

# ステビアのレバウディオサイドA高含量系統の 四倍体作出とその特性

島 修一\*・藤田 智

\*タマ生化学株式会社・研開技術部  
(恵泉女学園短期大学園芸生活学科・非常勤講師)

## Artificially Induced Tetraploid Plants in Stevia (*Stevia rebaudiana* BERTONI) with High Rebaudioside A Content.

### 緒 言

甘味料作物ステビア(*Stevia rebaudiana* BERTONI)は、人工甘味料であるチクロ、サッカリンの発癌性等の危険性が指摘されて以来、新規天然甘味料ステビオサイドの原料として注目されてきた<sup>1)</sup>。その甘味度は砂糖と比較した場合、100～300倍であり<sup>2)</sup>、また、安全性についても多くの報告があることから<sup>3), 4)</sup>、現在では、天然甘味料として定着している。一方、従来品ステビオサイドは、若干の苦味を呈することから用途が限られていたが、同族体であるレバウディオサイドAを高含量に含む製品が開発されてからは、清涼飲料水に使用されるなど用途が広がっている<sup>5)</sup>。レバウディオサイドA高含量品開発の背景には、品種改良<sup>6)</sup>、酵素学的糖付加反応<sup>7)</sup>等が貢献しており、現在では、レバウディオサイドAを高含量に含む製品が主流となりつつある。しかし、レバウディオサイドA高含量品種は、レバウディオサイドAの含量が変化しやすいこと、従来の品種と比較して病害に弱いこと等、品質の安定性に劣るため、厳しい管理のもとで栽培する必要がある、一層の改良が望まれている<sup>8)</sup>。

著者らは、これらの問題点を三倍体利用による倍数性育種法で解決することを目指している。これまで、ステビアの倍数体作出についての報告には、懸濁培養細胞由来再生植物の中に四倍体が存在したという報告<sup>9)</sup>と、培養中のサイトカイニン処理により育成した多くの個体の中に四倍体が混在していたという報告<sup>10)</sup>の2例があるが、いずれも四倍体の獲得率が低いか、あるいは偶発的なものであった。本報告は、レバウディオサイドA高含量系統の生長点および腋芽を無菌的にコルヒチン処理することにより、効率的に染色体倍加個体を作成し、さらにそれら個体の諸特性について調査したものである。

### 材料および方法

1. 供試材料：レバウディオサイドA高含量系統、SMX-1およびSMX-6、また本学で系統維持しているKSの3系統を用いた。いずれも、染色体数は $2n = 22$ である。
2. 無菌植物の育成：供試植物の無菌化は、長尾<sup>11)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、腋芽を含め1cmに切断した茎切片を、市販の中性洗剤を数滴加えた溶液で1分間よく振とうし、水道水で洗浄した後、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間振とう殺菌した。次いで、75%エタノール溶液で2分間振とう処理し、滅菌水で3回すすいだ後、無機塩類のみを1/2濃度にしたMS培地(0.2 mg/l NAA, スクロース 20 g/l, ジェランガム 3 g/l, pH5.8に調整)に置床し、25℃, 3,000 lux, 16時間日長の人工気象器内で培養した。培養後、30日毎に継代し無菌材料とした。
3. コルヒチン処理：染色体倍加は、0.05%のコルヒチンを添加した1/2MS培地に生長点を直接置床する方法(生長点法)と腋芽を含む茎切片を挿し木の要領で培地に置床する方法(挿し木法)で行った。25℃, 暗黒下の人工気象器内で2日間あるいは6日間コルヒチン処理した後、1/2MS培地に継代培養した。
4. シュートの順化：継代後、シュートが生長し発根が見られた個体については、順次パーミキュライトに鉢上げし、順化した。
5. 形態および細胞学的観察：得られた植物の倍数性の確認は、本葉の裏面表皮の気孔の大きさの測定ならびに酢酸オルセイン押しつぶし法による根端の体細胞染色体数の観察により行った。

## 6. 四倍体植物の甘味成分の分析

(1) 薄層クロマトグラフィー (TLC) : 調査個体の本葉から熱水抽出を行った。すなわち、生葉0.1gに対し蒸留水1mlを加え、100℃、1時間で2回抽出を行った。抽出液は、吸着樹脂ダイヤイオンHP20 (三菱化学製) 1mlにかけ、蒸留水2mlで洗浄後、アセトン2mlで溶出させた。ステビオサイドおよびレバウディオサイドA含有液を1mlに濃縮し、2 $\mu$ lをシリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開した。展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：水=75：50：6であり、硫酸第2セリウムで発色させた。

