

组培甜菊糖苷的变化研究

叶 军, 陈睦传, 沈明山, 洪维廉

(厦门大学生物系细胞生物学研究室, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究了甜菊组培过程中, 甜菊苷 (Stevioside, 缩写为 SS) 和丽鲍迪苷 A (Rebaudioside, 缩写为 RA) 两种主要甜味成份的变化以及不同浓度的 6-氨基腺苷 (6-BAP) 对愈伤组织合成 SS 及 RA 的影响, 并初步探讨了根部在糖苷合成过程中的作用. 结果表明: 甜菊愈伤组织合成糖苷的能力随培养时间的不同而异. 培养 10 d 的愈伤组织可检测到少量残余叶片的 SS 及 RA, 而培养 20 d, 30 d 的愈伤组织则未检出. 培养 40 d 的愈伤组织仅检测到 RA, 表明此时的愈伤组织又恢复了合成糖苷的能力. 推测与叶绿体的再分化有关. 在含有不同浓度 6-BAP 的培养基中培养 2 个月的愈伤组织都能够合成糖苷, 但所合成糖苷的组分不同. 其中, 在含有 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 6-BAP 培养基中的愈伤组织只能积累 RA, 且随浓度的增加, RA 的含量逐渐降低; 而含有 3 mg/L 6-BAP 培养基中的愈伤组织只能合成 SS. 有根苗可合成 SS 及 RA, 而无根腋芽苗只能合成 SS.

关键词: 组织培养; 甜菊糖苷; 6-BAP

中图分类号: Q343.6

文献标识码: A

利用组织培养技术生产甜菊糖苷, 最早见于 Komatsu 等人^[1]的报道, 并获得了专利. Hsing^[2], Striedner^[3]等人也相继证实所培养的甜菊愈伤组织具有合成甜菊糖苷的能力. 但 Handro^[4], Swanson^[5]等却得出了相反的结果, 没有检测到甜菊糖苷的合成. 其中 Swanson 进一步证实, 只有当甜菊愈伤组织诱导出根后, 才能够启动甜菊苷的合成. 不过, 上述学者对甜菊愈伤组织培养过程中 SS RA 两种主要甜味成分的变化都没有做进一步的研究.

细胞分裂素 (Cytokinin, CTK) 是组织培养中不可缺少的植物生长促进物质. 在大多数研究中, 认为细胞分裂素对次生代谢产物的合成没有影响. 不过在某些实验中, 也观察到某种细胞分裂素对次生产物的积累有明显的作^[6-7]. 不同的细胞分裂素对于合成次生产物的作用也不同^[8]. 6-氨基腺苷 (6-BAP) 是人工合成的细胞分裂素之一, 是 6-BA 的衍生物, 在诱导愈伤组织的形成方面具有很好的效果, 但对于不同浓度的 6-BAP 对甜菊糖苷合成的影响的研究还未见报道. 本文针对上述不同的结果及存在的问题, 进一步探讨了甜菊愈伤组织合成糖苷的能力, 研究不同浓度的 6-BAP 对愈伤组织合成 SS, RA 的影响以及培养过程中这两种甜味成

收稿日期: 1999-05-21

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (C97007)

作者简介: 叶军 (1970-), 男, 讲师.

分的变化.通过对有根苗及无根腋芽苗的培养,在植株的水平研究根对糖苷合成的影响.

1 实验方法

1.1 有根苗、无根腋芽苗及甜菊愈伤组织的培养

无茵苗培养 甜菊种子经 75%的乙醇,0.1%的升汞杀菌后,用无菌水冲洗 5次在无菌条件下接种于 MS固体培养基上,定期更换培养基.

甜菊愈伤组织的培养 取幼苗叶片,切成 0.25 cm²大小,分别接种于 MS培养基+ 2 mg/L NAA+ 0.5 mg/L 1 mg/L 2 mg/L 3 mg/L 6-BAP的培养基中,一个月后更换新的培养基,进行继代培养,获得愈伤组织.

