

天然甘味料作物ステビアの倍数性育種 (総説)

藤田 智, 畠 修一¹¹タマ生化学株式会社・研開技術部 (恵泉女学園短期大学・非常勤講師)A review on the polyploidy breeding of stevia, *Stevia rebaudiana* BertoniSatoshi FUJITA and Shuichi HATA¹¹Department of Research and Development, Tama Biochemical Co. Ltd.

はじめに

甘味料作物ステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) は、南米パラグアイ原産のキク科に属する多年生草本植物であり、パラグアイでは古くからインディオの間で自然の甘味料として使用されていた (西, 1983)。このステビアが天然甘味料として注目されるようになったのは、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使用禁止になったことがきっかけであった (宮崎・渡辺, 1974)。当時、これらに代わる安全性の高い天然甘味料の開発が要望され、新規天然甘味料の原料作物としてステビアへの関心が急速に高まったのである。その甘味度はショ糖と比較した場合、約300倍であり、また、安全性についても多くの報告があることから、現在では天然甘味料として定着している (明石, 1975; 明石, 1977; 菊池, 1985; 菊池, 1988)。

一方、1970年代に日本へステビアが導入されて以来、関係各機関で栽培技術や品種の改良に努力が注がれ、ステビア甘味料の工業生産上、最も要望されているレバウディオサイドA高含量品種も育成されているが、生育が不揃いである、病気に弱い、あるいは収量が低い等の問題点を指摘されているのが現状である。著者らは、これら育種上の問題点を従来ステビアでは試みられていなかった三倍体利用による倍数性育種法で解決することを計画し、検討を重ねてきた (畠・藤田, 1996; 畠ら, 1998a; 畠ら, 1998b; 来島・藤田, 1998)。

本稿では、著者らの研究紹介を中心に、現在のステビア甘味料生産の現状、ならびに栽培および育種上の問題点、さらに今後の展望について述べてみたい。

ステビアの植物学および作物学的特徴

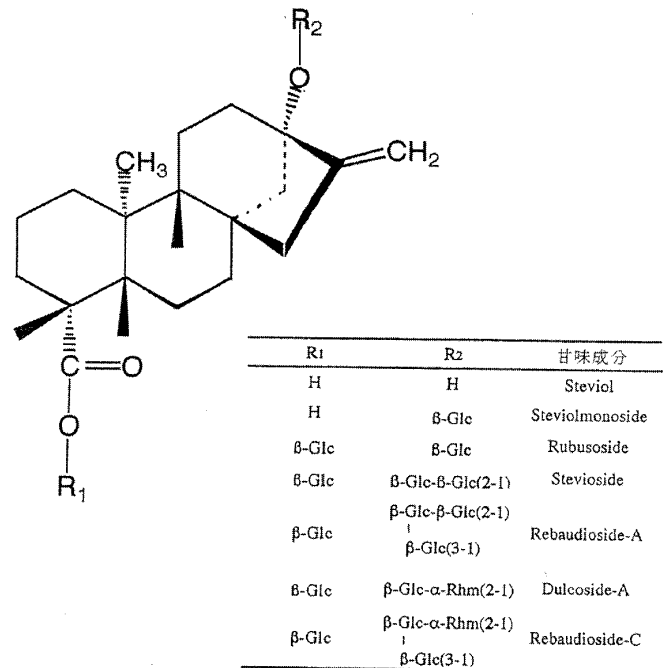
ステビアは、世界に広く分布している約20,000種のキク科植物の中でも、葉中に低カロリーで甘さがショ糖の300倍という配糖体の甘味成分を有する特異的な多年生草本植物である。南米パラグアイ原産のため、生育適温は20-25℃と温暖な気候を好み、15℃以下になると生育は不良となる。したがって、日本の栽培では、冬期の低温が越冬に多大な影響を及ぼすため、栽培適地は西南暖地や九州など地域が限定される (住田, 1980)。著者らの実験地、神奈川県伊勢原市における露地での越冬率は30%であり、営利栽培地としては条件的に厳しいものと思われる。繁殖は、種子 (実生)、挿し木および株分けによって行われている。これらのうち、大量の苗を育成するのに最も有利な方法は、種子繁殖である。しかし、ステビアは一般に自家不和合性が強く、種子繁殖の場合、品種としての均一性が大きな問題となっている。とくに、工業生産ベースでは、収穫物である乾燥葉の甘味成分に個体差がある場合、甘味成分抽出量の減少や品質の劣化が起こるため、均一なレバウディオサイドA高含量品種の育成が必要とされているのである (宮川ら, 1984)。収穫の対象は、開花前の本葉であるが、ステビアは典型的な短日植物であり、日長が短くなってくると着蕾し、開花に至る。したがって、晩生品種が望まれる。とくに、短日開花の問題は近年栽培の可能性が検討されている低緯度地帯で重大な育種課題になることが予想される。また、多年生であるため、1年生株と2年生以降株の草姿が異なるのも特徴である。1年生株は、主茎1本とそれから発生する分枝で生育し、2年生以降の株では越冬した株元から多数萌芽し、多くの茎を主体とする草型になる (住田, 1977)。当然、収量は2年生以降の株の方が高くなる。主要な病害は、土壌病害の白絹病、立ち枯れ病、斑点病等があるが、抵抗性育種の研究は進んでいないのが現状である。

