

甜叶菊新品系的主要农艺性状及糖苷含量比较

杨文婷,吴 卫,蔡乾蓉,徐应文,魏 超

(四川农业大学农学院,雅安 625014)

摘 要: [目的]对 4 个甜叶菊品系的主要农艺性状、茎叶产量及糖苷含量进行比较,为不同用途的甜叶菊育种提供一定的依据。[方法]对 SR-1,SR-2,SR-3 和 SR-5 共 4 个甜叶菊品系的株高、茎节长、一级分枝数、叶长、叶宽、叶长宽比和茎叶干重等进行考察,采用 HPLC 法测定其干叶 ST 和 RA 糖苷含量,并分析了各性状间相关关系。[结果]4 个品系间植株形态、茎叶产量及糖苷品质均存在显著差异,ST 苷含量和茎叶产量最高的品系为 SR-5,RA 苷含量和 RA/ST 值最高的品系为 SR-2,综合 RA 苷含量和茎叶产量考虑,RA 苷总量最高的为 SR-3。茎叶产量同株高、茎节长、叶宽间相关显著。RA 苷含量与干叶产量、干茎产量及茎叶总产量等呈显著负相关。ST 苷含量则与各农艺性状间相关均不显著。[结论]提高甜菊的产量会一定程度影响甜叶菊的品质,但仍有可能选出既高产,品质又符合生产所需的优良甜叶菊新品种。SR-5 品系可作为较好的药用型甜叶菊品系,SR-2 可用作糖用型甜叶菊育种材料。

关键词: 甜叶菊;ST 苷;RA 苷;品系;农艺性状;产量;糖苷含量

中图分类号:S566.901

文献标识码:A

甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni),简称甜菊,为菊科甜叶菊属多年生草本植物,原产南美巴拉圭一带,于 1976 年在我国引种试种成功^[1]。甜叶菊富含甜菊苷(stevioside,简称 ST 苷)、莱鲍迪苷 A(rebaudioside A,简称 RA 苷)等糖苷类物质,RA 糖苷的甜度为蔗糖 350~450 倍^[2],热量仅为蔗糖的 1/300,且味质好,口感最接近于蔗糖,是一种新型的绿色保健型甜味剂;ST 糖苷的甜度为蔗糖的 250~300 倍^[2],有后苦味,作为甜味剂品质不及 RA 苷,但 ST 糖苷有很好的抗癌活性^[3]和降低 II 型糖尿病血糖浓度和控制高血压的作用^[4-6],在开发为医药保健产品上潜力巨大。甜叶菊中糖苷类成分结构相似,功能和作用却不尽相同,对于作为糖用或药用型的甜叶菊品种,生产上不仅要求其具备相应的高 RA 苷或高 ST 苷含量,还要求其高 RA/ST 比值或高 ST/RA 比值以利于工业生产中的提取分离。近年来,四川开始大面积栽种甜叶菊,本课题组于 2007~2008 年间从四川蒲江、绵阳、遂宁等地收集甜叶菊材料,优选单株,经连续 3 年的栽培观测和分类筛选,逐步选育形成 4 个比较有代表性的甜叶菊品系 SR-1,SR-2,SR-3,SR-5。本文旨在对新选育出的 4 个甜叶菊品系的一些基本农艺性状、茎叶产量及品质指标糖苷含量进行考察比较和相关分析,为不同用途的甜叶菊育种提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

甜叶菊原始材料于 2007—2008 年收集自四川蒲江、绵阳、遂宁等地,经四川农业大学吴卫教授鉴定为菊科甜叶菊属植物甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni),新选育出的 4 个品系于 2010 年 6 月扦插生根后移栽于四川农业大学教学科研农场,每个品系种植 3 个小区,每个小区栽种 20 株,株行距 40cm×20cm,3 次重复。

1.2 方法

1.2.1 农艺性状调查 于 2010 年 8 月中旬甜叶菊开花前期,每份材料分别按小区取样,每小区随机取样 5 株长势中等,具有代表性的植株,考察株高、中部茎节长、一级分枝数、叶长、叶宽、叶干重、茎干重等。叶形的划分参考文献^[1]。