有根苗、无根腋芽苗的培养 待幼苗生长两个月后,将带有腋芽的侧枝剪下,分别接种于生芽培养基(MS培养基+ 0.2 mg/L 6-BAP+ 0.1 mg/L NAA)和生根培养基(MS培养基+ 0.2 mg/L NAA)上.

1.2 甜菊糖苷的提取与检测

培养于 MS+ 2 mg/L NAA+ 0.5 mg/L 6-BAP培养基中的愈伤组织,分别收集培养 10 20 30 40 60 d的组织块.培养于 MS+ 2 mg/L NAA+ 1 mg/L 2 mg/L 3 mg/L 6-BAP培养基中的愈伤组织,培养至 60 d分别收集,烘干研磨后,取一定量粉末用滤纸包好,置于索氏提取器中.先用三氯甲烷提取 3 h脱脂.弃去提取液,残渣再用甲醇 50 mL提取 5 h.甲醇提取液最后浓缩定容至 20 mL.

分别采集无根腋芽苗和有根苗的叶片,烘干后研磨得一定量粉末用滤纸包好,按上述方法提取甜菊糖苷.

1.3 高效液相色谱法(HPLC)检测甜菊糖苷

标准液 10 mg甜菊苷纯品溶于 10 mL CH₃OH: H₂O(62: 38),使用时稀释 10倍.样品液 吸取 5 mL甜菊苷甲醇提取液,15 000 r/min离心 20 min,取上清液直接上样.色谱条件 流动相 CH₃OH: H₂O(62: 38);流速 1 mg/min,检测波长 210 nm,进样量 20 μL.

2 实验结果

2.1 培养时间对甜菊愈伤组织糖苷含量及组分的影响

分别收集在 MS+ 2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BAP培养了 10 20 30 40 d的愈伤组织块进行糖苷含量的测定. HPLC检测的结果(如图 1)表明:培养 10 d的愈伤组织含有少量叶片残留的 SS及 RA.培养 20 30 d,没有检测到 SS及 RA.培养 40 d时,RA重新出现,但检测不到 SS.以峰面积表示 SS及 RA的相对含量,标样单位峰面积所含 SS及 RA的量为基准,计算不同时期愈伤组织中 SS及 RA的量,结果见表 1.

表 1 培养不同时间后 SS及 RA的含量

Tab. 1 The contents of SS, RA with different culturing time

培养时间 /d	糖苷含量 μgmg ⁻¹ .愈伤组织干重	
	SS	RA
0	3.72	3.37
10	0.2	0.16
20	0	0
30	0	0
40	0	0.32

2.2 不同浓度的 6-BAP对愈伤组织糖苷含量及组分的影响

在含有 0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L 6-BAP 的培养基中经 2 个月培养的愈伤组织只能积累 RA, 并且随浓度的增加逐渐降低. 而培养在含有 3 mg/L 6-BAP 培养基中的愈伤组织只有 SS 的合成 (图 2). 可见, 培养在含有不同浓度 6-BAP 的培养基中的愈伤组织, 都具有合成糖苷的能力. 但合成的糖苷组分却不相同 (表 2).

表 2 不同浓度的 6-BAP对糖苷含量的影响
Tab. 2 The contents of SS, RA in callus with different 6-BAP concentrations

不同浓度的 6-BAP/mg. L ⁻¹	糖苷含量 μg mg ⁻¹ . 愈伤组织干重	
	SS	RA
0.5	0	0.71
1	0	0.6
2	0	0.46
3	0.009	0

