

· 技术方法 ·

花粉管细胞壁原子力显微镜观测制样方法优化

覃思颖^{1*}, 罗燕¹, 张禾², 胡君¹, 廖菊够³

¹北京大学生命科学院, 北京 100871; ²北京大学现代农学院, 北京 100871; ³云南大学生态与环境学院, 昆明 650500

摘要 原子力显微技术是研究植物细胞壁超微结构与力学性质的重要表征手段, 良好的样品制备是获得可靠数据的前提。花粉管作为微米级别的植物样品, 是研究细胞壁结构与功能的典型实验材料, 但是制样过程中活性生理状态下的花粉管与基底黏附不牢固, 难以获得活性生理状态下的花粉管原子力显微镜观测数据。该文以烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉管为材料, 对花粉管原子力显微样品制备和观测方法进行优化, 采用固体培养基薄层作为花粉管与基底之间的黏附剂, 花粉管在萌发和生长的同时完成与基底的黏附。与常规的干燥-复水法相比, 优化的液下黏附法, 可在液体环境下直接观测, 无需经过干燥处理, 避免了干燥-复水过程对花粉管造成的形貌皱缩与力学性质改变, 能够获得活性生理状态下花粉管细胞壁原位的高分辨率原子力显微镜观测数据。该方法可应用于不同种属及不同尺寸花粉管的原子力显微镜观测。

关键词 原子力显微镜, 花粉管, 细胞壁, 原位, 力学性质

覃思颖, 罗燕, 张禾, 胡君, 廖菊够 (2024). 花粉管细胞壁原子力显微镜观测制样方法优化. 植物学报 59, 783–791.

作为植物细胞的特征性结构, 细胞壁在植物生长发育过程中扮演着极为重要的角色, 除了为植物提供机械支持、维持细胞形态与应对外界胁迫之外, 其力学性质还影响植物细胞的生长与分化等多种行为 (Zhang et al., 2021a)。花粉管为典型的极性生长细胞, 外形呈细长管状, 生长区域集中在顶端 (Dumais, 2021)。花粉萌发与花粉管伸长是被子植物有性生殖的关键环节, 花粉在柱头上萌发并长出花粉管, 花粉管通过顶端的极性生长穿过花柱到达子房, 进入胚珠完成双受精 (Nezhad and Geitmann, 2013; Cameron and Geitmann, 2018)。在整个环节中, 花粉管细胞壁的力学性质直接影响花粉的萌发、花粉管伸长以及受精过程中花粉管穿越多层细胞壁和细胞外基质等过程, 对植物有性生殖至关重要 (李彤辉等, 2023)。

植物细胞壁结构的成像与表征手段, 除了光学显微镜、扫描与透射电子显微镜等常用技术外, 原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM)、点击化学标记、拉曼光谱以及傅里叶变换红外光谱等技术也是研究植物细胞壁结构、成分与性质的重要工具 (高步红等, 2018; 张御格等, 2023; 张曼等, 2023)。其中, 原

子力显微镜发明于1986年 (Binnig et al., 1986), 通过检测探针与样品表面之间的相互作用力来获取样品表面的形貌信息与力学性质, 具有纳米级别的空间分辨率与皮牛级别的力感应灵敏度。AFM是研究单细胞力学性质的重要技术方法 (Krieg et al., 2019; 李航宇等, 2021), 与之相比, 微纳米压痕 (Qian and Zhao, 2018) 和细胞力显微镜 (Routier-Kierzkowska et al., 2012) 等细胞力学性质表征技术只能获得分辨率较低的力曲线矩阵数据, 而AFM可同时获得样品表面纳米级别的精细结构以及多种力学性质 (如杨氏模量和黏附力), 实现表面结构与力学性质之间的高分辨直观关联研究 (李密等, 2018)。对于生物样品的观测, AFM有着独特的优势, 其制样与检测过程对样品无损, 且能够直接在溶液环境中进行原位检测, 保持生物样品的活性生理状态, 获得活体样品的原位高分辨率表面拓扑结构与力学性质 (关东石等, 2020)。

AFM广泛应用于单分子、单细胞与动植物组织等不同大小和不同类型的生物样品观测 (Dufrêne et al., 2017), 其在植物领域的应用备受关注 (祖元刚等,

收稿日期: 2024-04-26; 接受日期: 2024-06-21

基金项目: 国家自然科学基金 (No.32060175, No.32060043) 和云南省基础研究计划重点项目 (No.202201AS070014)

* 通讯作者。E-mail: qinsiyang@pku.edu.cn

2006)。植物样品种类繁多, 细胞与组织形态各异, 样品大小跨度较大, 取材过程也不尽相同, 并无通用的AFM观测制样流程, 而良好的制样对于获得可靠的AFM观测数据至关重要。醛类固定、干燥、包埋和切片等制样过程会影响样品的力学性质(Majda et al., 2017; Vaz Dias et al., 2019; Zhang et al., 2019), 因此活性细胞原位观测是植物样品AFM观测制样的目标。对于毫米至厘米级别的样品, 如下胚轴(Wu et al., 2020)、叶片(Zheng et al., 2023)、花瓣(Zhang et al., 2021b)和根茎(Qi et al., 2017; Kozlova et al., 2019; Zhang et al., 2021c; Wang et al., 2022; Xiao et al., 2023), 可直接用镊子夹取, 操作简易。对于微米级别的样品, 无法直接用镊子操作, 特别是一些植物样品不能离开液体培养环境, 需要在溶液中进行与基底之间的黏附固定, 在操作过程中难以保持样品的活性生理状态。以花粉管为例, 大部分文献采用干燥-复水法(Zerzour et al., 2009; 吴娟子, 2011; Leszczuk et al., 2019), 即花粉管在液体培养基中萌发后, 在载玻片上干燥几小时甚至几天, 利用失水干燥使其黏附在载玻片上, 再滴加溶液进行AFM扫描, 或直接使用干燥样品在空气环境下进行AFM扫描。干燥-复水法操作相对简便, 但由于样品干燥后会引引起表面形貌和力学性质的改变, 由此获得的AFM观测数据不能反映样品活性生理状态下的真实情况。苏黎世联邦理工学院的研究人员开发了一套花粉管力学性质高通量液下观测装置与设备(Vogler et al., 2013; Shamsudhin et al., 2016; Burri et al., 2019), 但该方法对观测条件要求高, 无法在其它实验室普及。液体环境下花粉管也能自然沉降, 黏附在多聚赖氨酸等黏附剂处理后的载玻片上, 但由于花粉管呈长圆柱型, 其与基底的黏附面积小, 弯曲的花粉管与隆起的花粉粒都会影响其黏附效果, 在AFM扫描过程中也极易松动脱落, 无法进行完整的扫描。

