

甜菊糖苷积累与其生物合成基因表达的关系

朱静雯, 郭书巧, 束红梅, 巩元勇, 蒋璐, 倪万潮

(江苏省农业科学院经济作物研究所, 南京 210095)

摘要:为探究甜叶菊叶片中甜菊糖苷积累与其合成途径上关键基因表达的关系,本研究分别检测了鑫丰3号苗期不同冠层和3个不同品种甜叶菊(守田3号、江甜3号、谱星1号)收获期混合叶片样品中多种糖苷的含量,同时定量检测对应样品中甜菊糖苷合成关键基因的表达水平。结果显示,总糖苷在鑫丰3号顶叶中最高,底叶中最低,而多数检测基因(6/8)表达水平也在顶叶最高底叶中最低;单一糖苷甜菊苷在顶叶中积累最高,而其催化酶编码基因 *SrUGT74G1* 表达也在顶叶中最高;莱鲍迪苷 A 则在底叶中积累最多,其催化酶编码基因 *SrUGT76G1* 表达水平也在底叶中表达最高。3个品种相比,总糖苷和莱鲍迪苷 A 的积累在江甜3号中最高,谱星1号中最低;甜菊苷的积累在守田3号中最高,江甜3号中最低,但基因表达水平与糖苷积累趋势一致的类似结果并未在不同品种间出现。由此可知,甜菊糖苷合成基因的表达水平可以影响总糖苷的积累,且在同一甜叶菊品种中单一糖苷合成调控基因的表达水平可以反映其调控的单糖苷的积累量。

关键词:甜叶菊;品种;冠层;甜菊糖苷;基因表达

The Relationship between Steviol Glycosides Accumulation and Biosynthesis Genes Expression

ZHU Jing-wen, GUO Shu-qiao, SHU Hong-mei, GONG Yuan-yong,

JIANG Lu, NI Wan-chao

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Province Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210095)

Abstract: In order to explore the relationship between the accumulation of steviol glycosides (SGs) and expression of SGs biosynthesis pathway genes, SGs content and composition in stevia leaves of different canopies of one variety (Xinfeng 3) and three varieties (Shoutian 3, Jiangtian3, Puxing 1) were analyzed and the related genes expression were tested by real-time PCR. The results showed that the accumulation of total SGs was highest in the top leaves and lowest in the bottom leaves of Xinfeng 3. Among the eight tested genes, six of them had the highest expression in the top leaves and had the lowest in the bottom leaves. The stevioside accumulation was highest in top leaves and the expression of its catalytic enzyme encoding gene *SrUGT74G1* was also highest in top leaves. And rebaudioside A (RA) content was the highest in bottom leaves and the expression of its catalytic enzyme encoding gene *SrUGT76G1* was highest in the bottom leaves. Among three varieties, the accumulation of total SGs and rebaudioside A (RA) was highest in Jiangtian 3 and lowest in Puxing 1, while the stevioside accumulation was highest in Shoutian 3 and lowest in Jiangtian 3. However expression of related genes did not show the same trend to SGs accumulation in three stevia varieties. So it was deduced that expression level of SGs biosynthesis pathway genes affected the SGs accumulation significantly, and in the same variety, the expression level of catalytic enzyme encoding gene could reflect the accumulation of corresponding steviol glycoside.

Key words: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni; variety; canopy; steviol glycosides; gene expression

收稿日期: 2016-11-08 修回日期: 2017-01-03 网络出版日期: 2017-06-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170613.0843.014.html>

基金项目: 江苏省农业三新工程(SXGC[2015]213); 江苏省农业科学院科技服务项目(KF(16)1042)

第一作者研究方向为植物次生代谢物。E-mail: jingwenstudy@126.com

通信作者: 倪万潮, 研究方向为植物次生代谢物。E-mail: nwchao@aliyun2002.com

甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) 是一种发源于巴拉圭地区的多年生菊科灌木^[1-2], 其绿色组织中可以合成并积累多种高甜度低热量的甜味剂——甜菊糖苷^[3-4]。自 2008 年美国 FDA 和 2011 年欧盟陆续宣布和批准甜菊糖苷可作为食品添加剂安全使用后, 甜菊糖苷被广泛应用在医药和食品饮料等行业中, 世界各国对甜叶菊的需求量也飞速增长^[5]。我国甜叶菊的种植开始于 19 世纪 70 年代, 南京中山植物园从日本引入, 目前中国是甜叶菊出口量最大的国家, 占据总出口量的 80%^[6-7]。甜叶菊原材料的大量出口有效地促进了我国甜叶菊种植业的蓬勃发展, 同时甜菊糖苷的合成、积累及相关的调控基因逐渐成为农学和生物研究的热点。

