

## 教学研究

# 组织化学染色技术在植物解剖学和植物发育生物学 实验教学中的应用

覃超 宋佳 王雪 孙爽莉 门淑珍\*

(南开大学生命科学学院, 植物生物学和生态学系, 天津 300071)

**摘要** 被子植物雄配子体(花粉粒)的发育涉及一系列细胞活动, 包括有丝分裂、液泡的动态变化和花粉管的萌发等。组织化学染色技术是研究植物花药发育和花粉粒活性的常用手段。该文针对本科生植物学课程中生殖器官的解剖观察设计了相应的实验教学课程。该实验以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)不同发育时期的花药为材料, 经各种试剂染色, 利用光学显微镜或荧光显微镜观察细胞核、液泡和花粉管的动态变化, 进而判断花粉育性。这些实验可以使学生对拟南芥的花粉发育过程有较为系统的理解。

**关键词** 组织化学染色; 花药; 花粉粒; 液泡; 花粉管; 拟南芥

## The Application of Histochemical Staining Technology in Experimental Course of Plant Anatomy and Plant Developmental Biology

TAN Chao, SONG Jia, WANG Xue, SUN Shuangli, MEN Shuzhen\*

(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** The development of angiosperm male gametophyte (pollen grain) involves a series of cellular activities, including mitosis, dynamic changes of vacuoles and germination of pollen tubes. Histochemical staining is a common method to study plant anther development and pollen fertility. In this paper, a corresponding experimental course is designed for the anatomical observation of reproductive organs in undergraduate botany course. In these experiments, the model plant *Arabidopsis thaliana* anthers at different developmental stages were stained with various reagents. The dynamic changes of nucleus, vacuoles and pollen tubes were observed by bright field microscope or fluorescence microscope, and then the pollen fertility was determined. These experiments enable students to have a systematic understanding of the process of *Arabidopsis thaliana* anther development.

**Keywords** histochemical staining; anther; pollen grain; vacuole; pollen tube; *Arabidopsis thaliana*

被子植物在漫长的演化过程中进化出了独特的生殖结构——花器官。花器官中重要的两个组分——雌蕊和雄蕊的正常发育对于被子植物完成

由孢子体到配子体, 再由配子体到孢子体的世代交替过程具有重要的意义<sup>[1-2]</sup>。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)作为一种模式植物, 在研究雌、雄配子体

收稿日期: 2022-01-22

接受日期: 2022-03-21

国家自然科学基金(批准号: 32070281、31870230)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 022-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

Received: January 22, 2022

Accepted: March 21, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070281, 31870230)

\*Corresponding author. Tel: +86-22-23500856, E-mail: shuzhenmen@nankai.edu.cn

的发育过程中具有一定的优势。许多研究者借助组织化学染色技术对不同植物花粉的发育过程进行了详细的观察。而且该技术被广泛应用于雄性败育突变体的表型分析实验中<sup>[3-12]</sup>。常用的组织化学染色技术包括: (1) 用于分析花粉粒活力的亚历山大染色(Alexander staining)<sup>[3-5]</sup>; (2) 对细胞核进行荧光观察的DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)染色<sup>[6-7]</sup>; (3) 对液泡进行观察的中性红染色(neutral red staining)<sup>[8-10]</sup>; (4) 对胼胝质(callose)进行染色的苯胺蓝染色(Aniline blue staining)<sup>[11-12]</sup>。

在大学生“植物学解剖实验课”教学中, 大多是对植物孢子体组织的观察, 例如通过徒手切片观察根和茎维管组织的结构等。而对于生殖器官的解剖观察相对较少。因此我们设计了四种实验来填补本科教学的空白, 并辅助“植物学”理论教学, 使学生可以更加直观地理解花粉发育过程中的一系列解剖结构变化。