(2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) : 抽出方法は、TLCと同様にして行い、HPLCによる試料の分析条件は、Kitada et al.<sup>12)</sup>の方法に準じて行った。

## 結 果

### 1. 供試材料の無菌化

供試した3系統とも、置床個体数の約50～70%の範囲でそれぞれ無菌植物を得ることができた。しかし、レバウディオサイドA高含量系統のSMX-1お

よびSMX-6は、KS系統の旺盛な生育に比較し無菌化してもその生育はやや劣っていた。

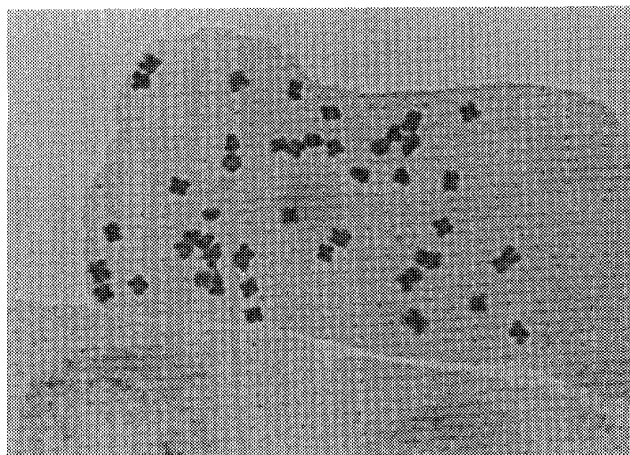
### 2. コルヒチン処理結果

コルヒチン処理によって得た倍数体の出現頻度は、第1表の通りである。まず、予備的実験として生育の旺盛なKSを用い、生長点法により0.1%コルヒチン培地で4日間処理を行ったが、コルヒチンの障害が大きく、再分化植物を得ることはできなかった。そこで、コルヒチンの濃度を0.05%に低下したところ、2個体の再分化植物が得られ、そのうち1個体が四倍体であった。この結果を参考に、0.05%コルヒチン培地でSMX-1およびSMX-6を処理したところ、SMX-1で11個体、SMX-6で1個体の計12個体の再分化植物が得られた。これら植物の体細胞染色体数を調査した結果、SMX-1で5個体、SMX-6で1個体が $2n = 44$ の四倍体植物であった(第1図)。得られた6個体の四倍体植物は、コルヒチン処理後明らかな肥厚芽生が認められ、培養中の生育もコントロール区に比較して著しく遅いという共通した特

第1表 ステビアの*in vitro*におけるコルヒチン処理結果

系統名	処理方法	処理日数	置床数	再分化個体数	四倍体数
SMX-1	生長点法	2日	35	5	2
		6日	— <sup>z</sup>	—	—
	挿し木法	2日	12	6	3
		6日	3	0	0
SMX-6	生長点法	2日	23	0	0
		6日	—	—	—
	挿し木法	2日	12	1	1
		6日	11	0	0
KS	生長点法	4日	30	2	1

<sup>z</sup>—：実験せず



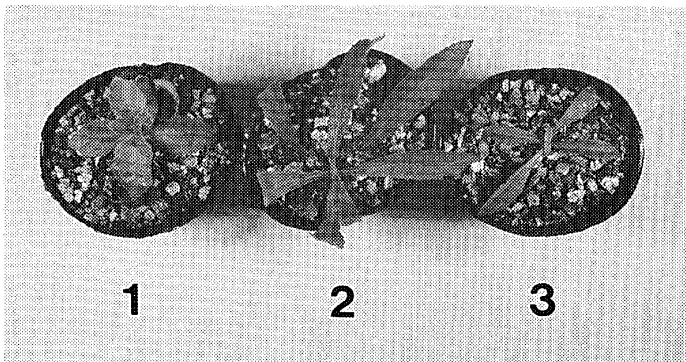
第1図 ステビア四倍体植物の体細胞染色体 (SMX-1,  $2n = 44$ )

