

## 贮存条件对卵叶牡丹花粉寿命的影响

贾文庆<sup>1,2</sup>, 郭英姿<sup>1,2</sup>, 王艳丽<sup>1</sup>, 朱小佩<sup>1</sup>, 王政<sup>2</sup>, 刘改秀<sup>3</sup>, 刘会超<sup>1</sup>,  
何松林<sup>1\*</sup>, 张翔宇<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院河南省园艺植物资源利用与种质创新工程研究中心, 新乡 453003; 2. 河南农业大学, 郑州 450002;  
3. 洛阳国家牡丹园, 洛阳 471000)

**摘要:** 为确定卵叶牡丹花粉萌发力准确测定的适宜培养基及高效保存方法, 解析花粉在不同温度贮存下花粉萌发率变化的生理机制。采用扫描电镜观察分析卵叶牡丹花粉表观特征, 用离体培养法对卵叶牡丹花粉进行了4因素(蔗糖、硼酸、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{GA}_3$ 含量)3水平正交试验, 并研究了不同贮存温度及时间对花粉萌发率、超氧化物歧化酶(SOD, Superoxide Dismutase)、过氧化酶(POD, Peroxidase)、过氧化氢酶(CAT, Catalase)活性、丙二醛(MDA, Malondialdehyde)含量的影响。结果表明: 卵叶牡丹花粉畸形、瘪粒率达19.50%, 是卵叶牡丹新鲜花粉萌发率低的主要原因; 影响卵叶牡丹花粉萌发的因子依次为: 蔗糖, 硼酸,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{GA}_3$ ; 花粉萌发力检测的最适宜培养基为: 110 g/L 蔗糖, 45 mg/L 硼酸, 55 mg/L  $\text{GA}_3$ , 30 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; 2、-20℃分别适宜1~6个月花粉的短期贮存, -80℃适合花粉1a左右的中期贮存, -196℃适合花粉的长期保存; 相关分析结果显示: 花粉萌发率与3种保护酶活性呈显著正相关, 与丙二醛含量呈显著负相关, 3种保护酶活性对花粉萌发率的影响次序为: 超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶, 过氧化酶; 不同贮存温度下, 3种保护酶的敏感性不同, 室温下, POD为敏感性保护酶; 2、-20、-80℃下, SOD为敏感性保护酶; 花粉丙二醛含量及3种保护酶活性基本稳定, 氧化代谢保持平衡, 是卵叶牡丹花粉在-196℃下贮存长久保持高萌发力的内因; 保护酶活性降低、丙二醛含量升高, 不能有效清除活性氧、自由基, 生理代谢失衡是卵叶牡丹花粉在室温、2、-20℃下贮存寿命缩短的主要原因之一。

**关键词:** 贮存; 低温; 酶; 卵叶牡丹; 花粉表观特征; 萌发; 丙二醛

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.14.037

中图分类号: S685.11

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2020)-14-0307-09

贾文庆, 郭英姿, 王艳丽, 等. 贮存条件对卵叶牡丹花粉寿命的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(14): 307-315.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.14.037 <http://www.tcsae.org>

Jia Wenqing, Guo Yingzi, Wang Yanli, et al. Effects of storage conditions on pollen longevity of *Paeonia qiui*[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2020, 36(14): 307-315. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2020.14.037 <http://www.tcsae.org>

## 0 引言

卵叶牡丹(*Paeonia qiui*)为芍药科芍药属落叶灌木, 是现在栽培牡丹的重要祖先之一, 卵叶牡丹早春、花期叶正面紫红、背面绿色, 花色粉色或粉红, 花期早, 是牡丹9个野生种质中仅有的春色叶、双面叶种质, 结实多, 总脂肪酸含量高<sup>[1-4]</sup>, 利用卵叶牡丹开展芍药属植物的种间杂交育种工作, 是培育油用牡丹新品种, 以及花期早、花色艳丽、春色叶的牡丹观赏品种最具潜力的途径之一。

花粉粒的小体积和耐干燥特性特别适合贮存, 是种质资源保存的重要材料, 杂交是牡丹培育新优种质的主要途径之一, 杂交特别是远距离杂交及远缘杂交, 需

要解决时空不遇, 延长花粉寿命等问题<sup>[5-7]</sup>, 以便与合适的母本进行杂交。杂交前对牡丹父本花粉进行贮存和对萌发率进行测定, 有助于制定适宜的杂交组合方案, 现有研究显示, 牡丹花粉自然寿命仅有5~10 d, 远远不能满足杂交的需求, 筛选适合卵叶牡丹花粉贮存的适宜方案, 是延长卵叶牡丹花粉寿命, 解决杂交时空不遇问题的唯一途径, 此外, 近年来, 越来越多的研究发现, 由于温度和水分胁迫, 花粉萌发率及寿命与花粉贮存期间活性氧的清除机制及膜脂过氧化水平有关, 保护酶活性及丙二醛含量的高低可以反映花粉的健康程度, 与花粉寿命及生活力具有相关性, 是花粉萌发力的直接表现<sup>[5-9]</sup>。目前, 有关卵叶牡丹的研究主要集中在分类学<sup>[2-3]</sup>、遗传学<sup>[4]</sup>、起源<sup>[10]</sup>、孢粉学<sup>[11]</sup>、杂交<sup>[12]</sup>等方面, 不同牡丹种质花粉生活力测定适宜的培养基差异较大<sup>[13-18]</sup>, 卵叶牡丹花粉萌发仅盖伟玲等<sup>[17]</sup>对花粉适宜的蔗糖、硼酸浓度进行了单因素筛选, 关于其萌发特性、贮存特性及贮存期间花粉生活力下降的生理机制方面的系统研究尚未见报道。为此, 本研究以洛阳国家牡丹园收集的卵叶牡丹花粉为材料, 探讨了花粉萌发力检测的适宜培养基, 不同的贮

收稿日期: 2020-03-24 修订日期: 2020-07-03

基金项目: 国家重点研发计划支持课题(2018YFD1000401); 河南省科技发展规划项目(202102110082); 国家自然科学基金(CI61201)

作者简介: 贾文庆, 博士, 副教授, 主要从事观赏植物资源创新与利用研究。

Email: jiaqw2012@126.com

\*通信作者: 何松林, 教授, 博士生导师, 主要从事观赏植物栽培生理及生物技术研究。Email: hsl213@163.com

存环境下的花粉寿命,并测定了贮存期间 3 种保护酶的活性及丙二醛的含量,以期确定卵叶牡丹花粉生活力检测的最佳、最可靠的培养基配方,明确卵叶牡丹花粉经济、最佳的贮存温度,探讨卵叶花粉寿命与花粉保护酶活性、丙二醛的含量的相关性,解析卵叶牡丹花粉寿命在不同贮存环境下降低的生理机制,为牡丹杂交育种提供理论和试验依据。

1 材料与方法

1.1 花粉收集、处理与贮存

1.1.1 花粉收集、处理

卵叶牡丹花粉采自洛阳国家牡丹园,预先选定生长健壮的植株,2018 年 4 月中旬上午 9:00~11:00,采集含苞待放的卵叶牡丹花苞,花柄下部在清水剪成斜口,然后迅速放入瓶中水培,带回实验室后置于(25±1)℃培养箱内继续培养 24 h,花朵开放后将花萼、花瓣剥去,轻弹倒置的花朵,花粉从花药中掉落或散出,用 150 目(孔径为 0.10 mm)过筛去除花药等杂质,收集备用。