1.2.2 RA 和 ST 糖苷测定 (1)仪器与试剂:Agilent 公司 1100 型高效液相色谱仪(含脱气机、四元梯度泵、自动进样器进样、柱温箱、DA D 检测器)、上海一恒科技有限公司 HWS 28 型电热恒温水浴锅、Thermo BR4i 型冷冻离心机、Sartorius CP225 D 型电子天平、HS6150 D 型超声清洗器、Millipore Mill-Q 型超纯水系统等。RA 苷标准品为日本和光纯药业株式会社制,其纯度≥97.4%;ST 苷标准品为成都曼思特对照品制,其纯度≥95.5%;乙腈为色谱纯;乙醇、Ca(OH)₂、FeSO₄·7H₂O 等为分析纯。

(2)糖苷提取方法:精密称取甜叶菊粉末 1g 于 50mL 离心管中,加入蒸馏水 20mL,盖紧离心管盖,80℃ 下恒温水浴浸提 2h,期间搅拌 2 次。8000r/min 离心 10min,倒出上清液备用,残渣再加 20mL 蒸馏水水浴浸提 2h,期间搅拌 2 次。8000r/min 离心 10min,合并两次提取的上清液,按 5:3 的比例^[7]加入 Ca(OH)₂ 和 FeSO₄·

收稿日期:2010-12-16

基金项目:四川农业大学双支计划(170705)。

作者简介:杨文婷(1986-),女,在读硕士研究生,研究方向:药用植物资源评价与利用。

通讯作者:吴 卫,(0835) 2882108, E-mail: ewuwei@gmail.com

7H₂O,80℃下静置沉淀 2h,再 8000r/min 离心 10min,取上清液定容至 50mL,待测。3 次重复。

(3)标准溶液的配制:分别称取 RA 苷标准品 0.0510g 和 ST 苷标准品 0.0500g 于 50mL 容量瓶中,用 V_{乙醇}:V_水=75:25 定容至刻度,再超声 5min,得 RA 苷和 ST 苷标准溶液。

(4)色谱条件:色谱柱:Phenomenex Luna NH2 柱,4.6mm×250mm;流动相:V_{乙醇}:V_水=75:25;流速:1.2mL/min;柱温:30℃;检测波长:205nm;进样量:10μL。

(5)方法学考察:①精密度试验:分别精密吸取 RA 和 ST 苷标准溶液 10μL,重复进样 5 次,记录结果,考察仪器精密度;②稳定性试验:分别精密吸取 RA 和 ST 苷标准溶液及试验样品 10μL,分别在 6、12、24、48、72 h 进样测定,在同一色谱条件下进样,记录结果,考察仪器精密度;③重现性试验:取同一份甜叶菊材料,按 1.2.2(2)的提取方法分别同时配制 6 份样液精密进样 10μL,在同一色谱条件下进样,记录结果,考察试验方法重现性。

(6)样品测定:样品提取液经 0.45μm 微孔滤膜过滤,取供试品溶液 10μL,进样,测定峰面积,以峰面积和标准曲线计算甜叶菊中 RA 苷和 ST 苷含量。

1.2.3 数据处理 由色谱工作站计算样品中 RA 和 ST 糖苷含量。采用 Excel 软件进行基本数据的统计,采用 DPS v7.05 软件进行数据方差和相关分析。

2 结果与分析

2.1 不同品系主要农艺性状比较

方差分析结果表明,4 个品系间除一级分枝数差异不显著外,株高、节长、叶长、叶宽、叶长宽比、茎叶干重等农艺性状间均存在显著差异。多重比较结果表明,SR-3 和 SR-5 品系植株显著高于 SR-1 和 SR-2 品系,中部节间长度也显著长于 SR-1 和 SR-2 品系。从表 1 中还可以看出,SR-1 品系平均叶长 6.40cm,叶宽 1.66cm,长宽比 3.09,叶形为披针形;SR-2 品系平均叶长 7.67cm,叶宽 1.38cm,长宽比 5.49,SR-2 为 4 个品系中叶片最长、最窄的品系,叶形为柳叶形;SR-3 品系的叶片长宽比为 4 个品系中最小,平均长宽比 2.97,叶形为短椭圆形;SR-5 品系叶片最大,平均叶长 7.27cm,叶宽 2.27cm,平均叶长宽比为 3.21,叶形为大披针形。4 个品系中无论是干叶产量、茎干产量还是茎叶总产量最高的都是 SR-5 品系,其次是 SR-3、SR-1,产量最低的是 SR-2。

