

· 专题论坛 ·

光学透明技术在植物多尺度成像中的应用

马灵玉^{1,3†}, 祁晓红^{1†}, 胡子建^{1,2}, 沈微微^{1,2}, 王广超^{1,2}, 张柏林^{1,2,4}
张曦^{1,2,4*}, 林金星^{1,2,4*}

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²北京林业大学树木与基因编辑研究院, 北京 100083; ³中国林业科学研究院木材工业研究所, 北京 100091; ⁴北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 北京 100083

摘要 光学透明技术是一种通过各种化学试剂, 将原本不透明的生物样本实现透明化, 并在光学显微镜下深度成像的技术。结合多种光学显微成像新技术, 光学透明技术可对整个组织进行成像和三维重建, 深度剖析生物体内部空间特征与形成机制。近年来, 多种植物光学透明技术和多尺度成像技术被陆续研发, 并取得了丰硕的研究成果。该文综述了生物体光学透明技术的基本原理和一些新技术, 重点介绍基于光学透明技术开发的新型成像方法及其在植物成像与细胞生物学中的应用, 为后续植物整体、组织或器官的透明、成像与三维重构及功能研究提供理论依据和技术支持。

关键词 植物整体透明, 多尺度成像, 光学透明技术, 三维重构

马灵玉, 祁晓红, 胡子建, 沈微微, 王广超, 张柏林, 张曦, 林金星 (2022). 光学透明技术在植物多尺度成像中的应用. 植物学报 57, 98–110.

植物细胞是构成植物体结构并赋予其功能的基本单位。植物细胞本身的光学不透明特性使观察植物体及其内部组织器官受到极大限制。近年来, 为了探究植物体及其内部特定组织或细胞的三维结构(three-dimensional structure)并进行拓扑分析(topological analysis), 许多新型处理方法和成像技术应运而生(Zhang et al., 2020, 2021)。切片法是较为传统的观察植物结构的方法, 但组织切片技术费时费力, 且在切片过程中极易破坏样本的完整性和亚细胞结构的连续性, 从而导致部分细胞内容信息缺失, 影响三维重构的结果。为了保持植物体及内部组织三维结构和信息的完整性, 实现对整个植物体内器官与细胞的位置、形态、拓扑参数和发育等信息的综合分析, 光学透明技术(optical clearing technology)和三维成像联用成为一种理想的解决方案。

光学透明技术是指使用1种或几种试剂组成的混合液, 通过浸泡、电泳或灌注等处理方式, 使生物体内部组织和器官达到视觉下或光学仪器下透明的组织学技术, 因而亦称组织光学透明技术(tissue opti-

cal clearing technology) (Richardson and Lichtman, 2015; 王培新等, 2016; Ueda et al., 2020)。随着光学透明技术的发展, 可被透明的样品类型不断增加, 体积不断增大, 从原有的整体组织水平逐步发展到整体生物水平(Susaki and Ueda, 2016)。该技术的应用为实现生物体研究从二维到三维的突破提供了有力的支持。在过去的几年里, 光学透明技术研究取得了巨大进展, 并已实现对生物体的活体观察。特别是随着光片层荧光显微技术(light-sheet fluorescence microscopy, LSM)和膨胀显微技术(expansion microscopy)的迅速发展, 作为样品制备的关键步骤, 透明技术也得到了改进和广泛应用。本文将综述光学透明技术的概念与原理以及现有的透明技术, 重点论述植物光学透明技术及多种基于植物光学透明的新型成像技术在植物细胞生物学中的应用。

1 光学透明技术的原理

组织不透明由光散射和光吸收引起(Johnsen and Wid-

收稿日期: 2021-10-11; 接受日期: 2022-01-13

基金项目: 国家自然科学基金(No.32000558, No.32030010)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: zhangxi@bjfu.edu.cn; linjx@ibcas.ac.cn

der, 1999; Tuchin, 2015)。由于光的散射和吸收等因素, 生物体及其内部组织大部分不具有透明特性。光散射主要是由于生物体内不同成分折射率(refractive index, RI)各异(如水、蛋白质、脂质、细胞器和无机盐的折射率分别为1.33、1.43、1.44、1.38–1.41和1.55)造成的。血红素、脂褐素和黑色素对光的吸收能力强, 从而进一步造成组织不透明(Horecker, 1943; Weissleder, 2001; Seo et al., 2016)。植物细胞壁的折射率(1.42)接近于玻璃的折射率(1.52), 而玻璃与液泡的折射率(约1.36)差异显著, 正是由于球差和光散射导致植物组织与器官的不透明。在植物的绿色组织和地下部分的细胞中, 由于色素和自发荧光的存在, 进一步导致明场和荧光显微镜图像质量下降。光学透明技术的发展, 使得致密和大体积的样本甚至整体植株, 在不使用切片的情况下不仅可以获得大样本的三维成像, 还可以全面了解器官发生的细胞机制, 从多尺度定量分析组织的形态发生(Kierzkowski and Routier-Kierzkowska, 2019)。因此, 研究者常对细胞组分的散射特性进行改变, 提高样品的透明度(Richardson and Lichtman, 2015)。为了达到生物样本光学透明的目的, 可以采用化学或物理方法消除元素的散射或遮挡的光线, 如将样本浸入指定的匹配液中, 以获得均匀的内部折射率匹配。经过透明化处理的生物样本, 即使在几毫米深的组织部位也能获得高质量的图像(Jing et al., 2019)。综上所述, 光学透明的方法旨在使组织内部的光散射和光吸收最小化。

生物组织光学透明技术是将完整的不透明生物组织或整体经过单种或者多种生化试剂混合溶液处理后, 获得高透明生物组织样本的方法(图1A) (李亚敏等, 2017)。光学透明的原理是使用1种或多种试剂分解消化组织或细胞中的内含物, 使得不透明器官和组织在三维成像中可视化, 从而获取更多不同维度的生物学信息。常用的透明方法包括有机溶剂法、水溶剂法和水凝胶包埋等。光学透明应实现内源性吸收物质的去除和组织内RI的均一化, 且不丢失或破坏感兴趣的分子, 使得能够在毫米到厘米的尺度上以微米和纳米分辨率提取详细的三维结构和分子信息。组织光学透明过程通常包括组织固定、溶液渗透、脱色及RI匹配4个步骤(Tainaka et al., 2016)。

2 常用的光学透明技术

光学透明技术在神经科学领域应用较早, 旨在识别和分析生物体细胞的神经连接。研究者使用荧光标记并结合光学显微镜进行脑神经成像, 但组织不透明成为细胞层面高分辨成像的技术障碍。为了解决高分辨成像难题而开发的多种光学透明方法将光学透明技术与荧光蛋白和小分子标记成像相结合, 通过快速体积成像和高效的图像处理方法, 可获得全面的单细胞分辨率数据。根据此前报道的技术, 可以将光学透明方法分为3大类, 即基于有机溶剂、基于水溶剂以及基于水凝胶的光学透明技术(Jing et al., 2019)。