ステビア甘味成分とその化学構造

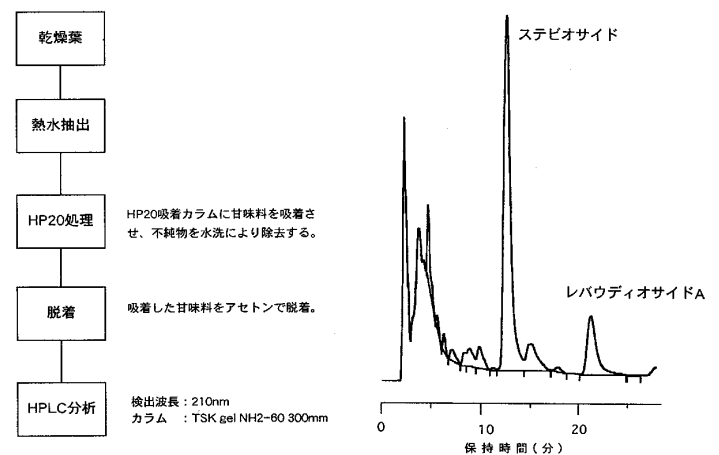
ステビアは、二次代謝産物として数種の甘味物質を産生するが、その主たるものはステビオールをアグリコンとするジテルペン配糖体であり、結合する糖の種類、数さらに結合する位置により甘味度が変化することが知られている（東ら, 1994）。ステビアに含まれる甘味成分としては、ステビオサイド、レバウディオサイドA, レバウディオサイドCおよびダルコサイドA等が知られているが、主要なものはステビオサイドとレバウディオサイドAである。第1図は、ステビオサイドとレバウディオサイドAの化学構造を示したものである（Shibata et al., 1995）。ステビオサイドとレバウディオサイドAは、それぞれカウレン骨格とよばれる骨格構造に糖が付加した構造を有している。すなわち、ステビオサイドはR₁の位置にグルコースが1つ、R₂の位置にグルコースが2つ付加した構造であり、一方、レバウディオサイドAはR₁は同じであるが、R₂の位置にグルコースが3つ付加した構造である。従来、ステビアの甘味成分といえば、乾燥中に6～15%含まれているステビオサイドが主流であったが、若干の苦味を呈することから用途が限られていた。しかし、甘味の強さ、質ともにすぐれているレバウディオサイドAが発見されてからは、甘味料としての需要が増大している。このレバウディオサイドAを安定的に供給することは甘味料生産上重要な課題であるが、そのためには、レバウディオサイドAを多量に含みかつ収量の高いステビア品種を安定的に確保することが必要となる。

