

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 11 月 10 日

一. 实验内容:

1. 在操作台面上借助低倍显微镜探究性解剖拟南芥叶片、花等器官;
2. 在显微操作室中: 学习利用亚历山大(Alexander)染色法检测拟南芥的花粉活力; 学习利用 DAPI 染液对拟南芥花粉细胞核的状态进行表征。

二. 实验原理:

(一) 花粉粒发生的简要机理:

花药中花粉母细胞(pollen mother cell)特化形成小孢子母细胞, 小孢子母细胞进行减数分裂形成被胼胝质壁包裹的四分体, 四分体中每个细胞都是一个同样被胼胝质壁包裹的小孢子(microspore)。之后在胼胝质酶作用下小孢子被释放形成单核花粉粒, 单核花粉粒再进行有丝分裂形成最后成熟的花粉粒。

拟南芥是 3-细胞型花粉粒, 成熟花粉粒细胞中有两个精细胞核和一个营养细胞核。

(二) 亚历山大(Alexander)染液染色法:

亚历山大染色法是判断花粉活力的简便方法。染色液中的孔雀石绿可使细胞壁着色, 酸性品红可使花粉粒的原生质着色。如果花粉粒可育、有活性, 花粉粒就会被染成红色或紫红色; 相反, 如果花粉粒无育性或失活, 染色后就会呈现不正常的苍白或青蓝色。

(三) 花粉粒细胞核的 DAPI 染色:

DAPI(4,6- 二氨基 -2- 苯基吡啶)是常用来研究花粉粒细胞核发育情况的染料。DAPI 可以高特异性与核酸结合, 并在紫外光的激发下发出可见蓝色荧光。由于花粉粒细胞核中集聚核 DNA 从而有高浓度的核酸, 用 DAPI 对花粉粒染色后可用荧光显微镜观察到亮蓝色的细胞核。

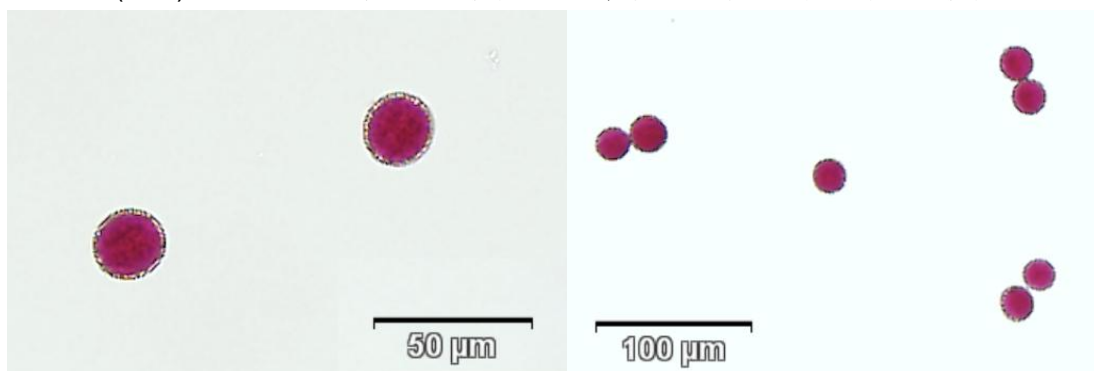
三. 实验步骤:

1. 利用解剖镊夹取拟南芥植株的器官(成熟叶片、成熟花朵、未成熟花苞等), 在显微台面上尝试性对其进行解剖, 并探究拟南芥不同发育状态下的不同器官之间在结构上的特性;
2. 显微操作室中, 用解剖镊夹取数朵拟南芥顶部成熟且状态良好的花朵, 将其雄蕊暴露后, 分别在滴有亚历山大染液、DAPI 染液的载玻片上反复沾染 8-10 次, 随后盖片制成临时标本(注意, 滴有 DAPI 染液的标本避光临时保存)。
3. 先在低倍镜、亮场下观察亚历山大染液染色后花粉粒的形态; 之后在暗室中利用高倍油镜、紫外光激发的荧光显微镜观察 DAPI 染液染色后花粉粒细胞核的形态;
4. 做好实验记录, 实验完毕后整理桌面并归还实验用品(随后参观拟南芥温室和花房)。

四. 实验结果:

在台面上利用较高倍数显微镜观察拟南芥的成熟绿色叶片, 可以看到叶片上有很多半透明、呈三角状的微绒毛。利用解剖镊分别剖开拟南芥成熟花朵、未成熟花苞的花柱, 可以看到其中左右依次间隔、沿花柱排列的半透明、近椭球状的子房, 且成熟花朵子房明显比未成熟花朵子房体积大、不透明度高。

下图(图一)是用亚历山大染液对花粉粒着色后，亮场观察的活性正常的花粉粒细胞：



(图一：亚历山大染液染色后活性正常的花粉粒细胞)