## 1 实验原理

拟南芥花粉的发育是一个受到多基因调控的复杂过程。产生具有正常功能的成熟花粉粒需要经过两个阶段: 小孢子发生和雄配子发生<sup>[13-14]</sup>。按照GOLDBERG等<sup>[15]</sup>的划分标准, 拟南芥花药的发育可以简单地分为14个时期: 1~8期为孢子体发育阶段, 完成花药形态的建成, 这个阶段形成了我们所熟悉的具有四个花粉囊的花药, 小孢子母细胞经过两次减数分裂形成四个由胼胝质包裹的小孢子, 其被称为四分体, 随后胼胝质降解而释放小孢子; 9~14期为配子体发育阶段, 小孢子经过两次有丝分裂产生具有一个营养细胞和两个精细胞(精细胞被包裹在营养细胞的胞质中)的成熟花粉粒, 这个过程还伴随着液泡体积的变化。成熟的花药随后开裂并释放花粉粒, 花粉粒落在雌蕊的柱头上后发生水合反应, 在胞内和胞外信号的共同调控下, 萌发的花粉管沿着柱头向下生长, 受到胚珠释放的信息吸引后到达珠孔并穿透其中一个助细胞, 花粉管爆裂释放精细胞, 随后两个精细胞分别与卵细胞和中央细胞融合, 完成被子植物特有的双受精<sup>[16-18]</sup>。

花粉的发育过程像是一个受到齿轮严格控制的精密手表, 任何一环的异常发育均会导致败育花粉粒的产生。因此对花粉发育过程中一系列组织变化的观察有助于我们研究其背后的调控机制。亚历山大染色是一种分析成熟花粉粒活性的方法, 通过

亚历山大染液中孔雀绿和酸性品红产生的对比色, 可以直观地观察花粉的活力<sup>[19-20]</sup>。孔雀绿可以对细胞壁中的纤维素进行染色, 使其呈现绿色, 有活力花粉的原生质会被酸性品红着色为红色或紫色, 而败育花粉粒不呈红色, 被染成绿色, 因而亚历山大染色可以区分活性和败育花粉粒<sup>[4-5]</sup>。DAPI是一种可以穿透细胞膜的核酸染料, 其通过疏水键和氢键与DNA双螺旋小沟中的AT碱基对结合形成DAPI-核酸荧光复合物, 在紫外光(波长为405 nm)的激发下可以观察到蓝色荧光, 而且它较其他核染色剂具有更高的光稳定性。因此, DAPI常被用来对活体组织的细胞核进行染色<sup>[7]</sup>。花粉发育过程涉及两次有丝分裂, 通过DAPI染色不仅可以观察正常花粉粒核的变化, 区分花粉发育的时期, 还可以判断突变体花粉败育的时期<sup>[3]</sup>。液泡的动态发育对于花粉的发育具有重要的意义<sup>[21]</sup>。中性红是一种可以将活细胞液泡着色为红色的弱碱性pH指示剂。在中性或微碱性的环境下, 植物细胞吸收中性红并向液泡聚集, 随后中性红产生大量阳离子而呈现红色, 在光学显微镜下就可以观察花粉发育各个阶段液泡的形态。花粉管壁是花粉粒内壁的延伸, 主要由胼胝质组成, 苯胺蓝染色液可以对萌发的花粉管进行染色, 同样在紫外光(波长为405 nm)的激发下观察到蓝色荧光。经过不同的组织化学染色后, 在显微镜下可以对花粉发育进行系统的观察<sup>[12-13]</sup>。

## 2 教学设计与安排

### 2.1 教学目的

开设本实验教学课的目的是为了填补本科教学中对植物生殖发育实验的空白。四种化学染色技术的学习, 使本科生对拟南芥花粉发育的过程具有更加清晰的认识与理解, 同时掌握植物组织染色制片技术和荧光显微镜的操作与使用。

### 2.2 教学的重点与难点

本实验教学的重点是使本科生熟练掌握四种组织化学染色技术, 并对拟南芥花药发育过程中核的变化、液泡的变化、花粉活力鉴定以及花粉的体内萌发具有更加深入的了解。教学难点是在制片时, 对雌蕊和雄蕊的分离需要谨慎操作, 保持组织的完整性; 在对花粉管进行分析时, 人工授粉以及随后的制片也需要谨慎操作。

### 2.3 实验材料与设备

2.3.1 实验材料 实验材料为野生型拟南芥哥伦

比亚生态型(Columbia-0, Col-0)。

**2.3.2 实验仪器和用具** 实验仪器和用具包括: 正置荧光显微镜(Leica, 德国)、体式显微镜(Leica, 德国)、6孔板、移液器、吸头、载玻片、盖玻片和镊子等。

## 2.4 教学安排

**2.4.1 学时安排** 本实验可以分成四个板块进行: (1) 取成熟但尚未裂开的花药(11~12期花)进行亚历山大染色, 并利用光学显微镜进行花粉活力的观察(4学时); (2) 取7~12期花蕾进行DAPI染色, 并利用荧光显微镜观察花粉核的变化(12学时); (3) 取10期花蕾和12期花蕾进行中性红染色实验, 并利用光学显微镜观察液泡的形态变化(6学时); (4) 取盛花期的拟南芥植株进行人工授粉, 并进行苯胺蓝染色, 随后利用荧光显微镜观察花粉管(16学时)。花及花药发育时期参照SANDER等<sup>[22]</sup>的划分标准。

