

甜菊良种的单株选育

韩玉林¹, 黄苏珍¹, 张坚勇², 谢明云¹, 汪泓江¹

(1. 江苏省植物研究所, 江苏南京 210014; 2. 江苏省农林厅, 江苏南京 210013)
中国科学院

摘要: 经高效液相色谱分析及部分农艺性状的综合评价, 从 3 个甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 优良品系 (中山一号、YS003 和 YS004) 的自然并辅助人工授粉结实得到的 13 株单株中筛选出 2 株优良单株 SZ99004003 和 SZ99004011, SZ99004003 单株干叶总甙含量为 16.64%, R-A 甙 13.34%, R-A 甙/总甙为 80.17%; SZ99004011 单株干叶总甙含量 19.20%, R-A 甙 12.30%, R-A 甙/总甙为 64.06%。

关键词: 甜菊; 单株选育; 高效液相色谱法

中图分类号: S655.9.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)01-0025-04

Selection of elite individual plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni HAN Yu-lin¹, HUANG Su-zhen¹, ZHANG Jian-yong², XIE Ming-yun¹, WANG Hong-jiang¹ (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Agricultural and Forestry Department of Jiangsu Province, Nanjing 210013, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(1): 25-28

Abstract: Thirteen individual plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni were obtained from the hybrides of 3 elite cultivars (No. 1 of Zhongshan, YS003 and YS004) by the natural and supplemental pollinations. Two elite individual plants SZ99004003 and SZ99004011 were selected by analyzing of HPLC and evaluation of the agronomic traits. The contents of total steviosides and R-A (rebaudioside A), and percentage of R-A in total steviosides in dry leaves of SZ99004003 are 16.64%, 13.34% and 80.17% respectively and these are 19.20%, 12.30% and 64.06% respectively in SZ99004011.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni; individual plant selection; HPLC

甜菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 为原产南美洲的菊科草本植物。从甜菊叶片中提取出来的天然的甜味剂有 8 种成分, 总称甜菊甙或甜菊糖甙 (Steviosides)。甜菊糖甙的甜度和口味取决于其中各组分的含量及比例, 一般来说甜菊糖的甜度和甜味 (口味) 主要由 St (Stevioside) 甙和 R-A (Rebaudioside A) 甙决定, 其原因是总甙中这 2 种成分所占比例很大 (一般在 90% 以上), 且甜度高, St 甙甜度约是蔗糖的 300 倍, R-A 甙甜度约是蔗糖的 450 倍。R-A 甙成分不仅甜度高于 St 甙成分, 而且口味优于 St 甙, 并与蔗糖接近。因此, 一般以 R-A 甙组分在甜菊糖总甙中的含量和比例的高低作为衡量甜菊品种及甜菊糖甙品质的主要指标^[1]。从甜菊糖生产成本考虑, 提高甜菊总甙的含量和总甙中 R-A 甙的比例, 可以达到提高产品质量和产糖量, 减少工艺流程和降低成本目的^[2]。因此, 甜菊良种选育的目标, 一是选育高 R-A 甙/总甙比例的优良品种, 从根本上提高产品质量; 二是选育高总甙含量的品种, 提高产量,

降低成本。

目前, 国内栽培的高总甙含量的品种是江苏省·中国科学院植物研究所于 20 世纪 90 年代初培育的“中山一号”, R-A/总甙比例相对较高的品种是从日本引进的守田系列, 经过多年栽培, 这些品种都出现了不同程度的退化。因此, 不断推出优良甜菊品种, 是甜菊产业持续和稳定发展的重要任务之一。甜菊是自交不育的异花授粉植物, 在遗传学上是异质性很强的杂合体^[1], 实生植株的形态特征和甜味成分含量都有明显的差异, 为通过实生植株的形态、甜菊总甙的含量特别是甜菊糖甙的组成等性状, 筛选甜菊优良单株提供了先决条件。笔者经过几年的筛选, 已获得一些优良的甜菊单株, 并进行了无性繁殖、试种、检测及品质稳定性等研究, 希望为今后国

收稿日期: 2001-03-27

基金项目: 南京科技局农业开发项目资助 (2000-04)

作者简介: 韩玉林 (1957-), 男, 黑龙江青冈人, 硕士, 副研究员, 主要从事园艺和经济植物的资源开发利用研究。

内甜菊良种的选育提供理论依据和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 良种选育

将江苏省·中国科学院植物研究所培育的“中山一号”和甜菊品种 YS003、YS004 的无性系群体(约 50 株)交叉种植在同一地块,每个品种随机选定 10 株,每株各选定一个枝上的 10 朵花,自然加上辅助人工授粉,收取种子,播种并记录出苗率,观测株高、节间距、分枝情况、叶形及叶色等性状特征并详细记录,同时进行了单株间及与亲本之间外部性状的比较筛选,结合甜菊甙含量和组成的分析检测,综合评价筛选优良单株。

