based on microfluidic system. *Processes*, 2022, 10: 2507
- [33] Han Z, Chen L, Zhang S, et al. Label-free and simultaneous mechanical and electrical characterization of single plant cells using microfluidic impedance flow cytometry. *Anal Chem*, 2020, 92: 14568-75
- [34] Chen L, Han Z, Fan X, et al. An impedance-coupled microfluidic device for single-cell analysis of primary cell wall regeneration. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112374
- [35] Maisch J, Kreppenhof K, Büchler S, et al. Time-resolved NMR metabolomics of plant cells based on a microfluidic chip. *J Plant Physiol*, 2016, 200: 28-34
- [36] Finkbeiner T, Manz C, Raorane ML, et al. A modular microfluidic bioreactor to investigate plant cell-cell interactions. *Protoplasma*, 2021, 259: 173-86
- [37] Shimizu K, Kawakatsu Y, Kurotani KI, et al. Development of microfluidic chip for entrapping tobacco BY-2 cells. *PLoS One*, 2022, 17: e0266982
- [38] Kurotani KI, Kawakatsu Y, Kikkawa M, et al. Analysis of plasmodesmata permeability using cultured tobacco BY-2 cells entrapped in microfluidic chips. *J Plant Res*, 2022, 135: 693-701
- [39] Patabadige DEW, Millet LJ, Aufrecht JA, et al. Label-free time- and space-resolved exometabolite sampling of growing plant roots through nanoporous interfaces. *Sci Rep*, 2019, 9: 10272
- [40] Koman VB, Lew TTS, Wong MH, et al. Persistent drought monitoring using a microfluidic-printed electro-mechanical sensor of stomata in planta. *Lab Chip*, 2017, 17: 4015-24
- [41] Haling RE, Brown LK, Bengough AG, et al. Root hairs improve root penetration, root-soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. *J Exp Bot*, 2013, 64: 3711-21
- [42] Pereira D, Alline T, Singh G, et al. A microfluidic-like system (MLS) to grow, image, and quantitatively characterize rigidity sensing by plant's roots and root hair cells. *Methods Mol Biol*, 2023, 2600: 121-31
- [43] Grossmann G, Guo WJ, Ehrhardt DW, et al. The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science. *Plant Cell*, 2011, 23: 4234-40
- [44] Zhu D, Hou L, Xiao P, et al. VvWRKY30, a grape WRKY transcription factor, plays a positive regulatory role under salinity stress. *Plant Sci*, 2019, 280: 132-42
- [45] Clark RT, MacCurdy RB, Jung JK, et al. Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software platform. *Plant Physiol*, 2011, 156: 455-65
- [46] Shi H, Kim Y, Guo Y, et al. The *Arabidopsis* SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell*, 2003, 15: 19-32
- [47] Busch J, Mendelsohn IA, Lorenzen B, et al. A rhizotron to study root growth under flooded conditions tested with two wetland Cyperaceae. *Flora*, 2006, 201: 429-39
- [48] Jin KM, Shen JB, Ashton RW, et al. Wheat root growth responses to horizontal stratification of fertiliser in a water-limited environment. *Plant Soil*, 2015, 386: 77-88
- [49] Song ZX, Chai HH, Chen F, et al. A foldable chip array for the continuous investigation of seed germination and the subsequent root development of seedlings. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10: 884
- [50] Park YH, Lee N, Choi G, et al. Plant array chip for the germination and growth screening of *Arabidopsis thaliana*. *Lab Chip*, 2017, 17: 3071-7
- [51] Singh G, Pereira D, Baudrey S, et al. Real-time tracking of root hair nucleus morphodynamics using a microfluidic approach. *Plant J*, 2021, 108: 303-13
- [52] Xu W, Ding G, Yokawa K, et al. An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 2013, 3: 1273
- [53] Cabrera J, Conesa CM, Del Pozo JC. May the dark be with roots: a perspective on how root illumination may bias *in vitro* research on plant-environment interactions. *New Phytol*, 2022, 233: 1988-97
- [54] Silva-Navas J, Moreno-Risueno MA, Manzano C, et al. D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *Plant J*, 2015, 84: 244-55
- [55] Grossmann G, Meier M, Cartwright HN, et al. Time-lapse

- fluorescence imaging of *Arabidopsis* root growth with rapid manipulation of the root environment using the RootChip. *J Vis Exp*, 2012, 65: 4290
- [56] Lanquar V, Grossmann G, Vinkenborg JL, et al. Dynamic imaging of cytosolic zinc in *Arabidopsis* roots combining FRET sensors and RootChip technology. *New Phytol*, 2014, 202: 198-208
- [57] Chai HH, Chen F, Zhang SJ, et al. Multi-chamber petaloid root-growth chip for the non-destructive study of the development and physiology of the fibrous root system of *Oryza sativa*. *Lab Chip*, 2019, 19: 2383-93
- [58] Dai H, Wu B, Chen B, et al. Diel fluctuation of extracellular reactive oxygen species production in the rhizosphere of rice. *Environ Sci Technol*, 2022, 56: 9075-82
- [59] Moussus M, Meier M. A 3D-printed *Arabidopsis thaliana* root imaging platform. *Lab Chip*, 2021, 21: 2557-64