ステビア甘味成分の分析

ステビア甘味成分の分析には、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が利用されている（Kusama et al., 1986; Kitada et al., 1989; 東ら, 1994; 島・藤田, 1996）。第2図は、著者ら（島・藤田, 1996）のHPLCによるステビア甘味成分の定量法をまとめたものである。まず、調査個体の乾燥葉から甘味成分の熱水抽出を行う。ついで、抽出液を吸着樹脂ダイヤイオンHP20（三菱化学製）にかけ甘味成分を吸着させた後、不純物を蒸留水で洗浄・除去する。吸着した甘味成分はアセトンで脱着（溶出）し、濃縮した後、HPLCによって分析する。定量は、標準物質で検量線を作成し、面積比率によって量を求める。検出波長は210nm, TSKge1NH2-60カラムを用い、溶媒は80%アセトニトリル含水液を用いる。



第1図 ステビア甘味成分の構造（Shibata et al., 1995）



第2図 HPLCによるステビア甘味成分の分析法

この方法による測定結果（第2図右のクロマトグラム）によれば、不純物の後に、ステビオサイドが12minで検出され、さらにレバウディオサイドAが20minで検出される。

レバウディオサイドA高含量製品開発の背景

ステビオサイドに比較し高品質で、甘味度も約1.5倍であるレバウディオサイドAが発見されて以来、食品への利用が拡大されている。用途としては、漬物、チューインガム、調味料、冷菓、水産加工品、乳製品等幅広く、また、低カロリーということ

もあり、糖の摂取量減少の目的で医療分野においても今後その需要は伸びると予想される。このレバウディオサイドA高含量製品開発の背景には、育種的手法による品種改良(中村・田村, 1985)や酵素学的糖付加反応, すなわち, ステビオサイド分子に1分子のグルコースを付加してレバウディオサイドAへ変換する手法(Kusama et al., 1986; Fukunaga et al., 1989; Shibata et al., 1991; 東ら, 1994)の研究が貢献している。

