

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 24 日

一. 实验目的与流程：

实验目的：观察拟南芥花粉管的半体外萌发；

实验流程：

1. 利用拟南芥的纯合 **ms1** 雄性不育株(或者经人工去雄的野生型拟南芥)为材料作为雌蕊柱头的给体，在花粉萌发培养基上进行花粉管的半体外萌发；
2. 显微镜亮场下观察花粉管半体外萌发的形态特征。

二. 实验原理：

(一) 拟南芥 **ms1** 雄性不育株^[1]：

拟南芥 **MS1 (Male Sterility1)** 基因纯合突变体 **ms1** 表现出雄性不育的特征：和野生型拟南芥相比，在表型上，纯合 **ms1** 雄性不育株成花的花药中无法正常产生花粉粒，但除此以外花药等雄蕊结构发育以及植株的其它部分发育情况正常。

通过对 **ms1** 雄性不育株雄蕊花粉囊发育过程的持续切片观察发现，在小孢子(microspore)从四分体(tetrad)中释放后到绒毡层细胞(tapetal cell)讲解之前的时期，**ms1** 突变体植株花粉囊中的小孢子和绒毡层细胞出现异常的细胞体积膨大和细胞质空洞化(vacuolated)现象；此后，**ms1** 突变体植株中小孢子和绒毡层细胞体积进一步扩大并发生细胞质退化(cytoplasm degeneration)，最终使其花粉囊中几乎完全没有成熟花粉粒。

通常认为，**MS1** 基因在植株花药发育和雄配子发生的特定阶段发挥调控相关基因转录的作用。此外，有学者(Ito et al, 2007)研究指出，**ms1** 突变体的花粉外壁结构不规则且含油层完全缺失，这表明 **MS1** 基因可能参与了雄蕊中花粉包被的形成^[2]。

(二) 花粉管的半体外萌发：

花粉管的半体外(semi in-vitro)萌发，是指在花粉培养基表面将花粉涂抹在处理过的柱头上，而后花粉管萌发穿过柱头组织后再附着在培养基表面生长。

通常情况下，活性正常的花粉粒也可以直接附着在花粉培养基表面萌发生长，但相对比而言其生长情况劣于半体外萌发；此外，未经历柱头而直接在培养基表面生长的花粉管对植物体内源的花粉管吸引物质不响应。所以，在需要定量刻画某些特定花粉粒萌发和花粉管生长的竞争性活力时，一般选用花粉管半体外萌发的实验操作。

三. 实验步骤：

1. 用低熔点琼脂糖和花粉培养基母液配置花粉培养基，并置于 90℃热水中水浴；
2. 用微量可调移液器吸取 75 μ L 培养基，快速均匀涂抹在花粉培养皿中心处的透明小薄片上(注意均匀涂抹；可以先加入两管 75 μ L 培养基，涂抹均匀后再吸出 75 μ L)；
3. 将配置好的培养基开盖冷却 1 min 左右后，置于湿盒中常温保存；
4. 取 **ms1** 雄性不育株拟南芥的成花(或野生型拟南芥人工去雄后的成花)，在显微操作台面上用解剖镊和注射器针头挑取雌蕊组织中的柱头部分并将其置于配置的培养基表面，重复 2-3 次；(Noted: 尽量让柱头的横切面平齐地与培养基表面接触，这样利于后续花粉管在培养基表面的生长)