1.1.2 花粉贮存

将新鲜花粉用 45℃恒温干燥箱脱水 4 h(花粉含水率从 14.8%降到 7.8%)后,分成 5 份,每份 20~30 个 2 mL 离心管,每管加 1~3 粒变色硅胶,装入 1~1.5 g 花粉,封口贮存,之后依次放到室温(18~25℃)、2、-20、-80、-196℃(放入液氮罐中,定期添加液氮)下贮存。

1.2 花粉超微结构观察

将 1.1.2 所得烘干脱水花粉用 2%戊二醛固定 2 h,1%锇酸固定 1 h,75%、85%、95%、100%、100%乙醇梯度脱水镀金,二氧化碳临界点干燥,镀金后在日立 SU-1510 扫描电镜下观察、拍照,记录花粉表面纹饰、大小。

1.3 卵叶牡丹花粉萌发最适培养基的筛选试验

在矮牡丹花粉萌发研究的基础上,选取对植物花粉萌发影响较大的硼酸、蔗糖、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、GA<sub>3</sub>作为试验的 4 个因素,采用 4 因素 3 水平完全随机正交试验,共 9 个固体培养基处理,1 个空白对照,浓度梯度见表 1,试验重复 3 次,确定 4 因素的最佳组合。培养基琼脂添加量为 5 g/L, pH 值调至 6.0。培养基加热熬制待琼脂完全融化后,分装至培养皿,冷却后将新鲜花粉均匀撒在培养基上,之后放入放有 2 层湿润滤纸的大培养皿里,加盖。置于培养箱中培养,温度保持在(25±1)℃、湿度 80%~90%,18 h 后在显微镜下观察统计花粉萌发情况,总计观察花粉数大于 300 粒。花粉萌发率计算如下

花粉萌发率=花粉管长度大于花粉直径的花粉数/观察花粉数×100%。

1.4 不同贮存温度对卵叶牡丹花粉萌发、丙二醛含量及 3 种保护酶活性的影响试验

卵叶牡丹花粉贮存 8、24、40、72、120、184、264、365 d 后,分别从 5 个贮存环境中取出 1 只离心管(其中 -20、-80、-196℃取出的花粉在 35℃下水浴 5~10 min 快速解冻),每离心管取出少许采用 1.3 所得最适培养基培养测定花粉萌发率,统计花粉贮存寿命(一批花粉萌发率降到新鲜花粉萌发率 50%的时间,即花粉的半衰期),其余花粉用于保护酶活性和丙二醛含量检测。

3 种保护酶及丙二醛含量溶液的提取:准确称取 0.100 g 卵叶牡丹花粉,放入 4℃预冷玻璃研钵中,加入少许聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl Pyrrolidone, PVP)、石英砂,然后加入 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 7.0),匀速研磨 30~40 s,之后将研磨混合液倒入离心管,8 000 g 4℃离心 10 min,取上清,置冰上待测。

过氧化氢酶(Catalase, CAT)(可见光分光光度法)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量(硫代巴比妥酸法)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)(氮蓝四唑法)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)(愈创木酚法)采用北京索莱宝科技有限公司提供的试剂盒测定<sup>[19]</sup>。

数据用 EXCEL 2003、DPS 6.5 进行作图、方差分析。

2 结果与分析

2.1 卵叶牡丹植物形态及花粉表现特征

卵叶牡丹株形婆娑,叶紫红,花色艳丽(图 1a)。肉质花盘亚组卵叶牡丹花粉粒为 3 个萌发沟,为孢粉学研究的原始类型,平均极轴长 47.55 μm(38.15~53.07),平均赤道轴长 22.65 μm(17.30~24.90 μm),P/E≈2.09(图 1b~1d),与何丽霞等<sup>[11]</sup>的研究结果不同,大于神农架居群的 39.84 μm×19.36 μm,与保康居群花粉(37.02 μm×23.05 μm)相比,极轴更长,但赤道轴稍短,这表明卵叶牡丹不同居群间遗传特性存在差异,要合理揭示其系统发育意义,仍需进行更全面更深入的研究。卵叶牡丹花粉形态观为长椭圆形,面包状,两端逐渐收缩呈尖形或截形;花粉粒的 3 个萌发沟基本到达两极,呈现两极窄而浅,中间稍宽而深,有毛状突出物,边缘明显增厚,极面观为长椭圆形,少数花粉极面观近圆形(图 1d)。赤道外壁纹饰基本类型为粗网筛状,网眼多为椭圆形、圆形、近圆形或不规则多边形,网眼平均直径为 3~4.7 μm,大小网眼不规则分布,网眼较深(图 1e),网脊平滑,大于网眼直径。畸形花粉长在 10~40 μm 之间,总体观不饱满、空瘪,多为勺状、条状、三棱状、不规则状等,约占观察花粉总数的 19.50%(图 1b)。

2.2 不同培养基对卵叶牡丹花粉萌发的影响

蔗糖、硼酸、Ca<sup>2+</sup>是大多数植物花粉离体萌发测定常用的物质,蔗糖能维持高渗透压,为花粉萌发提供营养<sup>[14,16]</sup>,硼酸促进花粉对糖的吸收,促进花粉管壁的形成,提高萌发率<sup>[20-22]</sup>,而 Ca<sup>2+</sup>在花粉管的脉冲式生长、花粉管的生长调节方面具有重要作用<sup>[9]</sup>。卵叶牡丹花粉萌发的正交试验结果及方差分析结果如表 2、表 3 所示,卵叶牡丹花粉在空白培养基上也能萌发,但萌发率较低,仅为 10.30%,

表 1 试验因素水平

Table 1 Test factor level

水平 Levels	因素 Factor			
	蔗糖 Sucrose A/(g·L <sup>-1</sup> )	硼酸 Boric acid B/(mg·L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> C/(mg·L <sup>-1</sup> )	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> D/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	90	30	25	30
2	110	45	40	50
3	130	60	55	70

这说明卵叶牡丹部分花粉内贮存有少量的营养物质。表 2 极差结果分析表明：正交设计中 4 个因素的  $R$ （极差）值差异较大，其中蔗糖极差值最大，其他依次是硼酸， $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  和  $\text{GA}_3$ ，这表明 4 个因素中对卵叶牡丹花粉萌发影响最大的因子为蔗糖，其它主要影响因子依次为：硼酸， $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  和  $\text{GA}_3$ 。由表 3  $F$  值可知，蔗糖对卵叶牡丹花粉萌发率影响最大，其次为硼酸，均达极显著水平， $F(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)=3.81$  大于  $F_{0.05}(2, 18)=3.55$ ，小于  $F_{0.01}(2, 18)=6.01$ ，说明  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  对卵叶牡丹花粉萌发率有显著影响，而  $F(\text{GA}_3)=2.47$  小于  $F_{0.10}(2, 18)=2.62$ ，表明  $\text{GA}_3$  对卵叶牡丹花粉萌发率无显著影响，试验中 4 个因素主次地位依次为：蔗糖，硼酸， $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  和  $\text{GA}_3$ ，与极差分析结果一致。蔗糖、硼酸不同水平间卵叶牡丹花粉萌发率差异显著，蔗糖、硼酸浓度分别为 110 g/L 和 45 mg/L 时，花粉萌发率高，但蔗糖、硼酸