甜菊糖苷是一类四环二萜类物质的混合物, 其生物合成过程与赤霉素的生物合成途径共享多步酶促反应^[1,8]。共享酶促反应过程获得两者的共同催化底物-贝壳杉烯酸, 首先异戊烯焦磷酸 (IPP, isopentenyl pyrophosphate) 与甲基赤藓糖醇途径 (MEP, the methylerythritol 4-phosphate) 合成的二甲烯丙基焦磷酸 (DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate) 在牻牛儿苗牻牛儿苗焦磷酸合酶 (GGPPS, geranylgeranyl disphosphatase) 作用下进行连续 3 次缩合反应生成 GGPP, GGPP 再经古巴焦磷酸合酶 (CDPS, ent-copalyl disphosphatase) 催化生成环化焦磷酸, 环化焦磷酸在贝壳杉烯合酶 (KS, kaurene synthase) 催化下生成内根-贝壳杉烯, 最终经贝壳杉烯酸合酶 (KO, kaurene oxidase) 催化生成内根-贝壳杉烯酸^[9-10]。贝壳杉烯酸后的五步酶促反应则是甜菊糖苷生物合成所特有, 其中关键节点酶促反应由不同的内根-贝壳杉烯酸脱氢酶 (KAH, kaurene acid hydroxylase) 控制, 在 13 位碳位置脱氢则生成不同甜菊糖苷的基本骨架甜菊醇, 若在 7 位碳位置脱氢则合成赤霉素^[11-12]。甜菊醇经过一系列糖基转移酶 UGT85C2^[13]、UGT91D^[14] 和 UGT74G1^[13] 的催化后生成甜菊苷, 甜菊苷通过 UGT76G1 的催化添加一个糖基生成莱鲍迪苷 A^[14]。甜菊醇在多种糖基转移酶催化下还可以合成多种痕量存在的甜菊糖苷如甜茶苷、甜菊双糖苷等。目前已报道甜菊糖苷共有 30 多种, 其中叶片中含量相对较高、口感较好的甜菊苷和莱鲍迪苷 A 受到更多研究者的关注。甜菊糖苷主要在甜叶菊的绿色组织中积累, 叶片中含量要远高于茎秆, 根系中仅存在微量的甜菊糖苷。甜菊糖苷的积累是个动态的、复杂的过程, 受多种外界因素的影响, 比如生长环境的光照、温度和水分供应等^[15-16]。除了这些外在的易控

制的因素, 甜菊糖苷含量在不同甜叶菊品种 (基因型)、不同生长时期及不同冠层叶片中也存在着显著的差异^[17-18]。目前研究已明确甜菊糖苷在甜叶菊叶片中的积累在花芽形成和开花前达到最高^[19]; 开花后植株不同冠层叶片中糖苷含量存在差异^[20]; 不同品种的甜叶菊叶片中其总量和组成差异显著且会随着植株生长时期和生长条件的改变而改变^[21]。

目前甜菊糖苷积累的研究主要是在生理层面探究如何在单位干物质内积累更多的甜菊糖苷, 但积累差异出现的分子机理研究鲜有报道。已有报道中关于甜菊糖苷生物合成积累调控的分子机制主要围绕参与催化反应的酶的编码基因。目前成功克隆并验证其催化功能的基因有与赤霉素共享途径的 *SrGGPPS*、*SrCDPS*、*SrKS* 和 *SrKO*^[22-23], 甜菊糖苷合成特有基因 *SrKA13H*、*SrUGT85C2*、*SrUGT74G1* 和 *SrUGT76G1*; 其中编码催化甜菊苷和莱鲍迪苷 A 生物合成酶的 *SrUGT74G1* 和 *SrUGT76G1* 研究较多^[22,24-26]。虽然已有研究报道发现甜菊糖苷在品种及冠层叶片中积累存在差异, 但详尽系统的实验数据并未提供, 且积累差异的基因调控更鲜见报道^[27-28]。因此本研究对苗期鑫丰 3 号不同冠层和收获期 3 个不同甜叶菊品种 (守田 3 号、江甜 3 号、谱星 1 号) 叶片中的甜菊糖苷积累水平进行检测, 并检测对应样品中甜菊糖苷生物合成途径上相关基因的表达水平, 试图寻找甜菊糖苷的积累与相关基因表达规律, 为后续甜菊糖苷积累和分子调控机制的研究提供一些参考, 为甜叶菊优质种质资源的分子水平筛选提供候选基因。