徴が見られた。また、2通りのコルヒチン処理方法を比較すると、挿し木法の方が生長点法より簡便かつ効率的な点で四倍体植物の獲得に有利な結果となった。

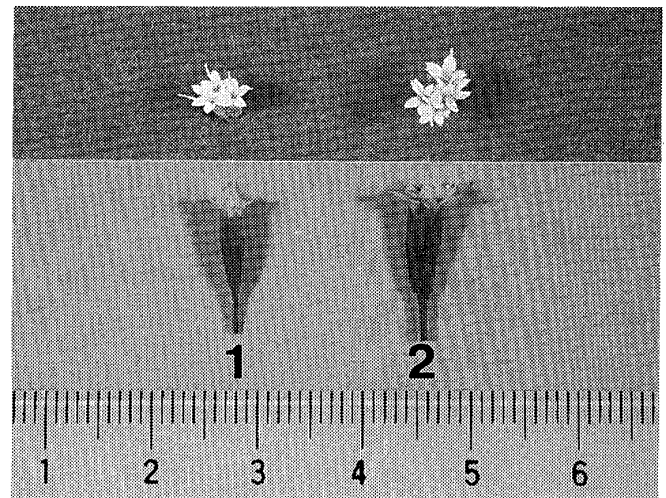
### 3. 四倍体植物の形態および細胞学的観察

育成した四倍体植物の草姿は、第2図の通りである。いずれの系統も葉縁には浅い鋸歯があり、葉の表裏は短細毛で覆われていた。葉の形は、SMX-1

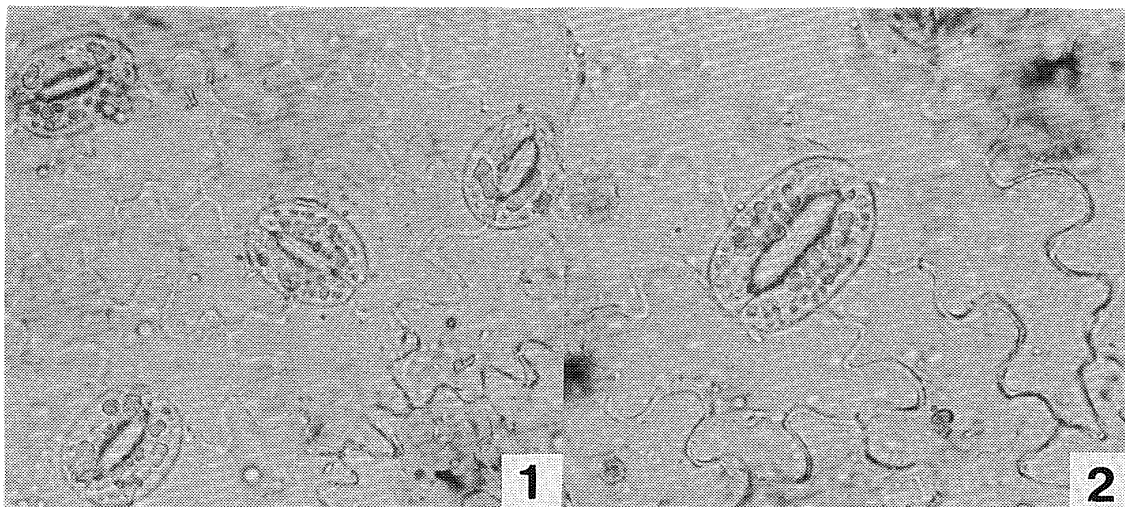
およびSMX-6は披針形であったが、KSは丸形であり明らかな差異が見られた。また、四倍体植物は二倍体植物に比較し葉色の緑が濃い傾向であり、四倍体植物の葉と花は、二倍体植物に比較し大型化していた(第3図)。さらに、葉の裏面表皮の気孔を観察したところ、3系統いずれも四倍体植物の方が明らかに大きく、その比は二倍体を100とした場合、長径で125~142、短径で118~129であった(第2表、第4図)。この器官の大型化の由来を追求する



第2図 育成したステビア四倍体植物の草姿  
1. KS 2. SMX-1  
3. SMX-6



第3図 育成したステビア四倍体植物の花の大きさ (SMX-6)  
1. 二倍体 2. 四倍体



第4図 ステビア四倍体植物の気孔の大きさ (SMX-1)  
1. 二倍体 2. 四倍体

第2表 ステビアの二倍体と四倍体の気孔孔辺細胞の大きさの比較

系統名 (倍数性)	長径 (±SD) <sup>z</sup>	比 <sup>y</sup>	短径 (±SD) <sup>z</sup>	比 <sup>y</sup>
SMX-1 (2n)	32.23 (± 2.38) μm	100	24.19 (± 1.60) μm	100
SMX-1 (4n)	44.63 (± 2.63)	138	28.63 (± 2.47)	118
SMX-6 (2n)	31.38 (± 2.71)	100	23.06 (± 1.70)	100
SMX-6 (4n)	44.48 (± 3.11)	142	29.75 (± 2.61)	129
KS (2n)	37.13 (± 1.68)	100	24.63 (± 1.82)	100
KS (4n)	46.38 (± 2.34)	125	29.00 (± 2.67)	118