本研究以烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉管为实验材料, 采用固体培养基薄层作为黏附剂, 使花粉管在萌发、生长的同时黏附在涂有固体培养基薄层的载玻片上, 不经过干燥和复水等处理过程, 直接在液体环境下对活性花粉管进行AFM观测, 通过优化制样与观测方法, 获得具有生理活性的花粉管细胞壁无损、原位且高分辨率的表面形貌与力学性质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物材料为烟草栽培品种K326 (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'K326')。将其种子播种于基质(凯吉拉0–10 mm)中, 置于28°C恒温培养室生长至1月龄, 再移栽至25°C温室, 1周浇灌1–2次自来水。将德美绿源公司的20-20-20-TE按1:1 000 (v/v)加水稀释成液体肥, 每月施用1次, 每次50 mL。待烟草开花后收取成熟期花药, 置于培养皿中自然风干爆开, 分装于1.5 mL离心管中, 保存于–20°C冰箱备用。

1.2 仪器设备

生物型原子力显微镜(型号Bruker BioScope Resolve), 搭建于倒置显微镜(型号Nikon Eclipse Ti)上。

1.3 实验方法

1.3.1 培养基配制

液体培养基: 10%蔗糖、0.01%硼酸和0.025% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。固体培养基: 10%蔗糖、0.01%硼酸、1.5%琼脂和0.025% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。高压灭菌后放置于4°C冰箱备用。

1.3.2 花粉管AFM观测制样: 液下黏附法

液下黏附法见图1A示意图。将固体培养基加热至溶液状态, 取5–10 μL 滴于载玻片中央区域, 用盖玻片边缘将溶液铺平成约2 μm 厚的薄层, 重复3–5次增加薄层厚度。用疏水笔(图1C上)或透明速干指甲油(图1C下)将薄层四周圈涂, 以便后续滴加花粉悬液于薄层上不会外溢。为防止固体培养基薄层变干影响黏附效果, 制备好的黏附载玻片需在1小时内使用。

取200 μL 含0.08%琼脂的液体培养基于1.5 mL离心管中, 放入1–2粒花药, 使用移液枪吹吸混匀, 获得花粉悬液。取30–50 μL 花粉悬液滴加至固体培养基薄层中央, 置于湿盒内28°C培养4–6小时。AFM观测前, 使用不含琼脂的液体培养基轻柔冲洗3–5遍, 再滴加50 μL 不含琼脂的液体培养基于薄层上, 即可进行AF观测。