1 材料与方法

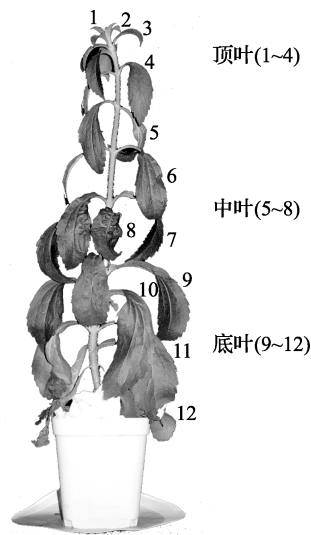
1.1 材料

鑫丰 3 号种子于江苏中大种业公司购置, 守田 3 号、江甜 3 号和谱星 1 号甜叶菊幼苗为本实验室留存植株扦插扩繁获得。

1.2 方法

1.2.1 甜叶菊的培养 不同冠层叶片比较实验采用鑫丰 3 号甜叶菊种子, 先用 30% 次氯酸钠消毒 30 min, 再清水洗 4~5 遍后, 播种于 121 ℃ 灭菌的蛭石与有机质 (1:1 比例混合均匀) 混合基质营养钵中, 光照培养箱发芽培养 (光照/黑暗: 16 h/8 h, 温度为 28 ℃) 1 周左右单株移植新盆钵。单株培养植株共 12 对叶片时, 按照从上到下每 4 对叶片分组为顶叶、中叶和底叶 (图 1), 分别进行基因表达检测和

糖苷测定。不同甜叶菊品种比较实验选择株高约为 6~8 cm、4~6 对叶片长势一致的守田 3 号、江甜 3 号和谱星 1 号的扦插苗种植于江苏省农科院实验基地,在始花期采集其叶片混合样品提取 RNA 检测基因表达,叶片烘干后进行甜菊糖苷测定。



1~12 分别代表甜叶菊完全展开的 12 对叶片;顶叶(1~4)代表第 1 对到第 4 对叶片混合后为样品顶叶;中叶(5~8)代表第 5 对叶片到第 8 对叶片混合后为样品中叶;底叶(9~12)代表第 9 对叶片到第 12 对叶片混合后为样品底叶

1-12 respectively represent twelve pairs of fully spread leaves,the top leave(1-4)represent the mixture sample from the first to fourth pairs of leaves from the plant top,the middle leaves(5-8)represent the mixture sample from the fifth to eighth leaves from the plant top,the down leave(9-12)represent the mixture sample from the ninth to twelfth leaves

图 1 样品采集示意图

Fig. 1 Sketch of sample collection

1.2.2 甜菊糖苷的提取和测定 将烘干的甜叶菊叶片用粉样机粉碎后过筛,除去粗纤维得到甜菊粉

末。称取 0.5g 甜菊粉末置于 50 mL 离心管中,加入 25 mL 80% 乙醇摇匀后 80 ℃ 水浴超声处理 30 min,然后补齐到 25 mL 过滤至新离心管中保存。过滤后的残渣中加入 25 mL 80% 乙醇重复上述操作,最后将粗提取样品定容到 50 mL。取 2 mL 甜菊糖苷粗体液放置于 50 ℃ 恒温箱内,待溶剂完全挥干后加入 1 mL 超纯水,50 ℃ 重新溶解。待充分溶解后加入 1 mL 异戊醇,上下颠倒混匀后静置萃取(或 4000 r/min 离心)后吸上清,过 0.22 μm 有机相滤膜备用。测定仪器采用安捷伦 1200 高效液相色谱仪,色谱柱选择安捷伦公司的氨基柱(250 mm×4.6 mm,粒径 5 μm),流动相为乙腈-水(比例为 75:25),流速为 1 mL/min,进样量为 20 μL,柱温为 30 ℃,紫外检测器,检测光波长为 210 nm。

1.2.3 甜叶菊叶片 RNA 的提取及 cDNA 的获得 将采集的新鲜甜叶菊叶片样品放入液氮中冷冻后用灭菌的研钵研磨成粉,用 OMEGA 公司针对多糖多酚的植物样 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。mRNA 反转录获得 cDNA 严格按照 TAKARA 公司定量 PCR 反转录试剂盒的操作步骤进行。

1.2.4 定量 PCR 引物设计验证及基因表达检测 使用 ABI 公司定量 PCR 仪器配套的定量引物设计软件 ABI Primer Express 为甜菊糖苷生物合成途径上特有的 *SrKAI3H*、*SrUGT85C2*、*SrUGT74G1* 及 *SrUGT76G1* 4 个基因均设计 2 对引物,经过 PCR 获得基因的定量片段,酶连到克隆载体 pMD-19-T,共转化入大肠杆菌感受态,至少选 3 个单克隆分别摇菌测序,DNAMAN 比对后选择完全正确的引物和部分已报道的引物(表 1)用于定量检测基因的表达^[26],基因的相对定量表达检测采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪检测。