**2.4.2 课前准备** 由于我们进行的是花粉实验, 因此需使用盛花期的拟南芥植株。助教老师需分批进行野生型拟南芥的种植, 以保证后续实验的正常进行。助教老师也需提前购买相关试剂并配制母液。

**2.4.3 学生分组** 可根据教研室条件将学生每2~4人分为一个小组, 组员之间协调配合, 共同完成实验步骤, 分析实验结果, 整理实验数据, 并展开讨论。

## 3 实验步骤

### 3.1 拟南芥种植与培养(由指导老师或助教完成)

将营养土与蛭石以3:1进行混合, 倒入适量水拌匀后将其分装在培养钵中。在每个培养钵的四个角撒3~5粒野生型拟南芥种子, 随后用保鲜膜将其覆盖保湿, 放入温室进行培养, 培养条件为16 h光照, 8 h黑暗, 光照强度为 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , 温度为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。待种子萌发子叶展开后, 将保鲜膜取下, 5~7天后间苗, 每一个角处留下一株发育良好的拟南芥幼苗, 继续培养至开花即可用于实验。由于实验所需盛花期的拟南芥, 因此需由助教老师间隔7天连续进行拟南芥的播种与培养。

### 3.2 实验试剂的配制

(1) 亚历山大染液: 乙醇10 mL, 1%孔雀绿(酒精溶解) 1 mL, 蒸馏水50 mL, 甘油25 mL, 苯酚5 g, 水合氯醛5 g, 1%酸性品红(水溶) 5 mL, 1%橙黄G(orange G, 水溶) 0.5 mL, 冰醋酸1~4 mL。苯酚购自上海阿拉丁试剂有限公司, 其余试剂均购自上海生工生物

工程股份有限公司。待上述成分溶解后, 溶液应于室温避光保存。

(2) DAPI购自上海生工生物工程股份有限公司, 需在 $-20^\circ\text{C}$ 保存。

(3) 中性红染液购自上海生工生物工程股份有限公司, 需在 $4^\circ\text{C}$ 保存。

(4) 苯胺蓝染液: Aniline blue粉末, 购自上海生工生物工程股份有限公司, 室温保存, 使用时需用 $50 \text{ mmol}/\text{L}$  (pH7.5)的磷酸钾缓冲液配制, 工作浓度为 $0.05\%$ (W/V), 避光保存, 现配现用。

### 3.3 亚历山大染色及显微观察

在1.5 mL离心管中加入500  $\mu\text{L}$ 亚历山大染液, 将盛花期拟南芥处于11~12期的花蕾放入上述离心管中, 颠倒使其完全浸没在亚历山大染液中,  $37^\circ\text{C}$ 避光染色12 h。翌日, 从离心管中取出花蕾并放置在载玻片上, 在体式显微镜下将花萼、花瓣和雌蕊等去除, 将完整的花药取出, 并滴加20  $\mu\text{L}$  8%的蔗糖溶液, 轻轻将盖玻片从一侧缓慢放下, 吸除多余液体, 在正置显微镜明场下用20倍的物镜进行观察并拍照。

### 3.4 DAPI染色及显微观察

取7~12期的花苞放到卡诺固定液(乙醇:氯仿:冰醋酸为6:3:1)中固定过夜。翌日, 将花苞取出并剥出花药, 向载玻片滴加20  $\mu\text{L}$  DAPI染液, 并用镊子小心将花粉剥出, 室温黑暗条件下染色30 min, 小心盖上盖玻片, 在荧光正置显微镜下, 选用蓝色荧光滤光片, 用60倍油镜进行观察并拍照。

### 3.5 中性红染色及显微观察

取10~12期的花苞于载玻片上, 用镊子小心将花药剥出, 并在其上滴加一滴8%的蔗糖溶液, 再用镊子小心将花药拨开, 使花粉粒散布于液体中, 然后滴加10  $\mu\text{L}$ 中性红染液, 避光染色10 min。小心盖上盖玻片, 在正置显微镜明场下, 用60倍油镜进行观察并拍照。