1.3.3 花粉管AFM观测制样: 干燥-复水法

干燥-复水法见图1B示意图。取30–50 μL 花粉悬液滴

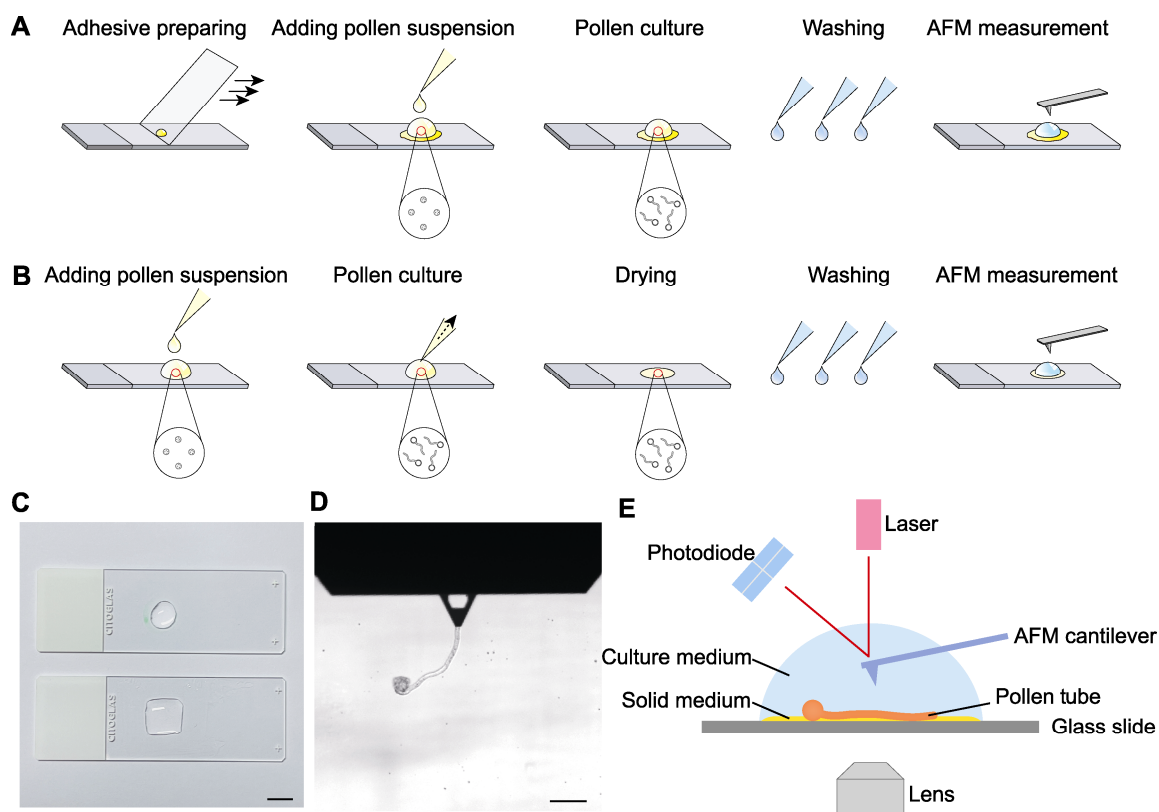


图1 花粉管原子力显微镜(AFM)制样及观测示意图

(A) 液下黏附法; (B) 干燥-复水法; (C) 载玻片待测区域(bar=1 cm); (D) AFM观测明场视野(bar=100 μm); (E) AFM液下观测

Figure 1 Schematic diagram of pollen tube atomic force microscope (AFM) preparation and detection

(A) Liquid-attaching preparation method; (B) Drying-rehydration preparation method; (C) Test areas of glass slides (bar=1 cm); (D) Optical bright field image of AFM probe at work (bar=100 μm); (E) AFM detection under aqueous conditions

加至普通载玻片的待测区域,置于湿盒内 28°C 培养4–6小时。将载玻片上多余的培养基吸干,放置在通风橱晾干数小时至数天,使用不含琼脂的液体培养基轻柔冲洗3–5遍后,滴加 $50\ \mu\text{L}$ 不含琼脂的液体培养基进行AFM观测。

1.3.4 AFM观测

探针选用ScanAsyst Fluid (Bruker, $0.7\ \text{N}\cdot\text{m}^{-1}$, 针尖半径 $20\ \text{nm}$)。使用载玻片校准探针灵敏度(单位: $\text{nm}\cdot\text{V}^{-1}$)与弹性系数(单位: $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$) (Thermal tune方法)。选用成像软件NanoScope 9.4中Feak Force QNM in Fluid的Scan模式,成像参数设置:扫描频率为 $0.5\ \text{Hz}$,扫描范围 $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$;扫描线为256;线采样点为256;峰值力阈值为 $5\ \text{nN}$ 。AFM观测明场视野与示意图见图1D, E。

1.3.5 AFM观测数据分析

使用离线软件NanoScope Analysis 1.8对AFM观测数据进行分析处理,从spm文件的Height Sensor通道中获得高分辨形貌的二维与三维展示图,叠加杨氏模量图作为皮肤的效果更为直观(Hu et al., 2020)。Modulus通道中选择Roughness对花粉管杨氏模量数据进行统计。Height Sensor通道中选择Section测量花粉管的高度并进行统计。pfc文件可获得每个像素点的力-距离曲线。

2 结果与讨论

2.1 不同黏附方法对花粉管黏附效果的影响

本研究比较了干燥-复水法与液下黏附法两种花粉管AFM观测制样方法。其中,干燥-复水法的花粉管黏附

比例较高,在显微镜视野中较易找到黏附花粉管。而液下黏附法的花粉管黏附比例较低,需要在视野中寻找合适的花粉管样品,为此可在萌发时适当增加花粉的浓度以获得更多的黏附花粉管。干燥-复水法黏附的花粉管,在滴加培养基之后,仍有部分黏附花粉管会失去黏附性,因此需在1小时内观测完毕。

2.2 不同黏附方法对花粉管细胞壁杨氏模量的影响

杨氏模量(Young's modulus),亦称弹性模量(elastic modulus, E),用于表征材料的刚度(stiffness),可反映花粉管细胞壁的弹性,也就是细胞壁受力后发生弹性变形的难易程度(Mirabet et al., 2011; Krieg et al., 2019)。在AFM扫描过程中,综合考虑花粉管的直径大小与扫描的稳定性,扫描范围设置为 $15\ \mu\text{m} \times 15\ \mu\text{m}$,分别扫描花粉管的顶端(最尖端的 $15\ \mu\text{m}$ 以内)与中段部位(距离顶端 $40\text{--}80\ \mu\text{m}$ 处)。花粉管的高分辨三维形貌图(图2A)显示花粉管的顶端和中段表面均为较粗糙的纤丝状结构,是其细胞壁表面的微纤丝。叠加杨氏模量图作为皮肤的高分辨三维形貌图(图2B),显示花粉管的细胞壁并非刚度均匀的单细胞,花粉管顶端细胞壁的刚度较小,中段的刚度较大,即花粉管细胞

壁的刚度沿其纵向呈不均一性分布。

花粉管顶端与中段区域杨氏模量测量与统计结果如图3所示。图3A–D为不同制样方法的代表性力-距离曲线,每条力-距离曲线包括逼近(approach)曲线与回撤(retract)曲线,分别描述探针逼近与远离样品表面的过程。利用Hertz接触模型对曲线进行拟合,得到该位置的杨氏模量进而获得花粉管顶端与中段的杨氏模量(图3E, F)。统计结果表明,干燥-复水法制样的花粉管,其顶端和中段杨氏模量平均值分别为 $0.88\ \text{MPa}$ 和 $1.59\ \text{MPa}$,液下黏附法制样的花粉管,其顶端和中段杨氏模量平均值分别为 $2.29\ \text{MPa}$ 和 $3.2\ \text{MPa}$ (图3G)。可见干燥-复水法的干燥过程对花粉管的力学性质有一定影响,且对花粉管顶端的影响更大。