1.2 供试样品

供试样品为经过初步筛选的 13 个单株;母本为中山一号的有 SZ99002001;母本为 YS003 的有 SZ99003003、SZ99003008 和 SZ99003013;母本为 YS004 的有 SZ99004001、SZ99004002、SZ99004003、SZ99004005、SZ99004007、SZ99004008、SZ99004009;SZ99004011 和 SZ99004015。

1.3 高效液相色谱分析

1.3.1 仪器与试剂 所用仪器为日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪,配有 SPD-6AV 可变波长紫外检测器、C-R6A 数据处理机;R-A (Rebaudioside A) 和 St (Stevioside) 标准品均为日本和光纯药业株式会社制,其纯度分别为 99.30% 和 98.70%。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:Kromasil NH₂ 4.6mm × 150mm, 10 μm, 大连依利特科学仪器有限公司产品;流动相为 V(乙腈):V(水) = 80:20;流速 1.20 mL/min,柱温 25℃,检测波长 210 nm。

1.3.3 样品提取方法 取 3 个亲本和上述 13 个后代单株,初蕾期摘取单株中部(主茎倒 5 节位叶片)

健康叶片凉干或烘干,取 40 ~ 50 g 用粉碎机粉碎,精确称取 10 g 样品,加水 200 mL 于 60℃ 水浴中提取 1 h,期间经常搅拌。浸提液用 2 号滤纸经布氏漏斗过滤。残渣再加 200 mL 的水重复提取 1 次。将两次提取液合并,供分离杂质精制用。

上述浸提液以 200 mL/h 的速度,通过填充了 100 mL 合成吸附树脂(HP₂₀ 日本三菱公司制)的玻璃柱;用水以 300 mL/h 速度洗净,将柱内水排除,用 90% 的甲醇 500 mL 将吸附在柱上的甜菊甙洗脱,减压浓缩洗脱液,用 80% 甲醇定容至 100 mL 供 HPLC 测定用。

1.3.4 标准溶液配制 取标准品 St 甙 4.420 mg 和 R-A 甙 2.420 mg,用甲醇分别配制成浓度为 0.884 mg/mL 的 St 甙和 0.484 mg/mL 的 R-A 甙标准品溶液。

1.3.5 HPLC 测定 取标准溶液、样品溶液各 10 μL,分别进样,将样品峰面积与标准品峰面积比较,根据保留时间定性,外标后定量。以标准品 St 甙对照样品的 St 甙和 D-A (Dulcoside A) 甙,以标准品 R-A 甙对照样品的 R-A 甙和 C (Dulcoside B) 甙。

2 结果与分析

2.1 亲本结实及种子发芽情况

亲本中山一号、YS003 和 YS004 的优良群体的结实率和发芽率见表 1。

从表 1 可以看出,3 个亲本品种的结实和发芽率明显地表现出 YS004 > YS003 > 中山一号的趋势,中山一号的总甙含量最高达 17.89%,结实率和发芽率却都不高。

2.2 亲本及杂交后代单株的外部性状观测评价

在一个生长周期内,对中山一号、YS003 和 YS004 及其杂交后代实生种苗进行了株高、节间距、

表 1 甜菊亲本单株的结实及种子发芽率

Table 1 The fruit set percentage and situation of seed germination of parent individuals of *Stevia rebaudiana* Bertoni

| 品种 Cultivars | 观察花数 Number of flowers observed | 获得种子数 Number of seeds harvested | 结实率(%) Fruit set percentage | 种子发芽数 Number of germination seed | 发芽率(%) Germination percentage |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|
| 中山一号 No. 1 of Zhongshan | 100 | 12 | 12 | 2 | 16.67 |
| YS003 | 100 | 28 | 28 | 6 | 21.42 |
| YS004 | 100 | 39 | 39 | 19 | 48.72 |
| 合计 Total | 300 | 79 | 26.33 | 27 | 34.18 |