表 1 不同品系甜叶菊主要农艺性状 (Duncan 法)

品系	株高 /cm	节长 /cm	一级分枝 数/个	叶长 /cm	叶宽 /cm	长宽比	叶干重 /g	茎干重 /g	茎叶干 重/g
SR-1	42.01 b	2.52 c	20 a	6.40 c	1.66 c	3.90 b	2.99 b	1.67 bc	4.66 b
SR-2	38.71 b	2.43 c	20 a	7.67 a	1.38 d	5.49 a	1.70 c	1.23 c	2.93 c
SR-3	52.25 a	2.94 b	21 a	6.37 c	2.15 b	2.97 d	3.35 b	2.17 b	5.52 b
SR-5	54.00 a	3.41 a	20 a	7.27 b	2.27 a	3.21 c	4.78 a	3.75 a	8.54 a

注:同一列不同字母代表差异显著,P<0.05(下同)。

2.2 不同品系甜叶菊糖苷含量比较

2.2.1 方法学考察结果 (1)精密度试验:分别精密吸取 RA 和 ST 苷标准溶液 10μL,重复进样 5 次,测得 RA 和 ST 苷相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.05 %、1.37 %,表明仪器进样精密度良好。(2)稳定性试验:分别精密吸取 RA 和 ST 苷标准溶液及试验样品 10μL,分别在 6、12、24、48、72 h 进样测定,标准品的相对标准偏差(RSD) 分别为 1.14%、1.36 %;样品的相对标准偏差(RSD)为 2.18%。结果表明标准品及样品在 72 h 内有良好的稳定性。(3)重现性试验:取同一份甜叶菊材料 6 份提取液,精密进样 10μL,测得相对标准偏差(RSD) 均为 2.45 %,表明该方法的重现性较好。

2.2.2 不同品系糖苷含量 4 个甜叶菊品系在糖苷品质上存在明显差异,其 RA 苷、ST 苷、总苷(RA+ST)含量及 RA/ST 比值等差异显著,4 个品系间各指标测定结果见表 2。从表中可以看出,4 个品系的 RA 苷含量从高到低依次为 SR-2>SR-3>SR-1>SR-5,RA 苷含量最高的品系是 SR-2,其 RA 苷含量达 11.59%;其次为 SR-3,含量为 8.70%;RA 苷含量最低的品系是 SR-5,RA 苷含量仅为 2.16%。4 个品系的 ST 苷含量从高到低依次为 SR-5>SR-1>SR-2>SR-3,SR-5 和 SR-1 的 ST 苷含量分别高达 17.39%和 15.26%,ST 苷含量最低的是 SR-3 品系,含量为 6.93%。总苷含量(RA+ST) 从高到低依次为 SR-1>SR-2>SR-5>SR-3,SR-3 品系可能

