

## 钾离子对长柄扁桃不定芽诱导的影响

郭斌, 陈邦, 吴道长, 车德路, 尉亚辉\*, 申烨华, 李聪

西北大学生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西省生物技术重点实验室, 西安710069

**摘要:** 研究了钾离子对长柄扁桃不定芽诱导的影响, 结果表明, 在MS基本培养基中添加800~1 200 mg·L<sup>-1</sup>钾离子有利于长柄扁桃不定芽的形成和生长, 不定芽的诱导率和数量分别比对照提高了17%和84%, 不定芽的平均高度提高了64%; 高浓度钾离子(>1 600 mg·L<sup>-1</sup>)可导致长柄扁桃不定芽严重褐化。生理指标测定结果表明, 适当浓度的钾离子提高了抗氧化酶(SOD和POD)的活性和不定芽的组织细胞活力; 高剂量的钾离子(>1 600 mg·L<sup>-1</sup>)显著增加了不定芽中MDA的含量。

**关键词:** 钾离子; 长柄扁桃; 不定芽

## Effects of Potassium Ion on Adventitious Bud Induction of *Amygdalus pedunculata*

GUO Bin, CHEN Bang, WU Dao-Chang, CHE De-Lu, WEI Ya-Hui\*, SHEN Ye-Hua, LI Cong

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

**Abstract:** The effects of potassium ion on adventitious bud induction of *Amygdalus pedunculata* were studied. The results showed that the optimal concentration range of potassium ions is 800–1 200 mg·L<sup>-1</sup>. The adventitious bud induction frequency and the bud number per explants increased by 17% and 84%, respectively, compared to those cultured in MS basic medium without additional potassium nutrition. And the height of the adventitious bud increased by 64%. However, the high concentrations of potassium ions (>1 600 mg·L<sup>-1</sup>) caused adventitious buds serious browning. The physiological indexes suggested that appropriate potassium concentrations increased antioxidant enzymes (SOD and POD) activities and adventitious bud viability. High dose of potassium ions (>1 600 mg·L<sup>-1</sup>) significantly increased the malondialdehyde content in adventitious bud.

**Key words:** potassium ion; *Amygdalus pedunculata* pall.; adventitious bud

长柄扁桃(*Amygdalus pedunculata* Pall.)是蔷薇科(Rosaceae)桃属扁桃亚属(Subg. *Amygdalus*)的落叶灌木, 又名野樱桃、柄扁桃、毛樱桃, 是我国特有的扁桃亚属野生种(孙占育等2010)。长柄扁桃有强大的根系, 具有防风固沙的优良特性; 另外, 其果实中含致泻成分郁李仁甙, 对气管炎、高血压、神经衰弱、肺炎、糖尿病都有一定疗效; 长柄扁桃种仁中油含量在55%以上, 是一种极具开发潜力的生物能源植物(李聪等2010)。但是由于人为破坏, 长柄扁桃的分布面积日趋减少, 已被列为二级濒危植物(赵一之1992)。为了加速长柄扁桃的快速繁殖, 孙占育等(2008)、孙占育(2010)已经建立了长柄扁桃的快速繁殖平台, 为长柄扁桃的人工繁殖提供了新的途径。

我们在长柄扁桃离体培养过程中发现, 以实生苗的节为外植体在人工培养基上诱导不定芽的形成, 芽的玻璃化和褐化程度比较高, 对不定芽的诱导和生长产生严重影响。为此, 我们对野生长

柄扁桃中矿质元素含量进行了测定(原子吸收光谱法), 发现钾离子含量比一般植物中的含量高很多, 达到1 542.79 mg·kg<sup>-1</sup>。本文主要研究钾离子对长柄扁桃不定芽诱导(包括不定芽的数量、状态等)的影响, 为提高长柄扁桃的离体繁殖效率提供依据。

## 材料与方法

### 1 植物材料与培养

长柄扁桃(*Amygdalus pedunculata* Pall.)种子采自陕西神木毛乌素沙漠, 去掉外壳, 挑选完好的种仁, 用70%酒精浸泡45 s, 再用0.1%的氯化汞灭菌5 min, 无菌水清洗5~6次, 然后接种到无激素的MS固体培养基中培养。

