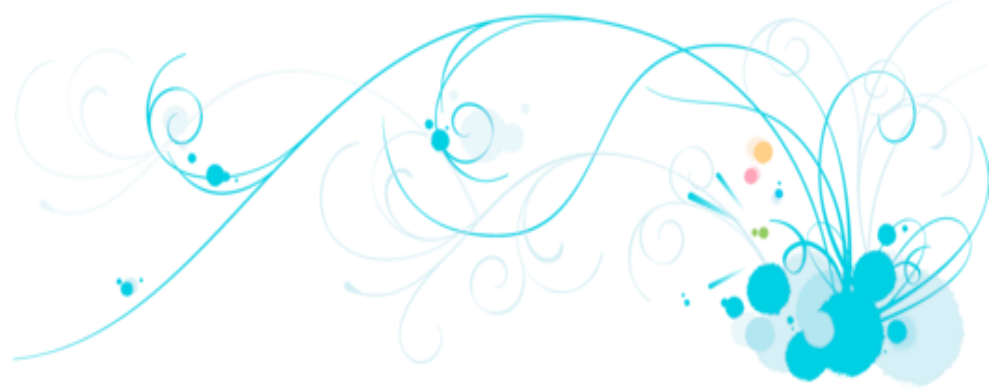


实验五 不同园艺植物花粉生活 力的测定




一、实验目的


- 1.掌握园艺植物的花粉收集方法、花粉生活力测定的不同方法。
- 2.观察花粉在离体条件下的萌发情况（花粉萌发形成花粉管的外形、伸长过程以及萌发的长度），为理解园艺植物的生殖过程及杂交育种奠定基础。

二、实验原理

正常的成熟花粉粒具有较强的活力，在适宜的培养条件下便能萌发和生长，在显微镜下可直接观察计算其萌发率，以确定其活力。




花粉贮藏的原理在于创造一定的条件，使花粉降低代谢强度，延长花粉的寿命。花粉寿命的长短，因植物种类不同而异。在自然条件下，大多数植物的花粉从花药散出后只能存活几小时，几天或几个星期。



花粉寿命的长短除了遗传性的差异以外，还与温度、湿度有密切的关系。通常高温高湿下花粉呼吸旺盛，会很快失去生命力，但在极干燥的条件下，花粉失去水分，也不利于保存。

- 试验发现苹果花粉在干燥状态下，可保存3个月；如放在2~8℃，湿度80%的条件下，经过5个星期即失去生活力。
- 丁香的花粉贮藏在干燥器中，15d以后发芽率降到50%；至20d时，仅有个别花粉发芽；到30d时，即全部死亡。



因此，暂时不用的花粉，应立即在适宜的条件下贮藏，妥善保存。为保持花粉生活力则人为采取减低其代谢强度，将其贮存于低温、干燥、黑暗，并较为稳定的环境条件下，以保持其活力。

三、实验材料、主要仪器和试剂

1. 材料：不同园艺植物，任选3种

2. 主要仪器：镊子、显微镜、恒温箱、培养皿、烧杯、玻璃棒、量缸、电磁炉、标签、记号笔、离心管、冰箱、牙签、分析天平。

3. 主要试剂：琼脂、蔗糖、硼酸、无水 CaCl_2 、 $\text{I}_2\text{-KI}$ 、TTC、醋酸洋红、蒸馏水。

四、花粉生活力的不同测定方法

1.采集花朵

选择正常的、无病虫害的园艺植株上含苞待放的正常花朵，采集后带回实验室剔除过大或过小的。

2.收集花药及散粉

用镊子取出花药（每个园艺植物取20个花蕾的花药）置于培养皿（纸盒-花粉量多）中，写上标签，进行必要的加温处理（培养箱温度 25°C ）使其散粉。

3.花粉的贮藏

散粉后将花粉收集于2ml的离心管（花粉瓶）中，用封口膜密封盖子，写上标签置于冰箱（ -20°C ）内储藏备用（或者不同温度 25°C ， 5°C 、 0°C 、 -20°C 、 -40°C 和 -86°C 下贮藏）。