- [60] Shaposhnikov AI, Belimov AA, Azarova TS. The relationship between the composition of root exudates and the efficiency of interaction of wheat plants with microorganisms. *Appl Biochem Microbiol*, 2023, 59: 330-43
- [61] Englert DL, Manson MD, Jayaraman A. A microfluidic device for quantifying bacterial chemotaxis in stable concentration gradients. *J Vis Exp*, 2010, 38: 1779
- [62] 陈登博, 付玉明, 冯佳界. 基于微流控的植物根部-微生物相互作用研究进展. *载人航天*, 2022, 28: 845-52
- [63] Meier M, Lucchetta EM, Ismagilov RF. Chemical stimulation of the *Arabidopsis thaliana* root using multi-laminar flow on a microfluidic chip. *Lab Chip*, 2010, 10: 2147-53
- [64] Stanley CE, Grossmann G, Solvas XC, et al. Soil-on-a-chip: microfluidic platforms for environmental organismal studies. *Lab Chip*, 2016, 16: 622
- [65] Mafra-Endara PM, Arellano-Cacedo C, Aleklett K, et al. Microfluidic chips provide visual access to *in situ* soil ecology. *Commun Biol*, 2021, 4: 889
- [66] Kaiser CF, Perilli A, Grossmann G, et al. Studying root-environment interactions in structured microdevices. *J Exp Bot*, 2023, 74: 3851-63
- [67] 洪炎, 王乐, 王儒敬, 等. 用于土壤中氮钾含量快速测定的非接触电导微流控芯片. *智慧农业(中英文)*, 2024, 6: 18-27
- [68] Aufrecht JA, Timm CM, Bible A, et al. Quantifying the spatiotemporal dynamics of plant root colonization by beneficial bacteria in a microfluidic habitat. *Adv Biosyst*, 2018, 2: 1800048
- [69] Aufrecht J, Khalid M, Walton CL, et al. Hotspots of root-exuded amino acids are created within a rhizosphere-on-a-chip. *Lab Chip*, 2022, 22: 954-63
- [70] Canarini A, Kaiser C, Merchant A, et al. Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 420
- [71] Patko D, Gunatilake UB, Dupuy LX, et al. Spatial and temporal detection of root exudates with a paper-based microfluidic device. *Soil Biol Biochem*, 2024, 197: 109532
- [72] Massalha H, Korenblum E, Shapiro OH, et al. Tracking root interactions system (TRIS) experiment and quality control. *Bio Protoc*, 2019, 9: e3211
- [73] Poole P. Shining a light on the dark world of plant root-microbe interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 4281-3
- [74] Stanley CE, Shrivastava J, Brugman R, et al. Dual-flow-RootChip reveals local adaptations of roots towards environmental asymmetry at the physiological and genetic levels. *New Phytol*, 2018, 217: 1357-69
- [75] Gao J, Sasse J, Lewald KM, et al. Ecosystem fabrication (EcoFAB) protocols for the construction of laboratory ecosystems designed to study plant-microbe interactions. *J Vis Exp*, 2018, 134: 57170
- [76] Jabusch LK, Kim PW, Chiniquy D, et al. Microfabrication of a chamber for high-resolution, *in situ* imaging of the whole root for plant-microbe interactions. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 7880
- [77] Suwanchaikasem P, Idnurm A, Selby-Pham J, et al. Root-TRAPR: a modular plant growth device to visualize root development and monitor growth parameters, as applied to an elicitor response of *Cannabis sativa*. *Plant Methods*, 2022, 18: 46
- [78] Noirot-Gros MF, Shinde SV, Akins C, et al. Functional imaging of microbial interactions with tree roots using a microfluidics setup. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 408
- [79] Ghanbari M, Nezhad AS, Agudelo CG, et al. Microfluidic positioning of pollen grains in lab-on-a-chip for single cell analysis. *J Biosci Bioeng*, 2014, 117: 504-11
- [80] Shamsudhin N, Laeubli N, Atakan HB, et al. Massively parallelized pollen tube guidance and mechanical measurements on a lab-on-a-chip platform. *PLoS One*, 2016, 11: e0168138
- [81] Agudelo C, Packirisamy M, Geitmann A. Influence of electric fields and conductivity on pollen tube growth assessed via electrical lab-on-chip. *Sci Rep*, 2016, 6: 19812
- [82] Yanagisawa N, Sugimoto N, Arata H, et al. Capability of tip-growing plant cells to penetrate into extremely narrow gaps. *Sci Rep*, 2017, 7: 1403
- [83] Hu C, Munglani G, Vogler H, et al. Characterization of size-dependent mechanical properties of tip-growing cells using a lab-on-chip device. *Lab Chip*, 2016, 17: 82-90
- [84] Wang X, Jiang H, Wang Y, et al. Generation of temperature gradient on microfluidic plant chip for high-throughput plant phenotyping[C]. 2017 IEEE 12th International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS), Los Angeles, CA, USA, 2017: 309-401
- [85] Hu C, Vogler H, Aellen M, et al. High precision, localized proton gradients and fluxes generated by a microelectrode device induce differential growth behaviors of pollen tubes. *Lab Chip*, 2017, 17: 671-80
- [86] Yanagisawa N, Sugimoto N, Higashiyama T, et al. Development of microfluidic devices to study the elongation capability of tip-growing plant cells in extremely small spaces. *J Vis Exp*, 2018, 135: 57262