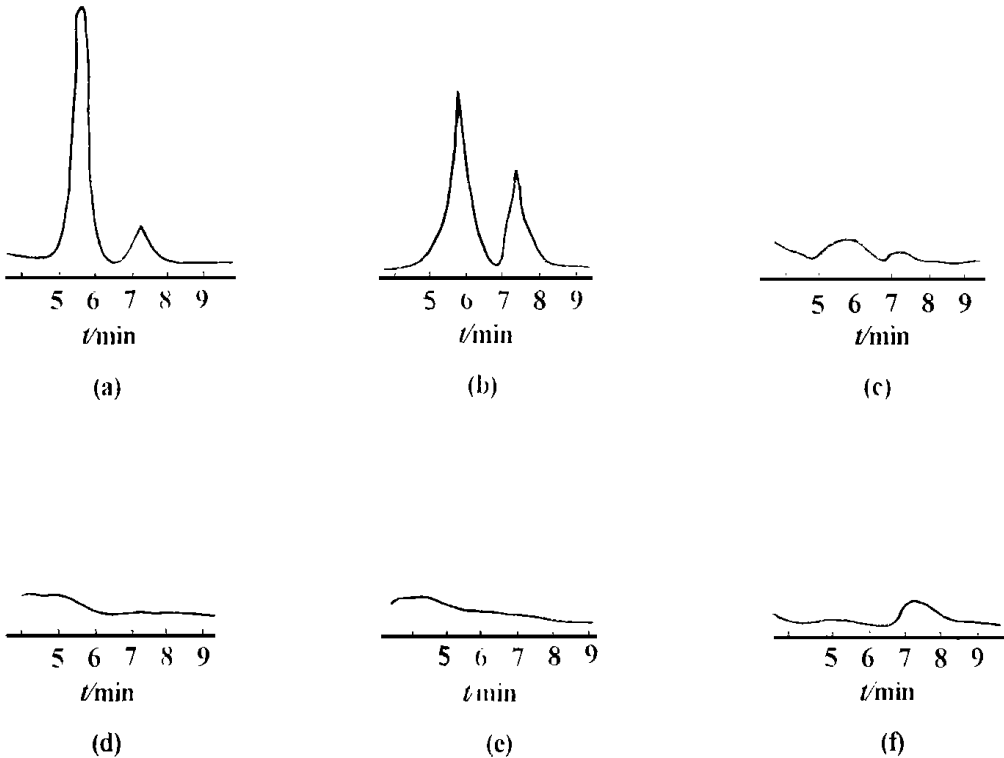


图 1 标准样及糖苷提取液 HPLC峰图

(a): 甜菊糖苷标准样; (b): 接种前甜菊糖叶片糖苷; (c): 培养 10 d;
(d): 培养 20 d; (e): 培养 30 d; (f): 培养 40 d

Fig. 1 HPLC diagrams of steviol-glycoside standard and crude extracts from stevia

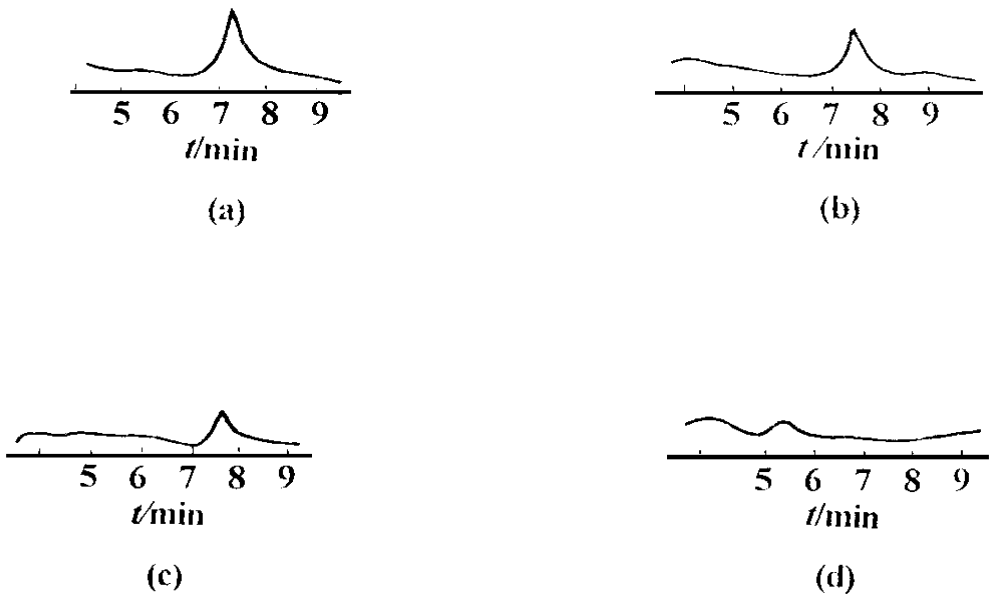


图 2 不同浓度 6-BAP 的愈伤组织 HPLC 峰图

(a): 含 0.5 mg/l 6-BAP, (b): 含 1 mg/l 6-BAP, (c): 含 2 mg/l 6-BAP,
 (d): 含 3 mg/l 6-BAP