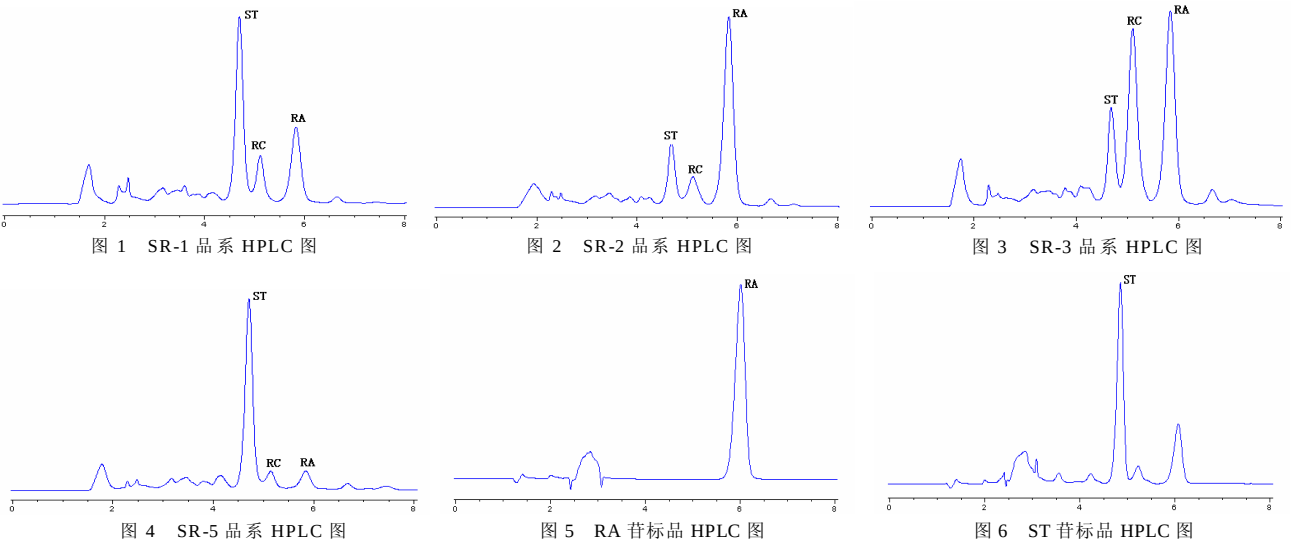
表 2 不同品系甜叶菊糖苷含量 (Duncan 法)

品系	RA 苷/%	ST 苷/%	总苷 RA+ST/%	RA/(RA+ST)	ST/(RA+ST)	RA/ST
SR-1	6.61±0.17 c	15.26±0.26 b	21.87 a	30.22%	69.78%	0.43 b
SR-2	11.59±0.43 a	9.04±0.13 c	20.48 b	55.96%	44.04%	1.27 a
SR-3	8.70±0.12 b	6.93±0.12 d	15.63 d	55.68%	44.32%	1.26 a
SR-5	2.16±0.33 d	17.39±0.40 a	19.55 c	11.06%	88.94%	0.12 c

注:RA 苷、ST 苷、总苷(RA+ST)含量以 RA 苷、ST 苷、总苷(RA+ST)含量占鲜叶重的百分比表示。

是因生成较高的 RC 苷的缘故,总苷含量为 4 个品系中最低。4 个品系中 RA 苷占总苷(RA+ST)比例最高的是 SR-2 品系,其次是 SR-3,分别占 55.96%,55.68%。4 个品系中 ST 苷占总苷(RA+ST)比例最高的是 SR-5 品系,高达 88.94%。RA/ST 值 SR-3 品系与 SR-2 品系接近,但 SR-2 的 RA 糖苷、ST 糖苷含量均显著高于 SR-3。

4 个品系的甜叶菊糖苷测定的 HPLC 色谱图有明显区别,见图 1~4。结合图 1~4 和表 2 中 RA 苷、ST 苷含量及 RA/ST 比值可以看出,SR-1 为高 ST 型甜叶菊品系,SR-2 为高 RA 型品系,SR-3 为高 RC 型品系,SR-5 为高 ST 低 RA 型甜菊品系。



2.3 各性状间的相关性

由表 3 可以看出,产量指标与株高、节长、一级分枝数、叶宽等农艺性状呈正相关关系,其中干叶产量与株高、节长、叶宽相关显著;茎干重与节长、干叶重呈极显著正相关,相关系数分别高达 0.98、0.96。甜叶菊的品质指标 ST 糖苷、总苷及 RA/ST 比值等指标与农艺性状、产量指标间相关程度低或不相关;RA 糖苷含量与产量指标间呈显著负相关,同叶干重、茎干重、茎叶干重间相关系数分别为-0.94,-0.90,-0.93,说明高 RA 苷含量甜菊品系,其产量往往会偏低;ST 苷含量则与各农艺性状间相关均不显著;总苷含量除与一级分枝数间呈显著负相关外,与其他农艺性状间相关均不显著;RA/ST 比值尽管与叶干重、茎干重、茎叶干重间相关系数值较高,分别为-0.73,-0.69,-0.72,但均未达显著水平;此外,RA 苷与 ST 苷间呈较高的负相关关系,相关系数为-0.84,RA 苷与 ST 苷间表现出此消彼长的趋势,但也未达显著水平。由此说明,尽管提高甜菊的产量会一定程度影响甜叶菊的品质,但仍有可能选出既高产,品质又符合生产所需的优良甜叶菊新品种。