收稿 2013-06-24 修定 2013-08-27

资助 波音(中国)投资有限公司科研项目、国家自然科学基金(31000144)和陕西省教育厅科研项目(12JK0846)。

致谢 尹久盛老师和陈闯老师对该研究精心指导和帮助。

\* 通讯作者(E-mail: weiyahui@nwu.edu.cn; Tel: 029-88302199)。

一周后种子萌发,待幼苗长至3个节后,取其节部,接种到以MS培养基为基础培养基及添加不同浓度钾离子(以氯化钾的形式添加)的不定芽诱导培养基上,培养基中含有 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA以及4%蔗糖、0.2%聚乙烯吡咯烷酮, pH 5.8。每瓶接种3~5个节,每个处理5瓶,重复3次,对照组不添加钾离子。在温度 $25\sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 $25\sim 30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 条件下培养35 d。

## 2 测定方法

### 2.1 细胞活力的测定

参考Steponkus和Lanphear (1967)方法。取培养不同时间的长柄扁桃不定芽200 mg (鲜重),置于10 mL试管中,加入0.4% TTC液2.5 mL, pH 7.0的磷酸缓冲液2.5 mL,混匀,用针筒抽真空,然后于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理13~16 h。去上清液,加入5 mL水,如此方法洗涤3次,再用剪刀将材料剪碎,加入95%乙醇5 mL,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴保温30 min。再置于室温下至组织完全无色。于485 nm处测其吸光度,不定芽组织的细胞活力以 $\text{OD}_{485}$ 值表示。

### 2.2 SOD、POD和CAT活性测定

取生长不同阶段的不定芽,置于预冷的研钵中,加入10 mL预冷的提取液,提取液中含 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Tris-HCl缓冲液(pH 6.8)。研磨后的提取液在 $15\ 000\times g$ 下冷冻离心20 min。上清液用来测定酶活性。所有操作均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。SOD活性测定按照Giannopolitis和Ries等(1977)的方法; POD活性按照Hammerschmidt等(1982)的方法测定。CAT活性按照Arrigoni等(1992)的方法测定。

### 2.3 MDA (丙二醛)含量测定

按李合生(2000)的方法测定。

## 3 统计方法

所有的试验采取随机取样进行,每个水平至

少重复3次。SPSS 13.0软件在 $P<0.05$ 水平上对数据进行单因素方差和邓肯多重范围检验。

## 结果与讨论

### 1 钾离子浓度对长柄扁桃不定芽诱导的影响

从表1和图1可知,钾对长柄扁桃不定芽的诱导有显著影响。当添加钾离子的剂量在 $400\sim 1\ 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽的诱导频率和每个外植体上不定芽的数量逐渐增高,最高分别达到84%和4.6个;不定芽的平均高度达到2.3 cm,和对照相对比有显著提高,但褐化的芽比例没有显著变化。当添加钾离子的剂量大于 $1\ 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芽诱导频率和数量都显著减低,且褐化芽比例也显著增多。

对不同处理的不定芽的细胞活力进行测定,结果表明添加钾离子的剂量显著影响不定芽的活力。当添加钾离子的剂量为 $1\ 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,不定芽的细胞活力最高,比对照提高了69%。随着添加的钾离子剂量继续增高,芽的细胞活力显著降低,褐化程度也增大(图1-C、D)。

从表1可知,钾对长柄扁桃不定芽的分化有一定影响。董丽芬等(2006)等在培养油松胚时也发现在MS基本培养基中添加适量钾离子可提高不定芽的诱导效率,这和我们实验结果相类似(表1)。钾参与植物细胞糖、脂肪和蛋白质的合成过程,也调节细胞的分化和细胞内外的水分平衡。但是过高的浓度会大大增加培养基的渗透压,抑制细胞的生长。本研究结果表明,对长柄扁桃不定芽诱导时,在MS基本培养中再添加 $800\sim 1\ 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钾离子有利于长柄扁桃不定芽的形成和生长,当太高的钾离子浓度( $>1\ 600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )会引起不定芽活力降低、组织褐化。