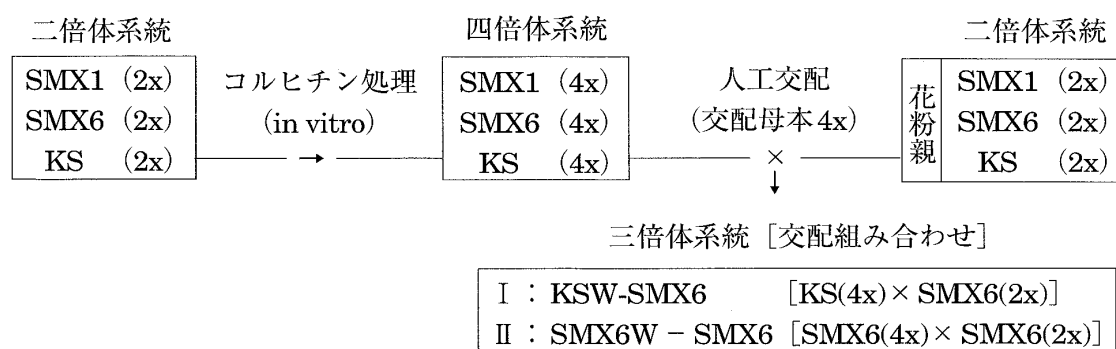
1. 育種的手法によるレバウディオサイドA高含量品種の育成

1970年から1971年に北海道農業試験場の住田氏によってステビアが日本に導入されて以来, 日本におけるステビア栽培定着化のための研究が各地で行われてきた(川谷ら, 1973; 宮崎・渡辺, 1974; 宮崎ら, 1974; 住田, 1977; 川谷ら, 1978; 宇都宮, 1978; 住田, 1980; 水上ら, 1983)。その中で, ステビオサイドおよびレバウディオサイドAの含量を栽培技術の改良によって向上させる試みがなされてきたが, ステビアの甘味成分含量は肥料三要素の有無および窒素施用水準とは無関係であるとされ(川谷ら, 1978), 甘味成分含量の改良が遺伝育種的手法によらねばならないことが示唆されている。作物栽培において, 生産者が品種に求めているのは, 第1に均一性とヘテロシスであり, 工業生産上も, 高品質の甘味料を安定的に供給するという観点から, レバウディオサイドA高含量で均一性の高い品種の育成が強く要望されてきた(宮川ら, 1984)。しかし, ステビアの場合, 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い。そこで, 優良個体を選抜し, 挿し木によって増殖する方法(中村・田村, 1985; 住田, 1980)や突然異変の利用(Ferreira and Handro, 1988; 村上・村上, 1991)等の育種に関する報告がなされてきたが, レバウディオサイドA高含量品種(あるいは

系統)に関する報告は, 開発企業間の思惑(特許権)が複雑に絡まり, あまり見当たらないのが現状である。また, レバウディオサイドA高含量多収品種に関する報告は全くなかった。そこで著者らは, 従来ステビアの分野であり注目されていなかった倍数性育種の方法を用いることによって, レバウディオサイドA高含量多収性品種の育成を計画し, 1994年, 恵泉女学園短期大学, タマ生化学株式会社およびシグマ研究所との共同研究により実験に着手したのであった。

2. 酵素学的糖付加反応によるステビオサイドからレバウディオサイドAへの変換

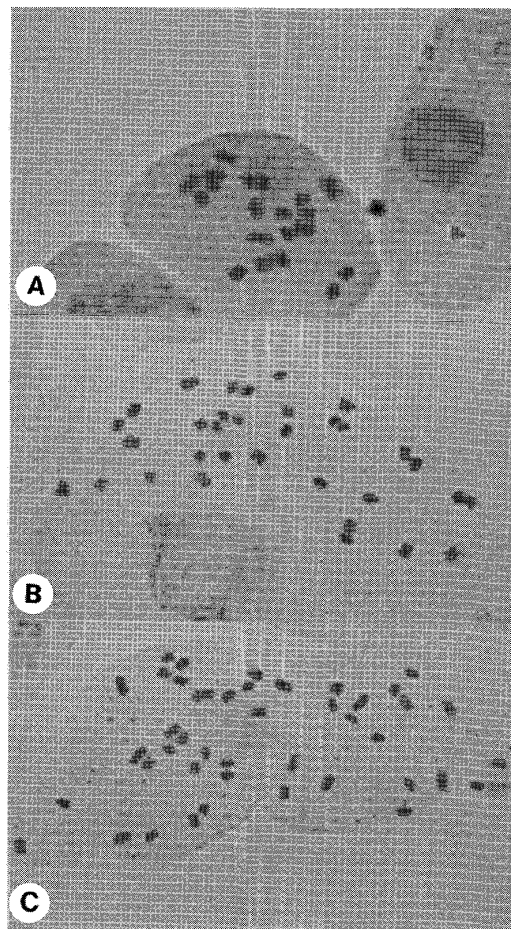
一方, 育種的手法によるレバウディオサイドA高含量品種育成に対し, 生化学的手法によってレバウディオサイドAを工業生産しようとする研究も盛んに行われてきた。最近の研究例を紹介する。東ら(1994)は, レバウディオサイドA高生産品種8号を用いて, まず植物体中におけるステビオサイドとレバウディオサイドAの分布について調査し, 植物体全体では茎頂に近い若い部分の葉, また葉に関しては十分に生長展開した葉で, 中央より先端部に多く含まれていることを明らかにした。さらに, 茎頂部の葉からステビオサイドにグルコース1分子を付加してレバウディオサイドAを生成する酵素, ステビア・グルコシルトランスフェラーゼを抽出, 部分精製し, これを材料として, 固定化酵素を作成, UDP-グルコースをグルコシル供与体, ステビオサイドを受容体とし, ステビオサイドへのグルコース付加によるレバウディオサイドAの生成系を確立した。この方法によっても, ステビアの葉中から抽出したステビオサイドをレバウディオサイドAへ変換できるが, 実際のレバウディオサイドA生産では, 糖転移反応という工程が入るため, コスト等の問題が生じる。したがって上述のような育種的手法の方が望ましいといえよう。



