



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112106666 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 202011175016.8

CN 101926284 A, 2010.12.29

(22) 申请日 2020.10.28

CN 106212275 A, 2016.12.14

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107535354 A, 2018.01.05

申请公布号 CN 112106666 A

CN 111802248 A, 2020.10.23

US 7005298 B1, 2006.02.28

(43) 申请公布日 2020.12.22

沈芳晨. 黄草乌再生体系构建. 《中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)农业科技辑》. 2020, (第01期), D047-305.

(73) 专利权人 中国科学院昆明植物研究所

地址 650201 云南省昆明市盘龙区青松路19号

田迎秋等. 乌头离体培养和快速繁殖. 《中草药》. 2007, 第37卷(第08期), 第1243-1247页.

(72) 发明人 何俊 浦秀丽

Gondval, M等. Thidiazuron-induced high

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 苏士莹

frequency establishment of callus cultures and plantlet regeneration in *Aconitum balfourii* Stapf.: An endangered medicinal herb of North-West Himalayas. 《INDIAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY》. 2016, 第15卷(第2期), 第251-255页.

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

王卜琼等. 黄草乌离体快繁技术研究. 《中国农学通报》. 2008, 第24卷(第7期), 第235-237页.

(56) 对比文件

CN 101695275 A, 2010.04.21

CN 102499078 A, 2012.06.20

CN 101390496 A, 2009.03.25

CN 107372125 A, 2017.11.24

审查员 胡佳

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

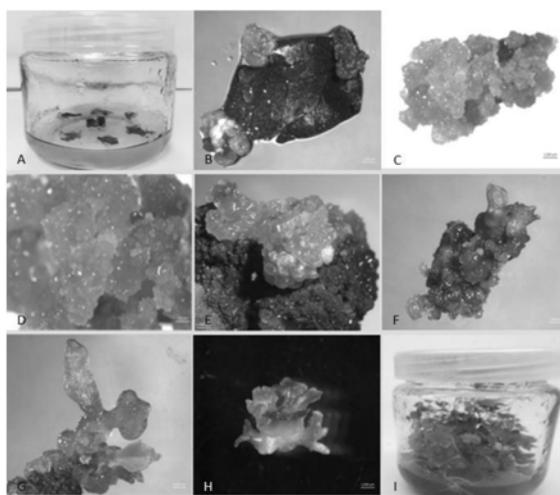
(54) 发明名称

一种器官发生途径再生黄草乌的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种器官发生途径再生黄草乌的方法, 涉及植物组培技术领域; 所述方法以黄草乌的带节茎段为外植体, 通过初代培养获得无菌新芽, 以新长出的叶片为对象, 通过诱导愈伤组织的形成、分化, 再到壮苗、生根, 获得了再生植株。经本发明所述方法, 愈伤组织诱导率为78%; 对愈伤组织进行增殖和分化, 增殖率可达到3倍以上, 5次继代后, 分化率接近70%; 将产生的芽培养1个月后可形成高约2cm左右的芽; 将其接种到生根培养基上1个月, 平均生根率可达为87.5%。本发明为今后黄草乌种质资源的挖掘奠定基础, 对黄草乌种苗的工业化生产, 建立敲除毒性基因的遗传转化体系技术支撑, 具有重要的理论和实践意义。

CN 112106666 B



1. 一种器官发生途径再生黄草乌的方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)以消毒后的黄草乌带节茎段为外植体,接种于初代培养基中进行初代培养,得无菌叶片;所述初代培养基由4MS培养基、NAA 0.1~0.2 mg/L、6-BA 1.0~2.0 mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

(2)将所述无菌叶片置于愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导,得愈伤组织;所述愈伤组织诱导培养基由MS培养基、2,4-D 4mg/L、噻苯隆3mg/L、IBA 1.5 mg/L、6-BA 2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

(3)将所述愈伤组织接种至愈伤组织增殖和分化培养基中进行增殖分化,得绿色芽点;所述愈伤组织增殖和分化培养基由MS培养基、KT 2.5mg/L、6-BA 3mg/L、蔗糖30g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;所述愈伤组织在所述愈伤组织增殖和分化培养基上每21d转接一次,连续转接4次,而后再继续进行增殖分化;

(4)将所述绿色芽点置于不定芽生长培养基进行不定芽的生长培养;所述不定芽生长培养基由WPM培养基、NAA 0.2mg/L、6-BA 1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8;

