



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104920214 B

(45)授权公告日 2017.06.20

(21)申请号 201510299045.8

(22)申请日 2015.06.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104920214 A

(43)申请公布日 2015.09.23

(73)专利权人 中国科学院昆明植物研究所
地址 650201 云南省昆明市蓝黑路132号

(72)发明人 朱宏涛 张颖君 王东 许敏
杨崇仁

(74)专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务
所(普通合伙) 53108

代理人 马晓青

(51)Int.Cl.
A01H 4/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103609440 A,2014.03.05,

CN 102210265 A,2011.10.12,

CN 1565171 A,2005.01.19,

CN 104620986 A,2015.05.20,

朱宏涛等.“茉莉酸甲酯对三七组培苗中总皂苷含量的影响”.《西部林业科学》.2015,第43卷(第2期),

审查员 杜玉娟

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种提高三七组培苗皂苷产量的方法

(57)摘要

本发明提供一种施用茉莉酸甲酯提高三七组培苗皂苷产量的方法,包括三七组培苗快繁体系的建立、三七组培苗施加茉莉酸甲酯、栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤。本方法简便易行,可在短期内形成大量优良三七快繁苗,具有繁殖速度快、周期短等优点;外施微量茉莉酸甲酯能在5-10日内提高三七总皂苷产量15倍,各主要单体皂苷产量提高2-5倍。此发明能有效地提高三七皂苷的产量,固体培养法繁育三七组培苗,无需昂贵的发酵设备、投资少;培养方法操作简单、繁育系数高、繁殖速度快、污染率低,不受季节限制,能有效降低三七皂苷的生产成本,对三七皂苷大规模生产具有实际指导意义。

1. 一种提高三七组培苗皂苷产量的方法,包括三七组培苗快繁体系的建立、三七组培苗施加茉莉酸甲酯、栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤,其特征在于:

所述的三七组培苗快繁体系的建立步骤是用固体培养法诱导三七愈伤组织、丛生芽、组培苗,确定三七组培苗快繁条件,建立三七组培苗快繁体系,获得三七组培苗;所述诱导三七愈伤组织步骤,是将三七幼嫩叶片、叶柄,经常规灭菌后接种在以B5为基本培养基,添加不同浓度和组合的NAA,KT和2,4-D培养基中进行三七愈伤组织诱导,所述NAA,KT和2,4-D浓度分别设置为0.1-1.5mg/L,0.5-2.0mg/L,1.0-3.0mg/L;将诱导后的愈伤组织接种在MS为基本培养基,添加6-BA0.2-2.0mg/L及IBA0.05-0.5mg/L的固体培养基中进行三七丛生苗的诱导,将诱导出的三七丛生苗接种在以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的IBA0.5-2.0mg/L、IAA0.5-2.0mg/L和6-BA0.01-1.0mg/L的培养基中进行三七不定根的诱导;

所述的三七组培苗施加茉莉酸甲酯步骤,是用20%的乙醇溶解茉莉酸甲酯,配制成50mmol/L的乙醇母液,并用0.22 μ m的微孔滤膜过滤灭菌,将灭菌后的茉莉酸甲酯母液添加到灭菌并冷却至35 \pm 5 $^{\circ}$ C的固体培养基中,使茉莉酸甲酯最终浓度为50-400 μ mol/L,固体培养基配比为MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.2mg/L,冷却至常温;然后将三七组培苗快繁体系的建立步骤所得的三七组培苗转接在上述添加了茉莉酸甲酯母液的培养基中,置于相对湿度60~66%、光照强度30 μ mol m⁻²s⁻¹,光照/黑暗8h/16h,温度23 \pm 2 $^{\circ}$ C条件下培养,于培养后的2,5,10,15,30天进行采样分析,采集的三七组培苗全株,采用UV和HPLC法进行三七总皂苷和单体皂苷产量检测;

所述的栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤是将上述步骤所得的三七组培苗移栽至以不同材料为基质的苗床内,移栽8个月后,采用茉莉酸甲酯进行叶面喷施,用少量乙醇助溶,将茉莉酸甲酯原液配成50-400 μ mol/L的溶液,喷洒于移栽8个月后的三七叶面,至叶面滴水为止,早、中、晚各喷施一次,于喷施后的2,5,10,15,30天采样进行三七总皂苷和主要单体皂苷产量分析。

