

班级：整合科学综合实验课程 2

学号：2200017797

姓名：侯书洋

实验名称：拟南芥中的植物生殖发育探究

实验日期：2023 年 12 月 1 日

一. 实验目的与流程：

实验目的：

显微观察拟南芥胚珠对半体外萌发花粉管生长的吸引作用；

实验流程：

1. 利用拟南芥 ms1 雄性不育株为雌蕊柱头组织材料, LAT-GFP 植株为花粉材料, 仿照 11 月 24 日实验进行花粉管半体外萌发的实验操作；
2. 利用拟南芥 ms1 雄性不育株为胚珠材料, 在培养基上对花粉管生长进行诱导；
3. 分别在亮场、荧光场下显微观察胚珠对半体外萌发花粉管生长的诱导作用。

二. 实验原理：

(一) 拟南芥花粉管生长概要：

拟南芥的花粉是典型的三细胞花粉, 两个较小的精细胞和一个较大的营养细胞共同构成雄性生殖单位, 其中精细胞负责承载父方单倍性的遗传物质, 营养细胞为花粉管的伸长并将精细胞输送到胚囊完成双受精的过程提供物质与能量基础。

拟南芥湿柱头表面的乳突细胞粘附花粉粒后, 花粉粒发生水合作用并开始萌发生长花粉管, 花粉管在穿过柱头、花柱后进入引导组织, 随后受雌蕊引导信号的指引穿过隔膜进入子房腔并沿着珠柄生长, 最后通过珠孔进入胚珠释放精细胞完成双受精过程^[1]。

值得关注的是, 在拟南芥花粉管通向雌蕊引导组织生长的过程中会经过花柱, 而已有研究表明, 花柱除了作为连接柱头和引导组织的过渡区域, 还具有使花粉管“获能”(Competence Acquiring)的作用, 即在体外培养的条件下, 穿过雌蕊柱头和花柱组织后生长的花粉管(半体外萌发花粉管, semi vitro)相比纯体外萌发的花粉管(in vitro)在对胚珠花粉管吸引物质的响应上有非常显著的提升^[2]。拟南芥花柱对其花粉管萌发的这种作用在功能上也可类比哺乳动物受精过程中精子的获能行为。

胚珠珠孔端对获能后的花粉管有吸引作用。此外, Higashiyama 等人在 2001 年以蓝猪耳(*Torenia fournieri*)为实验材料, 利用激光切除胚囊内细胞的技术成功论证了助细胞是胚珠内分泌花粉管吸引物质的主要部位^[3]；并且此后进一步的实验研究表明, 胚珠对花粉管生长的吸引具有很强的种间特异性。

(二) 实验材料的说明：

本实验中选用 ms1 拟南芥雄性不育突变株作为母本(雌蕊柱头、花柱组织和胚珠的给体), 利用 LAT52 启动子向基因组中转入 GFP 报告基因的纯合 LAT-GFP 拟南芥植株为父本(花粉粒的给体)。其中, MS1 基因突变致使雄性不育和 LAT52 启动子转基因元件构建的原理于先前的实验报告中有所提及, 故在此不再申明。

三. 实验步骤：

1. 配置花粉培养基, 冷却、凝固后置于湿盒中临时保存；
2. 在显微操作台面上, 用解剖镊和注射器针头切取 2 至 3 个拟南芥 ms1 雄性不育株的雌蕊柱头和花柱组织, 置于花粉培养基上(注意横切面与培养基表面尽量保持贴合状态)；

^[1] 侯英楠: 拟南芥花粉管的生长调控以及胚珠接受花粉管的分子机理研究, 2014, 北京大学博士学位论文。

^[2] Palanivelu, R. & Press, D. (2006) Distinct short-range ovule signals attract or repel *Arabidopsis thaliana* pollen tubes *in vitro*. *BMC Plant Biol*, **6**, 7.

^[3] Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science*, **293**, 1480-1483.