(一) 形态检测法

1. 原理： 具有品种典型性状的花粉粒作为有生活力的花粉；小的、皱缩的、畸形的以及没有内含物的作为没有生活力或生活力较弱的花粉。

2. 步骤： 花粉置于载玻片上，滴上1-2滴水，盖上盖玻片观察，然后自制表格进行记载。

(二) 染色检测法

1. I_2 -KI 染色测定法

(1) 原理

多数植物正常的成熟花粉粒呈球形，积累较多的淀粉， I_2 -KI 溶液可将其染成蓝色。发育不良的花粉常呈畸形，往往不含淀粉或积累淀粉较少， I_2 -KI 溶液染色呈黄褐色。因此，可用 I_2 -KI 溶液染色来测定花粉活力。

(2) 器材与用具

显微镜；载玻片与盖玻片；镊子；棕色试剂瓶；烧杯；量筒；天平。

(3) 试剂

I_2 -KI溶液

(4) 步骤

采集成熟花药，取一花药于载玻片上，加1~2滴I₂-KI溶液用镊子将花药捣碎，释放出花粉粒，盖上盖玻片，在显微镜下观察。

凡是被染成蓝色的为含有淀粉的活力较强的花粉粒，呈黄褐色的为发育不良的花粉粒。观察2~3张片子，每片取5个视野，统计花粉的染色率，以染色率表示花粉的活力。

2.氯化三苯基四氮唑（TTC）法

（1）原理：具有活力的花粉呼吸作用较强，其产生的 NADH_2 或 NADPH_2 可将无色的TTC（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）还原成红色的TTF（三苯基甲）而使其本身着色，无活力的花粉呼吸作用较弱，TTC的颜色变化不明显，故可根据花粉吸收TTC后的颜色变化判断花粉的生活力。

(2) 器材与用具

显微镜；载玻片与盖玻片；镊子；恒温箱；棕色试剂瓶；烧杯；量筒；天平。

(3) 试剂

0.5% TTC 溶液：称取0.5g TTC放入烧杯中，加入少许95%酒精使其溶解，然后用蒸馏水稀释至100ml。溶液避光保存，若发红时，则不能再用。

(4) 方法

采集植物的花粉，取少许放在载玻片上，加1~2滴0.5% TTC溶液，盖上盖玻片，置35°C恒温箱中，10~15min后镜检，凡被染为红色的花粉活力强，淡红次之，无色者为没有活力或不育花粉。重复三次，每片取5个视野，统计花粉的染色率，以染色率表示花粉的活力。

3.醋酸洋红法

(1) 原理

正常花粉呈圆球形，物质积累较多，对醋酸洋红的吸附作用与亲和力强，通常易被染成深红色，发育不良的花粉常呈畸形，不积累物质或积累很少，用醋酸洋红染色呈淡红色或无色。

(2) 器材与用具

显微镜、载玻片、镊子、滴瓶。

(3) 试剂

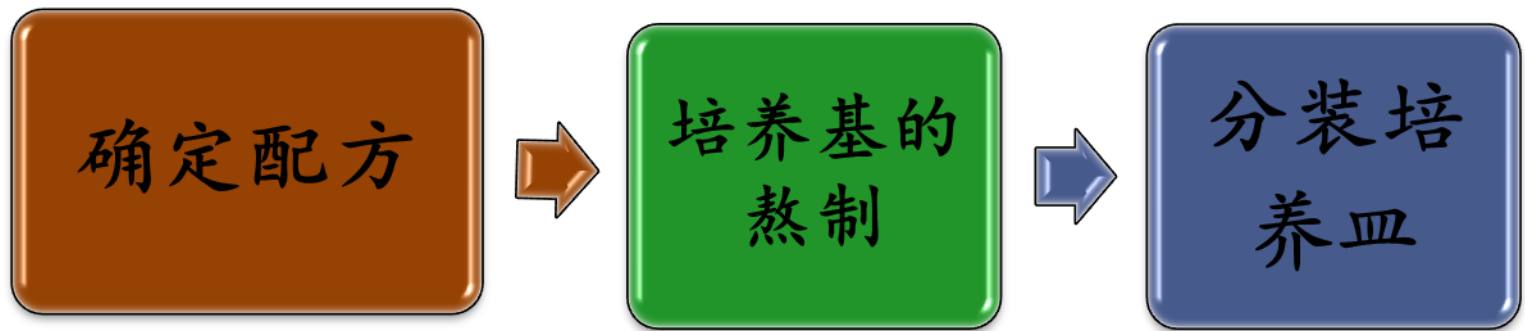
1%醋酸洋红:将洋红粉末1g倒入100mL45%醋酸溶液中，边煮边搅拌，煮沸(沸腾时间不超过30s)，冷却后过滤，即可使用。