### 3.6 苯胺蓝染色及显微观察

首先对露白(11期)的花苞进行去雄。翌日, 对其进行人工授粉, 分别在4 h、8 h、16 h和24 h后收集雌蕊, 将其放于卡诺固定液(乙醇:氯仿:冰醋酸为6:3:1)中室温固定3 h。去掉固定液, 用蒸馏水清洗2~3次, 加入1 mL 8 mol/L NaOH室温过夜。用1 mL 50 mmol/L pH 7.5的磷酸钾缓冲液洗3次, 每次5 min。将雌蕊转移到载玻片上, 加一滴0.05%的苯胺蓝(用

50 mmol/L pH7.5的磷酸钾缓冲液配制), 轻轻盖上盖玻片。用荧光显微镜在4倍物镜下观察花粉管并拍照, 选用蓝色荧光滤光片。

#### 4 实验结果

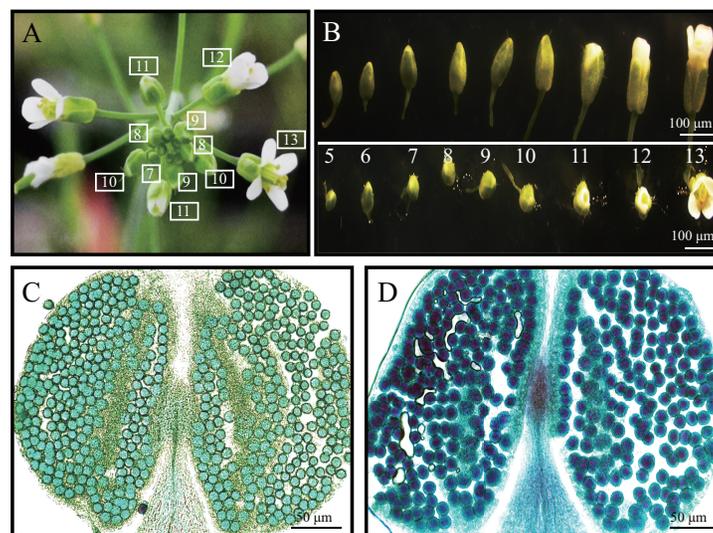
通过对野生型11~12期花药的亚历山大染色发现, 在经过12 h染色后野生型花粉可以被染成紫红色, 证明其具有活力(图1D), 而染色时间较短的花粉并不能被着色(图1C), 因此需要对花药进行充足的染色<sup>[4]</sup>。花粉的活力对于花粉的育性具有重要意义。当我们想知道某突变体的花粉育性是否有缺陷时, 首先可以借助亚历山大染色来判断<sup>[3]</sup>。

拟南芥花粉的发育经过两个过程, 小孢子母细胞经减数分裂后产生4个单倍体孢子, 这4个孢子由胼胝质所包裹, 被称为四分体(图2A), 随后小孢子从四分体中释放出来, 完成第一个过程——小孢子发生。游离的小孢子(图2B)随后经过第一次不对称有丝分裂产生一个大的营养细胞和一个小的精细胞(图2C), 之后精细胞再进行一次有丝分裂产生两个精细胞, 拟南芥成熟的花粉粒中包括一个营养细胞和两个精细胞(图2D), 完成第二个过程——雄配子发生<sup>[17-18]</sup>。研究发现, 某些基因的突变会导致花粉有丝分裂发生异常而停滞在单细胞或二细胞期, 因

此DAPI染色可用于分析突变体花粉粒核的数目, 从而判断其败育的时期<sup>[3]</sup>。

花粉发育过程中一个显著的变化是液泡的动态发育。通过中性红染色可以观察液泡的形态。首先从四分体释放出来的小孢子(单核花粉粒)中存在分散的小液泡(图3E), 随后小液泡聚合形成大液泡, 伴随着液泡体积的增大, 花粉粒的体积也逐渐增大, 大液泡将核挤在小孢子细胞的一侧, 这个时期被称为单核靠边期(图3A~图3C)。随后小孢子经过有丝分裂产生一个大的营养细胞和一个小的精细胞。拟南芥的花粉粒成熟时, 精细胞进行有丝分裂产生两个精细胞, 因此, 拟南芥的成熟花粉粒为三细胞花粉粒, 此时营养细胞的液泡从大液泡碎片化为小液泡(图3B)<sup>[21]</sup>。液泡的发育对于形成正常有功能的花粉粒具有重要意义, 而液泡属于内膜系统, 因此, 当我们所获得突变体与膜系统的发育相关时, 不妨对其进行中性红染色, 观察其液泡的形态变化是否受到影响。