分枝情况、叶形及叶色等5个表型性状的详细观测记录,其中株高和节间距两个指标亲本间和杂交后代间没有明显差别。分枝情况可按照一般、中间型和良好划分,一般:是指以主茎生长为主,若不去顶芽,腋芽几乎不能萌发,整个株形呈圆柱形,若适时去顶,腋芽可良好萌发,中山一号品种属于此种类型;良好:指以主茎生长为主,在自然生长状态下,不去顶芽,腋芽也能生长,若适时去顶,腋芽萌发更好,整个植株呈现宝塔形,YS003和YS004的两个品种属于此种类型,杂种后代除SZ99002001单株外,其余单株都属于此种类型;中间型:是指介于两者之间的类型,只有杂种单株SZ99002001属于此类型。叶形可划分为椭圆形、长椭圆形和柳叶形。椭圆形叶的长/宽小于2.5;长椭圆形叶的长/宽为2.6~3.5;柳叶形为长/宽大于3.6,根据观测可发现,中山一号的叶形为椭圆形;YS003、YS004和大部分杂种后代单株的叶形为柳叶形,只有SZ99002001叶形为长椭圆形。叶色可划分为绿色、深绿色和中间色,中山一号为绿色,YS003、YS004和大部分杂交后代单株为深绿色,两者之间色泽的差别非常明显,而介于两者之间为中间色,只有杂交后代单株SZ99002001的叶色呈中间色。

从上述观察的13株后代实生苗的3个表型性

状看,母本YS003和YS004的实生后代植株,上述3个性状表现与母本完全相同,母本中山一号的实生后代SZ9902001却表现为两个亲本的中间类型,而未完全表现中山一号的性状。

2.3 甜菊亲本及后代单株的甜菊糖甙成分比较

所观察的13个杂种后代单株的上述3个外部性状均没有显示出与中山一号亲本完全相同或相似的性状特征,而有90%以上单株的外部性状与YS004和YS003完全相同或相似。但从高效液相色谱糖甙成分分析的结果(表2)看,其成分比例的变化与亲本(母本)的比例完全不同,每一单株的甜菊糖甙组分都发生明显变化,并在总甙和个别组分出现超亲现象。从单株组分看,St甙成分的变化全部介于亲本之间;C甙表现为6个单株高于亲本中山一号,1个单株低于YS004含量,其余6株介于亲本之间;从R-A甙看有9株的含量高于上述亲本,4株低于亲本;从总甙含量看,除了SZ99004011为19.20%高于可能的亲本中山一号外,另外12株的含量均介于亲本之间。

R-A甙占总甙的比例,是衡量一个品种质量的关键因素之一,从表2的13个单株的R-A成分占总甙的比例看,有9株高于亲本,从这9个单株总糖甙的含量分析看,其中一个单株高于亲本中山一号,其

表2 甜菊杂种后代及亲本单株干叶的糖甙成分

Table 2 Stevioside constituents contents in hybrids progeny and parent individuals of *Stevia rebaudiana* Bertoni

(%)

| 样品 Samples | St 甙 Stevioside | C 甙 Dulcoside B | R-A 甙 Rebaudioside A | D-A 甙 Dulcoside A | 总甙 Total Steviosides | R-A 甙与总甙的比值 R-A/Total Steviosides |
|-------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 中山一号 No. 1 of Zhongshan | 5.68 | 1.56 | 10.36 | 0.29 | 17.89 | 57.91 |
| YS003 | 1.03 | 1.06 | 11.08 | 0.19 | 13.36 | 82.93 |
| YS004 | 0.93 | 0.90 | 11.03 | 0.15 | 13.01 | 84.78 |
| SZ99002001 | 2.92 | 2.17 | 11.88 | 0.04 | 17.01 | 69.84 |
| SZ99003003 | 3.81 | 1.49 | 11.46 | 0.11 | 16.87 | 67.93 |
| SZ99003008 | 2.36 | 2.64 | 12.03 | 0.15 | 17.18 | 70.02 |
| SZ99003013 | 2.54 | 2.07 | 11.39 | 0.14 | 16.14 | 70.57 |
| SZ99004001 | 5.19 | 1.35 | 8.83 | 0.12 | 15.49 | 57.00 |
| SZ99004002 | 4.64 | 1.08 | 9.01 | 0.18 | 14.91 | 60.43 |
| SZ99004003 | 2.34 | 0.87 | 13.34 | 0.09 | 16.64 | 80.17 |
| SZ99004005 | 2.85 | 1.45 | 11.62 | 0.14 | 16.06 | 72.35 |
| SZ99004007 | 3.35 | 2.01 | 9.33 | 0.09 | 14.78 | 63.13 |
| SZ99004008 | 2.42 | 1.03 | 11.80 | 0.19 | 15.44 | 76.42 |
| SZ99004009 | 2.10 | 1.71 | 10.29 | 0.12 | 14.22 | 72.36 |
| SZ99004011 | 5.05 | 1.59 | 12.30 | 0.26 | 19.20 | 64.06 |
| SZ99004015 | 3.03 | 1.32 | 11.92 | 0.15 | 16.42 | 72.59 |
| 平均 Average | 3.27 | 1.59 | 11.17 | 0.14 | 16.18 | 68.99 |