表1 钾离子浓度对长柄扁桃不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of potassium ion on adventitious bud induction of *A. pedunculata*

$\text{K}^{+}$ 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	芽诱导率/%	平均芽数/个	芽平均高度/cm	细胞活力( $\text{OD}_{485}$ 值)	褐化频率/%
0	72 <sup>b</sup>	2.5 <sup>c</sup>	1.4 <sup>b</sup>	0.335 <sup>c</sup>	13 <sup>c</sup>
400	75 <sup>ab</sup>	2.8 <sup>c</sup>	1.6 <sup>b</sup>	0.353 <sup>c</sup>	12 <sup>c</sup>
800	84 <sup>a</sup>	3.6 <sup>b</sup>	1.5 <sup>b</sup>	0.466 <sup>b</sup>	13 <sup>c</sup>
1 200	83 <sup>a</sup>	4.6 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	0.565 <sup>a</sup>	15 <sup>c</sup>
1 600	76 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>c</sup>	1.6 <sup>b</sup>	0.356 <sup>c</sup>	27 <sup>b</sup>
2 000	56 <sup>c</sup>	1.3 <sup>d</sup>	0.7 <sup>c</sup>	0.224 <sup>d</sup>	35 <sup>a</sup>

同列数字旁不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

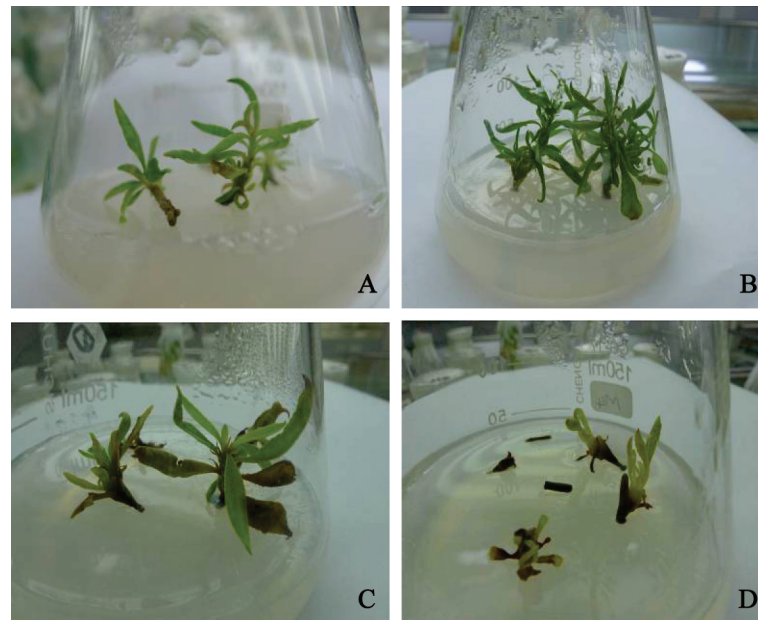


图1 钾离子对长柄扁桃不定芽诱导的影响

Fig.1 Effect of potassium ion on adventitious bud induction of *A. pedunculata*

A: MS培养基; B: MS培养基添加1 200 mg·L<sup>-1</sup>钾离子; C: MS培养基添加1 600 mg·L<sup>-1</sup>钾离子; D: MS培养基添加2 000 mg·L<sup>-1</sup>钾离子。

## 2 钾离子浓度对长柄扁桃不定芽抗氧化酶活性和MDA含量的影响

从表2可看出, 未添加钾离子的对照, 随着培养时间的延长SOD和POD活性出现了规律性的变化: 在培养的开始阶段酶活性逐渐增高, 直到培养21 d达到最高, 以后逐渐降低。但是, CAT活性在整个过程中变化不显著。在培养基中添加钾离子

可显著提高SOD和POD活性。当添加的钾离子的剂量达到2 000 mg·L<sup>-1</sup>时, CAT活性也显著提高, 此时也伴随着不定芽中MDA含量的增加(表3), 不定芽褐化严重, 部分死亡(图1-D)。