(4) 方法

取少许花粉于载玻片上，加1~2滴醋酸洋红溶液，盖上盖玻片；将制片放在显微镜(16×10)下观察3个片子，每片选择5个视野，以统计花粉的活力百分率。

(三) 花粉萌发检测法

1. 培养基的配制



琼脂量：7g/L

蔗糖：15g/100mL (15%) ，调pH6.0

□ 不同园艺植物花粉萌发所需的培养条件不同，可在固体培养基中分别添加蔗糖、硼酸、氯化钙为参照因素，按照（三因素三水平）进行正交设计。

表1 因素水平表

因素			
水平	蔗糖浓度/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	硼酸/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	氯化钙/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	100	50	100
2	150	100	150
3	200	150	200

表2 花粉培养正交试验正交表

试验处理	列号		
	1 (A)	2 (B)	3(C)
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

2.撒播花粉

取出花粉，用牙签沾取已经散好的花粉轻轻均匀抖在培养基上，抖上之后先在显微镜下观察，要求每个视野内30~50个，避免成团影响观察效果。

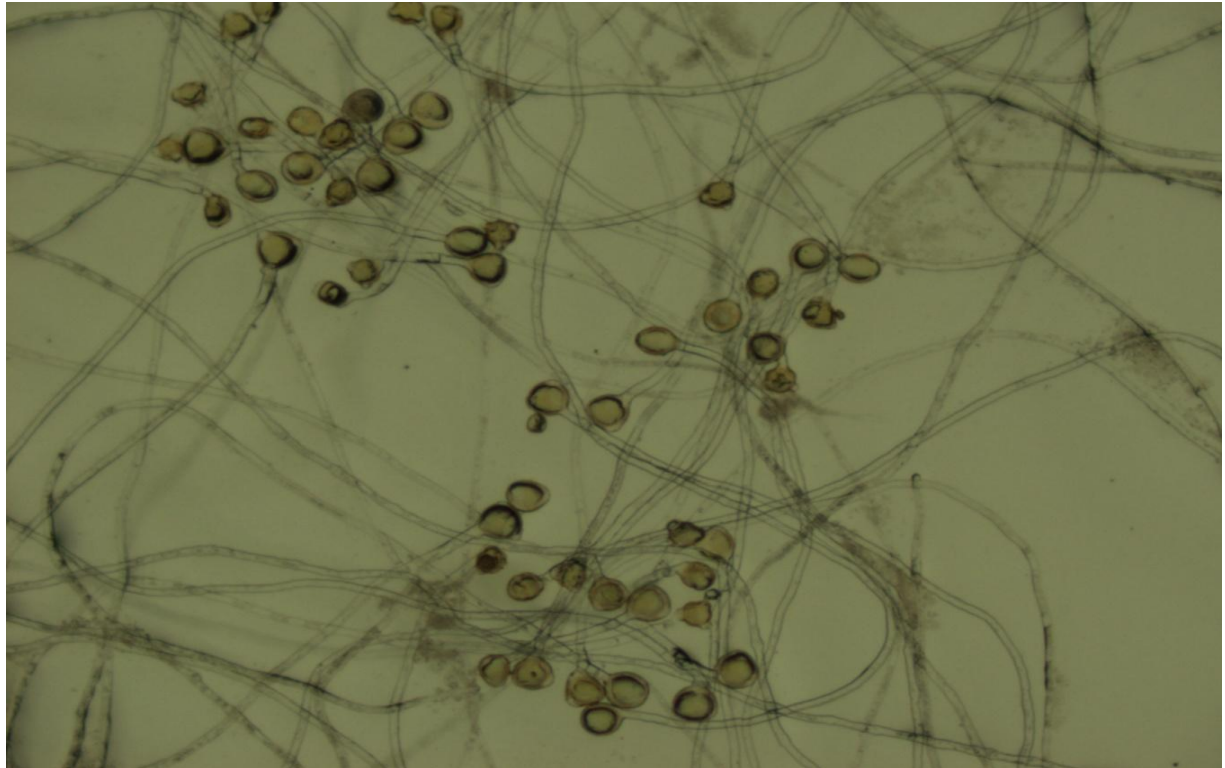
按要求撒好后用记号笔在标签上做标记（**时间、品种、组别**），放在25℃培养箱内进行培养，观察花粉管的萌发伸长。