浓度提高和下降，卵叶牡丹花粉萌发率均出现显著下降，不同浓度间的差异达到极显著水平；因素  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  中 30 g/L 水平显著性高于 50、70 mg/L，显示卵叶牡丹花粉萌发需要的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较低，因素  $\text{GA}_3$  中，40 mg/L 花粉萌发率高于其他 2 个水平。考虑到蔗糖、硼酸、赤霉素和硝酸钙 4 因素的互作作用，适宜卵叶牡丹花粉萌发最优的培养基参数的水平组合为  $A_2B_2C_3D_1$ ，即 110 g/L 蔗糖，45 mg/L 硼酸，55 mg/L  $\text{GA}_3$ ，30 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ，花粉萌发率最高，平均为 73.20%，明显高于其他组合。试验中发现，在最佳培养基中，光学显微镜下观察的结果显示，卵叶牡丹花粉萌发率为 73.2%，不萌发或者不符合萌发标准的花粉大多为畸形、瘪粒、小粒，占比平均为 19% 左右，显示花粉形态影响了花粉的萌发，这表明小粒、畸形、瘪粒率高是卵叶牡丹花粉萌发率低的主要原因。

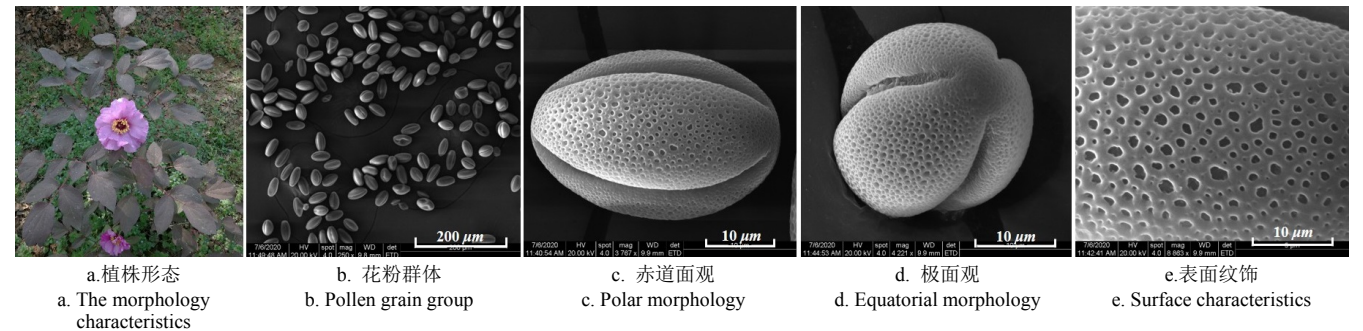


图 1 卵叶牡丹植株形态及其花粉表观特征

Fig.1 Morphology characteristics and pollen grain morphology of *Paeonia qiui*

表 2 卵叶牡丹花粉萌发的正交试验结果及极差分析

Table 2 Orthogonal test results and range analysis of pollen germination of *Paeonia qiui*

序号	因素 Factor				萌发率
No.	蔗糖 Sucrose	硼酸 Boric acid	GA <sub>3</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Germination rate/%
1	1	1	1	1	45.10±1.25 d
2	1	2	2	2	51.70±1.58 c
3	1	3	3	3	38.40±1.05 ef
4	2	1	2	3	61.55±0.85 b
5	2	2	3	1	73.20±0.95 a
6	2	3	1	2	54.70 ±1.00 c
7	3	1	3	2	35.85±0.65 f
8	3	2	1	3	40.55±1.52 e
9	3	3	2	1	30.56±1.30 g
10	0	0	0	0	10.30±1.25 h
K <sub>1</sub>	135.20 b	142.50 b	140.35 b	148.86 a	
K <sub>2</sub>	189.45 a	165.45 a	143.81 ab	142.25 b	
K <sub>3</sub>	106.96 c	123.66 c	147.45 a	140.50 b	
R	24.90	12.85	2.13	2.53	

注：不同小写字母分别表示在 0.05 水平上存在差异。  
Note: Different lower case letters indicate differences at 0.05 levels.

表 3 试验结果方差分析表

Table 3 Variance analysis of test results

变异来源 Source	平方和 Sum of square	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	临界值 Threshold	P 值 P value
模型 Model	4 455.16	8	556.90	109.18		0.000 1
A	3 515.05	2	1 757.53	344.55**	$F_{0.10}(2,18)=2.62$	0.000 1
B	876.01	2	438.01	85.87**	$F_{0.05}(2,18)=3.55$	0.000 1
C	25.21	2	12.61	2.47	$F_{0.01}(2,18)=6.01$	0.112 7
D	38.88	2	19.44	3.81*		0.041 7
误差 Error	91.82	18	5.10			

注：“\*\*”表示差异达到极显著水平，“\*”表示差异达到显著水平。  
Note: “\*\*” indicate very significant difference at 0.01 level, “\*” indicate significant difference at 0.05 level.

2.3 不同贮存温度下花粉萌发率随时间的变化

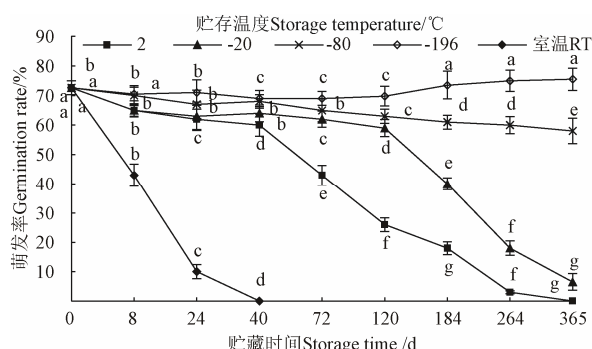
从图 2 可以看出，贮存温度对卵叶牡丹花粉萌发率影响极大。新鲜花粉的萌发率为 72.60%，随着贮存时间的延长，除-196℃贮存条件外，其他 4 个温度下，花粉萌发率均呈现下降的趋势，室温条件下萌发率下降最快，花粉的半衰期仅为 8 d，这可能是较高温度下，呼吸作用及酶活性较强，消耗了大量营养，导致部分花粉很快丧失萌发力，贮存第 40 天，花粉萌发率降为 0；2℃贮存，花粉半衰期出现在第 72 天，之后迅速下降，贮存第 264 天，萌发率仅为 3%；-20℃贮存，萌发率前期下降缓慢，后期下降加速，花粉半衰期为 184 d，-80℃贮存条件下，花粉萌发率随着时间的延长呈缓慢下降的趋势，曲线较为平缓，贮存第 365 天，花粉萌发仍达到 58%，这表明花粉半衰期超过 365 d。-196℃下花粉萌发率则成波动下降而后缓慢上升的趋势，贮存第 365 天花粉萌发率高达 75.5%，显著高于新鲜花粉萌发率 72.6%（图 2），这与李秉玲等<sup>[18]</sup>对日本牡丹品种‘日暮’和‘白王’的研究结果相似，花粉经超低温保存 1~2 a 后花粉萌发率有较大的提高。综合来看，贮存温度越低，卵叶牡丹花粉贮存寿命越长，-80、-196℃适合卵叶牡丹花粉的中长期贮存，作为种质资源保存最佳的贮存温度为-196℃。

2.4 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 MDA 含量随时间的变化

从图 3 可以看出，不同环境下随着贮存时间的延长，丙二醛含量呈现不同的趋势。室温、2℃下，卵叶牡丹花粉丙二醛含量呈现先升高，而后迅速降低的趋势，其中，



室温下贮存 72 d, 首先达到高峰, 2 °C 下随后在 184 d 出现高峰, 结合图 2 的分析可以看出, 2 个高峰均出现在花粉萌发率大幅下降后, 这表明花粉受到伤害加剧导致膜脂过氧化快速升高, 而后又随着多数花粉的死亡而迅速下降; -20 °C 下丙二醛含量呈现先缓慢后快速升高的趋势, 贮存第 365 天 MDA 达到最高, 为贮存前的 4.5 倍, 而 -80 °C 则呈现波动缓慢升高的趋势, 贮存第 365 天, 丙二醛含量为贮存前的 1.92 倍, 显示 -20 °C、-80 °C 下贮存 1 a 后, -80 °C 花粉细胞膜脂过氧化程度加剧程度较 -20 °C 下重。-196 °C 下卵叶牡丹花粉 MDA 含量总体变化幅度较小, 贮存 365 d, MDA 含量由贮存前的 7.2  $\mu\text{mol/g}$  升高到 7.5  $\mu\text{mol/g}$ , 但仅提高了 0.3  $\mu\text{mol/g}$ , 这表明在 -196 °C 贮存下卵叶牡丹花粉细胞膜系统维持稳定, 并未造成严重的膜脂过氧化。