3. 利用解剖镊挑取 LAT-GFP 转基因纯合拟南芥植株的花药, 对花粉培养基表面的雌蕊组织的柱头进行人工授粉;

4. 利用注射器针头划开 ms1 雄性不育株雌蕊的心皮组织, 沿珠柄处将胚珠从腹缝线的隔膜组织上剥离下来(注意尽量不要损伤胚珠), 挑至花粉培养基雌蕊组织的花柱侧的表面; 每个雌蕊组织的花柱侧分别挑取 2 至 3 粒胚珠;

(Noted: 注意胚珠在培养基表面摆放的方位)

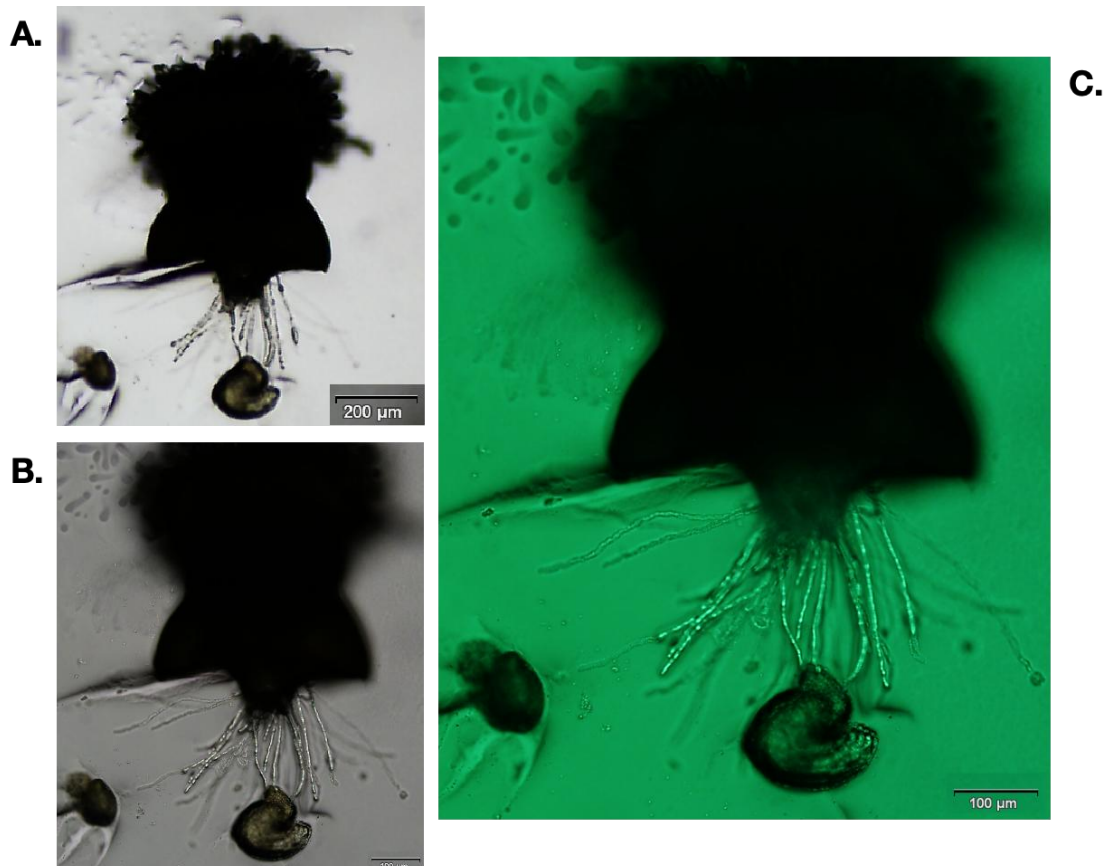
5. 将花粉培养基至于 22°C 恒温培养箱中培养 4 至 6 小时;

6. 取出花粉培养基; 利用光学显微镜, 分别在亮场和荧光场下观察培养基表面半体外萌发花粉管的生长状态, 判断胚珠对花粉管生长有无吸引作用。

四. 实验结果:

本次实验中, 个人于花粉培养基上放置了三个 ms1 雄性不育株的雌蕊柱头组织, 并且于每个雌蕊组织的花柱端放置 1-2 粒 ms1 雄性不育株雌蕊的胚珠。

如图 Pic. 1, 表征的是在亮场和 GFP 荧光场下观察其中一个雌蕊组织处的花粉管半体外萌发的形态, 其中 GFP 荧光场观察时也适当开启亮场以观测雌蕊组织的结构:

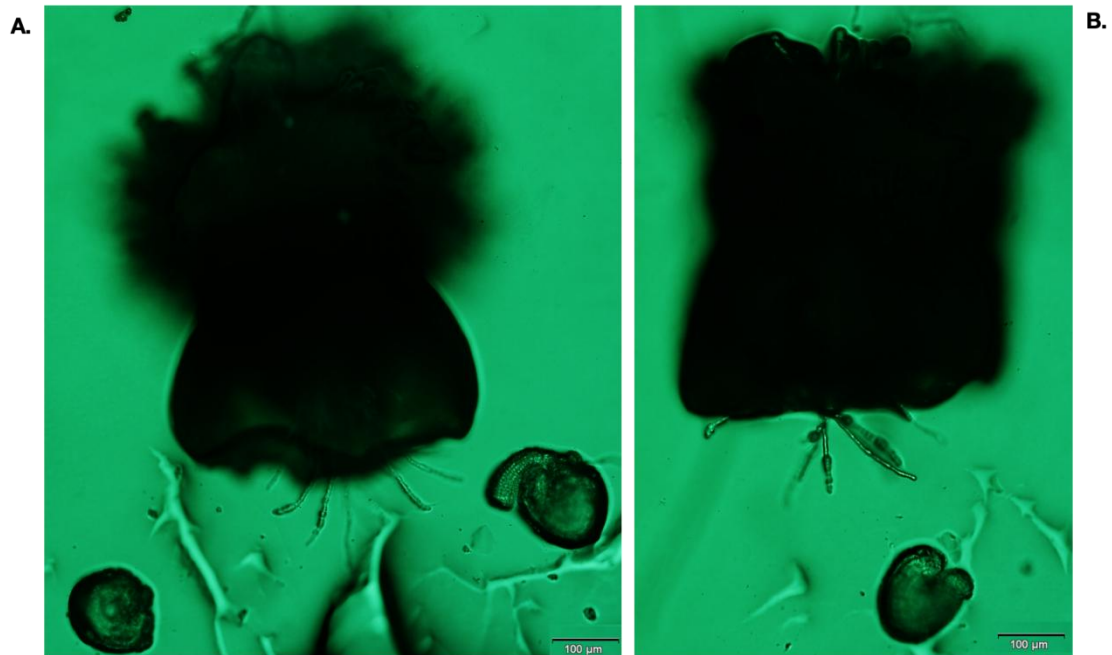


Pic. 1: 亮场和 GFP 荧光场下对实验中某特定雌蕊组织花粉管半体外生长的形态表征

(A: 亮场 x4 物镜观察 B: 亮场 x10 物镜观察 C: GFP 荧光场 x10 物镜观察)

从 Pic. 1 可观察到, 虽然 C. 中正下方胚珠的珠孔端微微有荧光亮起, 但并没有直接观察到花粉管生长进入珠孔的情景, 此胚珠珠孔端的荧光很可能是本底的荧光噪音。A. B. C. 三图中半体外萌发的花粉管表现出一定的向胚珠珠孔端生长的倾向性, 但并不明显; 此外, 和先前花粉管半体外萌发的实验观测的结果相比, 在同样的花粉培养基上半体外萌发 5 h 左右, 明显本次实验中萌生的花粉管长度短(该雌蕊柱头组织处花粉管的平均萌生长度约 100 μm , 而先前实验的平均长度约 200 μm), 生长状态并不好。

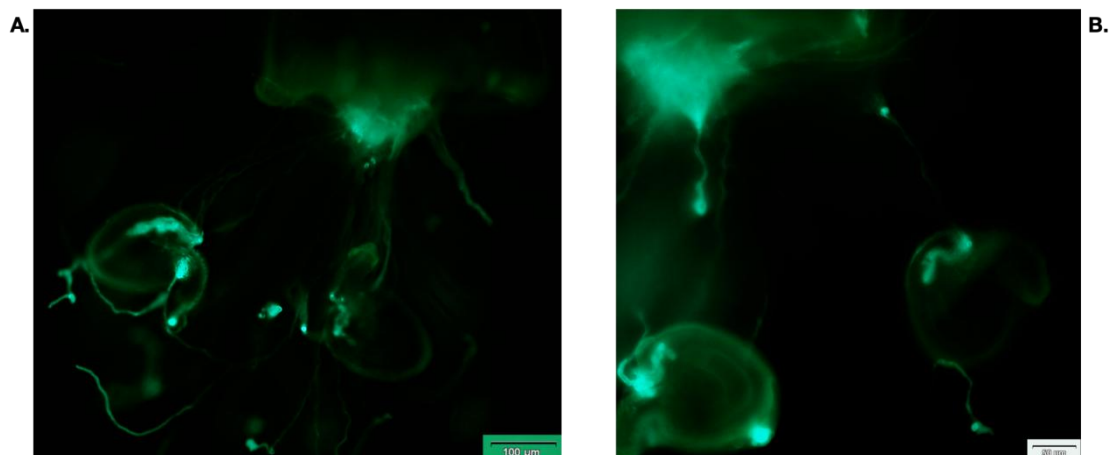
如图 Pic. 2, 表征了在 GFP 荧光场下(同样适当地开启了亮场)用 x10 物镜观察其它两个雌蕊柱头组织处花粉管半体外生长的形态:



Pic. 2: GFP 荧光场下对实验中其它两个雌蕊组织处花粉管半体外生长的形态表征
(A. B. : GFP 荧光场 x10 物镜观察)

可以看到, Pic. 2 中两个雌蕊组织处的花粉管萌生状态也不尽人意, 长度很短且花粉管直径纤细。综合 Pic.1 和 Pic. 2 两图结果以及实验操作的流程对花粉管生长情况差的原因进行剖析: 在显微观察下, 实验中所使用的雌蕊组织看不到柱头表面湿漉的表型, 柱头处的乳突细胞生长状态并不是很好, 这说明可能是在从 ms1 雄性不育株上获取的材料状态不好, 因而无法促进花粉管在其中的半体外萌生过程; 此外, 实验前也并没有先验 LAT-GFP 花粉的活力, 因此也存在着从 LAT-GFP 植株取材不当而导致花粉活性低的可能性。

下图(Pic. 3)是宋子菡学姐为了防止我们实验失败颗粒无收而为不写实验报告找借口, 和路茜学姐一起完成的模版组的显微结果, 其采用 x10、x20 物镜分别在 GFP 荧光场中观察:



Pic. 3: 高倍物镜下 GFP 荧光场中观察半体外萌发花粉管受雌蕊胚珠的吸引作用
(A: x10 物镜 GFP 荧光场观察 B: x20 物镜 GFP 荧光场观察)

Pic. 3 图 A. B.中均可以很清晰地观察到生长的花粉管探入胚珠的珠孔端从而使得珠孔端发出亮绿色荧光的结果。此外, 对于 A.图中偏左侧的胚珠, 可以看到其周围花粉管呈现明显的“逆向回勾”生长: 背离自由生长的路径而向胚珠珠孔端靠近。这也表明: 拟南芥雌蕊胚珠对半体外萌发的拟南芥花粉管有吸引作用, 且胚珠的珠孔端可能是释放吸引物质的关键部位。值得一提的是, B.图中左下角胚珠可以清晰地看到花粉管探入珠孔端的情景。

注意到, 相比 Pic. 1 和 Pic. 2, Pic. 3 中胚珠离雌蕊花柱端组织的距离略近一些, 并且胚珠的珠孔端大致朝向花柱侧(但背离了花粉管自由生长的路径)。

五. 实验要点札记:

Noted 1: 培养基表面胚珠与雌蕊组织花柱侧之间的相对位置关系:

由“实验原理”部分, 胚珠珠孔端的助细胞是分泌花粉管吸引物质的关键。因此, 为了让花粉管能够接收到助细胞分泌的“吸引因子”, 我们在培养基表面需要将胚珠的珠孔端朝向雌蕊组织的花柱侧。

但同时, 为了表明胚珠对花粉管生长具有吸引作用, 胚珠珠孔的朝向也不能恰好正对花粉管自由生长的方向, 而是需要适当偏离一定的角度。在此情况下如果在显微镜中观察到花粉管偏离自由生长方向从珠孔端进入了胚珠内部, 即可说明花粉管对胚珠吸引物质有所响应。

Noted 2: 花粉培养基的几种基本物质:

Mg²⁺、Ca²⁺、硼酸、蔗糖、低熔点琼脂糖等。

Noted 3: 显微镜荧光场中 GFP 的观察:

为了使没有导入 GFP 报告基因的雌蕊柱头、花柱组织也能显现出一定的轮廓, 可以在显微镜荧光场下观察花粉管 GFP 荧光时, 适当地打开亮场灯源。

Noted 4: 验证胚珠对半体外萌发花粉管吸引作用的实验有何现实作用?

我们已经知晓: 野生型拟南芥半体外萌生的花粉管可以受到野生型未受精胚珠的吸引。于是, 我们可以:

- a. 探究胚珠对半萌生花粉管吸引作用的机理, 包括花粉管、柱头、胚珠三个元件;
- b. 探究拟南芥胚珠对不同物种半体外萌生花粉管的吸引作用。

半体外萌发的花粉管是研究植物生殖过程中重要的实验材料和实验手段。