2.1 基于有机溶剂的光学透明技术

有机溶剂通常具有高脂溶解能力和高折射率(RI=1.5)的特点, 可使处理样品快速透明化(Vigouroux et al., 2017)。Becker等(2012)对BABB (benzyl alcohol/benzyl benzoate)法的脱水和折射率匹配进行改进, 并发明了DBE (dibenzyl ether)法, 保留了大部分绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的含量(Dodt et al., 2007)。在DBE的基础上开发的3DISCO (three-dimensional imaging of solvent-cleared organs)技术(Ertürk and Bradke, 2013), 以及在3DISCO基础上改良的uDISCO (ultimate three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) (Pan et al., 2016)、iDISCO (immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs) (Renier et al., 2014; Belle et al., 2017)和vDISCO (nanobody (V_HH)-boosted three-dimensional imaging of solvent-cleared organs)法(Cai et al., 2019)进一步提高了样品的透明效率, 然而脱水引起的组织收缩降低了成像真实性。Klingberg等(2017)使用3-苯基-2-烯酸乙酯(肉桂酸乙酯(ethyl cinnamate, ECi)开发了一种在保持荧光蛋白稳定性的同时实现样品脱水以及RI匹配的新型透明方法, 但荧光持续时间短。此外, Jing等(2018)使用的PEGASOS (polyethylene glycol (PEG)-associated solvent system)透明法可使样品在透明介质中保存数周, 但容易引起组织收缩。

基于有机溶剂的透明技术相对稳定, 可用于多种不同类型的组织。然而, 使用的有机溶剂大多具有毒

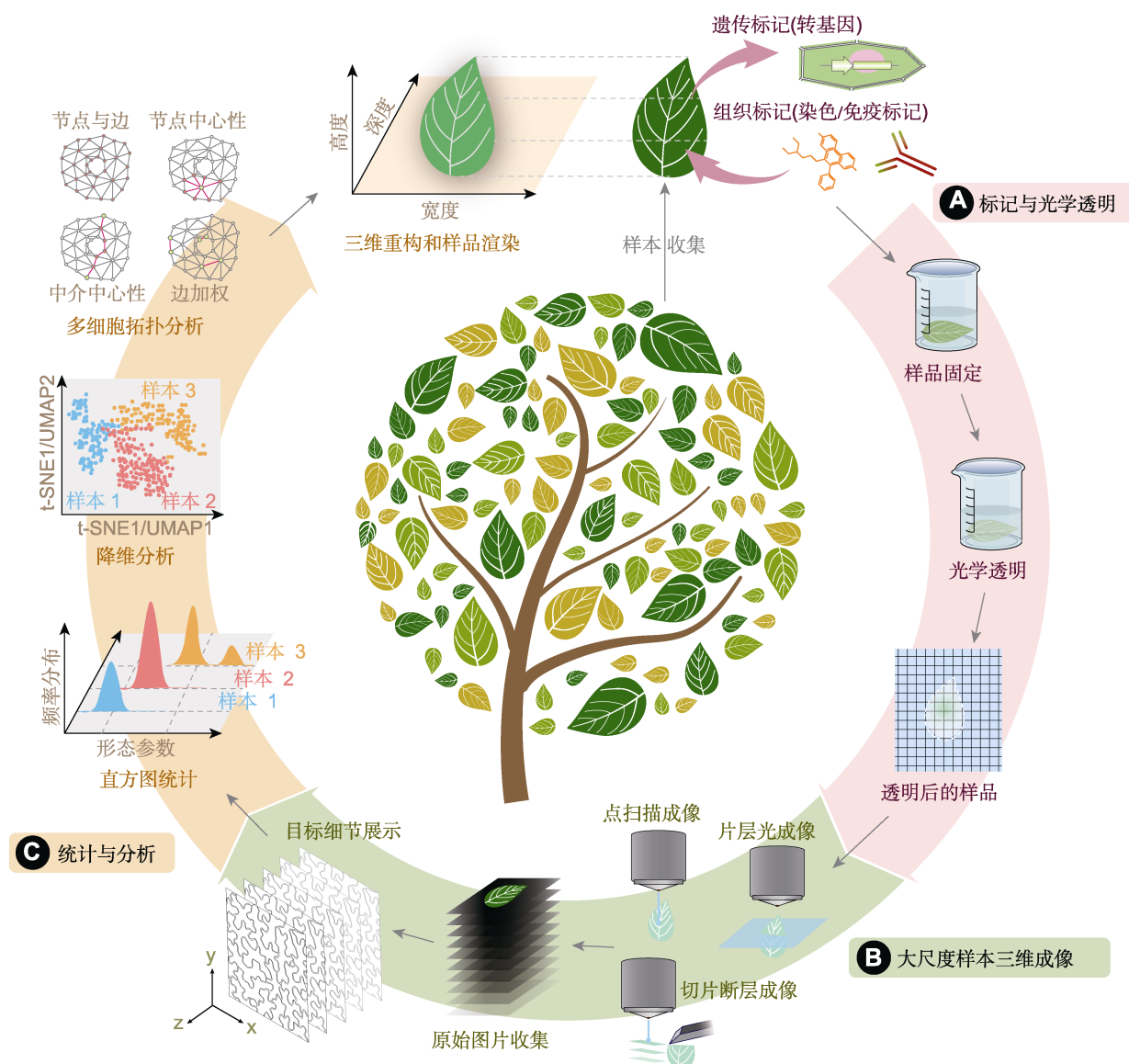


图1 植物样本光学透明、三维(3D)成像和数据分析流程

(A) 植物样本的标记与光学透明, 植物样本的标记主要分为遗传标记(转基因)和组织标记(免疫标记和染料染色); **(B)** 光学透明后的植物样本3D成像, 可借助光片层荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜和连续切片断层扫描等方法, 收集连续光学切片的原始图像后, 即可获取目标三维图像信息; **(C)** 植物样本三维信息统计分析主要包括感兴趣参数的直方图统计、降维分析(UMAP和t-SNE)和多细胞网络拓扑分析

Figure 1 Workflow of optical clearing, three-dimensional (3D) imaging and statistical analysis of plant sample

(A) Labeling and optical clearing of plant sample, mainly including genetic labeling (transgene) and histological labeling (immunolabeling and dyeing); **(B)** 3D imaging of optical cleared plant sample, 3D imaging mainly depends on light-sheet fluorescence microscopy, laser scanning confocal microscopy and serial section tomography, after raw images collection of serial optical sections, 3D images of interest target are displayed; **(C)** Statistical analysis of plant sample after 3D reconstruction, mainly containing histogram statistics of interest parameters, dimension reduction analysis (uniform manifold approximation and projection (UMAP) and t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE)) and topological analysis of a multicellular network

性, 脱水过程中组织收缩严重, 以及导致荧光蛋白淬灭, 限制了有机溶剂透明方法的使用, 降低了其利用率(Becker et al., 2012)。

2.2 基于水溶剂的光学透明技术

许多基于有机溶剂的透明技术应用受限, 原因是无法保持荧光蛋白的成像效果以及组织结构的变化(主要

是脱水引起的组织收缩)。而将水溶剂作为透明溶液可以减少处理样品过程中发生的形变,并防止样品荧光信号的淬灭。因此,许多研究人员试图用水溶剂代替有机溶剂,以获得更好的成像效果。