余 8 株均高于另外两个亲本;从 R-A 甙/总甙比看,其中有 2 株值得引起注意,编码为 SZ99004003(参见表 2,图 1-d)单株 R-A 甙/总甙虽然比所有亲本中最佳品种 YS004 的低,为 80.17%,但总甙却比亲本 YS004 提高了 27.90%;编码为 SZ99004011(图 1-e)的

单株,其总甙为 19.20%,R-A 甙/总甙比为 64.06%,这一单株为高总甙类型,其总甙的含量高于可能亲本中山一号(见表 2,图 1-a)7.32%,R-A 甙/总甙高于中山一号 10.62%。

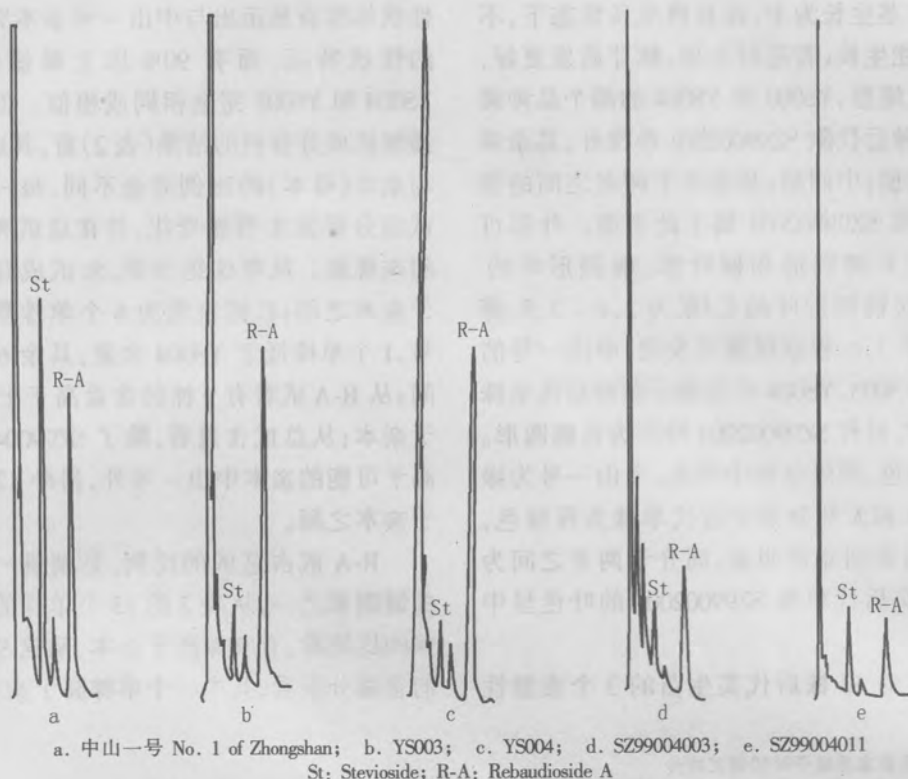


图 1 甜菊亲本及杂交后代单株的干叶糖甙 HPLC 图谱

Fig. 1 The HPLC chromatogram of stevioside constituents in parent and hybrid progeny individuals of *Stevia rebaudiana* Bertoni

3 讨论

3.1 甜菊优良单株筛选与评价

评价甜菊良种最重要的指标是总甙含量和 R-A 甙/总甙比值的高低,当然还要结合干叶产量、抗性性状特征进行综合评价,本研究筛选出的 YS99004003 和 YS99004011 单株已基本确定为优良单株,这 2 个优良单株的增殖可通过组织培养和扦插等无性繁殖^[3,4]增加个体数量,扩大栽培面积,作为新的优良品系进行推广。但其品质及优良性状的稳定性还需进一步观测和评价。

3.2 甜菊的自然杂交与制种

通过多个优良甜菊品种交互栽培种植,自然和配合辅助人工授粉获得杂交后代,其干叶甜菊糖甙

总甙的平均含量较高,本研究的结果总甙可达到 16.18%,R-A 甙/总甙达到了 68.99%。因此认为,通过此种方法可为生产优良甜菊种子提供可行的途径。

参考文献:

- [1] 黄应森,郭爱桂. 甜菊含糖量的变异及 R-A 型良种的选育[J]. 植物资源与环境,1995,4(3):28-32.
- [2] 黄应森,郭爱桂. R-A 型甜菊糖甙的研制[J]. 植物资源与环境,1996,5(4):29-32.
- [3] 黄苏珍,韩玉林,谢明云. 甜菊“中山一号”快速繁殖的研究[J]. 特产研究,1999,(4):48-49.
- [4] 韩玉林,黄苏珍,汪泓江,等. 甜菊扦插繁殖快速成苗的研究[J]. 特产研究,2001,(2):36-37.

(责任编辑:惠红)