Fig. 2 HPLC diagrams of SS, RA in callus with different 6-BAP concentrations

2.3 有根苗与无根腋芽苗糖苷含量与组分的比较

用 HPLC 检测两种苗叶片中糖苷的成分及含量. 结果表明: 无根腋芽苗仍具有合成 SS 的能力, 且其含量高于有根苗, 但不能合成 RA. 而有根苗除合成 SS 外, 还合成 RA (图 3). 无根腋芽苗经继代培养后, 仍具有甜味, 虽然其甜度远远低于有根苗. 这说明根对合成糖苷的影响主要是促进 RA 的形成.

3 讨论

甜菊苷 (SS) 的非糖配基 甜菊醇是由贝壳杉烯途径产生^[9], 而甜菊醇是在质体中合成, 并且贝壳杉烯合成酶活性依赖与质体内膜系统的发育^[10], 因此甜菊愈伤组织合成糖苷的能力与叶绿体的分化程度密切相关^[11]. 本实验中愈伤组织培养 20 d 到 30 d 时均未检测到糖苷的合成, 这与此时叶绿体分化程度低有关. 叶绿体分化程度低, 片层结构不发达可能导致贝壳杉烯合成酶活性降低, 从而使甜菊醇的合成受阻, 进而不能合成 SS 及 RA. 培养 30 到 40 d 时, 叶绿体开始分化, 至 60 d 仍保持较高的分化程度, 这一期间检测到 RA 的合成, 说明此时的愈伤组织又恢复了糖苷的合成能力, 甜菊醇的合成途径未受到阻抑, 但合成的糖苷只能积累 RA 而不能积累 SS, 这可能是由于此时的培养条件 (0.5 mg/L 6-BAP) 激活糖基转移酶 II 造成的^[12].

Handro, Swanson 等人的实验结果可能是培养基的组分, 特别是生长素和细胞分裂素的种类及浓度比例造成叶绿体分化程度的差异所致, 从而阻抑糖苷合成.



图 3 根对糖苷合成的影响

(a): 有根苗 HPLC 原始峰图, (b): 无根腋芽苗 HPLC 原始峰图

Fig. 3 The effects of roots on the steviol-glycoside biosynthesis

不同浓度的 6-BAP 对 SS 及 RA 合成的影响主要表现在两个方面: 一是通过影响叶绿体片层结构的分化程度而导致合成 SS 的量的差异. 随着 6-BAP 浓度从 0.5 mg/L, 1 mg/L 到 2 mg/L 的逐渐增加, 合成 SS 的量逐渐降低. 另一方面是通过影响催化 SS 转化为 RA 的糖基转移酶 II 的活性, 而导致 RA 合成量的差异, 其中 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 的 6-BAP 激活糖基转移酶的活性, 使合成的 SS 迅速转变为 RA, 而 3 mg/L 6-BAP 则抑制糖基转移酶 II 的活性, 使合成的 SS 不能进一步转变为 RA.

