

斑叶堇菜花粉形态、贮藏条件及其保护酶活性的变化

郭英姿¹, 汪家哲¹, 贾文庆^{1*}, 刘会超¹, 何松林¹, 李纪元², 王艳丽¹, 杜晓华¹, 穆金艳¹, 朱小佩¹

¹河南科技学院园艺园林学院, 河南新乡453003

²中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 杭州311400

摘要:以斑叶堇菜花粉为材料, 使用扫描电子显微镜观察花粉表观形态, 采用离体培养法研究花粉的萌发特性, 并探讨了不同贮藏温度和时间对花粉萌发率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响。结果表明: 初步判断斑叶堇菜在堇菜属中具有较为特殊的分类地位; 花粉萌发的最适宜培养基为: 280 g·L⁻¹蔗糖+250 mg·L⁻¹硼酸+50 mg·L⁻¹ GA₃+200 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂。花粉最佳贮藏条件为-80°C; -80°C贮藏360 d后, 花粉萌发率仍达到40.50%, 3种保护酶活性较高, 花粉抗氧化、衰老能力较强。贮藏过程中, 在3种酶出现峰值前后, 室温和4°C的花粉萌发率出现大幅度下降。不同贮藏温度下, 3种保护酶的作用不同, 室温下, CAT为敏感性保护酶; 4°C下, POD为敏感性保护酶, SOD为非敏感性保护酶; -20和-80°C下, POD为零下低温敏感性保护酶。花粉萌发率与SOD呈极显著正相关。

关键词:斑叶堇菜; 花粉; 萌发; 贮藏; SOD; POD; CAT

斑叶堇菜为堇菜科堇菜属多年生草本植物, 无地上茎, 叶基生, 圆形或卵圆形, 沿叶脉有明显的白色斑纹, 叶背紫红色, 花期3~9月, 叶、花、果俱美, 可用于花坛、镶嵌草坪、林下地被, 极富前景。斑叶堇菜自然分布于山区, 生长势强, 耐阴, 抗病、抗寒、抗热能力强, 是堇菜属育种的重要种质资源。全草可入药, 具有清热解毒、凉血止血功效。三色堇花期长, 但叶片形状单一, 耐热性、抗寒性较差, 严重制约了三色堇的应用推广。因此, 开展堇菜属植物的种间杂交育种工作, 是培育叶片奇特优美、花期长、耐热性强三色堇观赏品种最具潜力的途径之一。

杂交是培育三色堇新品种最常用的方法之一, 但堇菜属植物花期不同, 这就需要采集和贮藏花粉, 花粉生活力是评价贮藏成败的主要标志, 离体培养法是检测花粉萌发率最准确的方法之一(管雨等2012; 刘艳萍等2013; 谭健晖2011)。有关斑叶堇菜花粉生活力及贮藏特性尚未见报道。前人(刘艳萍等2013; 谭健晖2011; 赵文飞等2004)研究显示贮藏期间的花粉萌发率与保护酶活性呈显著正相关, 是植物花粉活力的主要表征。本文以斑叶堇菜花粉为试验材料, 对其花粉形态、花粉生活力、酶活性进行了研究, 旨在找出斑叶堇菜花粉生活力测定的快速准确方法, 从花粉的酶活性方面对花粉贮藏期间的生理生化反应进行探索, 以期为开展堇菜属种间杂交工作提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

材料引种自太行山南麓万仙山景区海拔1 200 m阴坡, 2016年4月上旬上午10时, 采集生长健壮的斑叶堇菜(*Viola variegata* Fisch. ex Link)盛花期含苞花朵, 带回实验室后, 将花瓣剥去, 用镊子剥下花药放入铺有硫酸纸的培养皿中, 置于(25±1)°C培养箱内散粉24 h。然后收集花粉, 一部分用于测定花粉萌发率, 一部分真空干燥6 h后, 放入离心管密封保存, 备用。

1.2 花粉形态扫描电镜观测

将收集的真空干燥花粉均匀散到贴有黑色导电胶的样品台上, 放入蔡司SIGMA 500扫描电镜下观察, 记录花粉群体畸形率、极轴(P)值、赤道长度(E)值, 观察描述花粉的表面纹饰。