注: RT 代表室温, 同一折线上的不同字母表示在 0.05 水平上差异显著, 花粉离体培养采用的培养基为 110 g·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 45 mg·L<sup>-1</sup> 硼酸, 55 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 30 mg·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 下同。

Note: RT represent room temperature. Different letters on the same polyline indicate significant differences at the 0.05 level, in vitro pollen germination medium containing 110 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 45 mg·L<sup>-1</sup> boric acid, 55 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>, 30 mg·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. The same below.

图 2 不同贮存温度下花粉萌发率随时间的变化

Fig.2 Effects of different storage temperature and time on pollen's germination

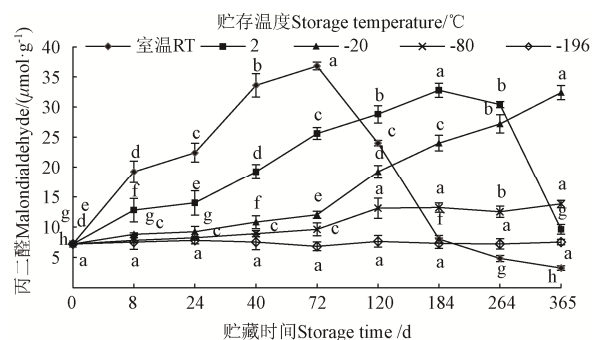


图 3 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉丙二醛含量随时间的变化

Fig.3 Effects of different storage temperature and time on pollen's MDA

## 2.5 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉保护酶活性随时间的变化

### 2.5.1 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 SOD 活性随时间的变化

图 4 试验结果显示, 室温下, 卵叶牡丹花粉 SOD 呈迅速下降的趋势, 这说明卵叶牡丹花粉超氧自由基不断减少, 导致保护能力快速下降, 而低温 (-2、-20 °C) 下, SOD 随时间延长呈现先快速升高后降低的趋势, -2 °C

下在贮存第 24 天, 花粉 SOD 活性最先达到高峰, 表明此时花粉受低温胁迫加剧, 需要提高 SOD 活性减少活性氧、自由基对花粉的伤害, -20 °C 下 SOD 活性则在第 72 天达到最高, 之后伴随着花粉萌发率的下降而迅速下降, 这表明此时胁迫加剧, SOD 活性不足以清除过多的自由基而导致花粉萌发率显著降低。-80 °C、-196 °C 下, 随着时间的延长, 均呈现总体缓慢波动上升的趋势, 变化幅度比较平缓, -80 °C 下, 伴随着花粉萌发率的缓慢降低 SOD 活性呈上升短暂下降后波动上升的趋势, 贮存 360 d, SOD 活性为 240 U/g, 达到贮存前的 1.56 倍, 而 -196 °C 贮存下 SOD 变化较小, 贮存 365 d 仅为新鲜花粉的 1.15 倍, 此时花粉萌发率较新鲜花粉无差异, 这表明超低温贮存, SOD 活性保持较为持久, 能有效清除过多的活性氧、自由基, 花粉细胞处于生理代谢平衡状态, 所以花粉仍具有较高活性。

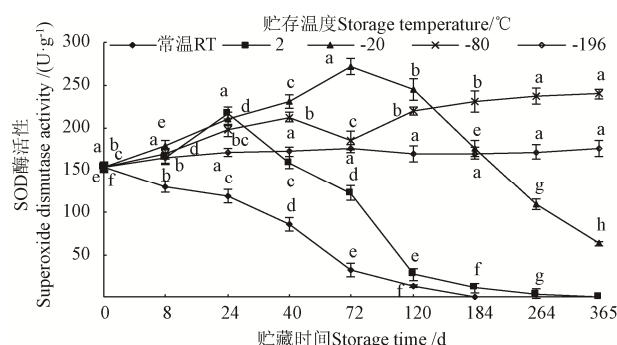


图 4 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 SOD 活性随时间的变化

Fig.4 Effects of different storage temperature and time on pollen's SOD activity

### 2.5.2 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 POD 活性随时间的变化

低温胁迫下, 植物材料易出现活性氧、自由基种类及数量增加, 造成代谢紊乱、膜脂过氧化, 植物通常通过提高保护酶的活性, 增加脯氨酸、抗坏血酸等物质来清除过量的活性氧、自由基, 以维持代谢平衡和膜系统的稳定性, 从而避免或减少损伤。POD 是植物保护系统的关键酶, 可有效清除醛、酚、胺以及 SOD 的副产物 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。由图 5 可以看出, 5 个贮存温度下, 卵叶牡丹花粉 POD 活性变化与 SOD 活性变化基本相似, 仅室温、-80 °C 下变化规律略有不同。室温、2 °C、-20 °C、-80 °C 贮存下, 卵叶牡丹花粉 POD 活性随着时间的增长, 基本呈现先升高后下降的趋势, 室温贮存至第 8 天时, POD 活性升至 135 U/g, 达到原来的 2.45 倍, 之后迅速下降, -2 °C、-20 °C、-80 °C 下, POD 活性则分别出现在贮存后的第 72、120、184 天, 伴随着高峰的出现, 4 个贮存温度下, 花粉萌发率均出现显著降低, 其中 2 °C、-20 °C 下, POD 出现高峰后迅速下降, 而 -80 °C 下, 上升与下降速度都较为缓慢, 变化不显著, 这表明与室温、2 °C、-20 °C 下相比, -80 °C 下, 花粉受到的胁迫较小。-196 °C 贮存, 过氧化物酶活性呈波动上升、下降、再上升的趋势, 最高峰分别出现第 120 天, 此时 POD 活性为原来的 1.11 倍, 之后 POD 活性开始下降, 贮存第 365 天, POD 活性为

59.64 U/g, 是贮存前花粉的 1.08 倍, 这表明卵叶牡丹花粉贮存 1 a 后, 仍然具有较强清除  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、苯、醛和胺等有害物质的能力, 进而保护花粉减少低温伤害, 保持较高的花粉萌发力。

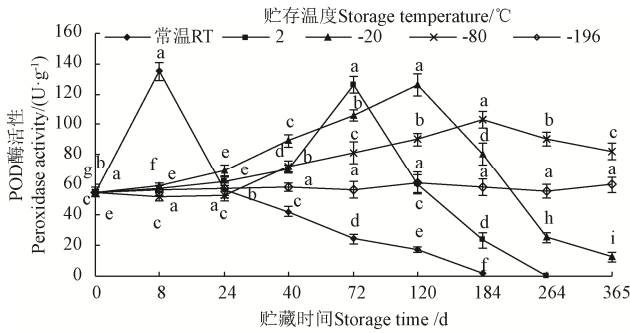


图 5 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 POD 活性随时间的变化  
Fig.5 Effects of different storage time and temperature on pollen's POD activity