2.3 不同黏附方法对花粉管截面高度的影响

为了进一步比较干燥-复水法与液下黏附法这两种方法对花粉管形态的影响,在花粉管的AFM高分辨形貌图中获取花粉管顶端与中段的截面高度数据,沿花粉管顶端的轴向(图4A虚线所示)与中段的径向(图4D虚线所示)提取高度信息,花粉管顶端的截面高度为距离尖端 $10\ \mu\text{m}$ 位置与基底之间的高度差(图4B箭头

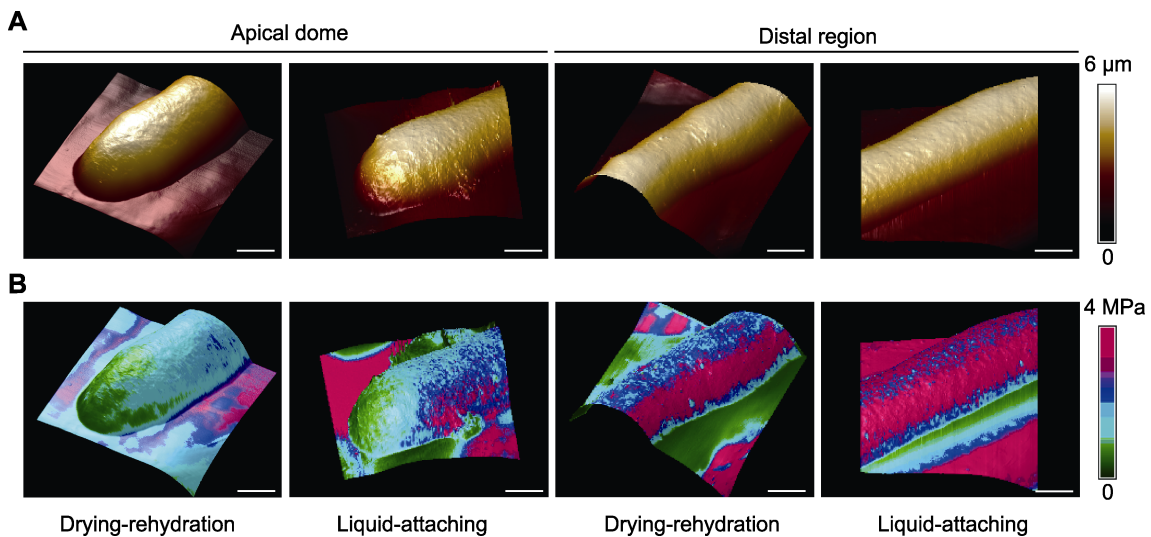


图2 干燥-复水法与液下黏附法的花粉管原子力显微镜(AFM)观测数据(顶端与中段部位)

(A) 花粉管三维形貌图(颜色表示高度); (B) 叠加杨氏模量数据的花粉管三维形貌图(颜色表示杨氏模量)。Bars=3 μm

Figure 2 Pollen tube atomic force microscope (AFM) imaging data of drying-rehydration and liquid-attaching preparation methods (apical dome and distal region)

(A) AFM-mapping of three-dimensional topography of pollen tubes (colors represent the height); (B) Three-dimensional topography of pollen tubes overlaid with Young's modulus (colors represent the elasticity). Bars=3 μm