(5)将长至高1.8~2.5cm的不定芽接种到生根培养基上进行生根培养,得黄草乌再生植株;所述生根培养基由1/2MS培养基,蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L组成,pH值为5.8。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(1)所述消毒包括:将清洗干净的黄草乌带节茎段,在无菌环境中,先用体积百分含量为75%的酒精消毒1 min,再置于质量百分含量为0.2%的HgCl<sub>2</sub>中浸泡10min,然后用无菌水冲洗5次。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(1)所述初代培养的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

4. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(2)将所述无菌叶片的四周修剪成长和宽分别为0.5cm和0.5cm的大小后,放入所述愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导。

5. 根据权利要求4所述方法,其特征在于,所述愈伤诱导的温度为25±3℃,光照强度为10~20μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

6. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述增殖分化的温度为25±3℃,光照强度为20~40 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

7. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(4)所述不定芽的生长培养的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

8. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤(5)所述生根培养的温度为 25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

9. 根据权利要求8所述方法,其特征在于,所述生根培养的时间为1个月以上。

## 一种器官发生途径再生黄草乌的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物组培技术领域,具体涉及一种器官发生途径再生黄草乌的方法。

### 背景技术

[0002] 黄草乌(*Aconitumvilmorinianum*)为毛茛科乌头属多年生草本植物,又称草乌,为我国特有,主要分布于云贵高原。黄草乌的块根是云南特色药材,长期以来一直被用于镇痛抗炎。当前,黄草乌野生主产区仍把引种、驯化黄草乌的野生资源作为发展草乌种植业的主要手段。盲目地收集引种、毁灭性采挖野生黄草乌,已造成其分布区不断萎缩,其野生种质资源受到严重破坏。此外,黄草乌的药用部位根状茎含有剧毒,每年因误食黄草乌而导致中毒的事件频频发生。乌头属植物的毒性高低与其植株在生长过程中积累的主要次生代谢产物“双酯型二萜生物碱”的含量多少有关,需经过特殊处理以获得低毒性的水解产物才可入药,而且该过程费时费力,增加了成本。通过生物技术手段建立黄草乌的组培快繁体系,满足种植行业对种苗的大量需求,可缓解黄草乌野生资源的生存压力;通过基因工程手段对其具毒性的次生代谢产物主要合成基因进行技术敲除,获得“无毒”或“低毒”的黄草乌植株,对确保食用草乌人群的人身安全、降低种植区域相关用药企业的成本投入和提高种质资源的利用效率都具有积极的意义。目前,构建适于敲除次生代谢产物主要合成基因的遗传转化体系,关键是建立经由愈伤组织路径的植株再生体系。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于一种器官发生途径再生黄草乌的方法,为今后黄草乌种质资源的挖掘奠定基础,对黄草乌种苗的工业化生产,建立敲除毒性基因的遗传转化体系技术支撑,具有重要的理论和实践意义。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了一种器官发生途径再生黄草乌的方法,包括以下步骤:(1)以消毒后的黄草乌带节茎段为外植体,接种于初代培养基中进行初代培养,得无菌叶片;所述初代培养基以4MS培养基为基本培养基,还包括:NAA0.1~0.2mg/L、6-BA1.0~2.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0006] (2)将所述无菌叶片置于愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导,得愈伤组织;所述愈伤组织诱导培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:2,4-D4mg/L、噻苯隆3mg/L、IBA1.5mg/L、6-BA2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0007] (3)将所述愈伤组织接种至愈伤组织增殖和分化培养基中进行增殖分化,得绿色芽点;所述愈伤组织增殖和分化培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:KT2.5mg/L、6-BA3mg/L、蔗糖30g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0008] (4)将所述绿色芽点置于不定芽生长培养基进行不定芽的生长培养;所述不定芽生长培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括:NAA0.2mg/L、6-BA1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0009] (5) 将长至高1.8~2.5cm的不定芽接种到生根培养基上进行生根培养,得黄草乌再生植株;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。

[0010] 优选的,步骤(1)所述消毒包括:将清洗干净的黄草乌带节茎段,在无菌环境中,先用体积百分含量为75%的酒精消毒1min,再置于质量百分含量为0.2%的HgCl<sub>2</sub>中浸泡10min,然后用无菌水冲洗5次。