表 3 各性状间相关系数												
相关系数	x1	x2	x3	x4	x5	x6	x7	x8	x9	x10	x11	x12
株高 x1												
节长 x2	0.94*											
一级分枝数 x3	0.49	0.17										
叶长 x4	-0.28	0.00	-0.57									
叶宽 x5	0.99**	0.93*	0.46	-0.34								
叶长宽比 x6	-0.89*	-0.74	-0.54	0.66	-0.93*							
叶干重 x7	0.89*	0.94*	0.08	-0.22	0.92*	-0.84						
茎干重 x8	0.86	0.98**	-0.02	0.05	0.87	-0.69	0.96**					
茎叶干重 x9	0.88*	0.97**	0.03	-0.10	0.90*	-0.78	0.99**	0.99**				
RA 苷含量 x10	-0.68	-0.81	0.24	0.13	-0.73	0.67	-0.94*	-0.90*	-0.93*			
ST 苷含量 x11	0.17	0.41	-0.70	0.08	0.24	-0.22	0.61	0.59	0.61	-0.84		
RA+ST 总量 x12	-0.66	-0.42	-0.93*	0.32	-0.61	0.56	-0.24	-0.23	-0.24	-0.10	0.62	
RA/ST x13	-0.33	-0.53	0.56	0.05	-0.40	0.39	-0.73	-0.69	-0.72	0.92*	-0.98**	-0.48

注: **表示在 0.01 水平上显著相关, *表示在 0.05 水平上显著相关。

3 讨论

一般认为 ST 苷和 RA 苷性状连锁,难以同时提高二者含量;同时提高产量和品质也是较为困难的^[1-8]。本试验结果发现 RA 苷与 ST 苷间存在此消彼长的趋势,但未达显著水平。同时,尽管 RA 苷含量与产量指标间呈显著负相关,ST 苷却与各农艺性状间相关均不显著;总苷含量除与一级分枝数间呈显著负相关外,与其他农艺性状间相关也均不显著。据此认为,虽然提高甜菊的产量会一定程度影响甜叶菊的品质,但仍有可能选

出既高产,品质又符合生产所需的优良甜叶菊新品种。舒世珍等^[9]的研究表明,甜叶菊的叶长、叶宽与总苷量有显著正相关关系,本研究结果与其不尽一致。究其原因,可能是材料不同所致。单株干叶产量与株高、中部茎节长及叶片宽度等相关显著,但一些对植株干叶产量可能构成影响的因子,如茎粗、总分枝数、单株叶片数等,本文尚未考察到。另外该试验所测产量比其他文献报道^[9-11]相比偏低,其主要原因为所用材料是今年6月扦插苗,生育期偏短所致。为此,明年我们将进行进一步试验验证。

由于甜叶菊中 RA 苷甜度更高、甜味更佳,目前甜叶菊栽培上的主推品种大多为高 RA 含量的糖用型甜叶菊品种,而近年来的文献表明 ST 苷具有降低 II 型糖尿病血糖浓度和控制高血压的作用^[3-4],并且 ST 苷还具有很好的抗癌活性^[5],有望开发成为新一代天然抗癌制剂,这使得选育高 ST 含量的药用型甜叶菊品种具有一定的前景。过去的甜叶菊糖用品种曾主要是高 ST 型品种,但 ST 苷含量一般在 60%~80%^[9],新选育的 SR-5 品系为高 ST 低 RA 型品系,具有高 ST/RA 值、更高 ST 苷含量(ST>88%)等特点,对于工业生产上 ST 苷的提取极为有利,且 SR-5 品系在 4 个品系中茎叶产量最高,可能是一个较好的生产药用 ST 苷的甜叶菊品系。而对于糖用型甜叶菊品种,要求其含有较高的 RA 苷含量和高 RA/ST 值,SR-2 品系和 SR-3 品系都具有高 RA/ST 值的特性,虽然综合产量因素考虑,SR-3 品系的 RA 苷产量更高,但由于 SR-3 中还有较高的 RC 苷含量,RC 苷甜度低,生产中不希望掺杂此类成分,高 RC 苷含量无疑将繁化工艺程序,增加生产成本;而 SR-2 品系的 RA 苷含量较 SR-3 品系更高,虽然茎叶产量偏低,但通过进一步地从 SR-2 品系中优选长势繁茂的单株及良好的栽培管理等措施,SR-2 品系更可能成为高 RA 苷糖用型甜叶菊育种的良好材料。