2. 5. 3 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 CAT 活性随时间的变化

CAT 等抗氧化酶可清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  及有害自由基, 对防御活性氧、自由基毒害具有重要作用。图 6 表明, 随着贮存时间的延长, 室温、2 °C 下, CAT 活性呈现先升高而后迅速下降的趋势, 其中室温下在第 24 天出现峰值, 2 °C 下则在第 72 天出现峰值, 室温下变化幅度较 2 °C 下剧烈, 二者差异显著。-20 °C 下, 则呈现先缓慢降低后缓慢升高, 再迅速下降的趋势, 这表明 -20 °C 下后期花粉萌发率的下降与 CAT 活性降低, 清除活性氧的能力下降有关。-80 °C, 卵叶牡丹花粉的 CAT 活性呈现先缓慢降低再缓慢升高而后又下降的曲线, 但整体变化幅度较小, 最高变化幅度仅为 1.34 倍, 这说明相比 2、-20 °C 下花粉受到的伤害较小; -196 °C 贮存卵叶牡丹花粉的 CAT 活性呈现缓慢升高的趋势, 总体上起伏较小, 最高值出现在第 365 天, 为 125 mg/g, 达到贮存前花粉 CAT 的 1.12 倍, 显示卵叶牡丹花粉保护机制处于健康状态, 仍然具有较强的  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除能力, 能够有效减轻花粉受到的胁迫伤害, 保持花粉较高的萌发力。

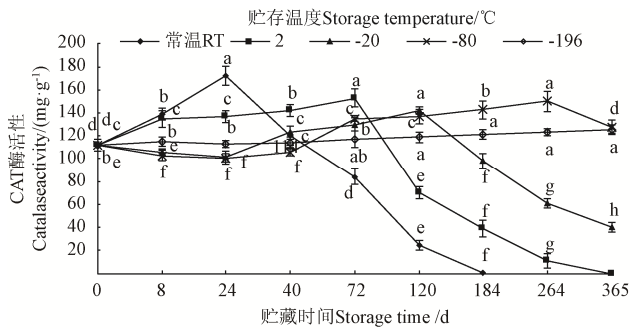


图 6 不同贮存温度下卵叶牡丹花粉 CAT 活性随时间的变化  
Fig.6 Effects of different storage temperature and time on pollen's CAT activity

2. 6 卵叶牡丹花粉萌发率与 MDA 含量、3 种保护酶活性的关系分析

从表 2 相关分析可以看出, 卵叶牡丹花粉萌发率与

丙二醛含量呈显著负相关关系, 花粉萌发率与 3 种保护酶(过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性)呈显著正相关( $P<0.01$ ), 说明在卵叶牡丹花粉的贮存过程中, 3 种保护酶活性对花粉萌发率起着主导作用, 从影响花粉萌发率的程度来看, 顺序依次为: 超氧化物歧化酶活性, 过氧化氢酶活性, 过氧化物酶活性。

表 4 花粉萌发率与 MDA 含量、3 种保护酶活性的相关分析表  
Table 4 Correlation analysis table of pollen's germination and protective enzymes activity

项目 Project	相关方程 Correlation equation	相关系数 Correlation coefficient
丙二醛含量 MDA	$y = -18.595x + 74.761$	-0.609 7**
超氧化物歧化酶 SOD	$y = 0.303x + 4.853\ 8$	0.839 8**
过氧化物酶 POD	$y = 0.699\ 5x + 24.474$	0.599 9**
过氧化氢酶 CAT	$y = 1.102\ 3x + 48.77$	0.700 0**

注: \*表示在 0.05 水平上显著的相关性; \*\*表示在 0.01 水平上显著的相关性。  
Note: \* and \*\* mean significantly correlation at 0.05, and 0.01 level, respectively.

3 讨 论

3. 1 不同培养基对卵叶牡丹花粉萌发率的影响

现有的研究表明不同的牡丹种质花粉萌发对蔗糖、硼酸的需求差异较大, 黄牡丹<sup>[13]</sup>、牡丹‘凤丹白’等(150 g/L 蔗糖及 60~80 mg/L 硼酸)<sup>[16]</sup>, 矮牡丹(90 g/L 蔗糖及 45 mg/L 硼酸)<sup>[14]</sup>, 日本牡丹(50 g/L 及 1 000 mg/L 硼酸)<sup>[18]</sup>, 滇牡丹(50 g/L 蔗糖)<sup>[23]</sup>, 因此探讨卵叶牡丹花粉萌发力测定的适宜培养基对于后续的杂交育种等工作的开展具有重要意义。本试验结果显示, 蔗糖、硼酸对卵叶牡丹花粉萌发影响极显著,  $\text{Ca}^{2+}$ 对花粉萌发影响显著, 而  $\text{GA}_3$  则对花粉萌发率影响不显著, 这表明蔗糖、硼酸、 $\text{Ca}^{2+}$ 是影响卵叶牡丹花粉萌发的主要因素,  $\text{GA}_3$  虽对部分植物花粉萌发有促进作用<sup>[24]</sup>, 但对卵叶牡丹花粉萌发无显著作用。综合来看, 卵叶牡丹花粉萌发最佳的培养基为: 110 g/L 蔗糖, 45 mg/L 硼酸, 50 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 蔗糖需求方面, 低于黄牡丹、牡丹‘凤丹白’, 但高于滇牡丹、矮牡丹等野生种质, 硼酸需求较其他牡丹种质低, 这表明不同牡丹种质花粉对硼酸、蔗糖的适应性不同, 这些萌发特性的差异可能是基因型不同造成的。

3. 2 不同贮存温度卵叶牡丹花粉萌发率随时间的变化

低温贮存是生物材料长期保存最有前途的方法, 已经广泛应用于作物、水果、蔬菜和观赏植物<sup>[25-29]</sup>。花粉体积小占用空间少, 使花粉粒特别适合贮存, 作为基因库的重要组成部分, 适宜花粉贮存库建立可以持续为育种计划提供有活力和可育的稀缺植物花粉, 满足育种的需求<sup>[29]</sup>。牡丹花粉自然情况下的寿命仅 10 d 左右, 常规的 4 °C 贮存仅能延长花粉寿命 1~2 个月<sup>[14-15,18]</sup>, 很难满足牡丹种质贮存、远缘杂交、隔年杂交的需要, 因此探讨牡丹花粉不同贮存条件下的寿命, 对于根据需要选择合适的、经济的贮存方法贮存牡丹花粉具有重要意义。研究表明, 美洲山核桃花粉贮存 13 a, 与新鲜花粉萌发率统计学差异不明显<sup>[30]</sup>, 超低温贮存 2 a 的日本牡丹花粉, 仍具有较高的萌发率, 个别品种甚至超过新鲜花粉的萌

发率<sup>[18]</sup>, 本研究结果也表明, 与室温、2℃、-20℃贮存环境下牡丹花粉萌发率随贮存时间延长快速下降相比, -80℃、-196℃下, 卵叶牡丹花粉仍保持较高的萌发率, 适合花粉的中、长期贮存, 特别是-196℃贮存 1 a 后, 花粉萌发率高达 75.5%, 比新鲜花粉萌发率提高了 2.9%, 这表明-196℃下卵叶牡丹花粉贮存 1 a 后, 花粉细胞处于生理代谢平衡的健康状态, 仍保持较高的萌发力, 适合作为牡丹花粉种质资源的长期保存, 这为克服牡丹远缘杂交、远距离杂交的时空障碍, 也为卵叶牡丹的种质长期保存奠定了基础。