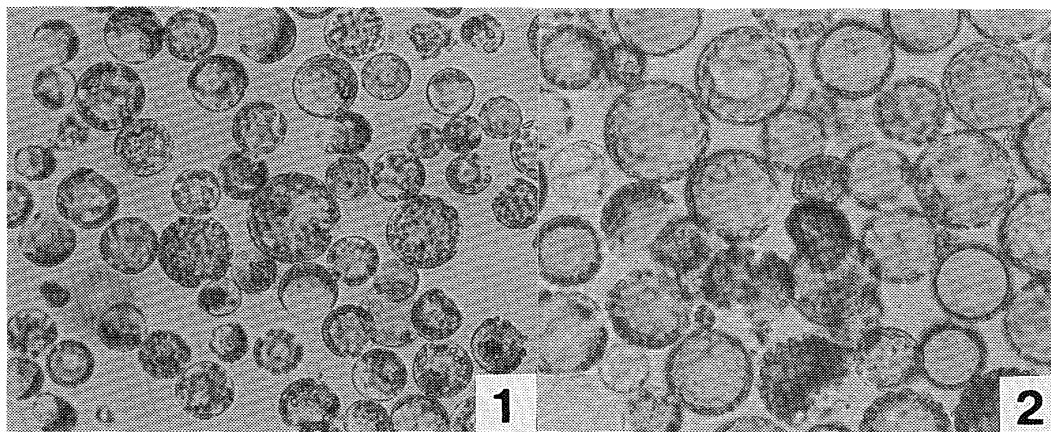
<sup>z</sup> SD: 標準偏差

<sup>y</sup> 比: 2nを100とした場合の比較

第3表 ステビアの二倍体と四倍体の花粉の大きさの比較<sup>z</sup>

倍数性	接眼マイクロメーターの目盛り (1目盛り = 2.5μm)														観察花粉数
	8	8.5	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14		
二倍体	4	3	36	34	58	7	3	1	1						147
四倍体						1	22	5	41	21	39	9	10		148

<sup>z</sup> 供試系統: SMX-1



第5図 単離直後のステビア葉肉プロトプラスト(SMX-1)

1. 二倍体 2. 四倍体

ため、まず葉肉プロトプラストを単離し観察した結果、四倍体植物は、二倍体植物に比較し明らかに大きく (第5図)、また花粉も同様であった (第3表)。これらの結果は、器官の大型化が細胞の大型化によることを示唆している。

#### 4. 四倍体植物の甘味成分の分析

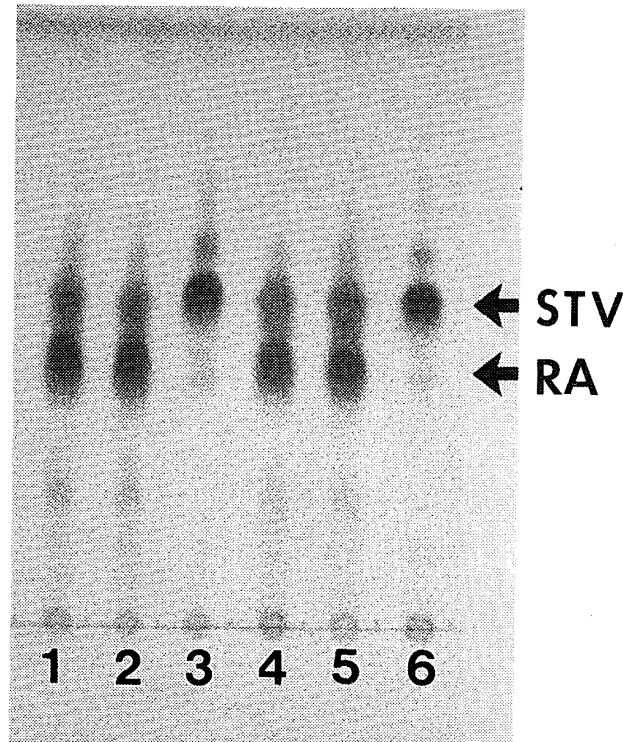
コルヒチン処理によって作出した四倍体植物の甘味成分をTLCによって分析した結果は、第6図に示す通りである。供試した3系統のうち、レバウディオサイドA高含量系統SMX-1およびSMX-6では、ステビアの甘味主成分であるレバウディオサイドAとステビオサイドに対応するスポットが確認された。硫酸第2セリウムの発色の濃さで両スポットを比較すると、二倍体植物と同様にレバウディオサイドAの方がステビオサイドより量的に多いことが推