第3図 ステビア倍数体系統の育成経過 (1994~1996年)

ステビアの倍数性育種

著者らが、ステビアの倍数性育種に関する研究を開始したのは1994年7月であった。それ以前の倍数体作出に関する報告としては、懸濁培養細胞由来再生植物の中に四倍体が存在していたという報告 (Ferreira and Handro, 1988) と、培養中のサイトカニン処理により育成した多くの個体の中に四倍体が存在していたという報告 (村上・村上, 1991) 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といえよう。著者ら (畠・藤田, 1996) は、無菌化した二倍体3系統 (SMX1, SMX6およびKS) から摘出した生長点あるいは腋芽を含む茎切片を0.05%コルヒチン添加MS培地中で2~4日間 *in vitro* 処理する方法によって、効率的に四倍体を獲得した。これらはすべて、染色体数 $2n=44$ で、形態的には植物体各器官 (葉, 花, 気孔等) の大型化が観察された。得られた四倍体の甘味成分をHPLCにより分析した結果、ステビオサイドとレバウディオサイドAの含量およびその比は二倍体とほぼ同様で、レバウディオサイドA高含量四倍体2系統 (SMX1W, SMX6W) とステビオサイド高含量四倍体1系統 (KSW) に分類された (第1表)。ついで、著者ら (畠ら, 1998a および1998b; 来島・藤田, 1998) はこれら育成した四倍体3系統を母本として、二倍体3系統を交配し、得られた種子を播種し育成した個体から、2系統の三倍体植物を得た (第3図)。これら三倍体植物の



第4図 ステビア倍数体系統の体細胞染色体

A : SMX6 ($2n=22$)B : KSW-SMX6 ($2n=33$)C : KSW ($2n=44$)

第1表 ステビア倍数体系統の葉形と甘味成分含量

系統名	倍数性	染色体数	葉形	甘味成分含量 ^z (mg/g fw)		R A 比 ^y
				STV	RA	
M27	二倍体	$2n=22$	披針形	6.8	22.2	0.77
SMX1	二倍体	$2n=22$	披針形	8.3	24.5	0.75
SMX4	二倍体	$2n=22$	披針形	7.3	29.6	0.80
SMX4-3	二倍体	$2n=22$	披針形	4.3	20.6	0.83
SMX4-7	二倍体	$2n=22$	披針形	7.3	27.6	0.79
SMX6	二倍体	$2n=22$	披針形	6.1	23.5	0.79
KS	二倍体	$2n=22$	広披針形	17.8	0.0	0.00
KSW-SMX6	三倍体	$2n=33$	広披針形	17.3	0.9	0.05
SMX6W-SMX6	三倍体	$2n=33$	披針形	2.9	6.0	0.67
SMX1W	四倍体	$2n=44$	披針形	5.5	22.5	0.80
SMX6W	四倍体	$2n=44$	披針形	7.0	24.5	0.78
KSW	四倍体	$2n=44$	広披針形	19.4	0.0	0.00

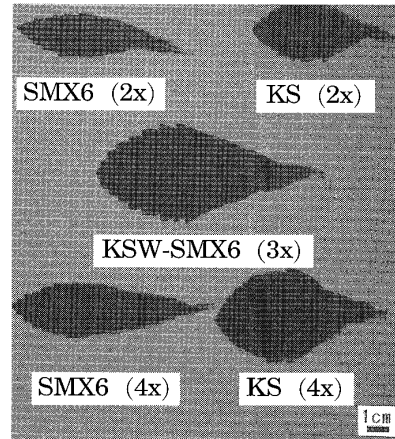
z STV: ステビオサイド RA: レバウディオサイドA

y RA比: RA/STV+RA (0.35以上がRA高含量品種とされている)