2. 根据权利要求1所述的一种提高三七组培苗皂苷产量的方法,其特征在于所述的栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤,是将三七组培苗快繁体系的建立步骤所得的三七组培苗移栽至以不同材料为基质的苗床内,所述的材料为珍珠岩、蛭石、腐殖土、草炭、河沙、泥炭和蔗渣中的一种或多种复配。

一种提高三七组培苗皂苷产量的方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域，尤其涉及一种施用茉莉酸甲酯提高三七组培苗皂苷产量的新方法。

技术背景：

[0002] 三七 (*Panaxnotoginseng* (Burk.) F.H.Chen) 为五加科人参属植物，是我国传统的名贵中药，主产云南，也是云南省重要的特色植物药。随着三七有效成分和药理作用的不断阐明，三七产品不断开发，市场需求日增。截至2013年底，经SFDA批准含有三七药材的中成药制剂达400多种，相关药品生产批准文号3300多个和制药企业1300多家，三七产业年总产值超过200亿，三七在我国医药产业的发展中起着至关重要的作用。

[0003] 三七皂苷主要通过三七的大田栽培获得。但因三七栽培产业中种苗混杂、种质资源退化、三七连作障碍现象突出、轮作间隔年限长、病害种类繁多、危害巨大、过量农药的施入导致农残和重金属超标等因素，从质量、产量和安全性上严重影响了三七种植业的发展，加剧了合格三七产品的供求矛盾，进一步制约了以三七为原料的医药产业发展壮大。无论是进行三七优良种苗的繁育、缩短三七轮作间隔时间还是规范农药的施用方式，都很难从根本上打破三七产业发展的瓶颈，达到快速、稳定的工厂化生产。研发一种有效提高三七皂苷产量的生产方法，是解决三七原料供需矛盾的关键所在。

[0004] 茉莉酸甲酯 (Me-JA) 作为植物信号诱导子能够安全有效地激发植物次生代谢物的产生和积累，但对植物生物量的增长具有负面影响。因此，优选合适的茉莉酸甲酯施用时间和浓度，才能最大限度地提高药用植物活性成分的产量。目前，现有技术中未见有合适的茉莉酸甲酯提高三七皂苷产量的施用时间和浓度的方法报道。

发明内容：

[0005] 本发明的目的在于减缓三七产品的供求矛盾，针对现有技术存在的不足，基于三七皂苷在植物体内分布的特点及其在药理方面的活性，提供一种施用茉莉酸甲酯提高三七组培苗皂苷产量的新方法，此方法能有效地提高三七皂苷的产量，具有见效快、成本低、操作简单、方便实施、产品无毒无残留等特征，对满足三七皂苷大规模生产具有重要意义。

[0006] 为了实现本发明的目的，本发明提供了如下的技术方案：

[0007] 一种提高三七组培苗皂苷产量的方法，包括三七组培苗快繁体系的建立、三七组培苗施加茉莉酸甲酯、栽培三七施加茉莉酸甲酯等步骤：

[0008] 所述的三七组培苗快繁体系的建立步骤是用固体培养法诱导三七愈伤组织、丛生芽、组培苗，确定三七组培苗快繁条件，建立三七组培苗快繁体系，获得三七组培苗；

[0009] 所述的三七组培苗施加茉莉酸甲酯步骤是将上述步骤所得的三七组培苗接种在含有茉莉酸甲酯的固体培养基中，置于相对湿度60~66%、光照强度 $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ，光照/黑暗8/16，温度 $23\pm 2^\circ\text{C}$ 条件下培养，于不同的培养时间采集三七组培苗全株，采用UV和HPLC法进行三七总皂苷和主要单体皂苷产量检测；

[0010] 所述的栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤是将上述步骤所得的三七组培苗移栽至以不同材料为基质的苗床内,移栽8个月后,采用茉莉酸甲酯进行叶面喷施,喷施后不同时间采样进行三七总皂苷和主要单体皂苷产量分析。

[0011] 根据所述的提高三七组培苗皂苷产量的方法,其中所述诱导三七愈伤组织是将三七幼嫩叶片、茎干、芽和须根,经常规灭菌后接种在以B5为基本培养基,添加不同浓度和组合的NAA,KT和2,4-D(浓度梯度设置为NAA0.1-1.5mg/L,KT0.5-2.0mg/L,2,4-D1.0-3.0mg/L)培养基中进行三七愈伤组织诱导,将诱导后的愈伤组织接种在MS为基本培养基,添加6-BA0.2-2.0mg/L及IBA0.05-0.5mg/L的固体培养基中进行三七丛生苗的诱导,将诱导出的三七丛生苗接种在以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的IBA0.5-2.0mg/L、IAA 0.5-2.0mg/L和6-BA0.01-1.0mg/L的培养基中进行三七不定根的诱导。