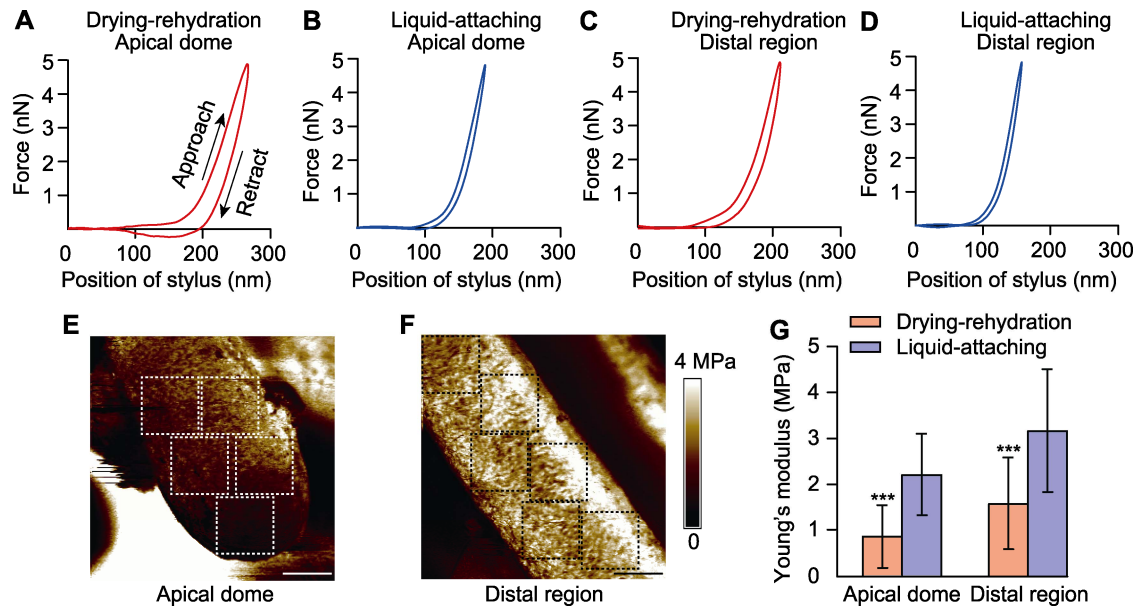


图3 不同黏附方法对花粉管顶端与中段杨氏模量的影响

(A)–(D) 干燥-复水法的花粉管顶端(A)、中段(C)与液下黏附法的花粉管顶端(B)、中段(D)的代表性力-距离曲线; (E) 花粉管顶端的杨氏模量图; (F) 花粉管中段的杨氏模量图(颜色表示杨氏模量, 虚线方框(边长 $3.5 \mu\text{m}$)为统计杨氏模量平均值的区域); (G) 干燥-复水法与液下黏附法的花粉管顶端与中段的杨氏模量统计结果(***)表示不同处理间在 $P < 0.001$ 水平差异极显著)。Bars= $3 \mu\text{m}$

Figure 3 Effects of different preparation methods on the Young's modulus of pollen tube apical dome and distal region

(A)–(D) Typical force-distance curves obtained from apical dome (A) and distal region (C) of drying-rehydration method, apical dome (B) and distal region (D) of liquid-attaching method; (E) Young's modulus of pollen tube apical dome; (F) Young's modulus of pollen tube distal region (colors represent the elasticity, dashed boxes (side length $3.5 \mu\text{m}$) are the areas for calculating the average Young's modulus); (G) The statistical results of Young's modulus of pollen tube apical dome and distal region using drying-rehydration and liquid-attaching preparation methods (***) represent extremely significant differences among different treatments at $P < 0.001$). Bars= $3 \mu\text{m}$

位置), 花粉管中段的截面高度为最高点与基底之间的高度差(图4E箭头位置)。统计结果表明, 干燥-复水法制样的花粉管, 其顶端和中段截面高度平均值分别为 $1.82 \mu\text{m}$ 和 $2.3 \mu\text{m}$, 液下黏附法制样的花粉管, 其顶端和中段截面高度平均值分别为 $3.67 \mu\text{m}$ 和 $3.46 \mu\text{m}$ (图4C, F)。可见干燥-复水法的干燥过程影响了花粉管的截面高度, 且花粉管顶端皱缩形变的幅度更大。

2.4 讨论

在生物样品的AFM观测中, 保持生物样品的活性生理状态以及制样过程尽量不影响其力学性质, 是获得样品真实力学数据的关键。植物样品形态各异、尺寸跨度大, 不同植物组织样品需要根据形态尺寸与生长特点来设计AFM观测制样方案。花粉管作为微米级别的植物单细胞样品, 对环境条件(如温度和湿度)极为

敏感, 为了攻克花粉管在活性生理状态下进行AFM观测的难点, 本研究对其制样流程进行优化, 采用花粉管固体培养基薄层作为黏附剂, 在花粉萌发和花粉管生长的同时完成其与基底的黏附。固体培养基薄层有一定的厚度, 可以更好地固定花粉管, 极大地提高了花粉管的黏附效率, 实现液体环境下花粉管在活性生理状态下无损、原位且高分辨率AFM观测。

与干燥-复水法相比, 液下黏附法获得的数据可避免由于干燥和形变等引起的形貌与力学性质改变, 而这些改变可能会降低甚至掩盖实验组与对照组之间的差异, 导致无法获得准确的组间比较数据。在AFM探针压入样品表面时, 如果基底较软, 压入深度则包含了基底的形变量, 导致计算得出的杨氏模量值偏小。液下黏附法的花粉管直接与载玻片基底相接触, 保证压入深度仅由样品本身形变所引起, 与其它方法如以琼脂糖为基底的方法(Riglet et al., 2020)相比,

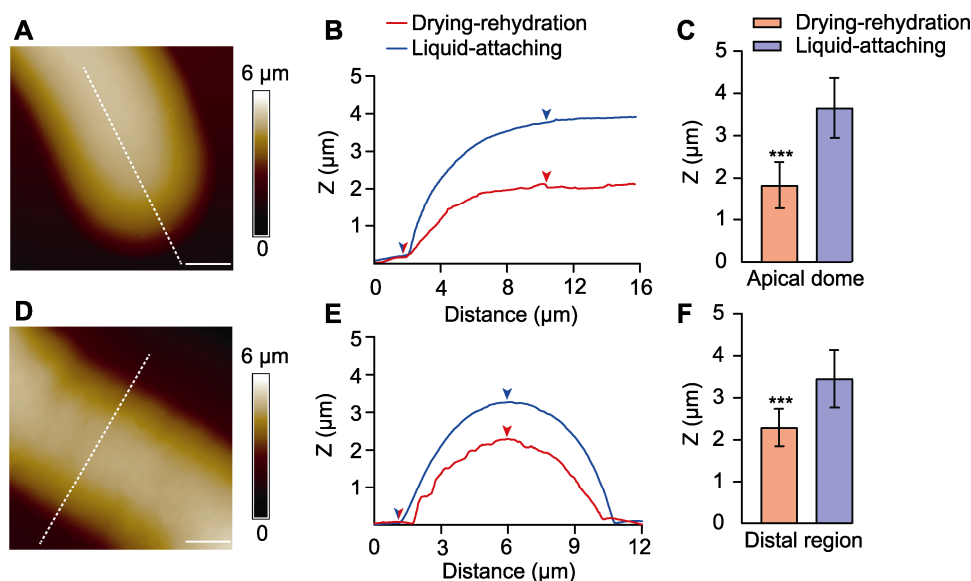


图4 不同黏附方法对花粉管顶端与中段截面高度的影响

(A), (D) 花粉管顶端(A)及中段(D)高度图(颜色表示高度, 虚线示截面位置); (B), (E) 不同黏附方法的花粉管顶端(B)及中段(E)截面高度图(箭头为截面高度差位置); (C), (F) 不同黏附方法的花粉管顶端(C)及中段(F)截面高度(Z)统计(***表示不同处理间在 $P<0.001$ 水平差异极显著)。Bars=3 μm