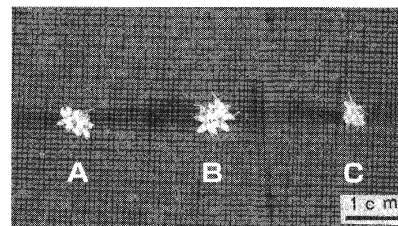
染色体数は $2n=33$ の個体が大部分であったが(第4図), 一部 $2n=32$ の異数体も観察された. ステビアの三倍体植物に関する報告は他に例が見当たらず, おそらく著者らの系統が最初の報告例といえよう. 形態的には, 四倍体同様, 三倍体2系統は二倍体に比較し葉や花器の大型化が観察され(第5図および6図), また葉形によって, 供試した系統が披針形と広披針形に分類されることが判明した(第1表). さらに, 甘味成分の分析の結果, 葉形と甘味成分含量には興味ある関係が示唆された. すなわち, 葉形が披針形の系統はレバウディオサイドA高含量であり, 広披針形はステビオサイド高含量であった. また, KSW(四倍体, 広披針形)とSMX6(二倍体, 披針形)の交配から得られた三倍体KSW-SMX6の葉形が広披針形で, しかもステビオサイド高含量を示したことは, 甘味成分と葉形の両形質に優劣関係のあることを示唆する(第1表). また, この葉形と甘味成分の連鎖関係は今後育種を進めていく上で, 肉眼で確認できる形質として注目されるであろう. また, 予備実験的に行った収量調査の結果, 三倍体(KSW-SMX6)の収量は, 供試した二倍体7系統の約1.5~2倍であり(第7図), 特にこの多収性は, 開花期の晩生化と密接に関連しているものと推察された. このように, 現在, 著者らの研究は実用的な育種段階へ進みつつあり, 倍数性育種を利用したステビア新品種育成への期待が高まっている.

今後の展望

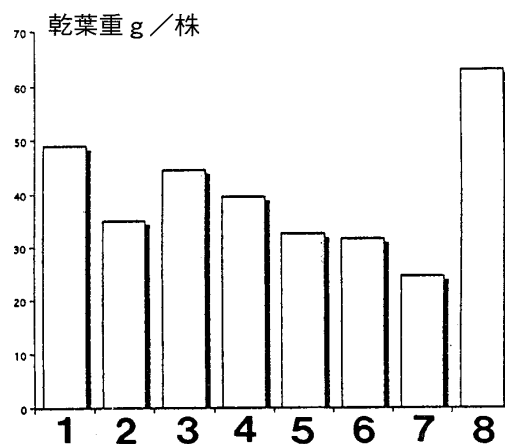
西(1983)によれば, ステビアが1970年代に日本に導入されてから, 各県の農業試験場で栽培試験が行われ, 普及が進められた結果, 一時期は南九州(熊本, 宮崎, 鹿児島県)を中心に, 20道県で栽培されるようになったという. しかし, 現在では, 海外での生産が主流であり, 主要生産地は中国となっている(化学工業日報, 1997). 日本における栽培減少の原因は, まず第1にステビアの生育適温(平均 20°C 以上)との関係があげられ, 経済栽培が比較的平均気温の高い西南暖地でなければ困難なこと(株の越冬が難しい), 第2には収穫以降の生産コストの問題であり, 海外と比較した場合かなりのコスト高になる(住田, 1977). そのため, 一時のステビアに対する関心の高まりが急速に下降している. しかし, 1995年にアメリカでステビアが食品添加物として認可されてから, ダイエットに悩む欧米人の市場がにわかに注目されるようになった. そのため, 開発途上国を中心にステビア栽培の可能性が盛



第5図 ステビア倍数体系統の葉形と大きさ
 葉形: 披針形(SMX6:二倍体および四倍体)
 : 広披針形(KS:二倍体および四倍体, 三倍体: KSW-SMX6)
 大きさ: 倍数体系統は二倍体に比較し, 大型化している.