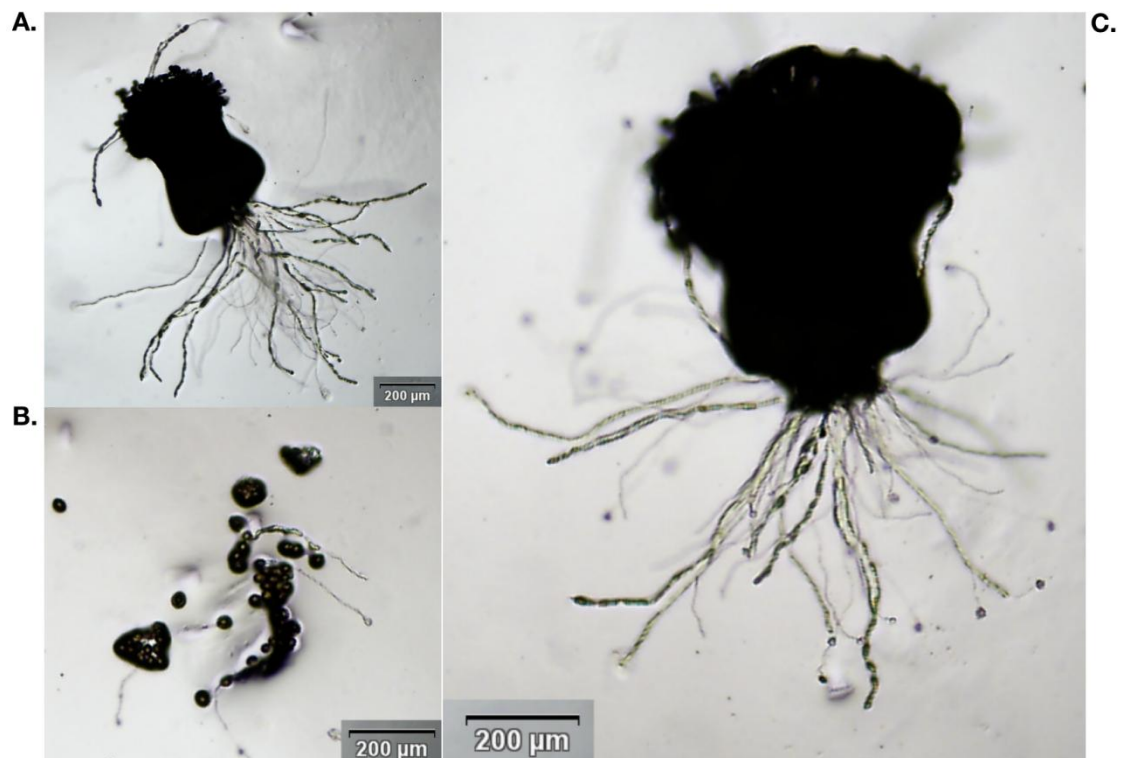
^[1] Wilson, Z. A., Morrolok, S. M., Dawson, J., Swarup, R., & Tighe, P. J., (2001). The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors, The Plant Journal, 28(1): p.27-39.

^[2] Ito, T., Nagata, N., Yoshida, Y., Ohme-Takagi, M., Ma, H., & Shinozaki, K., (2007). Arabidopsis MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development, Plant Cell, 19(11): p.3549-3562.

5. 在显微操作台面上,用解剖镊取出野生型拟南芥成花中雄蕊的花药部分,对培养基表面的雌蕊柱头进行授粉;此外,在花粉培养基其余空白位置涂抹适量花粉粒,作为花粉管体外萌发(*in vitro*)对照组;
6. 将花粉培养基封装后,在 22℃恒温箱中培养 4-6 h;
7. 取出培养后的花粉培养基,在显微镜室内分别利用 x4、x10 物镜亮场观察花粉培养基内柱头组织上花粉管半体外萌发的形态特征,并与体外萌发的花粉管形态对照;
8. 整理实验桌面,做好实验记录。

四. 实验结果:

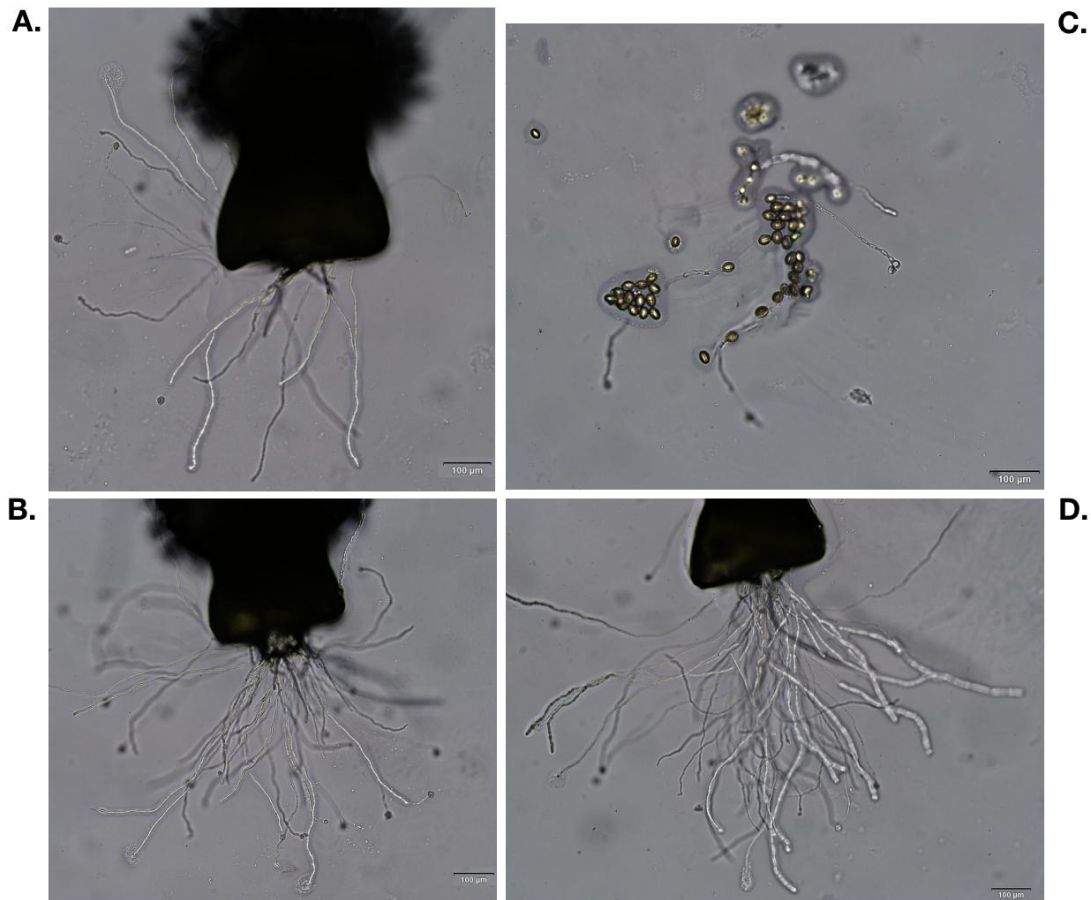
下图(Pic. 1)是利用 x4 物镜在亮场下观察 22℃恒温箱中培养 4h 后花粉管半体外萌发(*semi vitro*)和体外萌发(*in vitro*)的情况:



Pic. 1: 22℃恒温箱中培养 4h 后花粉管半体外(*semi vitro*)和体外(*in vitro*)萌发情况 (x4)
(A、C: 花粉管半体外萌发; B: 花粉管体外萌发)

由 Pic. 1 图 A、C 与 B 的对比,在相同培养条件下,花粉粒直接附着在花粉培养基上生长时萌生花粉管的平均长度约 200 μm,花粉粒先附着在柱头并穿过柱头组织生长时萌生花粉管的平均长度约 400 μm,后者萌生花粉管的平均长度更长;此外, A、C 图中花粉管的生长状况(如观察萌生花粉管的直径)、花粉粒的萌生率较 B 图也更好。由此可以猜测,雌蕊柱头组织中可能含有促进花粉管萌发、生长的某种因子。

下图(Pic. 2)是进一步利用 x10 物镜在亮场下观察 22°C 恒温箱中培养 4h 后花粉管半体外萌发(semi vitro)和体外萌发(in vitro)的情况:



Pic. 2: 22°C 恒温箱中培养 4h 后花粉管半体外(semi vitro)和体外(in vitro)萌发情况 (x10)

(A、B、D: 花粉管半体外萌发; C: 花粉管体外萌发)

由 Pic. 2 图 A、B、D, 在 x10 物镜下进一步观察半体外萌发的花粉管, 可以发现有些花粉管的末端呈现“透明囊泡”状(如 B 图正下方花粉管末端), 这可能是花粉管前端的营养细胞受培养基表面渗透压等理化环境的变化而发生破裂所释放出的细胞质内容物。此外, Pic. 2 也可以更清晰地看出花粉管半体外萌发的生长状况优于花粉管体外萌发的生长状况。

综合 Pic. 1、Pic. 2 观察, 该实验中半体外萌发的花粉管生长时并没有表现出明显的偏向性(如向地性生长、向特定水平方位生长等)。

五. 实验要点札记:

1. 在切离雌蕊柱头组织部分时, 可以在雌蕊柱头组织略微偏下处的心皮处操作, 避免损伤雌蕊柱头;
2. 尽量保证雌蕊柱头组织的切口平齐, 有利于培养基上花粉管的平行生长, 便于观察;
3. 配置培养基时动作迅速, 避免低熔点琼脂糖在配置过程中凝固使培养基表面不平整。