1.3 不同培养基对斑叶堇菜花粉萌发的影响

在预备试验基础上, 采用L₉(3⁴)正交试验设计(表1), 研究蔗糖、硼酸、GA₃和Ca(NO₃)₂等4个因素不同水平对花粉萌发的影响, 上述培养基均添

收稿 2017-10-31 修定 2018-03-15

资助 河南省基础与前沿项目(162300410157)、河南省高等学校重点科研项目(17A21005)、国际合作领域--科技攻关(172102410053)、国家十二五科技支撑项目(2012BAD01B07)、河南省产学研(152107000028)和大学生“百农英才”创新项目(BNYC2016-2-19)。

* 通讯作者(jiawq2012@126.com)。

表1 不同培养基对斑叶堇菜花粉萌发率的影响

Table 1 Effects of different media on pollen germination of *V. dissecta*

培养基编号	蔗糖浓度/g·L ⁻¹	硼酸浓度/mg·L ⁻¹	GA ₃ 浓度/mg·L ⁻¹	Ca(NO ₃) ₂ 浓度/mg·L ⁻¹	萌发率%
1(对照)	0	0	0	0	29.63±1.13 ^h
2	260	150	50	100	51.30±1.32 ^{de}
3	260	200	100	200	41.83±1.40 ^e
4	260	250	200	300	55.40±1.82 ^{bc}
5	280	150	100	300	56.00±0.11 ^b
6	280	200	200	100	66.00±0.10 ^{ed}
7	280	250	50	200	81.25±1.30 ^a
8	300	150	200	200	48.42±0.10 ^e
9	300	200	50	300	44.48±1.20 ^f
10	300	250	100	100	41.64±1.87 ^d
K1	49.15	51.91	59.01	49.65	
K2	67.75	50.77	21.49	57.17	
K3	44.84	59.43	46.49	51.96	
R	0.50	0.57	0.28	0.31	

不同小写字母表示不同处理间在0.05水平上差异显著。

加10 g·L⁻¹琼脂, pH调至5.8。用毛笔蘸取花粉均匀播于凹形载玻片上的培养基表层, 放入培养皿里浸湿的吸水纸上, 加盖。培养条件为(25±1)°C, 全光照培养。每处理设置3重复, 培养12 h后在显微镜下观察拍照, 每重复观察3视野, 总计观察花粉数大于150粒, 计算花粉萌发率(赵文飞等2004)。

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 不同贮藏方法对斑叶堇菜花粉萌发、保护酶活性的影响

将真空干燥的花粉装入放有硅胶干燥剂7 mL试管中, 用棉花封口。设置室温、4°C(低温)、-20°C、-80°C(超低温)4种贮藏温度, 每种贮藏温度放置10~15支。贮藏24、40、72、120、184、264和360 d后, 分别从离心管中各取出少许花粉, 采用上文1.3节所得最佳培养基测定萌发率, 其余花粉用于保护酶活性测定。

准确称取0.100 g斑叶堇菜花粉, 放入4°C预冷玻璃研钵中, 加入少许PVP、石英砂, 然后加入5 mL 0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH=7.0), 匀速研磨30~40 s, 然后将混合液倒入试管中于冷冻离心机里11 100×g离心20 min。上清液即为酶液。超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性采用上海索宝生物科技有限公司提供的试剂盒进行测定。

数据用SPSS 11.0进行方差分析, 采用Excel 2003进行绘图。

2 实验结果

2.1 斑叶堇菜花粉表观形态

从图1可以看出斑叶堇菜花粉粒为长椭球形(图1-B), 斑叶堇菜花粉粒平均极轴长为17.26 μm, 平均赤道轴长约8.97 μm, P/E≈1.924, 属于小型花粉。畸形花粉较多, 占32.50%, 呈船型或不规则形状。斑叶堇菜花粉表面较为光滑, 为小穴状雕饰纹, 网脊细而弯曲, 较为均匀, 形状及大小不规则(图1-C和D)。花粉赤道面观长椭圆形, 两端渐窄; 极面观三裂圆形, 花粉具三孔沟, 沟狭长, 沟缘凹陷, 沟膜粗糙, 沟宽约2 μm, 沟长快达到花粉粒两端, 长度平均约11.74 μm。