第6図 ステビア倍数体系統の花の大きさ
 A: KSW(四倍体)
 B: KSW-SMX6(三倍体)
 C: SMX6(二倍体)



第7図 ステビアの乾葉収量 (1997)
 1: SMX1 5: SMX4-7
 2: SMX6 6: KS
 3: SMX4 7: M27
 4: SMX4-3 8: KSW-SMX6
 (No.1~7:二倍体 No.8:三倍体)

んに論じられるようになった。住田（1997）によれば、南米ボリビア政府は、持続的農業生産と小農対策として商品性の高いステビアの導入・定着化を図り、農業経営体の収益性の向上および経済・社会の安定・発展を計画しているという。また、日本食糧新聞（1998）によれば、東南アジアのタイにおいても、すでにステビアの栽培から抽出までのシステムを日本の企業が確立したとの情報が提供されている。このように、温度的にステビアの適地といわれる地域での栽培化を目指した動きが急を告げている。しかし、ここで留意しておかなければならない問題点を指摘しておきたい。まず第1は、品種としての均一性の問題である。現在、栽培の中心的存在である中国でも、レバウディオサイドA高含量品種の生育が不均一で、かつステビオサイドの高い系統が混在しているため、採種時に交配が起こり、ステビオサイド含量の高い品種に置き換わってしまった例もあるという。この問題の解決法の一つとしても、著者らの三倍体利用による品種育成は興味もたれるところである。なぜならば、三倍体自体が一種のヘテロシス効果で生育も旺盛で病気にも強く、さらに遺伝的に不稔なため種子が形成されず、落ちこぼれた種子の雑草化も防止できるからである。三倍体ゆえに、繁殖上の問題点も指摘されるが、近年のバイオテクノロジー利用による大量増殖技術の進展（Takayama and Akita, 1994）がそれらを補うであろう。また、第2には、生態特性の問題である。ステビアは開花期前の葉を収穫の対象としており、開花期の早晩は収量に重大な影響を及ぼす。今後発展が期待されるボリビアやタイにしても低緯度地帯であり、日長の短い地域である。ステビアは短日植物のため、これらの地域での栽培では短日非感応性品種育成が不可欠となろう。その意味でも、晩生化した著者らの三倍体は有望であろう。

以上概説の通り、今後ステビアの需要は国際的に大きく伸びると予想される。それゆえ、当然多種多様な品種の開発が要望されてくるであろう。もちろん、東ら（1994）が指摘しているように、ステビア葉中に蓄積される多量の甘味成分が植物自身にとってのどのような意味があるのか、またキク科植物の中でも、なぜステビアだけにこの性質が備わっているのかなど、植物体自身の解決すべき基礎的な問題点も多いのも事実である。それら根本的な問題の解決も含めて、さまざまな角度からのステビア研究の一層の進展が望まれる。著者らは、倍数性育種の研究を進めて行くと同時に、細胞工学的手法を利用したステビア育種も視野に入れ、とくにプロトプラ

スト培養では、カルス誘導に成功し、植物体再分化条件の検討を始めている。このように、ステビア育種の分野でも、従来の育種法とニューバイオテクノロジーの技術を融合させた研究が21世紀に向けて主流となってくるであろう。また甘さがショ糖の300倍、しかも低カロリーという時代にマッチしたステビア甘味成分の需要が急増している状況を考えれば、研究の国際化・国際交流も重要なポイントとなるであろう。