### 3.3 不同贮存温度下花粉萌发率与丙二醛含量的关系

MDA 是膜质氧化的主要产物, 含量高低代表膜透性的强度, 与细胞是否受到伤害密切相关性<sup>[19, 31]</sup>。植物材料不同, 贮存温度的高低对细胞膜系统影响不同, 保存效果有较大差异, 牡丹‘凤丹白’花粉<sup>[31]</sup>、桃叶卫矛<sup>[26]</sup>超低温保存后丙二醛与新鲜材料基本一致, 贮存后的花粉、种子仍然保持较高的萌发力, 而留兰香<sup>[27]</sup>、牡丹‘八千代椿’花粉<sup>[31]</sup>经超低温处理后与对照组相比丙二醛(MDA)含量显著升高, 贮存后的牡丹‘八千代椿’花粉萌发力、留兰香再生能力均出现下降。本试验也证实了这一点, 随贮存时间延长, 室温、4℃贮存条件下, 卵叶牡丹花粉 MDA 含量呈先升高而后迅速降低的趋势, 伴随着高峰的出现, 花粉萌发率迅速下降, -20℃、-80℃下, 呈逐渐上升的趋势, 其中-20℃下, 上升趋势显著, 伴随着花粉萌发率的逐渐下降, 而-196℃下 MDA 含量比较平稳, 萌发率基本无变化或有部分提高。这表明花粉细胞膜在-196℃贮存下膜脂过氧化程度低, 膜系统稳定, 贮存 1 a 后, 花粉细胞内 SOD、CAT 和 POD 仍具有较高的活性, 协同作用有效的清除了多余的活性氧、自由基, 保持了氧化平衡状态, 这可能是卵叶牡丹花粉萌发率仍然很高的原因。

### 3.4 不同贮存温度下花粉萌发率与 3 种保护酶活性的关系

研究表明, 保护酶活性一定程度上是生物体机能维持的重要指标<sup>[32-39]</sup>, 低含水量、低温、低氧可以降低植物的代谢活动, 减少营养消耗, 是延长保存时间的有效途径<sup>[18, 25-30]</sup>, 植物花粉在保存期间, 在环境胁迫下, 代谢紊乱, 活性氧、自由基显著增加, 植物通常通过增加保护酶的活性来清除过量的活性氧, 以维持代谢平衡和膜系统的稳定性, 从而避免或减少损伤<sup>[36-40]</sup>, 因此保护酶活性的稳定性与保存质量具有相关性, 保护酶的大幅升高与降低, 可能预示保存材料萌发率的下降<sup>[6-8, 30]</sup>。本研究表明, 室温下 8~24 d, POD、CAT 先后出现最高峰值, 2℃下 24~72 d, SOD、POD、CAT 先后出现最高峰值, -20℃下 72~120 d, SOD、POD、CAT 先后出现最高峰值, 然后下降, -80℃下 184~264 d, POD、CAT 先后出现最高峰值, 在此期间, 卵叶牡丹花粉萌发率均出现了显著下降, 这表明在花粉萌发率下降最快期间, 花粉细胞膜质过氧化加剧, 活性氧、自由基增多, 3 种保护酶先后启动, 协同花粉内抗坏血酸等物质清除活性氧、自由基、醛、酚等有害物质, 减少损害, 但随着时间延

长、胁迫加剧, 3 种保护酶活性及体内抗坏血酸、脯氨酸等不足以消除花粉细胞内的活性氧, 导致有害物质积累, 花粉细胞死亡, 花粉萌发率随之降低。而在-196℃下, 卵叶牡丹花粉在贮存 1 a 的不同时间阶段, 3 种保护酶活性均保持平稳, 花粉萌发率接近或超过新鲜花粉萌发率, 这说明-196℃下, 卵叶牡丹花粉处于代谢平衡状态, 健康程度高, 因此花粉仍然具有较高的萌发力。随着贮存时间的延长, 室温下卵叶牡丹花粉 POD 活性最先达到最高峰值, CAT 随后达到最高峰值, 然后下降, SOD 活性则迅速下降, 说明室温下 POD 是敏感保护酶; 2℃、-20℃、-80℃下, SOD 活性首先升高, 分别在第 24、72、40 天达到最高峰值, 随后下降, 而 POD、CAT 活性则在贮存 72~264 d 才陆续出现高峰, 这表明 2℃、-20℃、-80℃下, SOD 为敏感性保护酶。

花粉低温保存可以有效地实现单倍体阶段的基因组保存, 为核遗传多样性提供了丰富的来源<sup>[29, 40]</sup>, 大部分植物花粉在贮存后花粉萌发率下降, 但一部分物种花粉超低温(-196℃)贮存后, 出现萌发率升高或明显升高的“冷刺激”的现象, 如矮牡丹<sup>[14]</sup>、山龙眼科<sup>[14]</sup>、日本牡丹品种‘日暮’、‘白王’、阿月浑子<sup>[18]</sup>、芍药<sup>[35]</sup>花粉等, 本试验也发现了类似现象, -196℃超低温贮存 1 a 后, 卵叶牡丹花粉萌发率高达 75.5%, 较新鲜花粉有较大提高, 这表明在超低温贮存下, 卵叶牡丹花粉生命代谢并非处于理论上的“停滞”状态, 张亚利<sup>[25]</sup>研究也发现, 超低温保存后, 伴随着梅花萌发率的提高, 花粉内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较新鲜花粉显著增加, 贮存前后存在差异蛋白, 本试验结果表明, 伴随着萌发率的升高, 花粉 SOD、POD、CAT 活性有不同程度的提高, 而丙二醛含量却出现下降, 花粉膜系统稳定, 生命代谢系统处于平衡的健康状态, 能有效清除过多的自由基、活性氧, 牡丹‘岛大臣’也发现了类似现象<sup>[31]</sup>, 这是否是卵叶牡丹花粉超低温贮存出现“冷刺激”现象的生理机制, 需要进一步研究探讨。

## 4 结 论

卵叶牡丹花粉不同居群间遗传特性存在差异, 单纯以花粉表观不足以揭示其系统演化规律; 花粉小粒、畸形和瘪粒率高是卵叶牡丹花粉萌发率低的主要原因。卵叶牡丹花粉离体培养最佳的培养基为: 110 g/L 蔗糖, 45 mg/L 硼酸, 55 mg/L  $\text{GA}_3$ , 30 mg/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 。蔗糖是影响卵叶牡丹花粉萌发率最大的因子, 其次是硼酸、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{GA}_3$  等。

不同温度贮存下, 卵叶牡丹花粉 3 种保护酶的作用不同, SOD 在 2、-20 和 -80℃时是敏感的保护酶, 而在室温下, POD 是敏感的保护酶, 花粉萌发率与 3 种保护酶活性呈显著正相关, 与丙二醛含量呈显著负相关, 3 种保护酶活性对花粉萌发率的影响次序为: SOD, CAT, POD。卵叶牡丹花粉在贮存期间, 3 种保护酶活性、丙二醛含量保持稳定, 细胞处于代谢平衡状态, 健康程度高, 是-196℃下贮存 1 a 后卵叶牡丹花粉仍然保持较高萌发力的生理原因; 贮存期间环境胁迫加剧, 花粉 3 种保护酶先后升高, 达到最高峰值后快速下降, 丙二醛含量快速

增高, 膜脂过氧化程度加剧, 不能有效清除活性氧、自由基, 生理代谢失衡, 是室温、2、-20℃下花粉贮存寿命缩短的内因之一。

贮存温度是影响卵叶牡丹花粉贮存寿命的关键因子之一, 且贮存温度越低, 卵叶牡丹花粉的贮存寿命越长。2、-20℃下, 花粉贮存寿命分别为 2~3 个月、5~6 个月, 综合经济、适用考虑, 家用冰箱即可满足卵叶牡丹花粉短期贮存的需求; -80℃下花粉贮存寿命超过 1 a, 适宜卵叶牡丹花粉的中期贮存; 卵叶牡丹花粉最佳的贮存温度为-196℃, 适宜卵叶牡丹花粉种质资源的长期保存。