2.2 不同培养基对斑叶堇菜花粉萌发的影响

表1表明, 斑叶堇菜花粉在各培养基上均能萌发, 但萌发率有显著差异。其中培养基7萌发率最高, 平均为81.25%; 对照的萌发率最低, 平均仅29.63%。从表1极差值可以看出, 4个因素中硼酸极差值最大, 因此硼酸为斑叶堇菜花粉萌发的主要影响因子, 其它依次是蔗糖、Ca(NO₃)₂和GA₃。考虑4因素的互作作用, 适宜斑叶堇菜花粉萌发的最优组合为: 280 g·L⁻¹蔗糖+250 mg·L⁻¹硼酸+50 mg·L⁻¹ GA₃+200 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 萌发率显著高于其他组合。

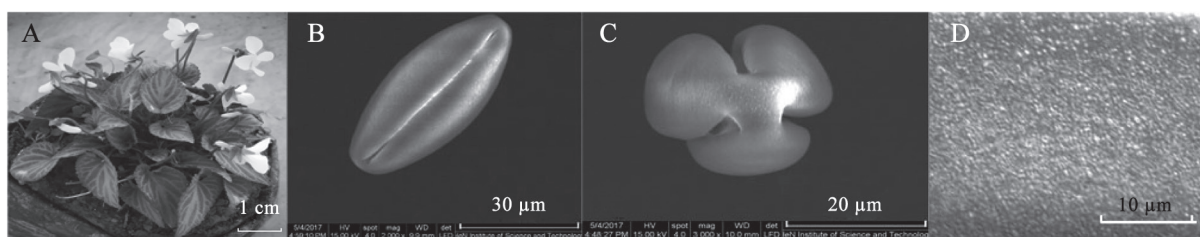


图1 斑叶堇菜花粉扫描电镜观察

Fig.1 Pollen morphology of *V. variegata* by SEM

A: 斑叶堇菜; B: 花粉赤道面观; C: 花粉极面观; D: 花粉外壁纹饰。

2.3 不同贮藏温度下斑叶堇菜花粉的萌发

图2表明, 贮藏温度对斑叶堇菜花粉的萌发率影响差异显著, 贮藏不同时间的花粉活力差异较大。室温和4°C下贮藏的斑叶堇菜花粉活力随时间延长迅速下降, 0~120 d的花粉萌发率呈迅速下降趋势; 室温下贮藏120 d的花粉萌发率为0, 4°C贮藏184 d的花粉萌发率也降为0, 花粉失去生活力。-20和-80°C贮藏温度下, 花粉活力呈现缓慢下降的趋势, 贮藏360 d, -80°C的花粉萌发率为40.50%, 是贮藏前萌发率的49.85%, -20°C贮藏的花粉萌发率也达到21.50%。-80°C下不同的贮藏时间花粉萌发率均高于-20°C, 综上所述, 适宜花粉贮藏的温度为-80°C。

2.4 不同贮藏温度对斑叶堇菜花粉保护酶活性的影响

2.4.1 不同贮藏温度和时间对斑叶堇菜花粉SOD活性的影响

由图3可知, 室温和4°C下贮藏, 斑叶堇菜花粉SOD活性随时间延长呈迅速下降趋势, 40~120 d下降速度较快, 120 d之后SOD活性丧失。-20°C下贮藏40 d的SOD活性达到顶峰, 之后基本呈缓慢下降

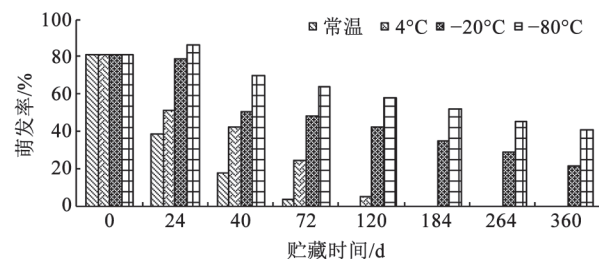


图2 不同贮藏温度对花粉萌发的影响

Fig.2 Effects of different storage temperatures on pollen germination

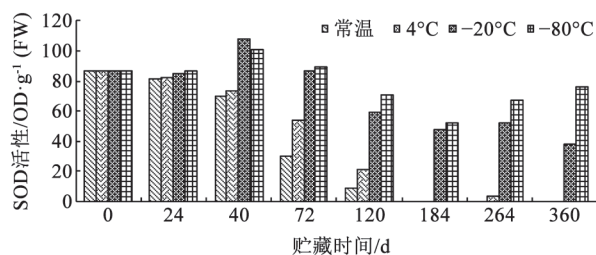


图3 不同贮藏温度及时间对斑叶堇菜花粉SOD活性的影响

Fig.3 Effects of different storage temperatures and time on SOD activities of *V. variegata* pollen