4 个甜叶菊品系无论是在植株外观形态、茎叶产量还是糖苷品质上均存在显著差异,说明 4 个品系具有较为稳定的外部形态特征和生理特征,使将这 4 个品系进一步选育成不同品种成为可能。

参考文献:

- [1] 舒世珍,陈睦传,李钦,等. 中国甜叶菊栽培及应用技术 [M]. 北京:农业出版社,1994.
- [2] Antonio S Dacome,Cleuza C da Silva,Cecilia E M da Costa,et al. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(11):3587-3594.
- [3] Midori Takasaki, Takao Konoshima, Mutsuo Kozuka, et al. Cancer preventive agents Part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, 17(2):600-605.
- [4] Hsieh M H, Chan P, Sue Y M, et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension two-year, randomized, placebo-controlled study[J]. Clin. Ther., 2003, 25:2797-2808.
- [5] Gregersen S, Jeppesen P B, Holst J J, et al. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects[J]. Metab.Clin. Exp., 2004, 53:73-76.
- [6] 马琴玉,楼凤昌,李翱. 甜叶菊的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 1992, 19(1):5-9.
- [7] 刘宗林,彭义交,郭洋,等. 甜叶菊苷的提取与结晶工艺研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8):99-100.
- [8] 黄应森,郭爱桂,钱愉,等. 甜菊含甙量的变异及 R-A 型良种的选育[J]. 植物资源与环境学报, 1995, 4(3):28-32.
- [9] 舒世珍. 甜菊优良品种选育研究[J]. 中国农业科学, 1995, 28(2):37-42.
- [10] 孟庆福,孟爱华,王继华,等. 甜菊主要数量性状与干叶产量的通径关系研究[J]. 吉林农业大学学报, 1998, 20(2): 17-19.
- [11] 舒世珍,王万忠. 甜菊数量性状变异及产量的关系[J]. 作物学报, 1988, 14(2):167-173.

Comparison on Main Agronomic Traits and Glucoside Content in Different *Stevia rebaudiana* New Lines

YANG Wen-ting, WU Wei, CAI Qian-rong, XU Ying-wen, WEI Chao
(Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China)

Abstract: To provide theoretical basis for breeding good varieties of *Stevia rebaudiana* with different uses, some main agronomic characters, yield and rebaudioside (RA) and stevioside (ST) contents of 4 different *S. rebaudiana* new lines were studied. Plant height, node length, number of first branches, leaf length, leaf width, length/width ratio, dry leaf weight, dry stem weight and total dry weight were measured. RA and ST contents in leaves were determined by HPLC. Correlation analysis among agronomic characters, yield, RA and ST contents were carried on. The results showed that there were significant differences in basic agronomic characters, dry leaf and stem yield and RA and ST contents of 4 lines. SR-5 line was rich in ST and was the highest yield line. SR-2 line was rich in RA with highest RA/ST ratio. SR-3 line had the highest quantity of RA content when yield and RA content of per plant were considered. There were significantly positive correlations between dry leaf yield with plant height, with node length, with leaf width, and negative correlations between RA content with dry leaf yield ($r=-0.94^*$), with dry stem yield ($r=-0.90^*$), with total dry yield ($r=-0.93^*$). While there were no correlations between ST content and agronomic characters. Improving yield may affect the qualities of *Stevia rebaudiana* in some content, however, it is still impossible to select out good new variety with high-yield as well as good-qualified. SR-5 line might be a good material for officinal *Stevia rebaudiana* breeding, while SR-2 for sweetener-use *Stevia rebaudiana* breeding.

Key words: *Stevia rebaudiana*; stevioside; rebaudioside; lines; agronomic characters; glucoside content