引用文献

- 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.
- 明石春雄, 1977. 新天然甘味料ステビア. 発酵と工業. 35: 1027-1029
- 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.
- 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.
- 島 修一・藤田 智, 1996. 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. 恵泉女学園短期大学園芸生活学科研究紀要. 28: 21-28.
- 島 修一・藤田 智・四方恒生・渡辺一也, 1998a. 三倍体ステビア. 公開特許公報(A): 591-594. (特許出願番号: 特開平10-113086) 日本国特許庁.
- 島 修一・四方恒生・藤田 智, 1998b. 天然甘味料作物ステビアの三倍体系統の育成とその特性. 熱帯農業. 42 (別2): 49-50.
- 東 四郎・阿部美紀子・内海俊樹・藤崎香里・中山法義・西 保則・南谷俊治, 1994. ステビアのグルコシルトランスフェラーゼによるステビオサイドからレバウディオサイドAへの変換. 鹿児島大学理学部紀要(地学・生物学). 27: 199-207.
- 化学工業日報, 1997. 低カロリー甘味料新ソース開拓が課題・ステビア. 化学工業日報(1997. 10. 9.) p6. 化学工業日報社.
- 川谷豊彦・金木良三・田部 猛, 1973. ステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) の栽培について. 熱帯農業. 17 (2): 125-130.

- 川谷豊彦・金木良三・田辺 猛・坂本征則・村上國子・田中 治, 1978. ステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) の栽培について. 第4報窒素施肥および肥料三要素の効果. 熱帯農業. 21 (3・4) 173-178.
- 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.
- 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.
- 来島泰史・藤田 智, 1998. 甘味料作物ステビアの倍数体系統の育成と栽培特性. 関東・甲信越地区大学附属農場協議会第63回研究集会講演要旨集: 5-6.
- 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.
- Kusama, S., I. Kusakabe, Y. Nakamura, S. Eda and K. Murakami, 1986. Transglucosylation into stevioside by the enzyme system from *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem. 50: 2445-2451.
- 宮川秀樹・藤田洋子・藤岡尚美・神田博史・山崎和男, 1984. ステビアの組織培養と成分に関する研究 (第1報). 生薬学雑誌. 38 (1): 12-18.
- 宮崎幸男・渡辺宏之, 1974. 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: 154-157.
- 宮崎幸男・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: 158-163.
- 水上 元・椎葉恵子・井上 智・大橋 裕, 1983. ステビアの生育ならびにステビオサイド生成におよぼす栽培温度の影響. 生薬学雑誌. 37 (2): 175-179.
- 村上 章, 村上邦睦, 1991. 植物生長ホルモンによる植物人為4倍体の作出方法, 日本国特許庁公開特許公報, H2-242623.
- 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.
- 日本食糧新聞, 1998. マリーコーポレーションが10月から天然ステビア甘味料「スーパーアール」発売. 日本食料新聞 (1998. 9. 21.). 日本食糧新聞社.
- 西 孝三郎, 1983. ステビア, p.261-268. 佐藤庚ら著. 工芸作物学. 文永堂. 東京.
- Shibata, H., S. Sonoke, H. Ochiai, H. Nishihashi, and M. Yamada, 1991; Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiol. 95:152-156.
- Shibata, H., Y. Sawa, T. Oka, S. Sanoke, K. Kim and M. Yoshioka, 1995. Steviol and steviol glycoside: Glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni - Purification and partial characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics. 321 (2):390-396.
- Sugawara, F., N. Yamamoto and O. Tanaka, 1994. Plant regeneration in vitro culture of leaf, stem and petiole segments of *Actinidia polygama* Miq., Plant Tissue Culture Letters. 11:14-18.
- 住田哲也, 1977. ステビアの栽培生産技術に関する諸問題. 食品開発. 12 (3) :18-23.
- 住田哲也, 1980. *Stevia rebaudiana* Bertoni の定着化に関する研究. 農事試験場研究報告. 31:1-71.
- 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.
- 住田哲也, 1997. 南米ボリビアにおけるステビア栽培の可能性と今後の課題. 食品化学新聞. 1661号. p7. 食品化学新聞社
- Takayama, S and M. Akita, 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 39 (2) : 147-156.
- 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.