Hama等(2011, 2015)先后开发了Scale和ScaleS透明法,为免疫化学标记和三维信号呈现提供稳定的组织保存途径。此外,Clear^T及改良的Clear^{T2}技术在透明样品的同时可有效保持蛋白质荧光信号、免疫组织化学标记和染料标记的荧光信号,组织形变较小,而且透明时间较短,透明效率更高(Kuwajima et al., 2013)。为了更好地保留组织形态,开发出SeeDB (see deep brain)、SeeDB2以及改进的FRUIT (fructose and urea induced transparency)法,使样品的光散射和球差都达到最小,增加了样品的成像深度,推动了生物高分辨成像研究(Ke et al., 2013, 2016; Hou et al., 2015)。此外,为了增加骨骼样品的透明度而发展起来的CUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis)系列方法具有透明度高和保持内源性荧光的优势,但在成像过程中水分可能会蒸发,从而降低组织的透明度并产生沉淀(Kubota et al., 2017; Tainaka et al., 2018)。

2.3 基于水凝胶的光学透明技术

为了增强样品的透明度及保留荧光信号,研究人员通过增加独特的水凝胶包埋步骤,以保护蛋白质免受恶劣的化学或电处理。水凝胶包埋法将完整的生物组织转化为一种混合形式,组织成分被清除并用外源元素替换,以增强接近性、功能性和清晰度。这样处理有助于快速提取解剖投影信息,对许多生物科学研究至关重要(Mombaerts et al., 1996; Petersen, 2007)。

清晰脂质交换丙烯酰胺杂交精细成像相容性组织水凝胶(clear lipid-exchanged acrylamide-hybridized rigid imaging-compatible tissue hydrogel, CLARITY)是一种新开发的技术,脂双层被更为坚硬和多孔的水凝胶物质所取代,既易保存,又能提供可获取的结构和分子信息,进而用于组织的可视化和分析(Chung and Deisseroth, 2013)。使用基于CLARITY法改进的PACT (passive CLARITY technique)法可获得透明度更高的样品,但是透明效率较低,且会出现严重的组织膨胀(Richardson and Lichtman, 2015;

Treweek et al., 2015; Pan et al., 2016)。

水凝胶法可对较大体积的生物系统(如整个成年小鼠(*Mus musculus*)大脑)进行分子和光学观察,解决了对大组织样品成像的难题。水凝胶法结合光镜可用于快速获取完整组织的精细结构和细节,同时在样品的制备过程中能保留全部结构信息。

3 新型植物光学透明方法

植物是光学显微镜下研究细胞机制和细胞功能的理想生物。全面揭示植物形态发生的分子和细胞机制,其前提是获得不同发育阶段整个器官的可靠三维信息。具有完整细胞分辨率的3D模型,是多尺度定量分析形态发生的先决条件(Kierzkowski and Routier-Kierzkowska, 2019; Sapala et al., 2019)。然而,大多数植物器官对光不透明,这阻碍了植物组织内部的高分辨率成像。为了观察植物内部结构,样品在成像前可通过机械切片法或使用透明剂进行处理。切片费时费力,并且由于结构的损失以及三维重建前对序列图像进行配准和对齐,导致样本三维结构不准确。透明技术作为一种快速制样和观察的手段,在植物细胞结构研究中得到广泛应用。植物光学透明技术不仅大大减少了切片所需的人力物力,而且便于获得整个组织的三维图像。

20世纪后期,植物科学领域已有多种透明技术的相关报道,如甘油透明法、冬青油透明法(Gardner, 1975)和4¹/₂复合透明剂法(Herr, 1971; Smith, 1973; Kenrick et al., 1986)。限于篇幅,曾在教科书中介绍过的方法,本文不再赘述。本文主要介绍近年来新兴的几种在光片层荧光显微技术和膨胀显微技术研究使用的透明方法,如PEA (plant-enzyme-assisted)-CLARITY法、ClearSee和CUBIC法。

3.1 PEA-CLARITY透明法

众所周知,植物细胞壁主要由纤维素、半纤维素、木质素和果胶等组成,60 kDa以上的分子难以穿越细胞壁。免疫组化实验中常用的IgG抗体的分子量约为150 kDa,因此无法穿透细胞壁,严重制约了免疫组化技术在植物样本中的应用。PEA-CLARITY即植物酶辅助的CLARITY透明技术,通过使用细胞壁降解酶增加壁的通透性,以及用淀粉水解酶减少淀粉颗粒

的光学干扰,克服了植物因存在细胞壁而造成的渗透和成像限制。结合水凝胶固定、组织透明和酶处理,该技术可将荧光蛋白以及抗体标记到整个完整的组织中,且能够保持细胞结构的高度完整性。对荧光蛋白和抗体进行深度光学可视化后,无需对材料进行任何切片即可获取完整组织中蛋白质或基因的三维定位。此外,在固定和透明过程中,由于去除脂质、叶绿素和其它色素,用该技术可显著提高叶片组织的透明度。同时,PEA-CLARITY透明技术也存在局限性,如糖含量较高的组织在长时间透明过程中可能出现褐变现象,酶处理后的组织更加脆弱,GFP等荧光蛋白的信号会减弱。此外,该方法处理周期较长,通常需要4–6周才能完成样本透明(Palmer et al., 2015)。

3.2 ClearSee透明法

为了解细胞排列随基因表达而改变的规律,发育生物学面临的重要挑战是在细胞水平上对完整组织中基因表达的三维形态进行可视化,对荧光蛋白标记的组织进行荧光成像可用于揭示基因在亚细胞水平上的表达。然而,由于植物组织中含有多种自发荧光的化合物,因此很难在完整的植物组织中观察到这种荧光蛋白,这导致背景图片中有强烈的非特异性荧光。由于细胞内部叶绿素和其它细胞组分均对光有不同程度的吸收作用,因此难以对植物组织进行深度成像。

ClearSee是将木糖醇粉末、脱氧胆酸钠和尿素混合在水中制成透明试剂并用于简单浸泡的一种光学透明方法。ClearSee透明法使固定的植物组织透明化,实现植物样本深度成像。ClearSee在保持荧光蛋白活性的同时,也降低了叶绿素自发荧光,打破了植物组织由于叶绿素存在而造成的成像障碍。因此,研究人员可使用ClearSee进行多色成像,并获得植物样本中精确的三维结构和特定的基因表达模式(Kurihara et al., 2015)。

3.3 TOMEI透明法

近些年新发展起来的透明植物器官成像方法TOMEI (transparent plant organ method for imaging)凭借其周期短(在3–6小时完成)及成像深度强等优势应用于多种植物器官中。TOMEI法主要包括固定和硫二甘醇(2,2'-thiodiethanol, TDE)处理2个步骤。TDE是一种水溶性低黏度液体,通过水溶液稀释调节折射率的范