表 1 定量检测基因表达使用引物序列

Table 1 Primer sequences for transcription analysis by real-time PCR in the present work

基因 Gene	参与编码的酶 Encoded enzyme	引物序列 Primer sequences	来源 References
26 S rRNA	内参基因	F:TCGAAGGATCAAAAAGCAACGT R:ACCACAGGATAACTGGCTTGT	[26]
<i>SrGGPPS</i>	牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶	F:CGGAAAAACACCAATCAAACCCA R:AGGCGTCCAGAGCTTCATTC	[26]
<i>SrCDPS</i>	焦磷酸合酶	F:TTGTGTCCAAATGGTCCTTCAC R:CGGAAAAACACCAATCAAACCCA	[26]
<i>SrKS</i>	贝壳杉烯合酶	F:ACCAAAGAACGGATCCAAAAACT R:ACTCAGGGAAACAAGCGCAT	[26]

表 1(续)

基因 Gene	参与编码的酶 Encoded enzyme	引物序列 Primer sequences	来源 References
<i>SrKO</i>	贝壳杉烯氧化酶	F:AGCTATGAGACAAGCATTGGGA R:CACCCATCATCGGGTCAACA	[26]
<i>SrKA13H</i>	内根-贝壳杉烯酸脱氢酶	F:ACCCATCGCGGTTTGAAG R:CCCCTCCAAATGGAACATATGT	本实验室新设计引物
<i>SrUGT85C2</i>	糖基转移酶-85C2	F:GACTCCAGATAACCTTCGTCAACA R:GGCCCGATGATTCAAGAAAC	本实验室新设计引物
<i>SrUGT74G1</i>	糖基转移酶-74G1	F:AGTCTTGGAGTCCCCGTTGTT R:TAGAAGCTTGGCATTCTAGTTTGA	本实验室新设计引物
<i>SrUGT76G1</i>	糖基转移酶-76G1	F:CCTCGACAACGACCCACAA R:GCGGACCATGAGTCGGTAGA	本实验室新设计引物

2 结果与分析

2.1 甜菊糖苷在甜叶菊叶片中的积累

2.1.1 甜菊糖苷在鑫丰 3 号不同冠层甜叶菊叶片中的积累 分别采集苗期甜叶菊上部、中部和底部的叶片进行甜菊糖苷的测定,结果表明越接近植株顶部的、更具生长活性的叶片中的总糖苷含量越高(7.73%),中部叶片中总糖苷含量约为 5.16%,接近底部叶片中总糖苷含量最低约为 4.99%;甜菊苷和莱鲍迪苷 A 的含量变化趋势与总糖苷含量一致(表 2)。不同冠层叶片中莱鲍迪苷 A 含量均高于甜菊苷,越靠近顶端的叶片中莱鲍迪苷 A 和甜菊苷的含量越接近(顶叶 RA/SS 为 1.01),底叶中莱鲍迪苷 A 与甜菊苷的含量的比值最高约为 1.25。其他糖苷含量在越接近底部的叶片中含量越高,顶叶、中叶和底叶中其他糖苷的含量分别为 26.26%、36.05% 和 40.08%(表 2)。

2.1.2 甜菊糖苷在不同品种甜叶菊叶片中的积累

甜菊糖苷含量和种类是衡量和选育甜叶菊优良品种的关键依据,本试验选择了源于日本的守田 3 号、江苏培育品种江甜 3 号和江西培育品种谱星 1 号为代表材料,研究了甜菊糖苷在不同品种甜叶菊叶片中的积累差异。结果表明江甜 3 号总糖苷和莱鲍迪苷 A 含量均高于其他 2 个品种,分别为 10.17% 和 5.47%;守田 3 号居中,总糖苷含量达到 9.82%,但莱鲍迪苷 A 含量较低,仅有 2.80%;谱星 1 号总糖苷含量和莱鲍迪苷 A 含量均最低,含量分别为 8.44% 和 2.68%。虽然谱星 1 号的

总糖苷和莱鲍迪苷 A 含量在 3 个品种中均最低,但莱鲍迪苷 A 占总糖苷比率(31.75%)要高于守田 3 号(28.51%),江甜 3 号中莱鲍迪苷 A 占总糖苷比率最高约为 53.79%,除去甜菊苷和莱鲍迪苷 A 最主要的 2 种甜菊糖苷外,其他甜菊糖苷的含量江甜 3 号中最低仅为 5.80%,守田 3 号和谱星 1 号中含量接近,分别为 11.51% 和 10.55%(表 3)。