的趋势; -80°C贮藏0~184 d的SOD活性呈缓慢上升-再下降的趋势, 相对而言, -80°C贮藏下花粉SOD活性下降幅度的曲线明显较-20°C平缓。贮藏184~360 d, -80°C下SOD呈缓慢上升的趋势, 而-20°C下则基本呈下降趋势; -80°C贮藏360 d的SOD活性达76 OD·g⁻¹ (FW), 为贮藏前的87.36%, 这说明斑叶堇菜花粉仍具有较高活性。

2.4.2 不同贮藏温度和时间对斑叶堇菜花粉POD活性的影响

从图4可以看出, 室温和4°C贮藏下, 斑叶堇菜花粉POD活性随时间的增长, 基本呈现逐步升高后迅速下降的趋势。室温贮藏72 d, POD活性升至483 OD·g⁻¹ (FW), 达到最高, 为原来的2.46倍, 之后下降, 贮藏264 d, 降为6 OD·g⁻¹ (FW)。4°C下, 斑叶堇菜花粉的POD最高峰出现在120 d, 之后随着时间的增长, POD活性开始迅速降低, 到264 d时, POD降为0 OD·g⁻¹ (FW)。-20和-80°C贮藏, POD活性变化基本一致, 呈升高-下降的趋势, 最高峰分别出现在120和184 d, 分别为原来的2.58倍和2.44倍。之后POD活性开始下降, 360 d时分别降为179和292 OD·g⁻¹ (FW), 为原来的0.91倍和1.49倍, 这表

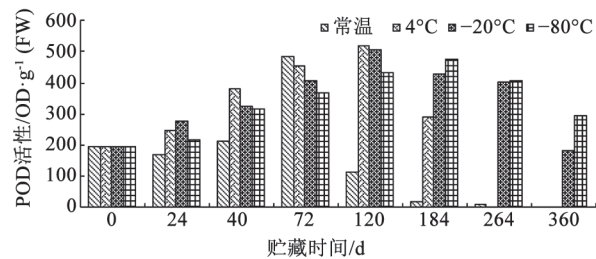


图4 不同贮藏温度及时间对斑叶堇菜花粉POD活性的影响

Fig.4 Effects of different storage temperatures and time on POD activities of *V. variegata* pollen

明花粉能够及时分解自由基,进而保护花粉减少低温伤害,保持较高的花粉活力。

2.4.3 不同贮藏温度和时间对斑叶堇菜花粉CAT活性的影响

如图5所示,室温和4°C贮藏温度下,斑叶堇菜花粉的CAT活性随贮藏时间的延长,呈先上升后下降的变化趋势,最高峰值分别出现在72和120 d,之后分别在贮藏264和360 d降为0。室温下CAT活性最高峰值显著高于其它三个处理。-20°C下,CAT活性呈现升高-下降-再升高的变化趋势,总体上-20°C贮藏的CAT活性高低起伏较大,最高值出现在120 d,最高峰值为128 mg·g⁻¹ (FW),为原来的1.16倍。-80°C下CAT活性变化趋势同-20°C,最高峰值为118 mg·g⁻¹ (FW),为原来的1.07倍,但CAT活性总体比-20°C高。

2.5 斑叶堇菜花粉萌发率与POD、CAT、SOD活性的关系

相关分析显示,花粉萌发率与3种保护酶SOD、POD和CAT的相关系数分别是0.8863、0.2544和0.05405,与SOD呈极显著正相关($P < 0.01$),说明在斑叶堇菜花粉的贮藏过程中,SOD对花粉萌发率起着