围。最初它是一种用于超分辨率显微镜的安装介质(Staudt et al., 2007),也可用于透明大组织样品(Aoyagi et al., 2015; Costantini et al., 2015)。在使用TDE法制备脑组织透明样品的过程中,发现硫二甘醇溶液的浓度越高,其折射率越高,样品越透明,但是荧光信号也越容易淬灭。值得注意的是,动物组织样品在97%硫二甘醇溶液中浸泡1–2天后体积变得非常小(Aoyagi et al., 2015)。而在植物组织中,用97% TDE处理不会导致植物器官的收缩或膨胀,植物器官可能因细胞壁的刚性而显示出对高浓度TDE的耐受性。此外,使用TDE法短时间内制备完成的植物透明样品,在成像时发生荧光淬灭的现象减少(Hasegawa et al., 2016)。此后,为了观察转基因花药中3种不同荧光蛋白的表达,Musielak等(2016)将花药组织固定过夜,并在70% TDE和10%甘油中过夜处理。经观察发现花药未发生明显的组织变形,所有3个荧光基团几乎不受TDE的影响。这种透明法使花粉成像更清晰,可清晰地检测到着丝粒的定位。TDE法通过使用水溶液温和处理样品,可保持样品的荧光强度,这种快速的透明方法不仅缩短了实验周期,而且处理后样品体积变小,可获得更加准确的多细胞三维空间信息。

3.4 其它方法

在实验过程中,通常不止使用1种透明方法或者试剂,需要将2种或多种试剂(表1)结合起来,达到最优的透明效果。三氯乙醛和甘油均属于非损伤性透明剂,可使浸泡后的组织和细胞在不同的光学平面上显示出来,且不破坏或基本保留细胞或组织成分,但透明效果相对较差(付金娥等, 2017)。研究发现,使用氢氧化钠和饱和水合三氯乙醛可获得比单独使用1种透明试剂更好的透明效果(Shih et al., 1983; 谢兆森等, 2018)。

值得关注的是,Shih等(1983)使用不同浓度的氢氧化钠、乳酸、脂质和蛋白质水解酶、水合氯醛、甲苯及各种脂质溶剂对种子进行处理,研发出一种改进的氢氧化钠-水合氯醛法,可用于清除枫树(*Acer palmatum*)胚中储存的脂肪、蛋白质和淀粉等,并成功应用于油菜(*Brassica rapa*)、西瓜(*Citrullus vulgaris*)及向日葵(*Helianthus annuus*)等油脂贮藏量高的种胚透明。

表1 不同生物光学透明技术的比较

Table 1 Comparison of clearing techniques in different organisms

透明方法	主要成分	作用	优点	缺点	应用	参考文献
3DISCO	四氢呋喃和二氯甲烷	脱水和脱脂	透明效果好, 荧光蛋白保存良好	试剂有毒性, 组织易萎缩	鼠脑, 小鼠脊髓、肺和脾, 免疫器官, 肿瘤组织	Ertürk and Bradke, 2013
CUBIC	四乙酸	脱色	操作简单, 透明效率高, 可重复性强	时间较长	小鼠组织	Tainaka et al., 2014; Susaki et al., 2015; Susaki and Ueda, 2016
CLARITY	水凝胶	组织灌注	透明效果好	操作复杂, 组织易褐化	鼠脑	Treweek et al., 2015
TDE	硫二甘醇	RI匹配	简单快速, 组织变形、体积变小	荧光蛋白易淬灭	鼠脑和拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)种子	Staudt et al., 2007; Aoyagi et al., 2015; Musielak et al., 2016
强碱	氢氧化钠和氢氧化钾	脱脂和除蛋白	操作简单, 成本低, 透明效率高	组织损伤较大	黄花蒿(<i>Artemisia annua</i>)叶片和葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)叶片	付金娥等, 2017; 谢兆森等, 2018
PEA-CLARITY	细胞壁降解酶	水解酶类	透明效果好	操作复杂, 组织易褐化	拟南芥叶片和烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)叶片	Palmer et al., 2015
ClearSee	木糖醇、脱氧胆酸钠和尿素	折射率(RI)匹配	保持荧光蛋白稳定性, 减少叶绿体自发荧光	时间较长	拟南芥幼苗、叶片和雌蕊	Kurihara et al., 2015; Slattery et al., 2016

4 植物光学透明技术及其应用

植物体由于有细胞壁和叶绿体等特殊组分, 导致光学透明技术在植物中的应用面临很大挑战。动物光学透明技术和三维重构技术的发展也促进了植物光学透明和三维重建的发展。利用光学透明技术, 可在不破坏整体结构的情况下多角度观察植物体内部结构(图1B)。近年来, 植物光学透明技术在植物组织器官、整体植株、膨胀技术以及植物多尺度成像领域得到了广泛应用, 逐渐成为植物细胞生物学和发育生物学的研究热点(Timmers, 2016)。

4.1 在整体植株可视化和成像研究中的应用

大多数植物研究都建立在整体植株的水平上。研究者筛选了24种包括多元醇、亲水性试剂以及传统透明溶液作为备选的透明试剂, 通过评估这些化合物在固定后的叶片中清除叶绿素自发荧光的效率, 进一步探究筛选合适的透明试剂。此外, 结合荧光的稳定性和淬灭程度, 使用筛选出的几种透明试剂处理整株拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗, 以PBS (phosphate buffer solution)处理后的幼苗作为对照, 通过对比发现, ClearSee是最适合拟南芥幼苗整体透明的光学透明试剂。使用ClearSee溶液对拟南芥幼苗透明后染色, 用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning con-

focal microscope, LSCM)观察, 发现韧皮部清晰可见。从亚细胞到整个植物体维管系统的功能研究, 有助于揭示植物体内水分和营养物质的运输以及信号的传递机制(Kurihara et al., 2015)。

4.2 在植物组织器官可视化和成像研究中的应用

植物具有开放的发育模式, 能够适应环境而进行细胞分裂, 包括分生组织中干细胞的重新分化, 形成新的多细胞器官。光学透明技术的建立有助于探究植物组织和器官内部的细胞类型及其相互作用。Wuyts等(2010)对不同时期的拟南芥叶片作透明处理后, 用激光共聚焦显微镜和多光子显微镜对叶片进行光学切片成像, 叶片细胞的三维可视化揭示了植物组织和细胞的相互作用。Truernit等(2008)将拟南芥材料透明化以后, 对野生型和突变体的韧皮部细胞进行了详细检测和比较。他们发现, 在韧皮部发育突变体中, 一类具有韧皮部和木质部混合特征的细胞由最初正常分化的原韧皮部细胞发展而来。这一发现为探究韧皮部发育以及维管组织的三维成像开辟了新的途径。有研究者采用整体透明法处理植物叶片, 观察并探究了气孔的形态特征和生长发育规律(付金娥等, 2017; 谢兆森等, 2018)。此外, 前人大多使用冬青油(即水杨酸甲酯)对花粉进行透明处理以进行后续研究(杨弘

远, 1988; 李国平等, 2006)。此后, 随着透明方法的改进, 有研究者尝试使用不同的透明方法对花器官, 如悬铃叶苧麻(*Boehmeria tricuspidis*)的雌花(李彦坤等, 2011)、苏门白茛草(*Conyza sumatrensis*)的花序(郝建华和强胜, 2007)、水稻(*Oryza sativa*)的胚囊(郭海滨等, 2006)、大麦(*Hordeum vulgare*)的胚珠(Wilkinson and Tucker, 2017)、水稻和小麦(*Triticum aestivum*)的子房(杜中等, 1995)进行透明处理及染色观察, 为揭示植物胚胎发育和生殖发生过程奠定了基础, 也进一步完善了整体透明技术在植物中的应用。