表 2 鑫丰 3 号不同冠层甜叶菊叶片中甜菊糖苷含量

Table 2 Steviol glycosides content and composition in Xinfeng 3 stevia leaves of different canopies

糖苷含量 SGs content	顶叶 Top leaves	中叶 Middle leaves	底叶 Down leaves
总糖苷(%)SGs	7.73 ± 0.316a	5.16 ± 0.112b	4.99 ± 0.038c
甜菊苷(%)SS	2.83 ± 0.053a	1.59 ± 0.048b	1.33 ± 0.018c
莱鲍迪苷 A(%)RA	2.87 ± 0.197a	1.71 ± 0.039b	1.66 ± 0.011c
其他糖苷(%) Other SGs	26.26 ± 1.011c	36.05 ± 1.376b	40.08 ± 1.928a
RA/SS	1.01 ± 0.010c	1.08 ± 0.009b	1.25 ± 0.012a

同一行不同小写字母表示平均值在 0.05 水平上差异显著,下同
SGs : Steviol glycosides, SS : Steviosides, RA : Rebaudioside A, Values followed by different letters in a row are significant among canopies at the 0.05 level, the same as below

表 3 不同品种甜叶菊叶片中甜菊糖苷的含量
Table 3 Steviol glycosides content and composition in stevia leaves of different varieties

糖苷含量	守田 3 号	江甜 3 号	谱星 1 号
SGs content	Shoutian 3	Jiangtian 3	Puxing 1
总糖苷 (%) SGs	9.82 ± 0.236a	10.17 ± 0.451a	8.44 ± 0.438c
甜菊苷 (%) SS	5.89 ± 0.017a	4.11 ± 0.040c	4.87 ± 0.102b
莱鲍迪苷 A (%) RA	2.80 ± 0.009b	5.47 ± 0.067a	2.68 ± 0.060b
其他糖苷 (%)	11.51 ± 1.934a	5.80 ± 1.218b	10.55 ± 1.067a
Other SGs	28.51 ± 1.769b	53.79 ± 2.298a	31.75 ± 2.079b
RA/SGs			

2.2 甜叶菊叶片中甜菊糖苷合成途径上基因的表达

2.2.1 鑫丰 3 号不同冠层甜叶菊叶片中甜菊糖苷合成途径上基因的表达 通过检测同一植株不同发育时期的叶片中的甜菊糖苷生物合成相关基因表达,结果显示与赤霉素合成途径共享的 4 个基因中, *SrGGPPS*、*SrKS* 和 *SrKO* 在不同发育时期叶片中的表达趋势一致,均为顶叶 > 中叶 > 底叶; *SrCDPS* 在中叶中的表达最高,在顶叶中的表达依旧高于底叶(图 2)。甜菊糖苷合成途径特有的 4 个基因检测结果显示,关键节点酶基因 *SrKA13H* 在中叶中表达最高,顶叶中的表达最低; *SrUGT85C2*、*SrUGT74G1* 和 *SrUGT76G1* 趋势一致,均在顶叶中的表达最高,底叶中的表达最低且差异显著(图 3)。

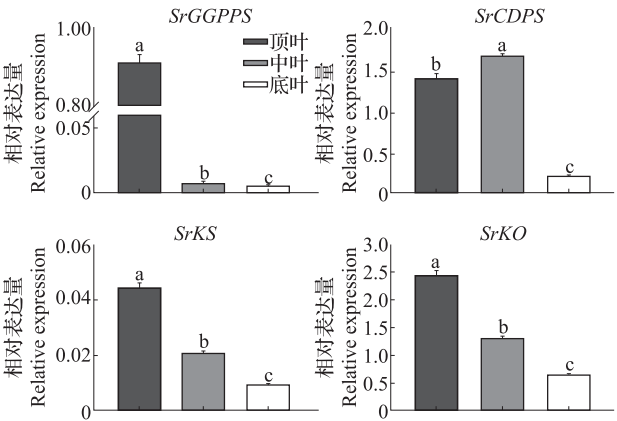


图 2 甜菊糖苷与赤霉素生物合成途径上的共享基因在鑫丰 3 号不同冠层叶片中的表达

Fig. 2 Transcriptions of SGs and gibberellin biosynthetic genes in different canopies leaves of Xinfeng 3