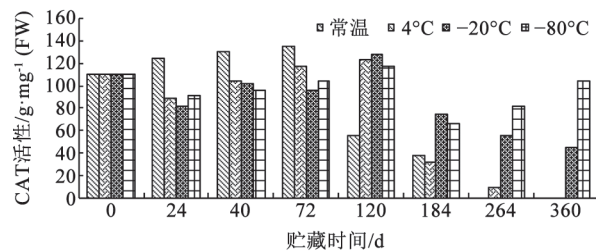


图5 不同贮藏温度及时间对斑叶堇菜花粉CAT活性的影响

Fig.5 Effects of different storage temperatures and time on CAT activities of *V. variegata* pollen

主导作用,即SOD对花粉萌发率的影响作用大于CAT和POD。

3 讨论

堇菜属植物由于种类众多,分布广和变异较大,而且很多种存在杂交及闭花受精现象,因此其分类上一直是个较为困难的类群。利用花粉形态作为本属分类的依据就成为比较可靠的方法之一。本研究结果显示斑叶堇菜花粉特征,主要表现在:(1)极面为正三角形,沟界较窄,其它种则较宽;(2)本种花粉表面较为光滑,其它种除美丽堇菜外,花粉外壁纹饰一般为脑纹状、皱波状、疣状和平滑疣状4种类型(贾文庆等2015b;倪穗等2007;许林等2010)。这些差异表明,斑叶堇菜在堇菜属中可能具有较特殊的分类地位和系统演化地位,根据倪穗等(2007)的研究,由花粉表面纹饰的演化趋势:表面光滑-表面网状-条纹状-表面疣状-刺状,斑叶堇菜较为原始。

离体萌发法是植物花粉萌发测定较为准确的方法(贾文庆等2012a;刘艳萍等2013;谭健晖2011)。堇菜属植物花粉萌发所需的蔗糖浓度一般为10~20 g·L⁻¹,硼酸浓度为50~100 mg·L⁻¹(贾文庆等2015b)。本试验结果显示,斑叶堇菜花粉萌发最适合的蔗糖浓度为280 g·L⁻¹、硼酸浓度为250 mg·L⁻¹,远高于堇菜属其他植物花粉萌发所需的蔗糖硼酸浓度。

贮藏环境是花粉是否可以保持较高萌发率、保证杂交育种成功的关键。低温贮藏可降低花粉的呼吸作用及代谢功能,是大多数植物花粉长期保持高活力的适宜方法(管雨等2012;刘艳萍等2013;谭健晖2011;赵文飞等2004)。本试验结果表明,4种贮藏方法对斑叶堇菜花粉活力的保持差异显著,室温、4°C下贮藏,花粉活力下降较快,室温下花粉贮藏120 d后花粉萌发率降为0。4°C下贮藏120 d时,花粉几乎丧失生活力,这表明4°C环境仅适宜斑叶堇菜花粉短期保存。-80°C下随着贮藏时间的延长,花粉萌发率呈现先升高后缓慢降低的趋势,贮藏360 d的花粉萌发率为贮藏前的49.85%,这说明斑叶堇菜花粉在-80°C下贮藏能长时间保持较高的生活力(徐瑾等2015;郭磊等2014)。

较低温度保存可使花粉萌发率、保护酶活性

保持在较高的水平(贾文庆等2015a; 倪穗等2007; 赵文飞等2004), 本试验结果表明: 斑叶堇菜花粉 -80°C 下贮藏360 d后, 花粉萌发率为40.5%, 达到原来的49.85%, 3种保护酶活性基本在原来的40%以上, 这表明此时花粉具有较强的活力, 对活性氧的清除能力强, 可以通过花粉内部的协调来延迟花粉的衰老(徐瑾等2015)。

花粉生活力与细胞内部的生理代谢活动、影响衰老的诸多因子紧密相关, 花粉生活力是花粉细胞内保护机制效果的外在表现(贾文庆等2012b; 李春燕等2011)。本试验结果显示, 室温下随着贮藏时间的延长, 胁迫加剧, CAT首先启动, POD随后启动, 而后三种保护酶活性随着花粉萌发率的快速下降呈逐渐下降的趋势, 这表明室温下CAT为敏感型保护酶, POD为非敏感型保护酶; 花粉在 4°C 贮藏下, POD高数值首先出现, 贮藏72 d后, 花粉萌发率仍达到贮藏前萌发率的30.10%, 这些结果说明 4°C 下POD较为敏感性, 适合花粉2~3个月短期保存。