[0011] 优选的,步骤(1)所述初代培养的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

[0012] 优选的,步骤(2)将所述无菌叶片的四周修剪成长和宽分别为0.5cm和0.5cm的大小后,放入所述愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导。

[0013] 优选的,所述愈伤诱导的温度为25±3℃,光照强度为10~20μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

[0014] 优选的,步骤(3)中所述愈伤组织在所述愈伤组织增殖和分化培养基上每20~30d转接一次,而后再继续进行增殖分化。

[0015] 优选的,所述增殖分化的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

[0016] 优选的,步骤(4)所述不定芽的生长培养的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

[0017] 优选的,步骤(5)所述生根培养的温度为25±3℃,光照强度为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间为12h/d。

[0018] 优选的,所述生根培养的时间为1个月以上。

[0019] 本发明提供了一种器官发生途径再生黄草乌的方法,以黄草乌的带节茎段为外植体,通过初代培养获得无菌新芽,再以新长出的叶片为对象,通过诱导其愈伤组织的形成、分化,再到壮苗、生根(图1),获得了经由器官发生路径形成的再生植株。在本发明中,经过愈伤诱导后,诱导得到的愈伤组织块疏松,淡黄色颗粒状,诱导率约为78%;将获得的淡黄色疏松颗粒状愈伤组织转移至愈伤组织增殖和分化培养基,1个月后愈伤组织块的边缘会分化出绿色的芽点,同时愈伤组织也在增殖,增殖率可达到3倍以上,连续继代培养4次后,绿色芽点的出现率可达36%(分化率),随着继代次数的增加,分化率也会提高,到第5次继代后,分化率接近70%,且有少量的植株出现;将愈伤组织分化后得到的绿色芽点转接到不定芽生长培养基上,培养1个月后可形成高约2cm左右的芽;将长至高约2cm左右的芽接种到生根培养基上,15d左右开始生根,培养1个月后,平均生根率可达为87.5%。本发明为今后黄草乌种质资源的挖掘奠定基础,对黄草乌种苗的工业化生产,建立敲除毒性基因的遗传转化体系技术支撑,具有重要的理论和实践意义。

## 附图说明

[0020] 图1为愈伤分化诱导及分化过程,其中A:叶片;B-D:愈伤组织;E-G:不定芽;H:丛芽;I:再生植株;

[0021] 图2为黄草乌再生植株。

### 具体实施方式

[0022] 本发明提供了一种器官发生途径再生黄草乌的方法,包括以下步骤:(1)以消毒后的黄草乌带节茎段为外植体,接种于初代培养基中进行初代培养,得无菌叶片;所述初代培养基以4MS培养基为基本培养基,还包括:NAA0.1~0.2mg/L、6-BA1.0~2.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0023] (2)将所述无菌叶片置于愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导,得愈伤组织;所述愈伤组织诱导培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:2,4-D4mg/L、噻苯隆3mg/L、IBA1.5mg/L、6-BA2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0024] (3)将所述愈伤组织接种至愈伤组织增殖和分化培养基中进行增殖分化,得绿色芽点;所述愈伤组织增殖和分化培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:KT2.5mg/L、6-BA3mg/L、蔗糖30g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0025] (4)将所述绿色芽点置于不定芽生长培养基进行不定芽的生长培养;所述不定芽生长培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括:NAA0.2mg/L、6-BA1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8;

[0026] (5)将长至高1.8~2.5cm的不定芽接种到生根培养基上进行生根培养,得黄草乌再生植株;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。

[0027] 本发明以消毒后的黄草乌带节茎段为外植体,接种于初代培养基中进行初代培养,得无菌叶片;所述初代培养基以4MS培养基为基本培养基,还包括:NAA0.1~0.2mg/L、6-BA1.0~2.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明外植体优选采自无病虫害、生长健壮的黄草乌。本发明对所述外植体进行消毒,所述消毒包括:将清洗干净的黄草乌带节茎段,在无菌环境中,先用体积百分含量为75%的酒精消毒1min,再置于质量百分含量为0.2%的HgCl<sub>2</sub>中浸泡10min,然后用无菌水冲洗5次。本发明在所述HgCl<sub>2</sub>浸泡过程中,不断摇晃使灭菌均匀(包括培养瓶内壁),然后用无菌水冲洗5次,并反复摇动以洗掉残留升汞,防止其对外植体的毒害作用。本发明将消毒过的外植体(带单个芽的茎段)接种到初代培养基上,进行初代培养,培养3个月后获得新长出的无菌芽及叶片,每瓶放置1个带芽茎段。本发明所述初代培养的温度优选为25±3℃,光照强度优选为20~40μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间优选为12h/d。本发明所述初代培养基中,细胞生长素NAA和细胞分裂素6-BA的联合使用可发挥诱导初代培养时芽的出现和叶的分化及长大,为后续实验提供材料,联合使用优于单独使用的诱导效果。