花粉管壁中主要的物质是胼胝质, 其来源于花粉内壁的延伸。花粉管通过极性生长, 通过花柱将精细胞送到胚囊<sup>[23-25]</sup>。通过苯胺蓝染色, 我们可以观察花粉粒在柱头上萌发及花粉管在花柱中的伸长。分别对未受粉和人工授粉4 h、8 h、16 h和24 h后的花粉管进行了观察, 随着时间的延长花粉管逐

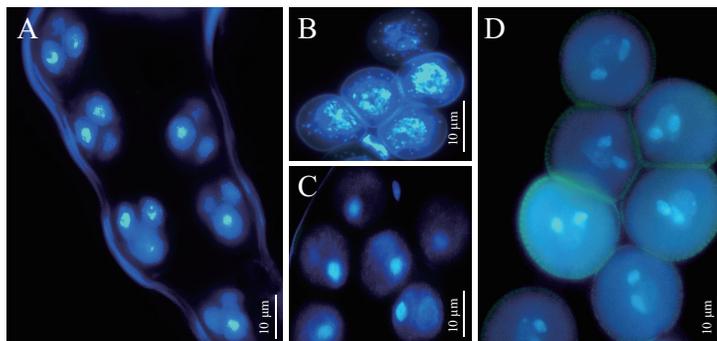


A~B: 野生型拟南芥花序俯拍图(A)和不同发育时期花蕾和盛开花侧拍图(B上)和俯拍图(B下)。其中数字5至13指示处于不同发育时期的花蕾和盛开花。C~D: 11期花药亚历山大染色6 h (B)和12 h (C)后的显微照片。

A,B: col inflorescence (A), side view (top row of B) and vertical view (bottom row of B) of flowers buds at different developmental stages. The numbers 5 to 13 indicate flowers buds at different developmental stages; C,D: micrographs of an 11 stage anther after staining with Alexander solution for 6 h (B) and 12 h (C).

图1 花药的亚历山大染色

Fig.1 Anther Alexander staining

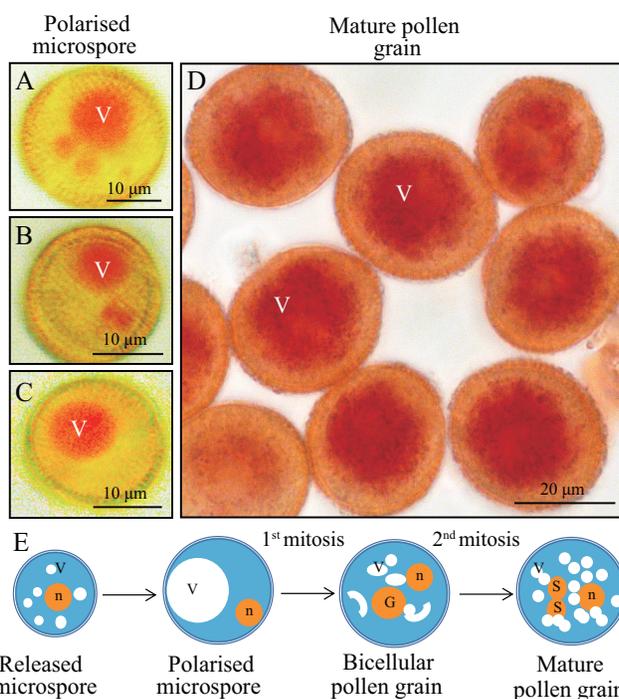


A: 四分体; B: 单核花粉粒; C: 二核花粉粒; D: 三核花粉粒。

A: tetrad pollen grains; B: uninucleate pollen grains; C: binucleate pollen grains; D: trinucleate pollen grains.

图2 DAPI染色

Fig.2 DAPI staining



A~C: 单核靠边期花粉粒中液泡的形态; D: 成熟花粉粒中液泡的形态; E: 花粉发育过程中液泡动态变化示意图。V: 液泡, n: 细胞核, G: 生殖细胞, S: 精细胞。

A-C: the morphology of vacuoles in uninucleate pollen grains; D: the morphology of vacuoles in mature pollen grains; D: the dynamic changes of vacuoles during pollen development. V: vacuole, n: nucleus, G: generative cell, S: sperm cell.