#### [参 考 文 献]

- [1] 裴颜龙, 洪德元. 卵叶牡丹—芍药属一新种[J]. 植物分类学报, 1995, 33(1): 91-93.  
Pei Yanlong, Hong Deyuan. *Paeonia qiui*—A new woody species of *Paeonia* from Hubei, china[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1995, 33(1): 91-93. (in Chinese with English abstract)
- [2] 洪德元, 潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 351-368.  
Hong Deyuan, Pan Kaiyu. Taxonomical history and revision of *Paeonia* sect. *Moutan*(Paeoniaceae)[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1999, 37(4): 351-368. (in Chinese with English abstract)
- [3] 张晓晓, 张延龙, 牛立新, 等. 陕西省芍药科一新分布种—卵叶牡丹[J]. 西北植物学报, 2015, 35(11): 2337-2338.  
Zhang Xiaoxiao, Zhang Yanlong, Niu Lixin, et al. *Paeonia qiui*, a new recorded species of paeoniaceae from Shanxi, China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(11): 2337-2338. (in Chinese with English abstract)
- [4] 闫振国. 旬阳卵叶牡丹遗传多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学. 2017.  
Yan Zhenguo. The Study on Genetic Diversity of *Paeonia qiui* Native to Xunyang[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [5] Akhond M A Y, Molla M A H, Islam M O, et al. Cross compatibility between *Abelmoschus esculentus* and *A. moschatus*[J]. Euphytica, 2000, 114(3): 175-180.
- [6] 刘艳萍, 朱延林, 马永涛, 等. 不同贮存条件对紫玉兰花粉保护酶活性及萌发率的影响[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(4): 59-61.  
Liu Yanping, Zhu Yanlin, Ma Yongtao, et al. Effects of different storage conditions on germination rate and protective enzymes activity of *Magnolia liliflora* Desr. pollen[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2013, 41(4): 59-61. (in Chinese with English abstract)
- [7] Jia M X, Yin S, Wei D, et al. ROS-induced oxidative stress is closely related to pollen deterioration following cryopreservation[J]. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2017, 53(4): 433-439.
- [8] 谭健晖. 贮存温度和时间对马尾松花粉保护酶活性及萌发率的影响[J]. 林业科学, 2011, 47(9): 28-32.  
Tan Janhui. Effects of storage temperature and storage time on germination rate and protective enzymes activity of *Pinus massoniana* Pollen[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2011, 47(9): 28-32. (in Chinese with English abstract)
- [9] 贾文庆, 王少平, 李纪元. 大花红山茶花粉形态特征和培养条件及其储藏过程的生理动态分析[J]. 西北植物学报, 2015, 35(4): 754-760.  
Jia Wenqing, Wang Shaoping, Li Jiyan. Pollen morphology, storage condition and physiologically dynamic change during storage of *Camellia magniflora*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(4): 754-760. (in Chinese with English abstract)
- [10] 袁涛, 王莲英. 中国栽培牡丹起源的形态分析[J]. 山东林业科技, 2004(6): 1-3.  
Yuan Tao, Wang Lianying. Morphological analysis of the origin of chinese cultivated peony[J]. Shandong forestry science and technology, 2004(6): 1-3. (in Chinese with English abstract)
- [11] 何丽霞, 李睿, 李嘉珏, 等. 中国野生牡丹花粉形态的研究[J]. 兰州大学学报(自科版), 2005, 41(4): 43-49.  
He Lixia, Li Rui, Li Jiajue, et al. Studies on pollen morphology of the wild peony[J]. Journal of Lanzhou University(Natural Science), 2005, 41(4): 43-49. (in Chinese with English abstract)
- [12] 刘欣, 钟原, 成仿云. 卵叶牡丹杂交育种初步研究[C]. 中国观赏园艺研究进展, 北京: 中国林业出版社, 2016.  
Liu Xin, Zhong Yuan, Cheng Fangyun. Preliminary study on hybrid breeding of *Paeonia qiui*[C]. Research progress of ornamental horticulture in China, Beijing: China Forestry Press, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [13] 律春燕, 王雁, 朱向涛, 等. 黄牡丹花粉生活力测定方法的比较研究[J]. 林业科学研究, 2010, 23(2): 272-277.  
Lu Chunyan, Wang Yan, Zhu Xiangtao, et al. Comparison of methods about *paeonia lutea*'s pollen viability determination[J]. Forestry Research, 2010, 23(2): 272-277. (in Chinese with English abstract)
- [14] 贾文庆, 刘会超, 刘露颖. 红花矮牡丹花粉贮藏及生活力研究[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(3): 46-49.  
Jia Wenqing, Liu Huichao, Liu Luying, et al. Studies on the pollen germination and storage characteristics of *Paeonia Suffruticosa* var. *spontanea*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(3): 46-49 (in Chinese with English abstract)
- [15] 施江, 辛莉, 史国安, 等. 三种贮藏温度条件下牡丹花粉的储藏特性[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2009, (3): 9, 86-88.  
Shi Jiang, Xin Li, Shi Guoan, et al. Pollen storage characteristic of *Paeonia Suffruticosa* Andr under three store temperature[J]. Journal of Henan University of Science & Technology: Natural Science, 2009, (3): 9, 86-88. (in Chinese with English abstract)
- [16] 施江, 王小燕, 张淑玲, 等. 培养基组分对牡丹花粉萌发和花粉管生长的影响[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2013, 34(2): 9, 85-90.  
Shi Jiang, Wang Xiaoyan, Zhang Shuling, et al. Effect of medium components on pollen germination and tube growth of tree peony(*Paeonia suffruticosa*)[J]. Journal of Henan