3.观察

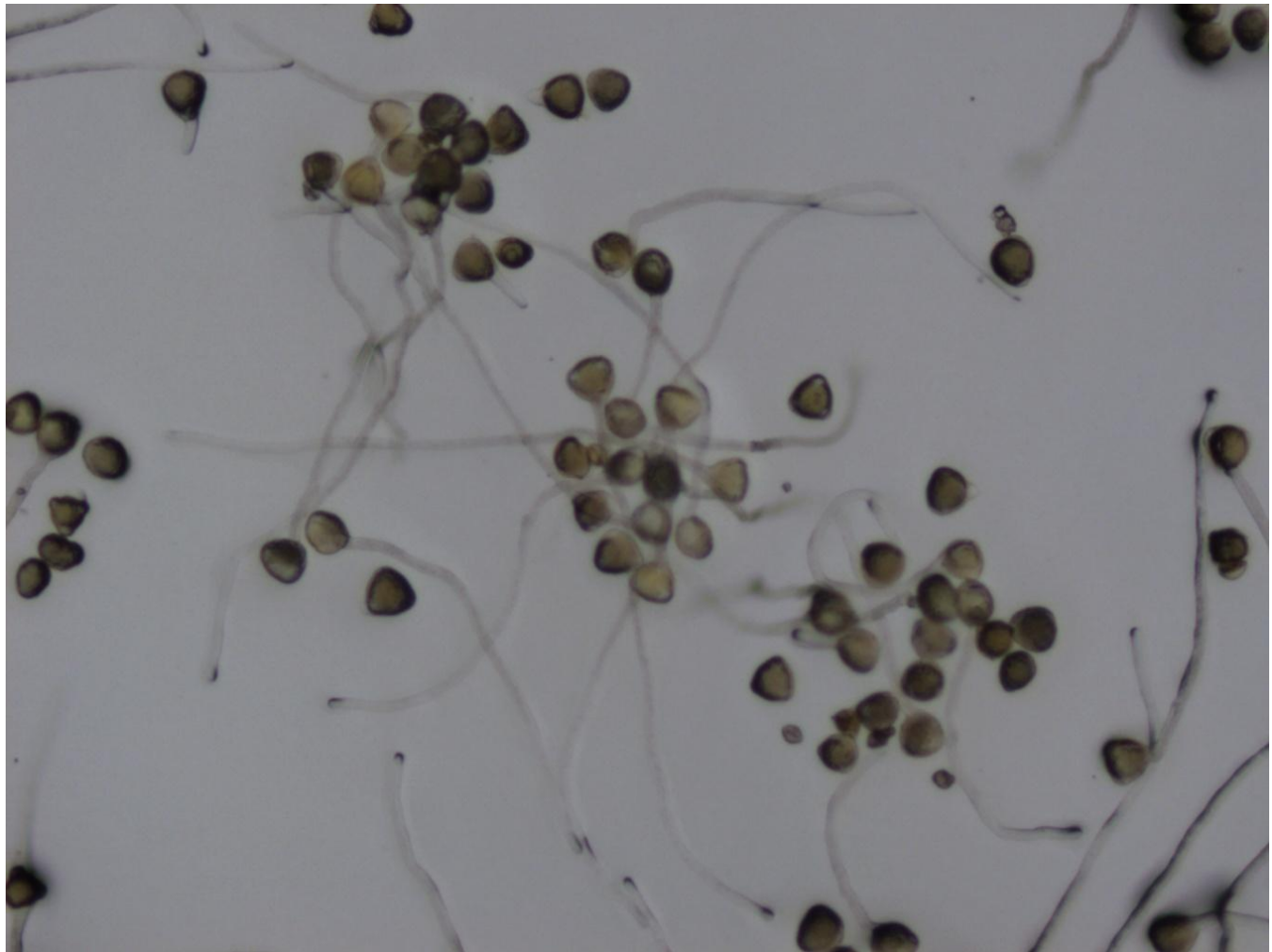
培养1h , 2h , 3h , 5h后 进行显微镜观 察,观察萌发的个数 , 每个培养皿观察3个重复 , 算出平均数 , 然后计算不同园艺植物不同贮藏条件下离体培养的花粉萌发率。