[0028] 本发明将所述无菌叶片置于愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导,得愈伤组织;所述愈伤组织诱导培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:2,4-D4mg/L、噻苯隆3mg/L、IBA1.5mg/L、6-BA2mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明优选将所述无菌叶片的四周修剪成长和宽分别为0.5cm和0.5cm的大小后,放入所述愈伤组织诱导培养基中进行愈伤诱导。经过本发明所述愈伤诱导后,1个月可见明显的愈伤组织形成,诱导得到的愈伤组织块疏松,淡黄色颗粒状,诱导率约为78%。本发明所述愈伤诱导的温度优选为25±3℃,光照强度优选为10~20μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照时间优选为12h/d。在本发明中,所述浓度的2,4-D、IBA、噻苯隆和6-BA多种细胞生长素和细胞分裂素的联合使用,能够更加高效的诱导愈伤组织的形成,更易获得较易分化的愈伤组织。

[0029] 本发明将所述愈伤组织接种至愈伤组织增殖和分化培养基中进行增殖分化,得绿色芽点;所述愈伤组织增殖和分化培养基以MS培养基为基本培养基,还包括:KT2.5mg/L、6-BA3mg/L、蔗糖30g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明将所述愈伤组织接种至愈伤组织增殖和分化培养基上后,优选每20~30d转接一次,而后再继续进行增殖分化,否则愈伤组织会褐化。本发明所述增殖分化的温度优选为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度优选为 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照时间优选为12h/d。本发明中,所述增殖分化1个月后愈伤组织块的边缘会分化出绿色的芽点,同时愈伤组织也在增殖,增殖率可达到3倍以上;连续继代培养4次后,绿色芽点的出现率可达36%(分化率);随着继代次数的增加,分化率也会提高,到第5次继代后,分化率接近70%,且有少量的植株出现。在本发明中,所述浓度的KT和6-BA两种细胞分裂素的联合使用,可促进愈伤组织的增殖并获得绿色芽点,进一步的分化获得不定芽。

[0030] 本发明将所述绿色芽点置于不定芽生长培养基进行不定芽的生长培养;所述不定芽生长培养基以WPM培养基为基本培养基,还包括:NAA0.2mg/L、6-BA1.0mg/L、蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明所述不定芽的生长培养的温度优选为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度优选为 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照时间优选为12h/d。利用本发明所述不定芽生长培养基进行生长培养,1个月后可形成高约2cm左右的芽。

[0031] 本发明将长至高1.8~2.5cm的不定芽接种到生根培养基上进行生根培养,得黄草乌再生植株;所述生根培养基以1/2MS培养基为基本培养基,还包括:蔗糖20g/L和琼脂5.6g/L,pH值为5.8。本发明所述生根培养的温度优选为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度优选为 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照时间优选为12h/d。在所述生根培养基上进行15d左右的生根培养,就开始生根,培养1个月后,平均生根率可达为87.5%。

[0032] 本发明对上述所有培养基的制备方法并没有特殊限定,优选的将各成分添加至基础培养基(溶液态)中,再利用基础培养基(溶液态)进行定容,混合均匀,调节pH值至5.8,灭菌备用。本发明对上述所有培养基中的成分来源并没有特殊限定,利用本领域的常规市售产品即可。

[0033] 下面结合实施例对本发明提供的一种器官发生途径再生黄草乌的方法进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

#### [0034] 实施例1

##### [0035] 一、外植体获取

[0036] 2016年6月在黄草乌种植基地,剪取无病虫害、生长健壮的黄草乌上部植株插入水中带回实验室备用。将黄草乌的带节茎段取下来,用清水冲洗干净后置于无菌超净工作台上,先用75%酒精消毒1min,然后放置在0.2% $\text{HgCl}_2$ 中进行灭菌,灭菌10min,灭菌过程中不断摇晃使灭菌均匀(包括培养瓶内壁),然后用无菌水冲洗5次,并反复摇动以洗掉残留升汞,防止其对外植体的毒害作用。