[0012] 根据所述的一种提高三七组培苗皂苷产量的方法,其中所述的三七组培苗施加茉莉酸甲酯步骤是用20%的乙醇溶解茉莉酸甲酯,配制成50mmol/L的乙醇母液,并用0.22 μ m的微孔滤膜灭菌,将灭菌后的茉莉酸甲酯母液添加到灭菌并冷却至35 \pm 5 $^{\circ}$ C的固体培养基中,所述的固体培养基配比为MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.2mg/L,至茉莉酸甲酯最终浓度为50-400 μ mol/L;然后将三七组培苗快繁体系的建立步骤所得的三七组培苗转接在上述添加了茉莉酸甲酯母液的培养基中培养,于培养后的2,5,10,15,30天进行采样分析。

[0013] 根据所述的一种提高三七组培苗皂苷产量的方法,其中所述的栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤是将三七组培苗快繁体系的建立步骤所得的三七组培苗移栽至以不同材料为基质的苗床内,所述的材料为珍珠岩、蛭石、腐殖土、草炭、河沙、泥炭和蔗渣中的一种或多种复配。

[0014] 根据所述的一种提高三七组培苗皂苷产量的方法,其中栽培三七施加茉莉酸甲酯步骤中,用少量乙醇助溶,将茉莉酸甲酯原液配成50-400 μ mol/L的溶液,喷洒于移栽8个月后的三七叶面,至叶面滴水为止,早、中、晚各喷施一次,于喷施后的2,5,10,15,30天进行采样分析。

[0015] 本发明为一种施用茉莉酸甲酯提高三七组培苗皂苷产量的新方法,能有效地提高三七皂苷的产量。其操作简单、不受季节限制、且有效降低三七皂苷的生产成本,对满足三七皂苷大规模生产具有重要意义。

[0016] 与现有技术相比较,本发明的优异性在于:

[0017] 1. 固体培养法繁育三七组培苗,无需昂贵的发酵设备、投资少;培养方法简单、繁育系数高、繁殖速度快、污染率低。

[0018] 2. 本发明以提高优质、安全的三七总皂苷和主要皂苷的产量为最终目的。

[0019] 3. 本发明以三七完整植株为研究对象,研究结果对三七皂苷的大田生产指导更具实施意义。

[0020] 4. 本发明在短时间内,安全有效地提高单位面积三七总皂苷和主要皂苷的产量。

具体实施方式:

[0021] 下面对本发明的实施例作详细说明。本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围并不以此为限。

[0022] 实施例1:

[0023] 步骤1:三七组培苗快繁体系的建立。

[0024] 两年生三七植株用碱性肥皂水洗去表面污泥后以清水漂洗干净,流水冲洗30min,蒸馏水冲洗4-5次。取其叶片和叶柄在75%的乙醇溶液中浸泡1min后,无菌蒸馏水冲洗3-4次,无菌滤纸吸干,置于0.1%的升汞(HgCl_2)溶液中浸泡40min,无菌水冲洗5-6次,无菌滤纸将水吸干。于无菌超净工作台将叶片切成 0.5cm^2 的块状,叶柄切成0.5cm的条状。接种于B5+KT 0.5mg/L+NAA0.6mg/L+2,4D2mg/L固体培养基中,于 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 、黑暗条件下进行愈伤组织的诱导和培养20日,其愈伤组织诱导率为98.3%。将生长良好的愈伤组织转接至MS+6-BA1mg/L+IBA0.1mg/L固体培养基中,置于光照强度 $30\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照/黑暗8/16,温度 $23\pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中进行丛生苗的诱导培养。诱导培养60日时,三七愈伤组织诱导幼苗的分化率为 $97.0\pm 1.4\%$,每块愈伤组织的成苗株数为 42.2 ± 3.1 株。将生长至长度为1cm的三七丛生苗单株接种在 $1/2\text{MS}+\text{IBA}0.8\text{mg/L}+6\text{-BA}0.1\text{mg/L}$ 固体培养基中进行诱导生根培养,培养20日时,三七单株生根率为96%,单株生根数量 13.0 ± 1.0 。将生根后的三七完整植株接种在MS+6-BA 1mg/L+IBA0.2mg/L固体培养基中培养,持续培养90日,生物量增长率为400%。