Figure 4 Effects of different preparation methods on the cross-section height of pollen tube apical dome and distal region (A), (D) The height images of pollen tube apical dome (A) and distal region (D) (colors represent the height, and dashed lines represent the position of the cross-section); (B), (E) The cross-section height of pollen tube apical dome (B) and distal region (E) using different preparation methods (the arrows indicate the position of cross-section height); (C), (F) The statistical results of cross-section height (Z) of pollen tube apical dome (C) and distal region (F) using different preparation methods (***) represent extremely significant differences among different treatments at $P<0.001$). Bars=3 μm

可排除软基底对实验数据的影响。图2B与图3E和F中花粉管顶端与中段部位的杨氏模量数据呈现局部数值偏大的现象, 可能是由于探针并非垂直压入细胞壁表面而造成接触力学模型计算出来的杨氏模量有偏差, 这一现象可通过有限元建模计算进行矫正(Routier-Kierzkowska et al., 2012)。

花粉管是典型的极性生长细胞, 此外, 真菌菌丝、苔藓和蕨类的原丝体、植物根毛与动物神经细胞等(Adhikari et al., 2020)也依靠极性生长来完成各种生命活动。植物细胞壁刚度与膨压共同决定了植物细胞的生长速率和方向(Boudaoud, 2010; Uyttewaal et al., 2010)。本研究表明, 花粉管顶端的杨氏模量比中段部位更小, 且对环境变化更为敏感, 而花粉管的顶端部位是生长与伸长的位置, 推测其细胞壁的成分与其它部位不同, 这一结果与前人的研究结果一致(Geitmann and Parre, 2004; Zerzour et al., 2009; Vogler et al., 2013; Shamsudhin et al., 2016; Leszczuk et al., 2019)。花粉管顶端细胞壁的杨氏模

量更小意味着受到细胞内部膨压的作用后更容易发生变形, 因此顶端部位会持续生长和伸长, 实现细胞的极性生长。花粉管细胞壁力学性质研究可推动花粉管极性生长与受精过程的深入解析, 如细胞骨架的排布与动态变化以及蛋白分子的功能调控(Landrein and Ingram, 2019), 从而揭示植物双受精的作用机理。

综上, 本研究对花粉管细胞壁的AFM观测制样方法进行优化, 利用固体培养基薄层作为黏附剂, 花粉管在萌发和生长的同时完成与基底的黏附, 可获得活性生理状态下花粉管细胞壁原位的高分辨表面形貌与力学性质, 可应用于不同种属及不同尺寸的花粉管, 为进一步揭示植物细胞壁的生长调控机制奠定了基础。

作者贡献声明

覃思颖: 构思并设计实验, 完成实验, 分析数据, 撰写论文; 罗燕: 完成实验, 分析数据; 张禾: 文献资料收集与分析; 胡君: 绘制图表, 提供技术支持; 廖