图3 中性红染色

Fig.3 Neutral red staining

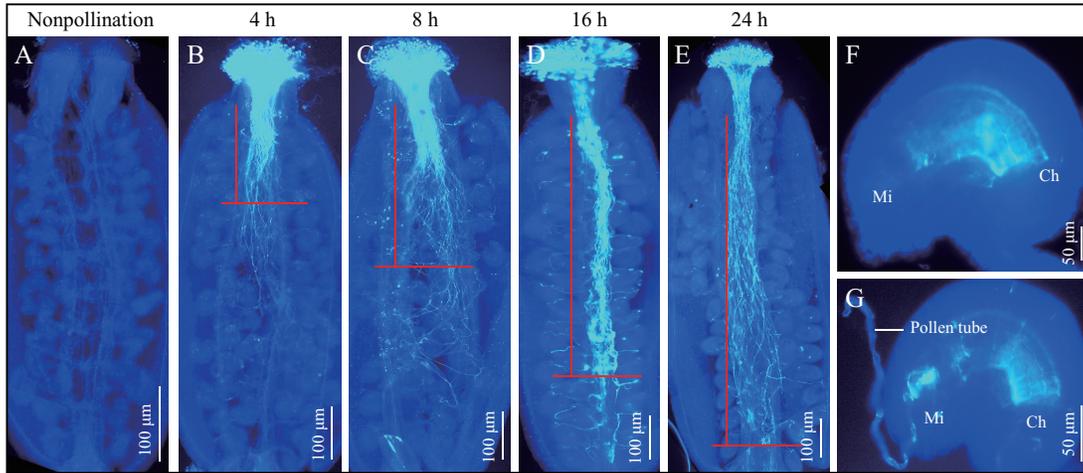
渐伸长(图4A~图4E), 并且可以观察到胚珠对花粉管的吸引(图4G)<sup>[11-13]</sup>。因此, 通过苯胺蓝染色实验, 我们可以观察雄性不育突变体的花粉萌发和花粉管伸长是否异常。

## 5 讨论

### 5.1 开设该实验的意义

被子植物有性生殖过程包括开花、传粉、受精

和结实四个部分。花粉粒落在雌蕊的柱头上发生水合, 在胞内外信号的共同调控下, 花粉粒萌发并长出花粉管。花粉管在花柱中延伸, 并在胚珠分泌信号的吸引下穿出花柱道隔膜, 导向胚珠的珠孔, 在穿透助细胞后花粉管爆裂释放精细胞, 随后两个精细胞分别与卵细胞和中央细胞融合, 完成双受精。在这一系列的生理过程中, 植物的雌蕊和雄蕊发挥着重要的作用, 并且整个过程受到复杂基因网络的调控。



A: 未受粉雌蕊苯胺蓝染色; B-E: 人工授粉4 h、8 h、16 h和24 h后雌蕊苯胺蓝染色; F-G: 未受粉胚珠(F)和授粉胚珠(G)苯胺蓝染色结果。Mi: 珠孔, Ch: 合点。

A: unpollinated pistil aniline blue staining; B-E: 4 h, 8 h, 16 h and 24 h after artificial pollination, pistil aniline blue staining; F-G: aniline blue staining of unpollinated ovule (F) and pollinated ovule (G). Mi: micropyle, Ch: chalaza.

图4 授粉前后雌蕊和胚珠的苯胺蓝染色结果

Fig.4 Aniline blue staining of pistil and ovule before and after pollination

而它们的正常发育以及之间的相互作用是我们需要探索的科学问题。该实验课程通过借助特定的组织化学染色以及显微镜技术,将植物微小的内部结构进行着色放大。这可以帮助本科生更直接和形象地观察到模式植物拟南芥花粉的发育过程及其液泡的动态变化、花粉粒的萌发和花粉管的伸长等。在对花粉发育缺陷突变体的表型分析中,这些染色技术都是常用的并且行之有效的检测方法。目前本科实验教学较少涉及对植物配子体发育缺陷突变体的观察,如若增加相关实验内容,将有助于加强学生对遗传学以及植物细胞生物学相关知识的理解。例如, *MGPI* (male gametophyte defective 1) 基因是编码线粒体  $F_1F_0$ -ATP合酶的一个亚基, *mgpl* 突变体细胞的线粒体功能紊乱而导致其花粉败育<sup>[26]</sup>。实验课上可以安排学生通过亚历山大和DAPI染色,观察野生型拟南芥和 *mgpl* 突变体植株花粉的发育情况,比较正常花粉粒和败育花粉粒的形态和染色情况,并且可以启发学生通过模式植物拟南芥雄配子体发育过程的学习,类比到其他植物,利用所学的组织化学染色和细胞学实验技术,观察其他植物花粉的发育过程,例如雌雄同株异花的重要油料植物——蓖麻<sup>[27]</sup>。因此,将本实验项目加入到本科教学实验中,不仅可以使学生们学习到溶液的配制、显微镜的使用、对拟南芥花蕾解剖等实验操作,还可以帮助本科生更好地理解 and 巩固相关理论知识,培养学