SOD、POD和CAT是维持胞内氧化还原环境稳定的重要生物酶。SOD是生物体内普遍存在的一种酶, 处于保护酶系中的核心地位。近几年, 在

表2 钾离子浓度对长柄扁桃不定芽诱导过程中抗氧化酶活力的影响

Table 2 Effect of potassium ion on antioxidant enzymes activities during the adventitious bud induction of *A. pedunculata*

培养时间/d	SOD活性/U·g <sup>-1</sup>			POD活性/U·g <sup>-1</sup>			CAT活性/U·g <sup>-1</sup>		
	对照	K <sup>+</sup> 1 200	K <sup>+</sup> 2 000	对照	K <sup>+</sup> 1 200	K <sup>+</sup> 2 000	对照	K <sup>+</sup> 1 200	K <sup>+</sup> 2 000
0	57.4 <sup>f</sup>	57.4 <sup>f</sup>	57.4 <sup>f</sup>	587.3 <sup>g</sup>	587.3 <sup>g</sup>	587.3 <sup>g</sup>	212.4 <sup>d</sup>	212.4 <sup>d</sup>	212.4 <sup>d</sup>
7	83.6 <sup>f</sup>	135.8 <sup>e</sup>	166.3 <sup>e</sup>	925.9 <sup>f</sup>	1 029.7 <sup>f</sup>	1 534.8 <sup>e</sup>	196.7 <sup>d</sup>	214.2 <sup>d</sup>	254.4 <sup>cd</sup>
14	147.3 <sup>e</sup>	262.9 <sup>d</sup>	304.7 <sup>bc</sup>	1 443.6 <sup>e</sup>	1 632.4 <sup>e</sup>	2 273.4 <sup>d</sup>	205.3 <sup>d</sup>	225.6 <sup>d</sup>	283.2 <sup>c</sup>
21	179.2 <sup>e</sup>	302.4 <sup>bc</sup>	325.2 <sup>b</sup>	1 392.7 <sup>e</sup>	1 616.5 <sup>e</sup>	3 106.7 <sup>c</sup>	210.6 <sup>d</sup>	200.8 <sup>d</sup>	342.5 <sup>b</sup>
28	156.1 <sup>e</sup>	292.2 <sup>bc</sup>	353.6 <sup>ab</sup>	1 305.2 <sup>e</sup>	1 523.2 <sup>e</sup>	4 005.2 <sup>b</sup>	203.9 <sup>d</sup>	221.5 <sup>d</sup>	371.3 <sup>ab</sup>
35	143.2 <sup>e</sup>	286.3 <sup>d</sup>	376.8 <sup>a</sup>	1 216.3 <sup>e</sup>	1 374.3 <sup>e</sup>	4 791.7 <sup>a</sup>	217.8 <sup>d</sup>	218.6 <sup>d</sup>	384.2 <sup>a</sup>

同一测定项目数字旁不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。K<sup>+</sup>浓度单位为mg·L<sup>-1</sup>。

植物组织培养中研究表明较高的SOD活性有利于组织的分化(Li等2009)。这一点在辣椒(黄丽华等2009)、大蒜(马琳等2011)、喜树(陈博等2012)和新疆雪莲(Guo等2013)等植物的离体分化中已有报

道。在我们的研究中也发现: 在培养基中添加适量的钾离子(1 200 mg·L<sup>-1</sup>)时, 不定芽的诱导频率和数量显著增加的同时, SOD和POD活性也在增高。

POD在活性氧的代谢中也起作用: 一方面它

表3 钾离子浓度对长柄扁桃不定芽诱导过程中  
MDA含量的影响

Table 3 Effect of potassium ion on MDA content during the  
adventitious bud induction of *A. pedunculata*

培养时间/d	MDA含量/mg·g <sup>-1</sup>		
	对照	K <sup>+</sup> 1 200 mg·L <sup>-1</sup>	K <sup>+</sup> 2 000 mg·L <sup>-1</sup>
0	1.23 <sup>e</sup>	1.23 <sup>e</sup>	1.23 <sup>e</sup>
7	1.24 <sup>e</sup>	1.21 <sup>e</sup>	1.84 <sup>d</sup>
14	1.15 <sup>e</sup>	1.26 <sup>e</sup>	2.47 <sup>c</sup>
21	1.31 <sup>e</sup>	1.38 <sup>e</sup>	3.35 <sup>bc</sup>
28	1.22 <sup>e</sup>	1.34 <sup>e</sup>	3.96 <sup>b</sup>
35	1.35 <sup>e</sup>	1.53 <sup>de</sup>	5.28 <sup>a</sup>