菊够: 提供样品与技术支持。

参考文献

- Adhikari PB, Liu XY, Kasahara RD** (2020). Mechanics of pollen tube elongation: a perspective. *Front Plant Sci* **11**, 589712.
- Binnig G, Quate CF, Gerber C** (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930–933.
- Boudaoud A** (2010). An introduction to the mechanics of morphogenesis for plant biologists. *Trends Plant Sci* **15**, 353–360.
- Burri JT, Vogler H, Munglani G, Läubli NF, Grossniklaus U, Nelson BJ** (2019). A microrobotic system for simultaneous measurement of turgor pressure and cell-wall elasticity of individual growing plant cells. *IEEE Robot Autom Lett* **4**, 641–646.
- Cameron C, Geitmann A** (2018). Cell mechanics of pollen tube growth. *Curr Opin Genet Dev* **51**, 11–17.
- Dufrêne YF, Ando T, Garcia R, Alsteens D, Martinez-Martin D, Engel A, Gerber C, Müller DJ** (2017). Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat Nanotechnol* **12**, 295–307.
- Dumais J** (2021). Mechanics and hydraulics of pollen tube growth. *New Phytol* **232**, 1549–1565.
- Gao BH, Xu L, Sun HJ, Xuan Y, Tang Y** (2018). Research progress on atomic force microscopy in wood science. *J Jiangsu For Sci Technol* **45**, 54–57. (in Chinese)
- 高步红, 徐莉, 孙海军, 宣艳, 唐颖 (2018). 原子力显微镜在木材科学研究中的进展. *江苏林业科技* **45**, 54–57.
- Geitmann A, Parre E** (2004). The local cytomechanical properties of growing pollen tubes correspond to the axial distribution of structural cellular elements. *Sex Plant Reprod* **17**, 9–16.
- Guan DS, Li HY, Tong PE** (2020). Experimental methods and recent progress in biomechanics using atomic force microscopy. *J Exp Fluid Mech* **34**(2), 57–66. (in Chinese)
- 关东石, 李航宇, 童彭尔 (2020). 原子力显微镜的生物力学实验方法和研究进展. *实验流体力学* **34**(2), 57–66.
- Hu JR, Chen SB, Huang DD, Zhang Y, Lü SQ, Long M** (2020). Global mapping of live cell mechanical features using PeakForce QNM AFM. *Biophys Rep* **6**, 9–18.
- Kozlova L, Petrova A, Ananchenko B, Gorshkova T** (2019). Assessment of primary cell wall nanomechanical properties in internal cells of non-fixed maize roots. *Plants* **8**, 172.
- Krieg M, Fläschner G, Alsteens D, Gaub BM, Roos WH, Wuite GJL, Gaub HE, Gerber C, Dufrêne YF, Müller DJ** (2019). Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nat Rev Phys* **1**, 41–57.
- Landrein B, Ingram G** (2019). Connected through the force: mechanical signals in plant development. *J Exp Bot* **70**, 3507–3519.
- Leszczuk A, Koziol A, Szczuka E, Zdunek A** (2019). Analysis of AGP contribution to the dynamic assembly and mechanical properties of cell wall during pollen tube growth. *Plant Sci* **281**, 9–18.
- Li HY, Nie PC, Guan DS** (2021). A hand of exploring the micro- and nano-scale world—atomic force microscope. *Mech Eng* **43**, 806–811. (in Chinese)
- 李航宇, 聂鹏程, 关东石 (2021). 探索微纳米世界的手——原子力显微镜. *力学与实践* **43**, 806–811.
- Li M, Xi N, Wang YC, Liu LQ** (2018). Applications of multi-parametric imaging atomic force microscopy in probing cellular and molecular mechanics. *Prog Biochem Biophys* **45**, 1106–1114. (in Chinese)
- 李密, 席宁, 王越超, 刘连庆 (2018). 基于多参数成像 AFM 的细胞及分子力学特性探测研究进展. *生物化学与生物物理进展* **45**, 1106–1114.
- Li TH, Wang T, Ren HY** (2023). Advances in the study of cytoskeleton system regulating pollen tube development. *Sci Sin Vitae* **53**, 763–774. (in Chinese)
- 李彤辉, 王婷, 任海云 (2023). 细胞骨架系统调控花粉管发育的研究进展. *中国科学: 生命科学* **53**, 763–774.
- Majda M, Grones P, Sintorn IM, Vain T, Milani P, Krupinski P, Zagórska-Marek B, Viotti C, Jönsson H, Mellerowicz EJ, Hamant O, Robert S** (2017). Mechanochemical polarization of contiguous cell walls shapes plant pavement cells. *Dev Cell* **43**, 290–304.
- Mirabet V, Das P, Boudaoud A, Hamant O** (2011). The role of mechanical forces in plant morphogenesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 365–385.
- Nezhad AS, Geitmann A** (2013). The cellular mechanics of an invasive lifestyle. *J Exp Bot* **64**, 4709–4728.
- Qi JY, Wu BB, Feng SL, Lü SQ, Guan CM, Zhang X, Qiu DL, Hu YC, Zhou YH, Li CY, Long M, Jiao YL** (2017). Mechanical regulation of organ asymmetry in leaves. *Nat Plants* **3**, 724–733.
- Qian L, Zhao HW** (2018). Nanoindentation of soft biological materials. *Micromachines (Basel)* **9**, 654.
- Riglet L, Rozier F, Kodera C, Bovio S, Sechet J, Fobis-Loisy I, Gaude T** (2020). KATANIN-dependent mechanical properties of the stigmatic cell wall mediate the