[0025] 步骤2:三七组培苗总皂苷含量的检测。

[0026] 将培养至90日的三七组培苗全株取出,流水冲去表面附着的培养基,于 45°C 条件下干燥、粉碎。精密称取样品干重0.3g,置于2mL的容量瓶中,70%的甲醇定容至刻度线、称重。间隔超声提取3次,每次超声30min,冷却过夜,70%的甲醇补足重量。过直径为 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜,续滤液进行总皂苷和5个主要的单体皂苷检测。

[0027] 分别吸取上述准备好的续滤液 $20\mu\text{L}$ 于10mL的试管中,同时做一空白对照,在水浴上蒸干,冷却至室温,加5%香草醛冰醋酸溶液0.2mL,加0.8mL高氯酸,在 70°C 热水浴中显色15分钟,流水冷却,加冰醋酸5mL,摇匀,在560nm波长处测定吸收值。同时精密称取总皂苷(标定为100%)10.0mg,置于10mL容量瓶中,加70%甲醇溶解、摇匀后定容至刻度线,分别吸取20、40、60、80、100、120、140、160和 $180\mu\text{L}$ 置于10mL的试管中,按照上述的样品检测方法进行检测。根据样品量和吸收值得出线性方程: $y=0.0045x-0.0574$, $R^2=0.9996$;检测范围20-180ug,根据样品吸收值和线性方程计算出三七总皂苷的含量。结果得出,培养90日的三七组培苗中总皂苷含量达到干物质的1.598%。

[0028] 步骤3:三七中主要皂苷Rg1、Re、Rb1、Rd和三七皂苷R1的含量检测。

[0029] 采用Waters2690分析仪,二极管阵列检测器,Waters Symmetry分析柱($4.6\times 250\text{mm}$);流动相:乙腈-水,梯度洗脱(20:80);流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$;检测波长203nm;柱温 25°C 。理论塔板数按人参皂苷Rg1峰计算,不低于6000。利用外标峰面积法测定,人生皂苷Rg1和Re的分离度大于1.5。

[0030] 标准曲线制作:将标准品在 45°C 条件下减压干燥至恒重,精密称取,70%的甲醇定容至10mL,分别配成R1(0.33mg/mL),Rg1(0.574mg/mL),Re(0.326mg/mL),Rb1(0.544mg/mL)和Rd(0.194mg/mL)的对照品溶液。分别取5、10、20、30、40、50、60、70、80、 $90\mu\text{L}$ 进样,测定标准品线性关系。结果如表1所示:

[0031] 表1三七5个主要皂苷含量检测的线性方程

| | 皂苷 | 标准曲线 | R ² | 线性范围 (ug) |
|--------|-----|-----------------------------------|----------------|--------------|
| | R1 | $y = 311,089.879 x + 251,584.878$ | 0.999 | 1.65 - 23.1 |
| [0032] | Rg1 | $y = 176,722.745 x + 308,588.302$ | 1.000 | 5.74 - 40.18 |
| | Re | $y = 265,108.437 x + 93,008.777$ | 1.000 | 3.26 - 22.82 |
| | Rb1 | $y = 158,745.887 x + 144,142.465$ | 0.999 | 5.44 - 32.64 |
| | Rd | $y = 233,099.038 x + 111,487.478$ | 0.999 | 0.97 - 7.76 |

[0033] 采用单体皂苷在上述实验中得到的线性方程(表1),根据样品检测的吸收值计算出各单体皂苷在三七组培苗中的含量。结果显示,培养90日的三七组培苗中产生了三七皂苷R1和人参皂苷Rg1、Re、Rb1,其在三七组培苗干物质中的含量分别为0.027%、0.102%、0.099%、0.088%。

[0034] 实施例2:

[0035] 用20%的无水乙醇溶解茉莉酸甲酯,配制成50mmol/L的乙醇母液,并用0.22 μ m的微孔滤膜过滤灭菌。将灭菌后的茉莉酸甲酯母液添加到灭菌并冷却至35 \pm 5 $^{\circ}$ C的供试培养基中,于常温下静置、冷却。制成茉莉酸甲酯浓度为0、150、200、250和300 μ mol/L的固体培养基。无菌条件下精密称取实施例1步骤(1)中所得三七组培苗,并转接至上述培养基中(苗鲜重5g/瓶,茉莉酸甲酯各浓度梯度设置10个重复,并以茉莉酸甲酯浓度为0的固体培养基中三七组培苗为对照组),置于光照强度30 μ mol m⁻²s⁻¹,光照/黑暗8/16,温度23 \pm 2 $^{\circ}$ C的条件下继代培养5日时,采样、称重、计算生物量。并于45 $^{\circ}$ C条件下干燥、粉碎后按照具体方法实施实施例1步骤(2)和(3)进行三七总皂苷含量的UV检测和主要皂苷含量的HPLC检测。根据皂苷含量及干物质的重量计算出三七总皂苷和主要单体皂苷的产量。研究结果如表2所示。