##### [0037] 二、初代培养

[0038] 将消毒过的外植体(带单个芽的茎段)接种到培养基上,进行初代培养,培养3个月获得新长出的无菌芽及叶片。每瓶放置1个带芽茎段。培养温度为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ,光照强度 $20\sim 40\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,光照12h/d。所述的初代培养基为:每升含萘乙酸(NAA)0.2mg、6-苄基腺嘌呤(6-BA)1.0mg、蔗糖20g、琼脂5.6g,其余为4MS培养基,灭菌前调整pH至5.8。

##### [0039] 三、愈伤组织的诱导

[0040] 以初代培养获得的无菌叶片为对象,将单个叶片的四周修剪成约0.5cm×0.5cm左右的大小放入愈伤组织诱导培养基进行愈伤诱导。培养1个月可见明显的愈伤组织形成,诱导得到的愈伤组织块疏松,淡黄色颗粒状,诱导率约为78%。培养温度为25±3℃,光照强度10~20μmol/(m<sup>2</sup>·s),光照12h/d。所述的初代培养基为:每升含二氯苯氧乙酸(2,4-D)4mg、噻苯隆(TDZ)3mg、吲哚丁酸(IBA)1.5mg、6-苄基腺嘌呤(6-BA)2mg、蔗糖20g、琼脂5.6g,其余为MS培养基,灭菌前调整pH至5.8。

[0041] 四、愈伤组织的增殖和分化

[0042] 将获得的淡黄色疏松颗粒状愈伤组织转移至愈伤组织增殖和分化培养基,1个月后愈伤组织块的边缘会分化出绿色的芽点,同时愈伤组织也在增殖,增殖率可达到3倍以上。但如果不及时转接,愈伤组织会褐化,转接周期以21d为宜。连续继代培养4次后,绿色芽点的出现率可达36%(分化率)。随着继代次数的增加,分化率也会提高,到第5次继代后,分化率接近70%,且有少量的植株出现。所述的愈伤组织增殖和分化培养基为:每升含激动素(KT)2.5mg、6-苄基腺嘌呤(6-BA)3mg、蔗糖30g、琼脂5.6g,其余为MS培养基,灭菌前调整pH至5.8。

[0043] 五、不定芽的生长

[0044] 将愈伤组织分化后得到的绿色芽点转接到不定芽生长培养基上,培养1个月后可形成高约2cm左右的芽。所述的不定芽生长培养基为:每升含萘乙酸(NAA)0.2mg、6-苄基腺嘌呤(6-BA)1.0mg、蔗糖20g、琼脂5.6g,其余为WPM培养基,灭菌前调整pH至5.8。

[0045] 六、生根培养

[0046] 将长至高约2cm左右的芽接种到生根培养基上,15d左右开始生根,培养1个月后,平均生根率可达为87.5%(图2)。所述的生根培养基为:每升含蔗糖20g、琼脂5.6g,其余为1/2MS培养基(仅MS的大量元素减半,其余成分不变),灭菌前调整pH至5.8。