4.3 在植物膨胀技术研究中的应用

膨胀技术是一种比较新颖的超分辨率成像方法, 它利用可膨胀的水凝胶增加生物样品中各向同性荧光基团之间的物理距离。膨胀技术包括免疫染色、锚定、聚合、均质化、膨胀、成像和验证等步骤。膨胀显微技术有诸多优势: (1) 花费相对较低, 可在传统显微镜上实现; (2) 对操作技术要求不高, 任何受过显微镜和生物实验室技术基础训练的人均可使用; (3) 可对常规的荧光基团进行多色成像, 不需要特殊的光物理性质(Truckenbrodt et al., 2019)。实验中使用聚丙烯酰胺凝胶包埋样品后, 经吸水膨胀, 凝胶内部99%的组分均为水, 样品及凝胶均近乎透明, 光折射系数基本一致, 可用于共聚焦和光片层显微镜成像。膨胀技术已广泛应用于多种组织中, 如斑马鱼(*Brachydanio rerio*)和果蝇(*Drosophila melanogaster*)(Cahoon et al., 2017; Freifeld et al., 2017)。通过分离大麦细胞核并扩大至4.2倍, 使用宽场显微镜显示扩大后的胞核和核仁保存完好, 还检测到未膨胀细胞核中不可见的染色质结构域。通过扩大细胞核, Kubalová等(2020)使用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测到着丝粒重复序列, 通过间接免疫染色发现着丝粒特异性组蛋白H3变体CENH3。此外, Kao和Nodine (2019)优化了膨胀显微技术, 用于拟南芥胚珠和种子的免疫染色, 在第1次细胞分裂之前检测到受精卵中活性转录的标记。他们通过进一步研究发现这种活性转录在受精卵和早期胚胎中是必需的。

4.4 在植物多尺度成像和拓扑研究中的应用

植物体由一系列不同空间尺度(宏观-介观-微观)的组

分构成, 自微观水平的氨基酸或蛋白质、小囊泡或细胞器、单细胞, 到介观水平的多细胞组织和器官, 再到宏观上的整个植物体。植物能够通过细胞分裂、分生组织的新生和分化形成新的多细胞器官。因此, 获取植物在多个时空尺度上的连通性定量信息, 对于揭示植物生物过程的机制具有重要意义(Zhu and Roeder, 2020; Zhang et al., 2021)。其中, 光片层荧光显微镜在多细胞活体生物成像研究中取得了重大突破, 使得介观尺度的研究达到了高精度高分辨率水平(Duran-Nebreda and Bassel, 2017)。光片层荧光显微技术(LSFM)是一种光学切片技术, 具有较小的光漂白和光毒性, 而且具有较高的空间分辨率。结合光学透明技术, LSFM为植物和动物的快速、无损检测和生理过程的长期成像开辟了新的途径(Ovečka et al., 2018)。基于LSFM的活体成像技术越来越多地被用于拟南芥根部发育过程研究, 其使用的荧光蛋白可以特异性标记亚细胞组分或细胞器, 如细胞核(Novák et al., 2016)、内体(Berson et al., 2014)、微管(Maizel et al., 2011; Vyplelová et al., 2017)或质膜(Lucas et al., 2013; von Wangenheim et al., 2016), 也可以对拟南芥其它器官进行成像, 如侧根、下胚轴和子叶(Ovečka et al., 2015; von Wangenheim et al., 2017)。大型样品仓的改进为较大体积的样品提供了更多的成像机会。例如, Vyplelová等(2017)对荧光标记微管结构域的苜蓿(*Medicago sativa*)根尖进行LSFM实时成像, 探讨了微管排列在有丝分裂过程中的动态模式, 发现根的生长速率与细胞分裂密切相关。因此, LSFM结合光学透明技术为各类组织成像提供了便利。由于LSFM是一种快速成像及图像采集重构技术, 能够以合适的横向和轴向分辨率捕获大体积样品的所有层面图像, 并通过图像处理分析工具进行重构, 最终得到包含原样品所有原始数据的三维重构模型(图1B)。因此, LSFM非常适合拟南芥以及其它植物的实时成像, 并且有助于揭示植物的发育过程(Ovečka et al., 2018)。

5 研究展望

植物由大量不同尺度的元件构成, 从小分子成分、亚细胞组分、多细胞结构到组织器官架构。这些多尺度元件相互联系, 构成复杂的网络并赋予植物高阶功能(Zhang et al., 2021)。20世纪以来, 科研工作者对植

物及其组织的解剖、胚胎发育、细胞(亚细胞)结构与功能方面的探索,为深入认识植物形态及发育奠定了坚实的基础。蛋白标记与成像示踪等细胞生物学技术促进了功能遗传学的发展。植物形态结构解析结合基因标记可视化研究为植物发育和功能探索带来了技术变革。然而,早期的研究大多仅针对某一特定时期、某一平面结构的形态观察,往往不能满足多尺度特别是大尺度植物样本的研究需求。例如,传统组织切片技术对样品造成不可逆的破坏,获取图像数据为单一层面,最终导致样品整体水平的生物学信息不够全面。同时,大量尚未建立成熟遗传转化体系的植物难以进行荧光标记与定性定量分析,严重制约了植物样本的基因可视化与功能遗传学研究。

植物样品不同尺度的三维形态特征可提供丰富的数据资源,有助于深入探索植物复杂的解剖结构、网络连接及其功能。近年来,许多三维重构技术的开发与应用促进了细胞学和发育生物学研究,成为细胞生物学的热点领域之一(Gualda et al., 2014)。经典形态学与发育生物学研究结合3D成像,将进一步揭示植物形态与结构的形成机制。基于LSCM断层扫描的植物形态三维重构和细胞拓扑网络分析已成功应用于模式植物拟南芥的结构与发育研究(Duran-Nebreda and Bassel, 2017)。拥有大尺寸样品仓和快速光片层荧光扫描的LSFM技术则更适合多尺度植物及其内部组分的三维重构与定量分析。随着样品尺寸的增大,植物大体积成像对光学透明技术的需求也愈发迫切。

尽管已有多种透明方法成功应用于植物组织和器官的成像及其功能研究,但现有透明方法应用于大体积样品的整体透明、标记与三维成像等方面仍存在巨大挑战。(1) 较为剧烈的透明方案可去除细胞内大部分光不透明成分,获得高度透明样本,后期结合细胞壁特异性染料或抗体进行荧光标记或免疫标记,可实现大体积样本内细胞形态与结构分布的荧光示踪。但剧烈的透明化处理可能造成细胞内结构和成分被严重破坏,难以对亚细胞组分和结构进行标记和后续分析。(2) 对于已有遗传转化体系且含有荧光标记的植物样本,可以采用温和透明方法进行透明化处理后进行三维可视化成像,但样本体积过大仍会降低组织内部深处荧光信号的强度和对比度。(3) 对于尚未建立遗传转化体系的植物样本,可以利用抗体免疫标记的方法进行目标物标记与成像,但仍需根据成像内容