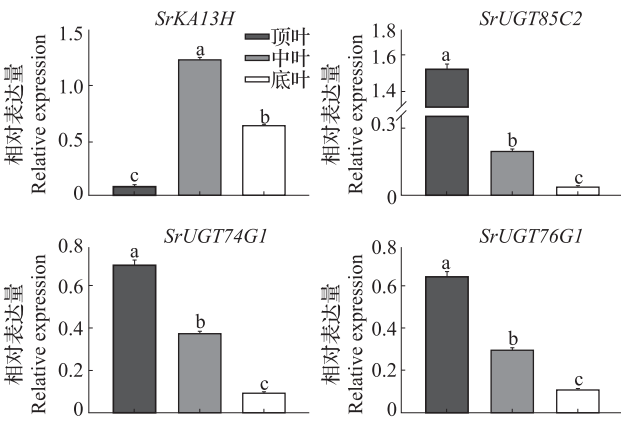


图 3 甜菊糖苷生物合成途径特有酶编码基因在鑫丰 3 号不同冠层叶片中的表达

Fig. 3 Transcriptions of SGs biosynthetic genes in different canopies leaves of Xinfeng 3

2.2.2 不同品种甜叶菊叶片中甜菊糖苷合成途径上基因的表达 甜菊糖苷的合成积累受其生物途径上相应催化酶编码基因的调控,检测这些基因在不同甜叶菊品种中的表达,结果显示在不同品种的甜叶菊中合成途径上游与赤霉素合成途径共享的 4 个基因中 *SrGGPPS*、*SrCDPS* 和 *SrKO* 均在谱星 1 号叶片中表达最低,仅 *SrKS* 表达在谱星 1 号中表达最高; *SrGGPPS*、*SrCDPS* 和 *SrKS* 在守田 3 号和江甜 3 号中表达无显著差异,仅 *SrKO* 在守田 3 号中表达显著高于江甜 3 号(图 4)。甜菊糖苷合成所特有的 4 个基因表达结果显示,关键节点基因 *SrKA13H* 的表达在江甜 3 号中表达最高,在谱星 1 号中表达最低; *SrUGT74G1* 在谱星 1 号中表达最高,在守田 3 号中表达最低, *SrUGT76G1* 在不同甜叶菊品种中的表达趋势与 *SrUGT74G1* 相反; *SrUGT85C2* 的表达在守田 3 号中表达最高,在其他 2 个品种中表达无显著差异(图 5)。

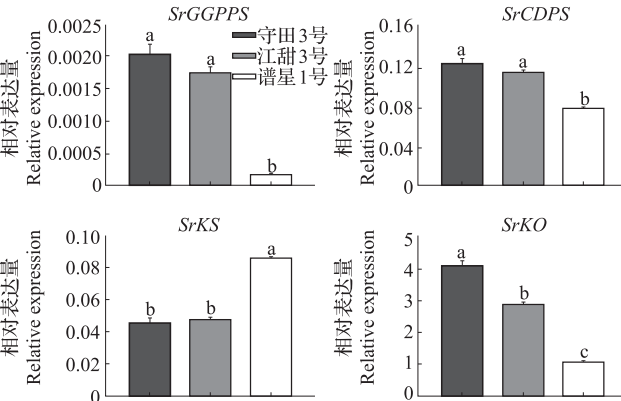


图 4 甜菊糖苷与赤霉素生物合成途径上的共享基因在不同品种甜叶菊叶片中的表达

Fig. 4 Transcriptions of SGs and gibberellin biosynthetic genes in stevia leaves of different varieties

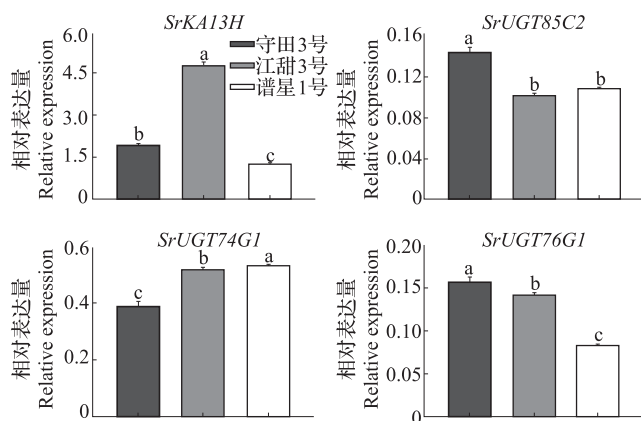


图5 甜菊糖苷生物合成途径特有酶编码基因在不同品种甜叶菊叶片中的表达

Fig. 5 Transcriptions of SGs biosynthetic genes in stevia leaves of different varieties