无根腋芽苗仍具有合成 SS 的能力, 但不能合成 RA. Shibata^[12] 从大田苗叶片中提取的粗酶提取液可催化 SS 及 RA 的合成, 而本研究中从无根腋芽苗中没有检测到 RA, 这说明无根腋芽苗中由 SS 到 RA 的反应受到阻抑. 而有根苗在合成 SS 的同时, 一部分 SS 又进一步转化为 RA, 从而使 SS 的量相对低于无根苗. 舒世珍^[13] 曾报道 SS 含量与 RA 含量呈负相关. 推测, 根对糖苷合成的影响可能是合成一些因子来引发 RA 的合成. 这些因子作为糖基转移酶的激活剂起作用. 至于这些因子的性质, 还有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] Komatsu K, Nozaki W, Takemura M, et al. Production of natural sweetener[J]. Chem Abstr. 1976, 84: 163-174.
- [2] Hsing Y I, Su W F, Chang W C, et al. Accumulation of stevioside and rebaudioside A in callus culture of *Stevia rebaudiana*[J]. Bot Bull Acad Sin, 1983, 24: 115-119.
- [3] Striedner J, Gutjahr E, Czygan F C, et al. Contributions to the Biotechnological Production of Sweeteners from *Stevia Rebaudiana* Bertoni. 2. Induction of Stevioside Accumulation in Cell Cultures by Variation of the Nutrient Medium and the Analysis of Small Amounts of Stevioside[J]. Anta Biotechnological 1991, 11(5): 501-504.
- [4] Walter Handro, Kurt G. Hell, Gilberto B Kerbaury, et al. Tissue culture of *Stevia rebaudiana*, a sweetening plant [J]. Planta Med 1977, 32: 115-117.
- [5] Steven M Swason, Gail B Mahady, Christopher W W Beecher. Stevioside biosynthesis by callus, root,

- shoot and rooted-shoot culture in vitro [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1992, 28: 151– 157.
- [6] Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. Formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15: 568– 569.
- [7] Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. Effector of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of Ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture [J]. *Agricultural and Biological chemistry*, 1977, 11: 97– 102.
- [8] Robins Richard J, Abryan Hanley. Uncharacteristic alkaloid synthesis by suspension cultures of *Cinchona pubescens* fed with L-tryptophan [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1987, 9: 49– 59.
- [9] Bennett R. Biosynthesis of steviol from (–)-kaurene [J]. *Phytochemistry*, 1967, 6: 1107– 1110.
- [10] Morre T C, Gomez Navarrete G. Effects of Protein synthesis inhibitors on ent-kaurene biosynthesis during Photomorphogenesis of etiolated pea seedling [J]. *Plant Physiol*. 1978, 61: 889– 892.
- [11] 欧阳学智. 甜菊叶愈伤组织诱导过程中叶绿体的超微结构变化 [J]. *武汉植物学研究*, 1993, 11(1): 61– 66.
- [12] Hitoshi Shibata, Satoru Sonoke, Hideo Ochiai, et al. Glucosylation of Steviol and Steviol-Glucosides in Extracts from *stevia Rebaudiana* Bertoni [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 152– 156.
- [13] 舒世珍. 甜菊优良品种选种研究. *中国农业科学*, 1995, 28(2): 37– 42.

The Study of Stevia-glycoside Change in Stevia Tissue Culture

YE Jun, CHEN Mu-chuan, SHEN Ming-shan, HONG Wei-lian

(Dept. of Biol. Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract The changes of two main sweet content, Stevioside (SS) and Rebaudioside (RA), the effects of 6-benzylaminopurine riboside (6-BAP) on the two sweet content in callus of *stevia rebaudiana*, as well as the role of root in the process of stevioside biosynthesis have been studied. the result showed that the ability for stevioside biosynthesis of callus altered with the lapse of cultural time; when cultured 10 days, Trace SS and RA were tested on callus. 20–30 days later, neither SS nor RA were tested, which indicated the callus had no ability for stevioside biosynthesis. But 40 days later, only RA was synthesized. It seems that the stevioside biosynthesis is related to re-differentiation of chloroplast. when cultured 60 days later, all the callus with different concentration 6-BAP do have ability to synthesize SS or RA. The callus in culture with 0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L 6-BAP can only synthesize RA, while the callus with 3mg/L 6-BAP only synthesize SS. The rooted seedling demonstrated the ability to synthesize both SS and RA, Shooted seedling only to synthesize SS.

Key words tissue culture; stevia-glycoside; 6-BAP