-20 和 -80°C 贮藏条件下, POD首先启动, 随着时间的延长及胁迫的加剧, 单一的POD抗氧化能力有限, SOD随后启动, 在40 d后出现最高值, 萌发实验显示花粉在此段时间出现了迅速下降, 这说明此段时间花粉受低温胁迫严重。整体来看, 花粉在 -20 和 -80°C 贮藏期间, POD启动早且活性高, 出现最高峰值后呈现快速下降的趋势, 而SOD和CAT在低温胁迫下启动晚, 但变化平缓, 说明这2种酶能在较长时间内保持高活性, 保护能力强(谭健晖2011), 本结果显示 -80°C 下贮藏360 d的花粉萌发率为40.50%, 仍达到贮藏前萌发率的49.85%, 这些结果证明, POD为 -20 和 -80°C 下花粉敏感性保护酶, -80°C 是斑叶堇菜花粉长期贮藏的适宜温度。

参考文献(References)

- Guan Y, Jia WQ, Liu HC, et al (2012). Pollen viability and storage of *Chaenomeles sinensis*. J Zhejiang A&F Univ, (5): 790–794 (in Chinese with English abstract) [管雨, 贾文庆, 刘会超等(2012). 木瓜花粉生活力测定及储藏特性. 浙江农林大学学报, (5): 790–794]
- Guo L, Zhang BB, Ma RJ, et al (2014). Effects of temperature on the pollen dissemination and germination of peach. Plant Physiol J, 50 (3): 269–274 (in Chinese with English abstract) [郭磊, 张斌斌, 马瑞娟等 (2014) 温度对桃离体花药散粉及花粉萌发的影响. 植物生理学报, 50 (3): 269–274]
- Jia WQ, Liu HC, Liu LY (2012a). Studies on the pollen germination and storage characteristics of *Paeonia suffruticosa* var. *spontanea*. Acta Agric Univ Jiangxi Ensiv (Nat Sci Ed), 34 (3): 0456–0460 (in Chinese with English abstract) [贾文庆, 刘会超, 刘露颖(2012a). 红花矮牡丹花粉贮藏及生活力研究. 江西农业大学学报, 34 (3): 0456–0460]
- Jia WQ, Wang SP, Fan ZQ, et al (2015a). Storage condition and viability change of *Camellia japonica* pollen. Sci Silv Bull, 28 (3): 374–379 (in Chinese with English abstract) [贾文庆, 王少平, 范正琪等(2015a). 耐冬山茶花粉储藏条件及其活力的动态变化. 林业科学研究, 28 (3): 374–379]
- Jia WQ, Wang SP, Li JY (2015b). Pollen morphology, storage condition and physiologically dynamic change during storage of *Camellia magniflora*. Acta Bot Bor-Occid Sin, 35 (4): 0754–0760. (in Chinese with English abstract) [贾文庆, 王少平, 李纪元(2015b). 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. 西北植物学报, 35 (4): 0754–0760]
- Jia WQ, You Y, Liu HC, et al (2012b). Morphological observation and pollen viability of dwarf peony. J Northwest Fore Univ, (5): 76–79 (in Chinese with English abstract) [贾文庆, 尤扬, 刘会超等(2012b). 矮牡丹花粉形态观察与萌发特性研究. 西北林学院学报, (5): 76–79]
- Li CY, LI QB, Cheng Z, et al (2011). Study on culture medium for in vitro pollen germination of *Viola × wittrokiana* Gams. and *Viola tricolor* L. Northern Horti, (03): 54–56 (in Chinese with English abstract) [李春燕, 李清斌, 程振等(2011). 大花三色堇和三色堇花粉离体萌发的培养基研究. 北方园艺, (03): 54–56]
- Liu YP, Zhu YL, Ma YT, et al (2013). Effects of different storage conditions on germination rate and protective enzymes activity of *Magnolia liliflora* Desr. pollen. J Northeast Agric Univ, 41 (4): 59–61 (in Chinese with English abstract) [刘艳萍, 朱延林, 马永涛等(2013). 不同贮藏条件对紫玉兰花粉保护酶活性及萌发率的影响. 东北林业大学学报, 41 (4): 59–61]
- Ni S, Li JY, Tian M, et al (2007). Pollen exine sculpture of Sect. *Camellia* in genus *Camellia* and its taxonomic significance. J Nanjing Forest Univ (Nat Sci Ed), 31 (4): 16–20 (in Chinese with English abstract) [倪穗, 李纪元, 田敏等(2007). 红山茶组植物花粉外壁纹饰特征及其演化关系. 南京林业大学学报(自然科学版), 31 (4): 16–20]
- Tan JH (2011). Effects of storage temperature and storage time on germination rate and protective enzymes activity of *Pinus massoniana* pollen. Sci Silva Sin, (9): 28–32 (in Chinese with English abstract) [谭健晖(2011). 贮藏温度和时间对马尾松花粉保护酶活性及萌发率的影响. 林业科学, (9): 28–32]
- Xu J, Shi Y, Liu Q, et al (2015). Oxidative stress and/or apoptosis of *Magnolia denudata* pollen after cryopreserva-