3 讨论

3.1 甜菊糖苷的积累

早在 19 世纪 70 年代就有关于甜菊糖苷在不同冠层和不同品种甜叶菊叶片中的积累的报道, 研究结果显示甜菊糖苷在叶片中的积累是一个动态的过程, 随着叶片的生长发育甜菊糖苷含量和种类也同时发生着改变。在苗期甜叶菊植株的不同冠层叶片中甜菊糖苷在越靠近顶端的具有较高生长活性的新叶中积累越高, 越靠近底部的叶片含量逐渐降低^[27], 这一结论在本研究鑫丰 3 号品种中也成立 (表 2), 因此可知, 甜菊糖苷在不同冠层叶片中的积累趋势在不同品种间的一致。本研究还进一步发现越接近底部的叶片中莱鲍迪苷 A 和其他糖苷在总糖苷所占比率越高, 这说明在叶片生长初期主要合成甜菊苷, 后在不同糖基转移酶作用下转化为莱鲍迪苷 A 及其他多种甜菊糖苷。因此, 相较于传统的始花期所有叶片混合收获的方法, 根据实际生产所提取目的糖苷的种类和含量分冠层采摘收集甜叶菊叶片或许可以有效提高提取效率, 节约提取成本。不同品种甜叶菊叶片中甜菊糖苷的积累差异也已有少量报道^[28], 守田 3 号和江甜 3 号甜叶菊叶片中总糖苷的含量在花芽形成和始花期差异不显著; 谱星 1 号在开花后糖苷含量迅速降低且低于江甜 3 号^[29], 这一结论在本研究中得以验证 (表 2)。同时本研究还发现江甜 3 号总糖苷含量虽然与守田 3 号相当, 但其 RA 含量超过总糖苷 50%, 而守田 3 号 RA 含量仅占总糖苷的 28.51%, 这说明江甜 3 号为高效提取莱鲍迪苷 A 的优质品种。因此, 根据目的

糖苷种类选择培育甜糖苷积累优势品种和将甜叶菊叶片分冠层收获是高效获得单一甜菊糖苷的有效方法。

3.2 甜菊糖苷积累的基因调控

无论是不同冠层还是不同品种甜叶菊叶片中甜菊糖苷积累差异的主要原因都与甜菊糖苷生物合成途径上的催化酶的编码基因的表达水平密切相关^[30-31]。在同一基因型甜叶菊的不同冠层叶片中, 检测的 8 个基因中有 6 个基因与总糖苷在不同冠层积累趋势一致。已有研究报道甜菊苷和莱鲍迪苷 A 的合成分别受 *SrUGT74G1* 和 *SrUGT76G1* 的调控, 在异源体系中表达这 2 个基因可以成功获得其编码酶催化合成的底物^[25,32]; 不同冠层叶片中这 2 个基因的表达水平均与对应调控糖苷的积累水平相吻合。因此, 可以通过检测甜叶菊中这 2 个基因的表达水平来判断甜叶菊中甜菊苷和莱鲍迪苷 A 的积累情况。不同品种甜叶菊叶片中检测的 8 个基因中的 6 个基因在谱星 1 号中表达最低, 守田 3 号和江甜 3 号在合成途径最上游的 3 个基因表达无显著差异, 后续基因中表达水平虽有显著差异, 但具表达优势的基因个数相当; 这或许是守田 3 号和江甜 3 号总糖苷含量无显著差异, 谱星 1 号总糖苷含量最低的原因。*SrUGT74G1* 和 *SrUGT76G1* 的表达水平与其对应的调控的下游产物含量变化趋势在不同品种间也并不吻合, 这或许是不同基因型甜叶菊中相同功能基因的核酸序列差异和基因数目多少所导致^[33]。因此可知, 甜菊糖苷生物合成途径上关键基因的表达水平可以显著影响其总糖苷的积累, 单一糖苷催化酶编码基因表达水平对应糖苷积累水平的指示作用仅限于相同基因型甜叶菊, 在不同遗传背景的甜叶菊品种中并不成立。

参考文献

- [1] Ceunen S, Geuns J M C. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function [J]. J Nat Prod, 2013, 76 (6): 1201-1228
- [2] Mitra A, Pal A. In vitro regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant [J]. J Plant Biochem Biot, 2007, 16 (1): 59-62
- [3] Geuns J M C. Stevioside [J]. Phytochemistry, 2003, 64 (5): 913-921
- [4] Urban J D, Carakostas M C, Brusick D J. Steviol glycoside safety: Is the genotoxicity database sufficient? [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51: 386-390
- [5] Barbet-Massin C, Giuliano S, Alletto L, et al. Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* (Berton) Berton under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition [J]. Genet Resour Crop Evol, 2016, 63 (4): 685-694