和目的选择合适的透明方法,防止过度透明化造成目标物丢失。(4) 通过物理、化学和材料科学等多学科交叉融合的方法对透明试剂配方与透明流程进行优化,特别是针对不同植物及其组织组开展个性化分析探索,有助于进一步优化透明效果和提升后期成像质量。(5) 植物的果实和种子等致密大组织材料内糖类、淀粉和脂质等含量较多,透明方法仍需要进一步优化。(6) 理想情况下,植物活体成像对于探究其功能至关重要,现有的透明方案在一定程度上均会造成样本活性降低甚至死亡,因此大体积植物样本活体动态研究仍是一大挑战。综上,研究者需根据研究目的并按照组织适用性、透明效果和荧光保存效率等标准来选择最合适的透明方法。

基于相邻细胞间的不变性而建立的拓扑结构分析,为复杂的三维器官细胞相互作用网络提供了简化研究手段(Montenegro-Johnson et al., 2015)。通过细胞水平成像和拓扑学分析,使得组织器官中的细胞相互作用网络能够根据细胞类型进行提取和注释,实现局部复杂构型和高阶多层次特性的同时分析(Bassel, 2019)。多尺度三维成像技术获取的大量细胞和组织三维网络数据配合拓扑分析手段,将进一步推动植物发育过程中的三维时空信息研究(图1C) (Jackson et al., 2017)。此外, t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding)和UMAP (uniform manifold approximation and projection)等降维技术是多细胞参数等高通量数据分析的有力工具,可用于二维或三维的低维空间中表示高维数据集,并应用于细胞形态和组织架构参数等高通量信息的降维可视化(图1C) (Jo et al., 2021; Vergara et al., 2021)。截至目前,对于大尺度植物组织器官参数的高通量分析手段仍较少,还需开发更强大的标记、成像和数据分析工具来拓展光学透明方法的应用。

综上所述,除技术和流程有待提高与优化,植物光学透明技术还有诸多不利因素限制其广泛应用。例如,透明的样本不易在透明试剂中长期保存,透明效果较好的有机溶剂通常毒性较高。尽管许多挑战亟待攻克,但现有的光学透明技术仍为植物样本多尺度多维成像与分析提供了关键的样品制备技术基础。展望未来,大尺度活体生物样品多模态成像的需求日益迫切,面向更长工作距离、更高分辨率、更快成像速度及更高信噪比的新型成像技术也在推陈出新,不断优

化,这将有助于突破植物细胞壁对大尺度植物样品活体成像的阻碍,为推进植物活体细胞结构和细胞动力学特征的研究提供更多契机(Tainaka et al., 2014)。

参考文献

- 杜中, 赵世绪, 周海鹰, 王莉莉 (1995). 用微分干涉差显微镜和子房整体透明法观察水稻和小麦的胚囊结构. 农业生物技术学报 **3**(4), 94–97.
- 付金娥, 黎颖菁, 韦树根, 潘丽梅, 胡风云, 童婷婷 (2017). 叶片气孔保卫细胞周长用于鉴定黄花蒿倍性的研究. 北方园艺 (6), 156–161.
- 郭海滨, 卢永根, 冯九焕, 杨秉耀, 刘向东 (2006). 利用激光扫描共聚焦显微镜对同源四倍体水稻胚囊形成与发育的进一步观察. 激光生物学报 **15**, 111–117.
- 郝建华, 强胜 (2007). 整体透明技术在植物生物学中的应用实例及其剖析. 植物学通报 **24**, 490–497.
- 李国平, 黄群策, 秦广雍 (2006). 用激光扫描共聚焦显微镜观察雪花花粉和花粉管. 激光生物学报 **15**, 1–8.
- 李亚敏, 薛成志, 李贵叶, 胡章立, 阮双琛, 陈玲玲 (2017). 生物组织光学透明技术研究进展. 生物学杂志 **34**, 83–88.
- 李彦坤, 臧巩固, 赵立宁, 李育君, 唐靖, 程超华 (2011). 整体透明技术观察悬铃木苎麻胚胎发育的方法研究. 中国麻业科学 **33**, 142–146.
- 王培新, 张丹, 尚爱加, 侯冰 (2016). 组织透明技术. 神经解剖学杂志 **32**, 124–128.
- 谢兆森, 杜鸿儒, 李建宝, Bondada B (2018). 组织透明法观察葡萄叶片生长过程中气孔与叶脉形态结构特征变化. 植物生理学报 **54**, 237–246.
- 杨弘远 (1988). 植物胚胎学中的整体透明技术. 植物学通报 **5**, 114–116.
- Aoyagi Y, Kawakami R, Osanai H, Hibi T, Nemoto T (2015). A rapid optical clearing protocol using 2,2'-thiodiethanol for microscopic observation of fixed mouse brain. *PLoS One* **10**, e0116280.
- Bassel GW (2019). Multicellular systems biology: quantifying cellular patterning and function in plant organs using network science. *Mol Plant* **12**, 731–742.
- Becker K, Jährling N, Saghaei S, Weiler R, Dodt HU (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One* **7**, e33916.
- Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, Chedotal A (2017). Tridimensional visualization and analysis of early human development. *Cell* **169**, 161–173.
- Berson T, von Wangenheim D, Takáč T, Šamajová O, Rosero A, Ovečka M, Komis G, Stelzer EHK, Šamaj J (2014). Trans-Golgi network localized small GTPase Rab-A1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biol* **14**, 252.
- Cahoon CK, Yu ZL, Wang YF, Guo FL, Unruh JR, Slaughter BD, Hawley RS (2017). Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the *Drosophila* synaptonemal complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E6857–E6866.
- Cai RY, Pan CC, Ghasemigharagoz A, Todorov MI, Förster B, Zhao S, Bhatia HS, Parra-Damas A, Mrowka L, Theodorou D, Rempfler M, Xavier ALR, Kress BT, Benakis C, Steinke H, Liebscher S, Bechmann I, Liesz A, Menze B, Kerschensteiner M, Nedergaard M, Ertürk A (2019). Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections. *Nat Neurosci* **22**, 317–327.
- Chung K, Deisseroth K (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nat Methods* **10**, 508–513.
- Costantini I, Ghobril JP, Di Giovanna AP, Mascaro ALA, Silvestri L, Müllenbroich MC, Onofri L, Conti V, Vanzi F, Sacconi L, Guerrini R, Markram H, Iannello G, Pavone FS (2015). A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. *Sci Rep* **5**, 9808.
- Dodt HU, Leischner U, Schierloh A, Jährling N, Mauch CP, Deininger K, Deussing JM, Eder M, Ziegglängsberger W, Becker K (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* **4**, 331–336.
- Duran-Nebreda S, Bassel GW (2017). Bridging scales in plant biology using network science. *Trends Plant Sci* **22**, 1001–1003.
- Ertürk A, Bradke F (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Exp Neurol* **242**, 57–64.
- Freifeld L, Odstrčil I, Förster D, Ramirez A, Gagnon JA, Randlett O, Costa EK, Asano S, Celiker OT, Gao RX, Martin-Alarcon DA, Reginato P, Dick C, Chen LL, Schoppik D, Engert F, Baier H, Boyden ES (2017). Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E10799–E10808.
- Gardner RO (1975). An overview of botanical clearing technique. *Stain Technol* **50**, 99–105.
- Gualda E, Moreno N, Tomancak P, Martins GG (2014). Going 'open' with Mesoscopy: a new dimension on multi-