- tion. *Plant Physiol J*, 51 (6): 916–920 (in Chinese with English abstract) [徐瑾, 石印, 刘芊等(2015). 超低温保存后玉兰花粉的氧化应激和细胞凋亡研究. *植物生理学报*, 51 (6): 916–920]
- Xu L, Du KB, Chen FZ, et al (2010). Pollen morphology, vitality and storage capacity of *Camellia rosthorniana* Hand.-Mazz. *Acta Horti Sin*, 37 (11): 1857–1862 (in Chinese with English abstract) [许林, 杜克兵, 陈法志等 (2010). 川鄂连蕊茶花粉的形态、生活力及贮藏力研究. *园艺学报*, 37 (11): 1857–1862]
- Zhao WF, Xing SY, Jiang YX, et al (2004). Effects of storage time on germination percentage and protective enzymes activity of *Ginkgo biloba* L. pollen. *J Wuhan Bot Res*, (3): 259–263 (in Chinese with English abstract) [赵文飞, 邢世岩, 姜永旭等(2004). 贮藏时间对银杏花粉保护酶活性和萌发率的影响. *武汉植物学研究*, (3): 259–263]

Changes of pollen morphology, storage conditions and protective enzyme activities of *Viola variegata*

GUO Ying-Zi¹, WANG Jia-Zhe¹, JIA Wen-Qing^{1*}, LIU Hui-Chao¹, HE Song-Lin¹, LI Ji-Yuan², WANG Yan-Li¹, DU Xiao-Hua¹, MU Jin-Yan¹, ZHU Xiao-Pei¹

¹College of Horticulture Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China

²Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China

Abstract: The pollen morphology of *Viola variegata* was investigated under scanning electronic microscope (SEM). The fresh pollen was took as materials to study the pollen viability by *in vitro*, and the effects of different storage temperatures and time on the pollen viability, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities were investigated. The results showed that *V. variegata* had a special classification status in the genus *Viola*, and the most suitable medium for pollen germination was 280 g·L⁻¹ sucrose+250 mg·L⁻¹ boric acid+50 mg·L⁻¹ GA₃+200 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂. The best storage temperature for pollen was -80°C. After 360 d storage of -80°C, the germination rate still reached 40.50%, while the three kinds of enzymes activities were high, the antioxidant capacity and aging ability of the pollen kept strong. During the storage, the germination rate of pollen decreased significantly at room temperature and 4°C when the activities of SOD, POD and CAT reached a high peak. At different storage temperatures, the effects of the three protective enzymes were different. CAT was a sensitive protection enzymes at room temperature; POD was a sensitive protective enzyme and SOD was a non-sensitive protective enzyme at 4°C; and POD was a subzero hypothermia sensitive protective enzyme at -20 and -80°C. The pollen germination rate was extremely significant positively correlated with SOD.

Key words: *Viola variegata*; pollen; germination; storage; SOD; POD; CAT

Received 2017-10-31 Accepted 2018-03-15

This work was supported by the Henan Province Science and Technology Planning Project (162300410157), Key Scientific Research Project of Henan Education Department (17A21005), The Field of International Cooperation-Scientific and Technological Project (172102410053), Program of Chinese 12th Five-Year Plan Support Project (2012BAD01B07), Industry-University Research Cooperation Project in Henan Province (152107000028), College Students "Hundred Farmers Excellence" Innovation Project (BNYC2016-2-19).

*Corresponding author (jiawq2012@126.com).