生的动手能力,锻炼学生的独立实验能力,激发学生对科研的兴趣,使学生更深入地了解植物生殖发育的过程。

## 5.2 该实验项目的教学定位

(1) 对于低年级的本科生,前期的材料准备,拟南芥的培养、样品的取材和试剂的配制、染色和制片等可由教师完成。学生需掌握各种染色技术的原理并完成对样品的显微镜观察。

(2) 针对三、四年级的本科生,可以以“综合性大实验”的形式开设该课程,前期拟南芥的培养可由教师完成,后期的染色剂及固定剂等试剂的配制、样品的解剖、染色、制片及显微镜的观察等由学生完成。

(3) 如若将该实验开设成本科生开放实验课程,前期的材料准备、样品取材及溶液的配制等可由学生在课余时间完成,制片、染色及显微镜的观察等可在4~12学时内集中完成。

## 5.3 实验安排的可行性

该实验项目经过本实验室研究生及本科生的反复试验,已具有成熟的实验条件,实验所用的模式植物拟南芥Col-0植株材料容易获得,植株培养和试剂配制等步骤操作简单,实验周期较短,结果容易获得。本实验中所涉及到的染色试剂的配制、花器官的解剖、样本染色以及显微镜的使用及样本的观察等实验操作,很多高校都具备开展相关实验操作的

条件。本实验项目可以让学生在理论知识的学习上更加深入地了解植物生殖发育的过程和机理, 巩固理论知识。

该实验项目在操作上简单, 连贯性不强。作为低年级本科生的实验课, 仅需显微镜观察即可。作为综合性大实验课程, 可分为前期植物材料准备、试剂配制、花粉的亚历山大染色、细胞核的DAPI染色、液泡的中性红染色和胼胝质的苯胺蓝染色五个部分进行学习, 在两周之内可以完成全部实验。作为开放实验课程, 学生可以在课余时间, 在老师的指导下分步完成上述五个实验部分。在实验课程结束后, 学生上交实验成果及实验报告, 并进行小组交流讨论, 共同探讨实验的注意要点, 分享心得体会。虽然该实验所需植物生长周期较长, 但前期实验材料准备由老师来完成, 学生只需进行试剂配制、制片和显微镜观察, 实验内容较简单, 不需要太大的连贯性, 也可以根据时间安排, 分为几个小的独立实验进行。此外, 还可以将本门课程与发育生物学相结合, 通过对植物受精后的胚胎进行组织透明和组织切片技术, 观察其胚胎发育<sup>[28]</sup>, 可以更好地帮助同学们理解植物双受精后的生物进程, 夯实对理论知识的理解。

#### 5.4 该实验的推广与应用

(1) 实验条件: 具备植物培养箱或培养室, 可供植物正常生长; 具备显微镜, 可供观察植物的显微组织结构。

(2) 课程安排: 根据不同年级学生所需的培养时长及培养内容, 灵活选择适合的开设课程方式及授课学时。

(3) 教师要求: 指导教师或助教应熟练掌握植物的生殖发育过程, 并熟练掌握溶液配制、组织解剖及染色、制片以及显微镜操作等实验技术。在实验开始前为同学们讲解基本实验原理以及实验的要点、注意事项等。