- pollen tube path in *Arabidopsis*. *eLife* **9**, e57282.
- Routier-Kierzkowska AL, Weber A, Kochova P, Felekis D, Nelson BJ, Kuhlemeier C, Smith RS** (2012). Cellular force microscopy for *in vivo* measurements of plant tissue mechanics. *Plant Physiol* **158**, 1514–1522.
- Shamsudhin N, Laeubli N, Atakan HB, Vogler H, Hu CZ, Haeberle W, Sebastian A, Grossniklaus U, Nelson BJ** (2016). Massively parallelized pollen tube guidance and mechanical measurements on a Lab-on-a-Chip platform. *PLoS One* **11**, e0168138.
- Uyttewaal M, Traas J, Hamant O** (2010). Integrating physical stress, growth, and development. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 46–52.
- Vaz Dias F, Serrazina S, Vitorino M, Marchese D, Heilmann I, Godinho M, Rodrigues M, Malhó R** (2019). A role for diacylglycerol kinase 4 in signaling crosstalk during *Arabidopsis* pollen tube growth. *New Phytol* **222**, 1434–1446.
- Vogler H, Draeger C, Weber A, Felekis D, Eichenberger C, Routier-Kierzkowska AL, Boisson-Dernier A, Ringli C, Nelson BJ, Smith RS, Grossniklaus U** (2013). The pollen tube: a soft shell with a hard core. *Plant J* **73**, 617–627.
- Wang MM, Zhu XP, Peng GQ, Liu ML, Zhang SQ, Chen MH, Liao ST, Wei XY, Xu P, Tan XY, Li FP, Li ZC, Deng L, Luo ZL, Zhu LY, Zhao S, Jiang DG, Li J, Liu ZL, Xie XR, Wang SK, Wu AM, Zhuang CX, Zhou H** (2022). Methylesterification of cell-wall pectin controls the diurnal flower-opening times in rice. *Mol Plant* **15**, 956–972.
- Wu JZ** (2011). Ultrastructure of pollen tube cell wall in *Torenia foenaria* L. observed by FESEM and AFM. *J Anhui Agric Sci* **39**, 21802–21804. (in Chinese)
吴娟子 (2011). 蓝猪耳花粉管细胞壁超微结构的FESEM和AFM比较研究. *安徽农业科学* **39**, 21802–21804.
- Wu QQ, Li Y, Lyu MH, Luo YW, Shi H, Zhong SW** (2020). Touch-induced seedling morphological changes are determined by ethylene-regulated pectin degradation. *Sci Adv* **6**, eabc9294.
- Xiao L, Fang YY, Zhang H, Quan MY, Zhou JX, Li P, Wang D, Ji L, Ingvarsson PK, Wu HX, El-Kassaby YA, Du QZ, Zhang DQ** (2023). Natural variation in the prolyl 4-hydroxylase gene *PtoP4H9* contributes to perennial stem growth in *Populus*. *Plant Cell* **35**, 4046–4065.
- Zerzour R, Kroeger J, Geitmann A** (2009). Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties. *Dev Biol* **334**, 437–446.
- Zhang BC, Gao YH, Zhang LJ, Zhou YH** (2021a). The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions. *J Integr Plant Biol* **63**, 251–272.
- Zhang H, Guo ZL, Zhuang Y, Suo YZ, Du JM, Gao ZX, Pan JW, Li L, Wang TX, Xiao L, Qin GJ, Jiao YL, Cai HQ, Li L** (2021b). MicroRNA775 regulates intrinsic leaf size and reduces cell wall pectin levels by targeting a galactosyltransferase gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **33**, 581–602.
- Zhang LJ, Gao CX, Mentink-Vigier F, Tang L, Zhang DM, Wang SG, Cao SX, Xu ZP, Liu XL, Wang T, Zhou YH, Zhang BC** (2019). Arabinosyl deacetylase modulates the arabinoxylan acetylation profile and secondary wall formation. *Plant Cell* **31**, 1113–1126.
- Zhang M, Zhang YZ, He QZH, E YL, Li Y** (2023). Advances in plant cell wall structure and imaging technology. *Bio-technol Bull* **39**(7), 113–122. (in Chinese)
张曼, 张叶卓, 何其邹洪, 鄂一岚, 李晔 (2023). 植物细胞壁结构及成像技术研究进展. *生物技术通报* **39**(7), 113–122.
- Zhang Y, Yu JY, Wang X, Durachko DM, Zhang SL, Cosgrove DJ** (2021c). Molecular insights into the complex mechanics of plant epidermal cell walls. *Science* **372**, 706–711.
- Zhang YG, Yuan XY, Zhang GF, Li YJ, Yin JH, Lin JX, Li XJ** (2023). The application of click chemistry reactions in plant cell labeling. *Chin Bull Bot* **58**, 956–965. (in Chinese)
张御格, 袁笑妍, 张贵芳, 李雨健, 殷金环, 林金星, 李晓娟 (2023). 点击化学反应在植物细胞标记中的应用. *植物学报* **58**, 956–965.
- Zheng L, Chen YJ, Ding LP, Zhou Y, Xue SS, Li BY, Wei JH, Wang HZ** (2023). The transcription factor MYB156 controls the polar stiffening of guard cell walls in poplar. *Plant Cell* **35**, 3757–3781.
- Zu YG, Zhang YL, Liu ZG, Wang YB, Liang HL, Liu HM** (2006). Application of atomic force microscope in plant biology research. *Chin Bull Bot* **23**, 708–717. (in Chinese)
祖元刚, 张宇亮, 刘志国, 王延兵, 梁慧丽, 刘红梅 (2006). 原子力显微镜在植物学研究中的应用. *植物学通报* **23**, 708–717.

Optimization of Preparation and Detection Methods for Pollen Tube Cell Wall by Atomic Force Microscopy

Siying Qin^{1*}, Yan Luo¹, He Zhang², Jun Hu¹, Jugou Liao³

¹School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; ²School of Advanced Agricultural Sciences, Peking University, Beijing 100871, China; ³School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, China

Abstract Atomic force microscopy (AFM) is a powerful tool for studying the ultrastructure and mechanical properties of plant cell walls, while good sample preparation is essential for AFM data acquisition. As micron-scale plant samples, pollen tubes are typical experimental materials for studying the structure and function of cell walls. Due to the difficulty in sample preparation, it is hard to obtain *in situ* AFM data in physiological state of pollen tubes as pollen tubes are hard to attach to the substrate firmly in fluid. In this study, the AFM preparation and detection methods are optimized using *Nicotiana tabacum* pollen tubes as the experimental materials. Thin solid medium is used as the adhesive, thereby pollen tubes are attached to the glass slide during germination and elongation in fluidic environment. Compared with the conventional drying-rehydration method, the optimized liquid-attaching method allows observation directly in fluid without drying treatment, which avoids the shrinkage and denaturation of pollen tubes caused by drying-rehydration process. Accordingly, liquid-attaching method can be applied for pollen tubes of different species and sizes, providing support to obtain high-resolution *in situ* AFM data of pollen tube cell walls in native physiological state under aqueous conditions.

Key words atomic force microscope, pollen tube, cell wall, *in situ*, mechanical properties

Qin SY, Luo Y, Zhang H, Hu J, Liao JG (2024). Optimization of preparation and detection methods for pollen tube cell wall by atomic force microscopy. *Chin Bull Bot* **59**, 783–791.

* Author for correspondence. E-mail: qinsiying@pku.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

通讯作者/团队简介

覃思颖, 北京大学生命科学学院公共仪器中心工程师, 负责原子力显微镜、流体力显微操作系统、共聚焦显微镜等大型仪器的技术支持与运行管理, 致力于多尺度生物样品的原子力显微镜观测、生物荧光成像与图像处理分析等技术服务, 为校内外100余个课题组提供技术支持, 支持用户在 *Nature*、*Cell*、*The Plant Cell* 等国际一流期刊发表论文70余篇, 已发表SCI论文6篇, 授权第一发明人专利1项, 2项技术与应用案例入选2023年中国仪器仪表学会科研仪器案例库。