- University of Science & Technology: Natural Science, 2013,34(2): 9, 85-9. (in Chinese with English abstract)
- [17] 盖伟玲, 盖树鹏. 牡丹花粉离体萌发的研究[J]. 北方园艺 2010,34(22): 132-133.  
Gai Weiling, Gai Shupeng. Study of the pollen germination in vitro in tree peony[J]. Northern Horticulture, 2010,34(22): 132-133. (in Chinese with English abstract)
- [18] 李秉玲, 王荷, 刘燕. 日本牡丹品种花粉超低温保存[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4): 303-306.  
Li Bingling, Wang He, Liu Yan. Pollen cryopreservation of Japanese tree peony cultivars[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010,32(4): 303-306. (in Chinese with English abstract)
- [19] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-167.  
Li Hesheng, Sun Qun, Zhao Shijie, et al. Experimental Principles and Techniques of Plant Physiology and Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 164-167. (in Chinese with English abstract)
- [20] Sorkheh K, Azimkhani R, Mehri N, et al. Interactive effects of temperature and genotype on almond (*Prunus dulcis* L.) pollen germination and tube length[J]. Sci. Hort. 2018, 227, 162-168.
- [21] Shekari A, Nazeri V, Shokrpour M. Influence of boric acid, sucrose and temperature on the germination of *Leonurus cardiaca* L., pollen[J]. Int J Farm Allied Sci. 2016, 5: 363-366.
- [22] Fragallah S A D A, Lin S, Li N, et al. Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.) [J]. forests, 2019, 10: 102.
- [23] 王兵益, 王伟, 丁开宇. 滇牡丹花粉贮存方法的探索[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2001(S1): 113-114, 116.  
Wang Bingyi, Wang Wei, Ding Kaiyu. A study on preserving the pollen of *paeonia delavayi* [J]. Journal of Yunan university, 2001(S1): 113-114, 116. (in Chinese with English abstract)
- [24] Acar I, Ak B E, Sarpkaya K. Effects of boron and gibberellic acid on in vitro pollen germination of pistachio (*Pistacia vera* L.) [J]. African Journal of Biotechnology, 2010,9(32): 5126-5130.
- [25] 张亚利. 梅花花粉超低温保存研究及其花粉库建立[D]. 北京: 北京林业大学, 2007.  
Zhang Yali. Pollen Cryopreservation of *Prunus mume* Sieb. et. Zuce. and the Construction of Pollen Bank[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2007. (in Chinese with English abstract)
- [26] 李万义. 桃叶卫矛超低温保存及其效果分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.  
Li Wanyi. The Cryopreservation of *Euonymus bungeanus* and Analysis of the Effect after Cryopreservation[D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [27] 邵丽. 留兰香种质材料的超低温保存及遗传变异分析[D]. 开封: 河南大学, 2011.  
Shao Li. Cryopreservation and Genetic Variation Analysis of *Mentha spicata* Germplasm[D]. Kaifeng: Henan university, 2011. (in Chinese with English abstract)
- [28] 陈和明, 尹光天, 胡哲森, 等. 黄藤花粉萌发与低温贮藏研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1395-1400.  
Cheng Heming, Yin Guangtian, Hu Zhesen, et al. Germination and low-temperature storage of *Daemonorops margaritae* pollens[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(4): 754-760. (in Chinese with English abstract)
- [29] Rajasekharan P E, Ganeshan S. Current perspectives on pollen cryopreservation in horticultural species[J]. Acta Hort, 2019, 1234, 47-56.
- [30] Sparks D, Yates I E. Pecan pollen stored over a decade retains viability[J]. Hort Science, 2002, 37(1): 176-177.
- [31] Ren R, Li Z D, Zhang L L, et al. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2020, 2: 1-14.
- [32] Dong B, Zheng X, Liu H, et al. Effects of drought stress on pollen sterility, grain yield, abscisic acid and protective enzymes in two winter wheat cultivars[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1008.
- [33] Zafra A, Castro A J, Alche J D, et al. Identification of novel superoxide dismutase isoenzymes in the olive (*Olea europaea* L.) pollen[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18, 114: 1-16.
- [34] Liu X S, Xiao Y F, Wang Y, et al. The in vitro germination and storage characteristics of *Keteleeria fortunei* var. *cyclolepis* pollen provide a reference for cross breeding[J]. Protoplasma, 2020, 4: 1-10.
- [35] 石印, 贾梦雪, 狄玮等. 芍药花粉超低温保存前后氧自由基变化研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(5): 86-90.  
Shi Yin, Jia Mengxue, Di Wei, et al. Research on the Change of Reactive Oxygen Species of Peony Pollen during Cryopreservation[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(5): 86-90. (in Chinese with English abstract)
- [36] Jiang X R, Di W, Jia M X, et al. MDH and CAT increase the germination of cryopreserved *Paeonia* pollen by regulating the ROS and apoptosis-like events[J]. Acta Hort, 2019, 1234: 105-112.
- [37] Jia M X, Jiang X R, Xu J, et al. CAT and MDH improve the germination and alleviate the oxidative stress of cryopreserved *Paeonia* and *Magnolia* pollen[J]. Acta Physiol Plant, 2018, 40: 37-47.
- [38] 赵文飞, 邢世岩, 姜永旭, 等. 贮存时间对银杏花粉保护酶活性和萌发率的影响[J]. 武汉植物学研究, 2004(3): 259-263.  
Zhao Wenfei, Xing Shiyan, Jiang Yongxu, et al. Effects of storage time on germination percentage and protective enzymes activity of *Ginkgo biloba* L. Pollen[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2004(3): 259-263. (in Chinese with English abstract)
- [39] Jin X, Qian L, Jia M X, et al. Generation of reactive oxygen species during cryopreservation may improve *Lilium*×*siberia* pollen viability[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2018, 50(3): 369-375.
- [40] Karun A, Sjini K K, Niral V, et al. Coconut (*Cocos nucifera* L.) pollen cryopreservation[J]. Cryo Letters, 2014, 35(5): 407-417.



## Effects of storage conditions on pollen longevity of *Paeonia qiui*

Jia Wenqing<sup>1,2</sup>, Guo Yingzi<sup>1,2</sup>, Wang Yanli<sup>1</sup>, Zhu Xiaopei<sup>1</sup>, Wang Zheng<sup>2</sup>, Liu Gaixiu<sup>3</sup>, Liu Huichao<sup>1</sup>, He Songlin<sup>1\*</sup>,  
Zhang Xiangyu<sup>1</sup>

(1. Henan Province Engineering Research Center of Horticultural Plant Resource Utilization and Germplasm Enhancement, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Luoyang National Peony Garden, Luoyang 471000, China)

**Abstract:** *Paeonia qiui* is one of the important ancestors of cultivated species of tree peony, serving as an important genetic resource in peony cross breeding, due to its purple-red leaves. The pollen is widely known to directly influence reproductive success and genetic structure of the main plant population. This study aims to investigate the storage characteristics of *Paeonia qiui* pollen, further to elucidate the physiological mechanism of pollen storage at different temperatures, in order to determine the accurate and efficient storage method for the viability of *Paeonia qiui* pollen. In this study, the pollen morphology of *Paeonia qiui* was characterized using scanning electron microscopes. Four factors (sucrose, boric acid, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>) at three different levels were selected in the orthogonal test to investigate the characteristics of *Paeonia qiui* in vitro germination. The experiment was conducted to explore the effect of storage temperatures and duration on the pollen germination rate, malondialdehyde (MDA), and the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase(POD), catalase (CAT). The results show that the rates of abnormal and shrunken pollen were as high as 19.5%, indicating the low viability of *Paeonia qiui* pollen. The important factors affecting the germination rate of *Paeonia qiui* pollen were listed in order, sucrose, boric acid, Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>. The optimum concentrations of media were achieved in vitro pollen germination, when containing 110 g/L sucrose, 45 mg/L boric acid, 55 mg/L GA<sub>3</sub>, 30 mg/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. The optimum temperatures were 2°C and -20°C for the pollen storage of 1-2 months and 4-6 months, respectively. The optimum condition was -80°C for the intermediate storage within one year, whereas the promising temperature was -196°C for the long-term preservation of *Paeonia qiui* pollen. The germination rate was 75.5% after 365 days of storage, indicating that the optimum condition can effectively prolong pollen longevity. The germination rate of pollen was positively correlated with three protective enzymes, while negatively correlated with malondialdehyde content. The influence of three protective enzymes on pollen germination rate was ranked in order: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD). The sensitivity of three protective enzymes was different at different storage temperatures. Specifically, SOD served as a sensitive protective enzyme at 2, -20°C and -80°C, whereas POD served as sensitive protective enzymes at room temperature. The protective enzyme activity decreased, while the malondialdehyde content increased, leading to the active oxygen can not be effectively removed. This process was one of the main reasons for the decrease in pollen viability after storage at room temperature, 2, -20 and -80°C. The malondialdehyde content and the activity of three protective enzymes in pollen remained basically stable. The three protective enzymes can effectively maintain the internal balance of oxidative metabolism, and thereby reduce the levels of oxidative damage. This can be the internal cause to keep high germination rate after cryopreservation. This finding can provide a promising experimental and theoretical basis for cross-temporal pollination hybridization and germplasm resource conservation.

**Keywords:** storage; low temperature; enzymes; *Paeonia qiui*; pollen grain morphology; germination; MDA