- [6] 段远霞,徐岚,刘永刚,等.甜菊糖苷的功能及应用[J].山东化工,2016,45(13):69-70
- [7] 郭雪霞,赵仁邦.甜菊糖苷的保健功能及其在食品中的应用[J].中国食物与营养,2012,18(1):32-35
- [8] Wanke M, Skorupinska-Tudek K, Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway[J]. ACTA Biochim Pol, 2001, 48(3):663-672
- [9] Totté N, Charon L, Rohmer M, et al. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway[J]. Tetrahedron Lett, 2000, 41(33):6407-6410
- [10] Brandle J E, Telmer P G. Steviol glycoside biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2007, 68(14):1855-1863
- [11] 郭书巧,束红梅,郑卿,等.甜菊醇糖苷生物合成途径关键酶基因 *KAI3H* 的克隆及序列分析[J].基因组学与应用生物学, 2010, 29(5):911-918
- [12] Kim K K, Sawa Y, Shibata H. Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni—purification and partial characterization of the enzyme[J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 332(2):223-230
- [13] Mohamed A A A, Ceunen S, Geuns J M C, et al. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides[J]. J Plant Physiol, 2011, 168(10):1136-1141
- [14] Wang J, Li S, Xiong Z, et al. Pathway mining-based integration of critical enzyme parts for de novo biosynthesis of steviol glycosides sweetener in *Escherichia coli*[J]. Cell Res, 2015, 26:258-261
- [15] Ohta M, Sasa S, Inoue A, et al. Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita[J]. J Biologic Chem, 2010, 285(3):199-209
- [16] Wölwer-Rieck U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof; a review[J]. J Agr Food Chem, 2012, 60(4):886-895
- [17] Brandle J. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana* [J]. Can J Plant Sci, 1999, 79(1):85-91
- [18] Kennelly E J. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni [J]. Stevia, the Genus Stevia. Medicinal Aromatic Plants—Industrial Profiles, 2002, 19:68-85
- [19] Kwang-He K. Physio-ecological studies on Stevia(*Stevia rebaudiana* Bertoni) [J]. Korean J Crop Sci, 1981, 26(1):69-89
- [20] Higashi S, Abe M, Uchiumi T, et al. Conversion of stevioside to rebaudioside A by stevia-glucosyltransferase[J]. Earth Sci Biol, 1994, 27:199-207
- [21] 赵永平,何庆祥,朱亚,等.不同基因型甜叶菊产量和甜菊糖苷含量研究[J].中国农学通报,2010,26(19):73-75
- [22] Yang Y, Huang S, Han Y, et al. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana* [J]. Plant Physiol Biochem, 2015, 86:174-180
- [23] Humphrey T V, Richman A S, Menassa R, et al. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis[J]. Plant Mol Biol, 2006, 61(1-2):47-62
- [24] Kundu S, Dey A, Bandyopadhyay A. Stimulation of in vitro morphogenesis, antioxidant activity and over expression of kaurenoic acid 13-hydroxylase gene in *Stevia rebaudiana* Bertoni by chlorocholine chloride [J]. Acta Physiol Plant, 2014, 36(10):2683-2693
- [25] Richman A, Swanson A, Humphrey T, et al. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana* [J]. Plant J, 2005, 41(1):56-67
- [26] Modi A R, Raj S, Kanani P, et al. Analysis of differentially expressed genes involved in stevioside biosynthesis in cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni treated with steviol as an immediate precursor[J]. J Plant Growth Regul, 2014, 33(3):481-488
- [27] Bondarev N I, Sukhanova M A, Reshetnyak O V, et al. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny [J]. Biol Plantarum, 2003, 47(2):261-264
- [28] Mitsuhashi H, Ueno J, Sumita T. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Determination of stevioside (author's transl) [J]. Yakugaku Zasshi, 1975, 95(1):127
- [29] 胡秀英,王仲伟,黄苏珍.甜菊糖苷含量跃变的理化特性分析[J].中国糖料,2016,38(4):19-23
- [30] Guleria P, Yadav S K. Agrobacterium mediated transient gene silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: insights into steviol glycoside biosynthesis pathway [J]. PLoS ONE, 2013, 8(9):e74731
- [31] Brandle J E, Richman A, Swanson A K, et al. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis [J]. Plant Mol Biol, 2002, 50(4-5):613-622
- [32] Yang Y, Huang S, Han Y, et al. Base substitution mutations in uridine diphosphate-dependent glucosyltransferase *76G1* gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A; mutations in *UGT76G1*, a key gene of steviol glycosides synthesis [J]. Plant Physiol Biochem, 2014, 80:220-225
- [33] 朱静雯,郭书巧,束红梅,等.甜叶菊中新 *KAH* 基因的克隆及表达模式分析[J].生物技术通报,2017,33(4):104-113