察された。また、KS系統はステビオサイドのスポットが確認された。

さらに、HPLCによってステビアの甘味成分の定量を試みた結果は、第4表に示す通りである。SMX-1およびSMX-6の両系統は、RA比が二倍体および四倍体いずれも0.72~0.78と高い値を示し、染色体倍加された個体が親系統の形質をきわめて強く引き継いでいることが確認された。一方、KS系統は、倍数性に関わらずRA比は、0.11~0.13とかなり低く、レバウディオサイドA高含量系統と明確な差が見られた。

#### 考 察

新天然甘味料としての有望性が認められ、ステビアが1970年および1971年にパラグアイおよびブラジルより日本に導入されて以来、このキク科の多年



第6図 TLCによるステビア四倍体植物の  
甘味主成分の分析結果

1. SMX-1 (2n)      4. SMX-1 (4n)  
2. SMX-6 (2n)      5. SMX-6 (4n)  
3. KS (2n)          6. KS (4n)

STV：ステビオサイド

RA：レバウディオサイドA

第4表 HPLCによるステビア甘味成分の定量結果（組成比）

系統名	甘味成分含有量 <sup>2</sup> (%)					
	DA	STV	RC	RA	TL	RA比
SMX-1 (2n)	0.2	1.8	1.1	6.4	9.5	0.78
SMX-1 (4n)	0.1	2.0	0.7	7.3	10.1	0.78
SMX-6 (2n)	0.1	2.6	0.8	7.9	11.4	0.75
SMX-6 (4n)	0.1	2.3	0.6	6.0	9.0	0.72
KS (2n)	0.3	5.8	0.2	0.9	7.2	0.13
KS (4n)	0.4	5.4	0.1	0.7	6.6	0.11

<sup>2</sup> DA: Dulcoside A STV: Stevioside RC: Rebaudioside C RA: Rebaudioside A TL: Total RA比: RA/STV+RA

生草本植物の定着化に関する研究が進められてきた<sup>13-17)</sup>。ステビアの繁殖は、実生、挿し木、株分けによって行われているが、大量の苗を育成するのに有利な種子繁殖においては、他殖性のため、遺伝的変異が大きく、工業生産上、高品質の甘味料を安定的に供給するという観点から高水準に均一性の高い品種の育成が強く要望されている<sup>6)</sup>。そこで、優良個

体を選抜し、挿し木によって増殖する方法<sup>6), 17)</sup>や突然変異の利用<sup>9), 10)</sup>等の育種に関する報告がなされてきた。本研究では、倍数性育種によりステビア栽培上の問題点の克服を試み、とくにレバウディオサイドA高含量系統の倍数体（四倍体）の作出に成功し、その諸特性を明らかにした。

植物における倍数体の利用は細胞遺伝学の発展と

ともに古くから試みられ、実用化されている作物も多い。小林<sup>18)</sup>によれば、ゲノムの倍加によって、一般に、①細胞や器官の大型化、②発育の旺盛（まれに弱勢）化、③各種抵抗性の強化、④含有成分の増減、⑤晩生化、⑥稔性低下などの変化がみられ、これらの特性の育種利用に成功した例として、ダイコン(4x)、カブ(4x)、ブドウ(4x)、レンゲソウ(4x)、ペチュニア(4x)などがあり、とくにクワ、果樹類、花卉類の育種では利用性が高いとされている。また、同質四倍体ともの二倍体との交配によって同質三倍体を作ることも可能で、同質三倍体の特性である不稔性を積極的に利用した例として、種子なしスイカがある。さらに、テンサイやハウレンソウの育種でも三倍体の示す強健性、含有成分の増加、多収性などを利用した品種育成が行われている。