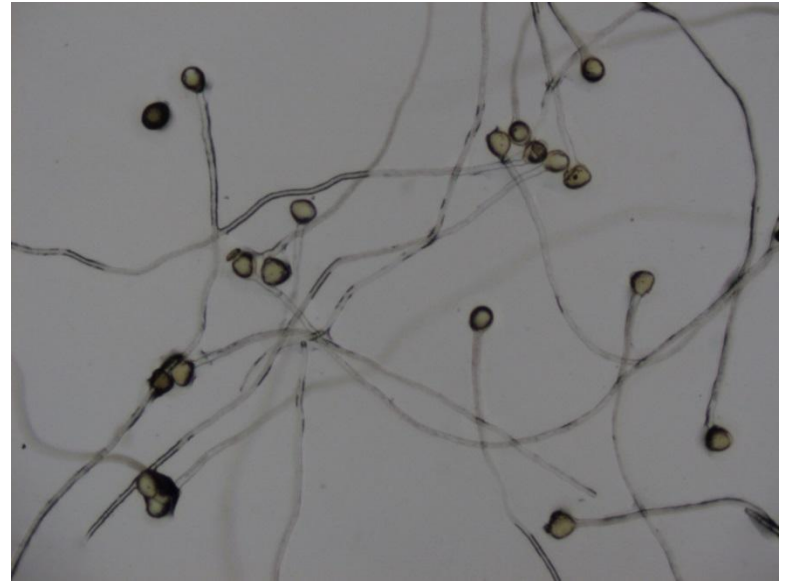
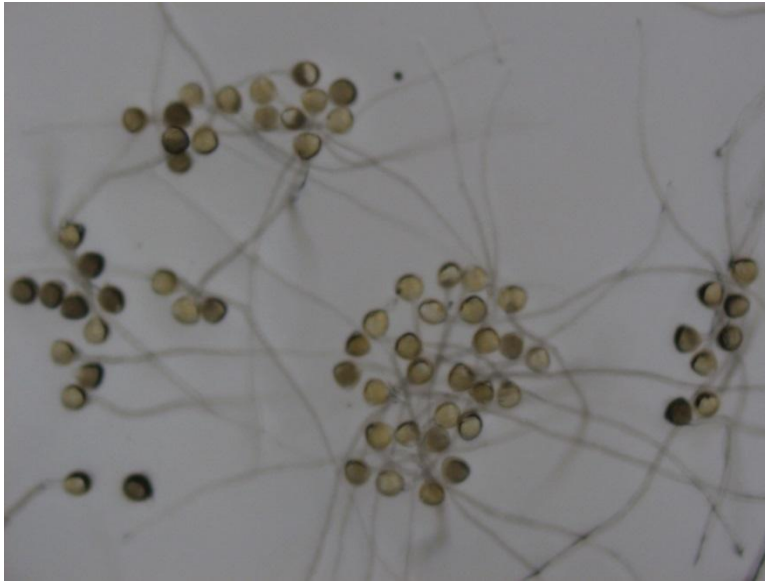
$$\text{萌发率}(\%) = \left(\frac{\text{已萌发的花粉粒数目}}{\text{花粉粒总数}} \right) * 100\%$$

5.照片描述



桃的花粉萌发率的观察（1）





桃的花粉萌发情况的观察（3）



粉萌



五、结果与分析

1. 将培养基法和染色法两种方法测得的结果列表记录，比较不同植物的花粉生活力。
2. 比较不同检测方法的优缺点。

思考题

- ◆ 影响花粉萌发的因素有哪些？



撰写实习报告