[0047] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

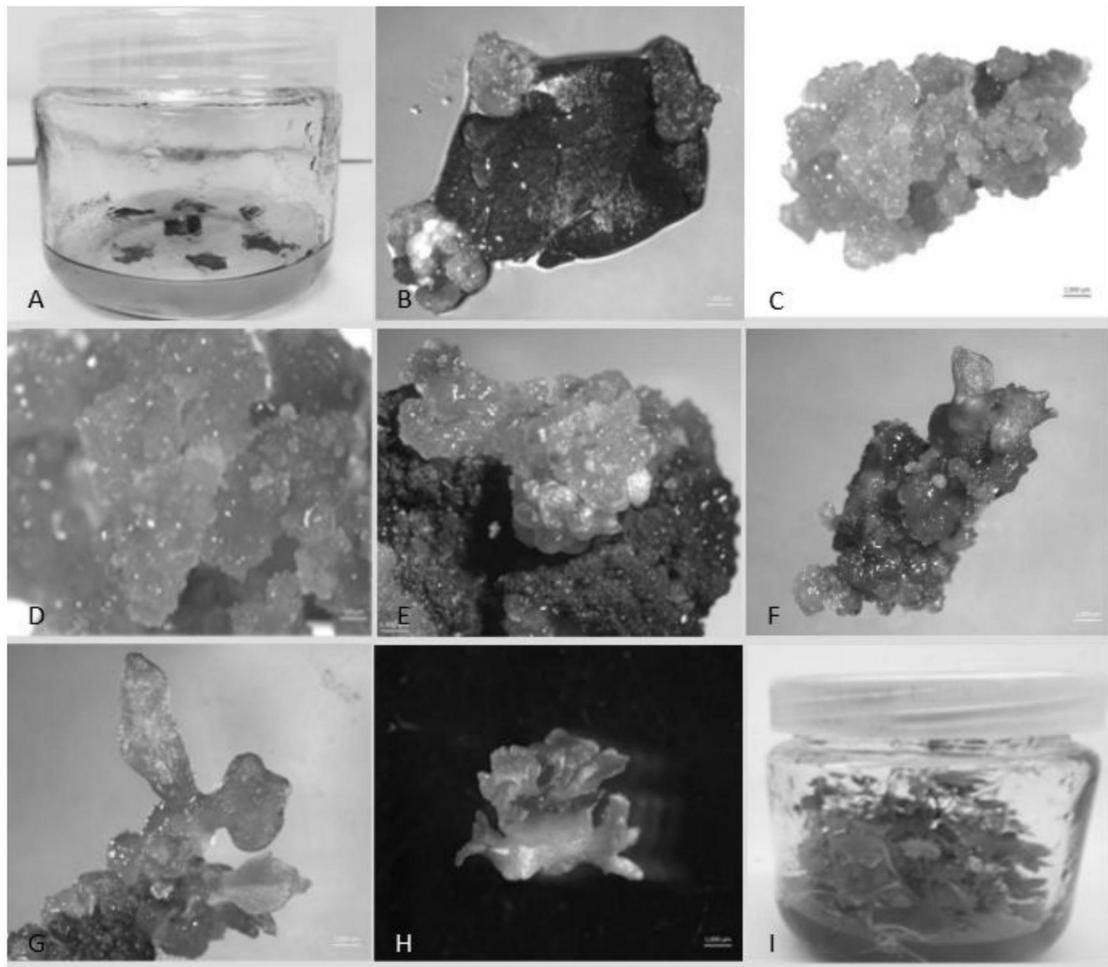


图1

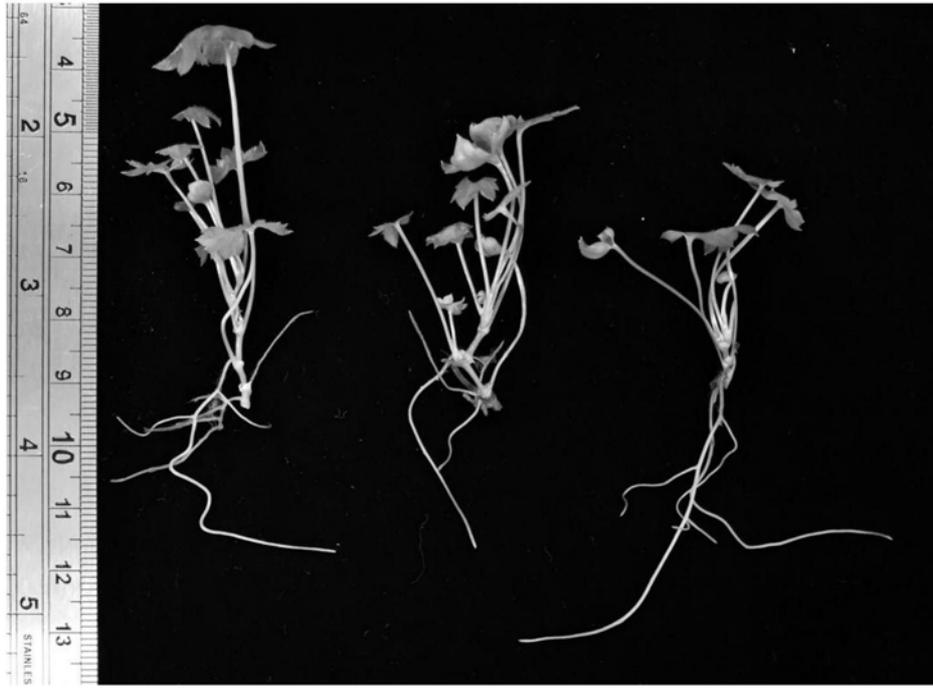


图2