植物の染色体倍加の方法としては、コルヒチンが常法として用いられるが、その際に問題となるのはコルヒチンの処理濃度、期間および方法であろう。本実験の場合、0.05%で2日間あるいは6日間の処理を行ったが、6日間の処理区からは再生植物を得ることはできなかった。in vitroにおけるコルヒチン処理の例として、テンサイ<sup>19)</sup>、コムギ<sup>20)</sup>等があるが、テンサイでは、高濃度で短時間処理する方法によって多くの倍加個体を得ており、コムギでは、処理は1日のみで、長期間の処理はむしろ植物体の再生を困難にすると報告している。これらの結果は、コルヒチンの毒性の影響が、長期間の処理において非常に大きいことを示唆するもので、本実験のステビアでも同様のことがいえよう。また、濃度については、今後詳細に検討する必要がある。SMX-1での結果にみられるように（第1表）、処理方法については、挿し木法の方が簡便でかつ効率的と思われた。生長点を処理する場合、一連の操作を実体顕微鏡下で行うため、熟練した技術が必要となる。しかし、本実験の挿し木法によれば、材料を簡単かつ大量に調達できるため、誰でも比較的容易にコルヒチン処理が可能となり、さらに、無菌化した供試材料を用いれば一層効果的であろう。

これまで、ステビアの育種に倍数体を積極的に利用しようとした研究は少ない。村上ら<sup>10)</sup>は、液体培地中に種々の薬剤を添加し、ステビアの変異体の誘発を行った。その結果、1mg/lのカイネチンを添加した培地で30日間処理し、再分化した個体の中から4個体の甘味成分の含有が高い系統を見いだした。しかも、これら4個体はすべて染色体倍加した $2n = 44$ の四倍体であった。また、Ferreira and Handro<sup>9)</sup>も、ステビアの懸濁培養において、BA0.02

mg/lを添加した培地で再生させた植物の中に、染色体異常や形態の変化が生じている個体を見いだし、その中には四倍体も存在していたことを報告している。これらの四倍体は、いずれも培地に添加したサイトカイニンの作用による染色体倍加と考察されているが、むしろ、Oono<sup>21)</sup>のいう、脱分化した培養細胞で誘発されたゲノム突然変異というべきであろう。なぜなら、培養細胞における突然変異は、細胞の脱分化した状態が、細胞の分裂・生長に対し不安定要因として働き、誘発されると考えられており、2, 4-Dなど特定の成分が突然変異誘発の主要な要因になっていないからである。これら培養中の変異を利用した場合、得られた個体が必ずしも倍数体とは限らず、その他の変異体（例えば、異数体等）も誘発される可能性がある。それに対し、本実験で作出した四倍体は、植物体各器官（葉、花、気孔等）の巨大化という倍数性植物の一般的形態的特徴が見られた以外は、他の形質、例えば最も重要な甘味成分の組成はもとの二倍体と同様、レバウディオサイド高含量であり、何ら変異は見られなかった（第6図および第4表）。それゆえ、生育の弱勢なレバウディオサイドA高含量系統の倍数性育種では、本実験の処理法の方がより有利と思われる。そして、これら倍数体系統の増殖は、挿し木および組織培養の方法を併用し、容易に可能となるだろう。

現在、著者らは、得られた3系統の四倍体植物を挿し木によって増殖し、生産性に関する試験を行おうとしている。同時に、四倍体植物と二倍体植物間との交配を進めており、一部の交配組み合わせにおいてはすでに採種を始めている。これらの交配種子から、本研究の目的とする三倍体植物の育成が期待される場所である。

## 摘 要

三倍体植物利用による、天然甘味料作物ステビアのレバウディオサイドA高含量品種育成を目的に、二倍体植物3系統の染色体倍加を試みた。

1. in vitroでのコルヒチン処理によって、供試した3系統いずれにおいても、 $2n = 44$ の四倍体植物が得られた。処理方法は、挿し木法が生長点法に比較し簡便で効率的と思われた。
2. 四倍体植物は二倍体植物に比較して、植物体各器官の巨大化が観察された。すなわち、葉、花粉粒、気孔の大きさ、等はいずれも増大していた。
3. TLCによる甘味成分の分析の結果、SMX-1およびSMX-6は、四倍体および二倍体植物のいずれに