数字旁不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

是H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除剂;另一方面它还是细胞中O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的重要来源,生成的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>用于细胞壁的木质化或蛋白质的交联。人们早已发现,POD对细胞壁的形成是必不可少的,POD参与细胞壁中木质素、木栓层的生物合成和富含羟脯氨酸的糖蛋白中异二酪氨酸(isodityrosine)的产生。Cordewener等(1991)和Jackson等(2001)的研究表明,一些POD在萝卜的培养细胞中能诱导体胚形成,添加这些POD能使被抑制的细胞恢复发育潜能。因此,适量添加的钾离子诱导SOD和POD活性的增加可能是促进长柄扁桃不定芽形成的原因之一。但是,当添加的钾离子浓度过高时,则伴随着细胞活力的下降(表1),MDA含量的升高(表3),表明细胞受到了氧化损伤(Hernandez等2001)。此时,较高的SOD、POD和CAT活性(表2)是为了消除高钾胁迫下植物形成的过多的活性氧,降低活性氧对细胞造成的伤害。因此,只有适量增加钾离子的剂量(在MS培养基上再添加1 200 mg·L<sup>-1</sup>)才有利于长柄扁桃芽的再生。

### 参考文献

陈博,陈哲皓,王利琳,胡江琴(2012).不同光质对喜树愈伤组织形成及分化潜质影响.北方园艺,17: 112~115  
董丽芬,肖颖,邵崇斌(2006).氮、磷、钾元素形态配比及浓度对油松胚培养的影响.西北林学院学报,21(3): 64~66  
黄丽华,洪亚辉,戴雄泽,张学文(2009).光质对辣椒离体愈伤组织

诱导及分化的影响.湖南农业大学学报(自然科学版),35(6): 615~617

李聪,李国平,陈俏,白斌,申烨华,张应龙(2010).长柄扁桃油脂脂肪酸成分分析.中国油脂,35(4): 77~79

李合生(2000).植物生理生化实验原理和技术(第2版).北京:高等教育出版社

马琳,刘世琦,张自坤,杨晓建,张宇,尉辉(2011).光质对大蒜愈伤组织诱导、增殖及器官分化的影响.西北农业学报,20(6): 118~122

孙占育(2010).长柄扁桃茎尖离体培养研究.安徽农业科学,38(19): 9988~9989

孙占育,郭春会,梅立新,罗梦,张利彩(2008).长柄扁桃继代培养方法研究.西北农业学报,17(2): 161~164

孙占育,孙志强,郭春会,曹斌(2010).6-BA与IBA对长柄扁桃增殖的影响.现代农业科技,(7): 126,128

赵一之(1992).内蒙古珍稀濒危植物图谱(第1版).北京:中国农业科技出版社,36~37

Arrigoni O, De Gare L, Tommasi F, Liso R (1992). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. Plant Physiol, 99 (1): 235~238

Cordewener J, Booij H, van der Zandt H, van Engelen F, van Kammen A, de Vries S (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. Planta, 184 (4): 478~486

Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59 (2): 309~314

Guo B, Stiles AR, Liu CZ (2013). Changes in endogenous hormones and oxidative burst as the biochemical basis for enhanced shoot organogenesis in cold-treated *Saussurea involucreta* explants. Acta Physiol Plant, 35: 283~287

Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuc J (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiol Plant Pathol, 20 (1): 73~82

Hernandez JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001). Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol, 127 (3): 817~831

Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS (2001). Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus culture is especially catalyzed by a 40-kDa peroxidase. Plant Physiol, 127 (3): 1065~1076

Li SW, Xue LG, Xu SJ, Feng HY, An LZ (2009). IBA-induced changes in antioxidant enzymes during adventitious rooting in mung bean seedlings: the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Environ Exp Bot, 66 (3): 442~450

Steponkus PL, Lanphear FO (1967). Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. Plant Physiol, 42 (10): 1423~1426