#### 参考文献 (References)

- [1] YANG X, ZHANG Q, ZHAO K, et al. The *Arabidopsis GPR1* gene negatively affects pollen germination, pollen tube growth, and gametophyte senescence [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1303.
- [2] THOMAS B, WELLMER F. Molecular regulation of flower development [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 131: 185-210.
- [3] BAO S, SHEN G, LI G, et al. The *Arabidopsis* nucleoporin NUP1 is essential for megasporogenesis and early stages of pollen development [J]. *Plant Cell Rep*, 2019, 38(1): 59-4.
- [4] FRESCURA VD, LAUGHINGHOUSE HD 4th, DO CANTOFOROW TS, et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods [J]. *Biocell*, 2012, 36(3): 143-5.
- [5] VANIA H T, Lisete C D, CASSIA Â P, et al. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids [J]. *Ge-net Mol Biol*, 2006, 29(2): 353-2.
- [6] HARD T, FAN P, KEARNS D R. A fluorescence study of the binding of Hoechst33258 and DAPI to halogenated DNAs [J]. *Photochem Photobiol*, 1990, 51(1): 77-6.
- [7] CHAZOTTE B. Labeling nuclear DNA using DAPI [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011, (1): 5556.
- [8] YAMAMOTO Y, NISHIMURA M, HARANISHIMURA I, et al. Behavior of vacuoles during microspore and pollen development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(11): 1192-1.
- [9] STEFANO G, RENNA L, BRANDIZZIF. Plant cell vacuoles: staining and fluorescent probes [J]. *Methods Mol Biol*, 2018; 1789: 55-3.
- [10] SCHWAB B, HULSKAMP M. Neutral red staining for plant vacuoles [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010(6): 4953.
- [11] JOHNSON S A, MCCORMICK S. Pollen germinates precociously in the anthers of raring-to-go, an *Arabidopsis* gametophytic mutant [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 685-5.
- [12] ISHIGURO S, KAWAI-ODAA, UEDA J, et al. The *DEFECTIVE IN ANT-HER DEHISCENCE* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(10): 2191-9.
- [13] SHIVANA K R, TANDON R. Developmental biology of dispersed pollen grains [J]. *Int J Dev Biol*, 2020, 64(1/2/3): 7-9.
- [14] GOMEZ J F, TALLE B, WILSON Z A. Anther and pollen development: a conserved developmental pathway [J]. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(11): 876-1.
- [15] GOLDBERG R B, BEALS T P. Anther development: basic principles and practical applications [J]. *Plant Cell*, 1993, 5(10): 1217-9.
- [16] WANG W Y, ZHANG L, XING S F, et al. *Arabidopsis AtVPS15* plays essential roles in pollen germination possibly by interacting with *AtVPS34* [J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(2): 81-2.
- [17] HONYS D, RENAK D, TWELL D. Male gametophyte development and function [J]. *Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology*, 2006, 5(1): 1265-5.
- [18] TWELL D. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants [J]. *Sex Plant Reprod*, 2011, 24(2): 149-60.
- [19] ALEXANDER M. P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen [J]. *Stain Technol*, 2009, 44(3): 117-2.
- [20] ALEXANDER M P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria [J]. *Stain Technol*, 2009, 55(1): 13-8.
- [21] PACINI E, JACQUARD C, CLEMENT C. Pollen vacuoles and their significance [J]. *Planta*, 2011, 234(2): 217-7.
- [22] SANDERS P M, BUI A Q, WETERI-NGS K, et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. *Sex Plant Reprod*, 1999, 11(6): 297-2.

- [23] TAYLOR L.P, HEPLER P.K. Pollen germination and tube growth [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 461-91.
- [24] CHEUNG A Y, WU H M. PLANT BIOLOGY: Pollen tube guidance-right on target [J]. *Science*, 2001, 293(5534): 1441-2.
- [25] FRANKLIN-TONG. Signaling and the modulation of pollen tube growth [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(4): 727-8.
- [26] LI W Q, ZHANG X Q, XIA C, et al. *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1*, encoding the FAd subunit of mitochondrial F1F0-ATP synthase, is essential for pollen formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(6): 923-5.
- [27] 郑钧伦, 罗琼, 李子彤, 等. 蓖麻生长素外输载体PIN蛋白家族的生物信息学分析 [J]. 聊城大学学报(自然科学版)(ZHENG J L, LUO Q, LI Z T, et al. Bioinformatics analysis of the aux-in efflux carrier PIN proteins of *ricinus communis* L [J]. *Journal of Liaocheng University, Natural Science Edition*), 2021, 34(5): 88-99.
- [28] 李桂忱, 刘兵, 杨泽云, 等. 组织透明技术在植物解剖学和植物发育生物学实验教学中的应用 [J]. 中国细胞生物学学报(LI G C, LIU B, YANG Z Y, et al. The application of tissue clearing technology in experimental course of plant anatomy and plant developmental biology [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2021, 43(3): 578-85.