も、レバウディオサイドAとステビオサイドに対応するスポットが確認された。また、KSはステビオサイドのスポットが確認された。

4. HPLCによる甘味成分の定量の結果、SMX-1およびSMX-6の両系統は、RA比が二倍体および四倍体いずれも0.72~0.78と高い値を示したが、KSは0.11~0.13とかなり低く、明確な差がみられた。

**謝辞** 本研究を行うにあたり、本学野菜園芸学研究室杉山信太郎教授には、終始ご指導とご助言を賜り、タマ生化学株式会社営業部 渡辺一也部長ならびに研開技術部 牧野孝夫部長には、このような貴重な機会を提供していただき、衷心より感謝の意を表します。また、シグマ研究所四方恒生氏には、長年の貴重な育種成果であるステビアのレバウディオサイドA高含量系統SMX-1およびSMX-6を快く提供していただき、深く感謝申し上げます。なお、本研究にご協力下さった野菜園芸学専修生、長尾純子さん、絹谷裕子さん、小野江津子さん、近藤由貴子さんに心より感謝申し上げます。

#### 引用文献

- 1) 明石春雄, 1977. 新天然甘味料ステビア, 発酵と工業, 35:1027-1029.
- 2) 住田哲也, 1983. ステビアの栽培技術と今後の課題, 農業および園芸 58 (1):168-174.
- 3) 明石春雄, 1975. ステビア乾葉抽出物の安全性について, 食品工業, 18:2-10.
- 4) 菊池哲明, 1988. 糖転移ステビア甘味料の安全性評価, 月刊フードケミカル, 6:54-58.
- 5) 菊池哲明, 1985. ステビアの甘味質改善の現状, 月刊フードケミカル, 10:54-58.
- 6) 中村重治, 田村幸吉, 1985. ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI)の主要甘味配糖体に関する変異, 熱帯農業, 29:109-115.
- 7) Fukunaga, Y., T. Miyata, N. Nakayasu, K. Mizutani, R. Kasai and O. Tanaka, 1989. Enzymatic transglucosylation products of stevioside, separation and sweetness-evaluation, Agric. biol. Chem., 53:1603-1607.
- 8) 四方恒生, 私信.
- 9) Ferreira, C. M. and W. Handro, 1988. Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* BERTONI, Plant Cell Reports, 7:123-126.
- 10) 村上章, 村上邦睦, 1991. 植物生長ホルモンによる植物人為四倍体の作出方法, 日本国特許庁公開特許公報, H2-242623.
- 11) 長尾純子, 1993. 甘味料作物ステビアの組織培養による大量増殖に関する研究, 恵泉女学園短期大学卒業論文.
- 12) Kitada, Y., M. Sasaki, Y. Yamazoe and H. Nakazawa, 1989. Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and C and dulcoside A in foods by high performance liquid chromatography, J. Chromatogr. 474:447-451.
- 13) 宮崎幸男・渡辺宏之, 1973. ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の栽培に関する研究 (第1報) 植物の繁殖について. 熱帯農業 17 (3):154-157.
- 14) ———・兼松明子・渡辺宏之, 1974. ステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の栽培に関する研究 (第2報) 植物の生育およびステビオサイド含量について. 熱帯農業 17 (3):158-163.
- 15) 川谷豊彦・金木良三・田辺猛, 1977. アマハステビア (*Stevia rebaudiana* BERTONI) の栽培について. 熱帯農業 20 (3):137-142.
- 16) 宇都宮隆, 1978. ステビアの栽培特性とその経済性. 愛媛県農業試験場研究報告. 19:17-22.
- 17) 住田哲也, 1980. *Stevia rebaudiana* BERTONI. の定着化に関する研究. 農事試験場報告. 31:1-71.
- 18) 小林仁, 1987. 細胞工芸育種法, 倍数性育種法, p. 1194-1195. 野口弥吉・川田信一郎監修. 農学大事典・養賢堂. 東京.
- 19) Hansen, A. L., C. Plever, H. C. Pedersen, B. Keimer and N. S. B. Anderse, 1994. Efficient in vitro chromosome doubling *Beta vulgaris* ovule culture, Plant Breed. 112:89-95.
- 20) Ouyang, J. W., H. Liang, S. E. Jia, C. Zhang, T. H. Zhao, L. Z. He and X. Jia, 1994. Studies on the chromosome doubling of wheat pollen plants, Plant Sci. 98:209-214.
- 21) Oono, K. 1981. Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture (Thorpe, T. A. ed.), p. 273. Academic Press, New York.