[0036] 表2三七皂苷和主要皂苷的产量

[0037]

| Me-JA (μ mol/L) | 培养 5 日时每瓶三七苗中的皂苷产量 (mg) | | | | | |
|-------------------------|-------------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | 总皂苷 | 三七皂苷 R1 | 人参皂苷 Rg1 | 人参皂苷 Re | 人参皂苷 Rb1 | 人参皂苷 Rd |
| 对照 | 7.32 | 0.31 | 2.28 | 1.41 | 4.32 | 0.00 |
| 150 | 36.97 | 0.73 | 5.36 | 1.95 | 6.75 | 1.77 |
| 200 | 89.25 | 1.13 | 8.25 | 3.35 | 7.54 | 2.03 |
| 250 | 114.61 | 1.51 | 11.08 | 3.58 | 8.29 | 3.04 |
| 300 | 39.71 | 0.32 | 2.33 | 0.97 | 9.68 | 2.59 |

[0038] 从上述结果,很明显地看出采用本发明(250 μ mol/L的Me-JA外施于三七组培苗中),能够刺激三七组培苗产生三七皂苷Rd,并极大地提高三七总皂苷和各单体皂苷的产量。其中总皂苷产量为114.61mg,是对照的15.66倍。三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Re和Rb1的

产量为1.51mg、11.08mg、3.58mg和8.29mg,分别是对照的4.87、4.86、2.54和1.92倍。

[0039] 实施例3

[0040] 实施例1步骤(1)中所得的生长健壮、单株重量一致的三七组培苗用流水洗净根部表面的培养基,移栽至由灭菌后的珍珠岩:蛭石(2:1)为基质铺成的苗床内,种植密度10cm X 10cm,以0.5m²为一个实验小区,每小区种植组培苗50株。在基质湿度25-28%,空气湿度60%,温度23±2℃,荫棚透光率17%的条件下培养,并以MS大量元素为追肥,培养至8个月时。将Me-JA分别配成150、200、250和300μmol/L的水溶液,均匀地喷洒于移栽8个月后的三七叶片,至叶面滴水为止(早、中、晚各喷施一次),于喷施后第5天采收三七根。并于45℃条件下干燥、称重、粉碎后过60目筛,按照实施例1中步骤(2)和(3)的方法进行三七总皂苷含量的UV检测和主要皂苷含量的HPLC检测。并根据皂苷含量和干物质的重量计算出0.5m²苗床面积内三七总皂苷和主要单体皂苷的产量。研究结果如表3所示。

[0041] 表3.0.5m²苗床面积内三七皂苷和主要皂苷的产量

[0042]

| Me-JA (μmol/L) | 喷施5日时各实验小区三七皂苷的平均产量(g) | | | | | |
|-------------------|------------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | 总皂苷 | 三七皂苷 R1 | 人参皂苷 Rg1 | 人参皂苷 Re | 人参皂苷 Rb1 | 人参皂苷 Rd |
| 对照 | 7.08 | 0.38 | 1.52 | 1.61 | 2.08 | 0.30 |
| 150 | 11.84 | 0.86 | 3.44 | 2.13 | 3.12 | 0.31 |
| 200 | 16.33 | 1.27 | 5.06 | 3.51 | 3.33 | 0.45 |
| 250 | 21.91 | 1.73 | 6.87 | 3.78 | 3.70 | 0.53 |
| 300 | 12.77 | 0.52 | 2.05 | 1.47 | 6.14 | 0.46 |

[0043] 从上述结果,可以看出采用本发明(250μmol/L的Me-JA叶面喷施于移栽8个月后的三七叶面),能极大地促进栽培三七根中总皂苷产量及其主要单体皂苷产量的增加。其中0.5m²苗床面积内三七总皂苷的产量为21.91克,约是同时期对照的3倍。三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、Re、Rb1和Rd的产量依次为1.73、6.87、3.78、3.70和0.53克,分别是对照的4.55、4.52、2.35、1.79和1.77倍。