图一中，可以清晰地观察到花粉粒细胞外圈的细胞壁以及被染成紫红色的原生质。

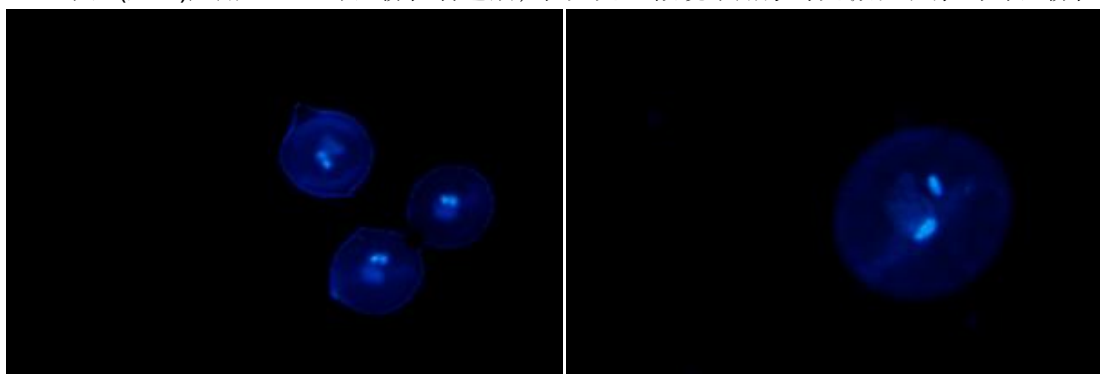
下图(图二)是用亚历山大染液对花粉粒着色后，亮场下观察到的染色异常的花粉粒细胞：



(图二：亚历山大染液染色后着色异常的花粉粒细胞)

个人认为：图二(左)左上角花粉粒细胞活性异常使得细胞质未被亚历山大染液正常着色；图二(右)花粉粒细胞的细胞壁在处理过程中破缺使得细胞内容物流出。

下图(图三)是用 DAPI 对花粉粒着色后，在荧光显微镜下用紫外光激发观察到的花粉粒：

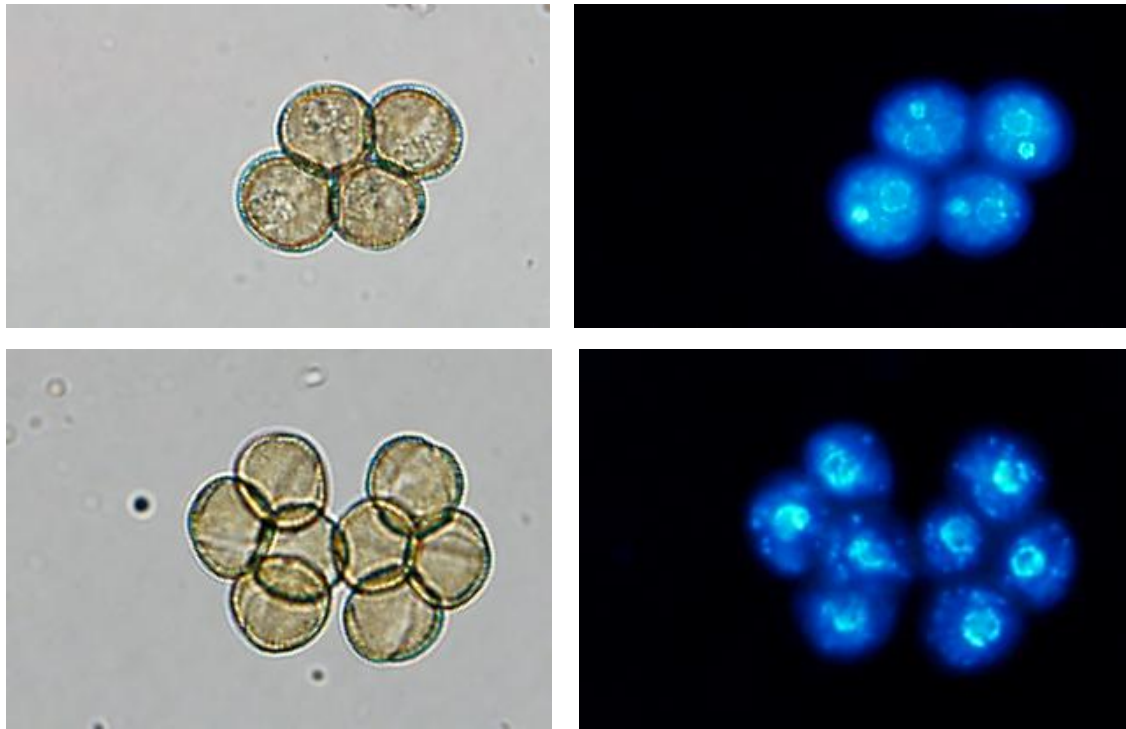


(图三：DAPI 染色后荧光显微镜下观察花粉粒细胞形态)

从图三中可以清楚看出，成熟的花粉粒细胞中有三个核区：其中两个小的、呈纺锤状的核区 DAPI 荧光强度高(亮蓝色)，对应的是染色体浓缩程度高的两个精细胞核；另一个大的、椭球状的核区 DAPI 荧光强度低(浅蓝色)，对应的是染色体浓缩程度低的一个营养细胞核。

此外，图三(左)中的花粉粒细胞还出现了轻微的质壁分离现象。

下图(图四)分别是在亮场和用 DAPI 染色观察的二核期(上)、三核期(下)的小孢子细胞:



(图四: 亮场和 DAPI 染色下观察小孢子细胞。上: 二核期; 下: 三核期)

同样的, 在图四中, 对小孢子细胞 DAPI 染色后, 也可以清楚地观察小孢子中细胞核的数目, 从而确定小孢子细胞的发育情况。

五. 实验反思与总结

1. 定好闹钟, 端正态度, 按时上课;
2. 留心观察, 注重细节, 不清楚的实验原理或步骤及时询问求解。