- view imaging. *Protoplasma* **251**, 363–372.
- Hama H, Hioki H, Namiki K, Hoshida T, Kurokawa H, Ishidate F, Kaneko T, Akagi T, Saito T, Saido T, Miyawaki A (2015). ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat Neurosci* **18**, 1518–1529.
- Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H, Fukami K, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* **14**, 1481–1488.
- Hasegawa J, Sakamoto Y, Nakagami S, Aida M, Sawa S, Matsunaga S (2016). Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. *Plant Cell Physiol* **57**, 462–472.
- Herr JM (1971). A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms. *Am J Bot* **58**, 785–790.
- Horecker BL (1943). The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near infra-red regions. *J Biol Chem* **148**, 173–183.
- Hou B, Zhang D, Zhao S, Wei MP, Yang ZF, Wang SX, Wang JR, Zhang X, Liu B, Fan LZ, Li Y, Qiu ZL, Zhang C, Jiang TZ (2015). Scalable and Dil-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Front Neuroanat* **9**, 19.
- Jackson MDB, Xu H, Duran-Nebreda S, Stamm P, Bassel GW (2017). Topological analysis of multicellular complexity in the plant hypocotyl. *eLife* **6**, e26023.
- Jing D, Yi Y, Luo W, Zhang S, Yuan Q, Wang J, Lachika E, Zhao Z, Zhao H (2019). Tissue clearing and its application to bone and dental tissues. *J Dent Res* **98**, 621–631.
- Jing D, Zhang SW, Luo WJ, Gao XF, Men Y, Ma C, Liu XH, Yi YT, Bugde A, Zhou BO, Zhao ZH, Yuan Q, Feng JQ, Gao L, Ge WP, Zhao H (2018). Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res* **28**, 803–818.
- Jo Y, Cho H, Park WS, Kim G, Ryu D, Kim YS, Lee M, Park S, Lee MJ, Joo H, Jo H, Lee S, Lee S, Min HS, Heo WD, Park Y (2021). Label-free multiplexed microtomography of endogenous subcellular dynamics using generalizable deep learning. *Nat Cell Biol* **23**, 1329–1337.
- Johnsen S, Widder EA (1999). The physical basis of transparency in biological tissue: ultrastructure and the minimization of light scattering. *J Theor Biol* **199**, 181–198.
- Kao P, Nodine MD (2019). Transcriptional activation of *Arabidopsis* zygotes is required for initial cell divisions. *Sci Rep* **9**, 17159.
- Ke MT, Fujimoto S, Imai T (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* **16**, 1154–1161.
- Ke MT, Nakai Y, Fujimoto S, Takayama R, Yoshida S, Kitajima TS, Sato M, Imai T (2016). Super-resolution mapping of neuronal circuitry with an index-optimized clearing agent. *Cell Rep* **14**, 2718–2732.
- Kenrick J, Kaul V, Williams EG (1986). Self-incompatibility in *Acacia retinodes*: site of pollen-tube arrest is the nucellus. *Planta* **169**, 245–250.
- Kierzkowski D, Routier-Kierzkowska AL (2019). Cellular basis of growth in plants: geometry matters. *Curr Opin Plant Biol* **47**, 56–63.
- Klingberg A, Hasenberg A, Ludwig-Portugall I, Medyukhina A, Männ L, Brenzel A, Engel DR, Figge MT, Kurts C, Gunzer M (2017). Fully automated evaluation of total glomerular number and capillary tuft size in nephritic kidneys using lightsheet microscopy. *J Am Soc Nephrol* **28**, 452–459.
- Kubalová I, Černohorská MS, Huranová M, Weisshart K, Houben A, Schubert V (2020). Prospects and limitations of expansion microscopy in chromatin ultrastructure determination. *Chromosome Res* **28**, 355–368.
- Kubota SI, Takahashi K, Nishida J, Morishita Y, Ehata S, Tainaka K, Miyazono K, Ueda HR (2017). Whole-body profiling of cancer metastasis with single-cell resolution. *Cell Rep* **20**, 236–250.
- Kurihara D, Mizuta Y, Sato Y, Higashiyama T (2015). ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* **142**, 4168–4179.
- Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C (2013). Clear^T: a detergent-and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* **140**, 1364–1368.
- Lucas M, Kenobi K, von Wangenheim D, Voß U, Swarup K, De Smet I, Van Damme D, Lawrence T, Péret B, Moscardi E, Barbeau D, Godin C, Salt D, Guyomarc'h S, Stelzer EHK, Maizel A, Laplace L, Bennett MJ (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 5229–5234.
- Maizel A, von Wangenheim D, Federici F, Haseloff J, Stelzer EHK (2011). High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *Plant J* **68**, 377–385.
- Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J, Axel R (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* **87**, 675–686.

- Montenegro-Johnson TD, Stamm P, Strauss S, Topham AT, Tsagris M, Wood ATA, Smith RS, Bassel GW** (2015). Digital single-cell analysis of plant organ development using 3DCellAtlas. *Plant Cell* **27**, 1018–1033.
- Musielak TJ, Slane D, Liebig C, Bayer M** (2016). A versatile optical clearing protocol for deep tissue imaging of fluorescent proteins in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **11**, e0161107.
- Novák D, Kucharova A, Ovečka M, Komis G, Šamaj J** (2016). Developmental nuclear localization and quantification of GFP-tagged EB1c in *Arabidopsis* root using light-sheet microscopy. *Front Plant Sci* **6**, 1187.
- Ovečka M, Vaškebová L, Komis G, Luptovčíak I, Smertenko A, Šamaj J** (2015). Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nat Protoc* **10**, 1234–1247.
- Ovečka M, von Wangenheim D, Tomančák P, Šamajová O, Komis G, Šamaj J** (2018). Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy. *Nat Plants* **4**, 639–650.
- Palmer WM, Martin AP, Flynn JR, Reed SL, White RG, Furbank RT, Grof CPL** (2015). PEA-CLARITY: 3D molecular imaging of whole plant organs. *Sci Rep* **5**, 13492.
- Pan CC, Cai RY, Quacquarelli FP, Ghasemigharagoz A, Lourbopoulos A, Matryba P, Plesnila N, Dichgans M, Hellal F, Ertürk A** (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat Methods* **13**, 859–867.
- Petersen CCH** (2007). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron* **56**, 339–355.
- Renier N, Wu ZH, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M** (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* **159**, 896–910.
- Richardson DS, Lichtman JW** (2015). Clarifying tissue clearing. *Cell* **162**, 246–257.
- Sapala A, Runions A, Smith RS** (2019). Mechanics, geometry and genetics of epidermal cell shape regulation: different pieces of the same puzzle. *Curr Opin Plant Biol* **47**, 1–8.
- Seo J, Choe M, Kim SY** (2016). Clearing and labeling techniques for large-scale biological tissues. *Mol Cells* **39**, 439–446.
- Shih CY, Peterson CA, Dumbroff EB** (1983). A clearing technique for embryos of lipid-storing seeds. *Can J Bot* **61**, 551–555.
- Slaterry RA, Grennan AK, Sivaguru M, Sozzani R, Ort DR** (2016). Light sheet microscopy reveals more gradual light attenuation in light-green versus dark-green soybean leaves. *J Exp Bot* **67**, 4697–4709.
- Smith BB** (1973). The use of a new clearing technique for the study of early ovule development, megasporogenesis, and megagametogenesis in five species of *Cornus* L. *Am J Bot* **60**, 322–338.
- Staudt T, Lang MC, Medda R, Engelhardt J, Hell SW** (2007). 2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microsc Res Tech* **70**, 1–9.
- Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR** (2015). Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc* **10**, 1709–1727.
- Susaki EA, Ueda HR** (2016). Whole-body and whole-organ clearing and imaging techniques with single-cell resolution: toward organism-level systems biology in mammals. *Cell Chem Biol* **23**, 137–157.
- Tainaka K, Kubota SI, Suyama TQ, Susaki EA, Perrin D, Ukai-Tadenuma M, Ukai H, Ueda HR** (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell* **159**, 911–924.
- Tainaka K, Kuno A, Kubota SI, Murakami T, Ueda HR** (2016). Chemical principles in tissue clearing and staining protocols for whole-body cell profiling. *Annu Rev Cell Dev Biol* **32**, 713–741.
- Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR** (2018). Chemical landscape for tissue clearing based on hydrophilic reagents. *Cell Rep* **24**, 2196–2210.
- Timmers ACJ** (2016). Light microscopy of whole plant organs. *J Microsc* **263**, 165–170.
- Treweek JB, Chan KY, Flytzanis NC, Yang B, Deverman BE, Greenbaum A, Lignell A, Xiao C, Cai L, Ladinsky MS, Bjorkman PJ, Fowlkes CC, Gradinaru V** (2015). Whole-body tissue stabilization and selective extractions via tissue-hydrogel hybrids for high-resolution intact circuit mapping and phenotyping. *Nat Protoc* **10**, 1860–1896.
- Truckenbrodt S, Sommer C, Rizzoli SO, Danzl JG** (2019). A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat Protoc* **14**, 832–863.
- Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, Grandjean O, Runions J, Barthélémy J, Palauqui JC** (2008). High-resolution

- whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 1494–1503.
- Tuchin VV** (2015). Tissue optics and photonics: light-tissue interaction. *J Biomed Photonics Eng* **1**, 98–134.
- Ueda HR, Ertürk A, Chung K, Gradinaru V, Chédotal A, Tomancak P, Keller PJ** (2020). Tissue clearing and its applications in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* **21**, 61–79.
- Vergara HM, Pape C, Meechan KI, Zinchenko V, Genoud C, Wanner AA, Mutemi KN, Titze B, Templin RM, Bertucci PY, Simakov O, Dürichen W, Machado P, Savage EL, Schermelleh L, Schwab Y, Friedrich RW, Kreshuk A, Tischer C, Arendt D** (2021). Whole-body integration of gene expression and single-cell morphology. *Cell* **184**, 4819–4837.
- Vigouroux RJ, Belle M, Chédotal A** (2017). Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing. *Mol Brain* **10**, 33.
- von Wangenheim D, Fangerau J, Schmitz A, Smith RS, Leitte H, Stelzer EHK, Maizel A** (2016). Rules and self-organizing properties of post-embryonic plant organ cell division patterns. *Curr Biol* **26**, 439–449.
- von Wangenheim D, Hauschild R, Friml J** (2017). Light sheet fluorescence microscopy of plant roots growing on the surface of a gel. *J Vis Exp* (119), e55044.
- Vyplelová P, Ovečka M, Šamaj J** (2017). Alfalfa root growth rate correlates with progression of microtubules during mitosis and cytokinesis as revealed by environmental light-sheet microscopy. *Front Plant Sci* **8**, 1870.
- Weissleder R** (2001). A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* **19**, 316–317.
- Wilkinson LG, Tucker MR** (2017). An optimised clearing protocol for the quantitative assessment of sub-epidermal ovule tissues within whole cereal pistils. *Plant Methods* **13**, 67.
- Wuyts N, Palauqui JC, Conejero G, Verdeil JL, Granier C, Massonnet C** (2010). High-contrast three-dimensional imaging of the *Arabidopsis* leaf enables the analysis of cell dimensions in the epidermis and mesophyll. *Plant Methods* **6**, 17.
- Zhang X, Hu ZJ, Guo YY, Shan XY, Li XJ, Lin JX** (2020). High-efficiency procedure to characterize, segment, and quantify complex multicellularity in raw micrographs in plants. *Plant Methods* **16**, 100.
- Zhang X, Man Y, Zhuang XH, Shen JB, Zhang Y, Cui YN, Yu M, Xing JJ, Wang GC, Lian N, Hu ZJ, Ma LY, Shen WW, Yang SY, Xu HM, Bian JH, Jing YP, Li XJ, Li RL, Mao TL, Jiao YL, Sodmergen, Ren HY, Lin JX** (2021). Plant multiscale networks: charting plant connectivity by multi-level analysis and imaging techniques. *Sci China Life Sci* **64**, 1392–1422.
- Zhu MY, Roeder AH** (2020). Plants are better engineers: the complexity of plant organ morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **63**, 16–23.

Applications of Optical Clearing Technique in Multi-scale Imaging

Lingyu Ma^{1, 3†}, Xiaohong Qi^{1†}, Zijian Hu^{1, 2}, Weiwei Shen^{1, 2}, Guangchao Wang^{1, 2}
Bolin Zhang^{1, 2, 4}, Xi Zhang^{1, 2, 4*}, Jinxing Lin^{1, 2, 4*}

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Institute of Tree and Genome Editing, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ³Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; ⁴National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract The optical clearing techniques are common methods that allow biological tissues or organs to be deeply transparent and imaged under an optical microscope by processing with chemical reagents. Driven by a variety of optical microscopy technologies, the entire tissue can be imaged and reconstructed three-dimensionally (3D) using the clearing technique to deeply analyze the internal spatial characteristics and formation mechanism of biological tissues. In recent years, several optical clearing techniques and multi-scale imaging techniques have been developed and fruitful researches have been reported. This article discusses basic principles and some new techniques of optical clearing, with particular focus on new imaging methods based on optical clearing technique and their applications in plant imaging and cell biology. This review will provide theoretical basis and technical support for the subsequent research on clearing, imaging and 3D reconstruction and function of whole plants, tissues or organs.

Key words clearing of whole plant, multi-scale imaging, optical clearing technique, three-dimensional reconstruction

Ma LY, Qi XH, Hu ZJ, Shen WW, Wang GC, Zhang BL, Zhang X, Lin JX (2022). Applications of optical clearing technique in multi-scale imaging. *Chin Bull Bot* **57**, 98–110.

† These authors contributed equally to this paper

* Authors for correspondence. E-mail: zhangxi@bjfu.edu.cn; linjx@ibcas.ac.cn