

琉球大学学術リポジトリ

パイナップル葉における内生 ABA の同定, 定量法の確立およびその含量の日変化

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): アブシジン酸, 気孔開閉, CAM植物, パイナップル キーワード (En): Abscisic acid, Crassulacean Acid Metabolism, Pineapple, Stomata 作成者: 川満, 芳信, 前田, 英樹, Kawamitsu, Yoshinobu, Maeda, Hideki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3696

パイナップル葉における内生ABAの同定, 定量法の確立 およびその含量の日変化

川満芳信*・前田英樹*

Yoshinobu KAWAMITSU and Hideki MAEDA: Identification and quantification of endogenous ABA and the diurnal changes in ABA levels in pineapple plants

キーワード : アブシジン酸、気孔開閉、CAM植物、パイナップル

Key Words : Abscisic acid, Crassulacean Acid Metabolism, Pineapple, Stomata

Summary

We developed the assay method for the abscisic acid (ABA) content by means with GC/MS and applied the method to measure the diurnal changes in pineapple, crassulacean acid metabolism plant. The stomata of pineapple leaves opened during night time (phase-1), closed during day time (phase-3), and reopened during late afternoon (phase-4). The ABA levels in phase-3 were increased as compared with in phase-1 and phase-4. It was suggested that the ABA content was in part contributing the stomatal control in crassulacean acid metabolism plants.

緒 言

沖縄県の主要作物の一つであるパイナップルは、一般に生長が遅く、収穫まで約2年を要する。それはこの植物が特異的なCAM(Crassulacean Acid Metabolism)型光合成を行うからである。CAM植物は、昼間にガス交換をほとんど行わず夜間にCO₂吸収するという、一般的な高等植物とは全く逆のガス交換の日変化を示す。Osmond¹¹⁾によれば、典型的なCAM植物のCO₂吸収の日周変動パターンは、夜間に吸収が見られるPhase 1, それに続く光照射直後の高いCO₂吸収期のPhase 2, その後CO₂吸収が急激に減少し吸収がほとんど見られないPhase 3, 明期後半に再び吸収が見られるPhase 4という4つの相に分けられる。このような植物のガス交換は、主に気孔の開閉によってもたらされており、パイナップルの生産性を高める上で、気孔開閉機能の制御は重要な要素の一つであると考えられる。

気孔は植物と大気環境の接点として、光合成による大気中のCO₂の吸収、植物からの水蒸気の放出(蒸散)など植物にとって重要な生理機能を制御している。気孔の開閉は孔辺細胞の容積変化によることはよく知られているが、この容積変化はK⁺の濃度により孔辺細胞の膨圧が変化するために起こる⁹⁾。K⁺の濃度により気孔の開閉は調節されるが、このK⁺の濃度は光、水、CO₂、植物ホルモンなど様々な要因により制御されており、気孔は複雑な開閉調節機構を持っている¹⁷⁾。パイナップルは昼間気孔を閉じ、夜間に開くCAM植物特有のガス交換を示すが、この気孔開閉の作用機構についてはまだ不明

* 琉球大学生物生産学科

な部分が多い。CAM植物の気孔開閉を司る各要因のうち、植物ホルモンに、中でも最も気孔開閉に関与すると言われるアブシジン酸(ABA)に着目すると、その働きについてはあまり知られていない¹⁷⁾。また、CAM植物における生体内でのABA含量の調節についてもほとんど明かにされていない。従って、CAM植物においてABA含量を定量し、生体内でABA含量がどのように変動するかを知ることは、CAM植物の気孔開閉の作用機構を明らかにする為に極めて重要である。しかし、内生ABAは含有量が微量で定量が困難であり、抽出、精製に長時間を要するため、その間ABAの消失、変化を伴うなどの問題がある。定量法については高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーなどを用いて行われているが多量の試料を必要とするなど、効率が悪く改良しなければならない問題がある。

そこで本研究では、まずパイナップルの葉からABAの抽出、精製法を確立し、ガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)により同定を行った。また、GC/SIM(Serekuto Ion Monitoring)法により定量法を確立し、ABA含量のパイナップルの葉における日変化を測定し、ガス交換との関連性を検討した。

材料及び方法

供試材料：実験に用いた材料は、パイナップル(*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. N67-10)であった。材料は1994年4月14日に、沖縄県農業試験場名護支場より入手したえい芽苗を、赤色土(国頭マーヅ)を詰めた1/2000aワグネルポットに植え付け、農学部内ガラスハウスにて育成した。灌水は土壌の乾き具合を見て適宜行った。施肥は液肥を週1回の割合で1ポット当り500ml与えた。液肥の成分は、6mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 12mM KNO_3 , 2mM KH_2PO_4 , 2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 μM H_3BO_3 , 10 μM $\text{MnPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 μM H_2MoO_4 , 0.1mM FeNa-EDTAであった。

サンプリングは、健全な個体の完全展開葉を、パイナップルのガス交換特性を基礎に、夜間の CO_2 吸収期である21:00(Phase 1), 昼間の CO_2 吸収が見られない11:00(Phase 3), 夕方再び CO_2 吸収が見られる17:00(Phase 4)にそれぞれ行った。サンプルは、直ちに液体窒素で凍結固定し、分析するまで -40°C の暗所で保存した。

抽出法：抽出から定量までの過程を第1図に示した。パイナップルの葉試料を生重1g当り10mlの80%メタノールと共にワーリングブレンダーを用いて磨砕した。80%メタノールには酸化防止剤として2,6-ditert-butyl-4-methylphenol(BHT)を溶液1リットル当り40mg加えた。磨砕液は 4°C の暗所条件

で12時間放置した後、ミラクロスで搾汁液をしぼり取った。残渣に同量の80%メタノールを加え約10分間けんたくした後、ミラクロスでしぼり取った。搾汁液をあわせてブフナー漏斗(濾紙, ADVANTEC No.2)で吸引濾過した。得られた濾液はロータリーエバポレーターを用いて 35°C 以下で約10mlになるまで減圧濃縮した。

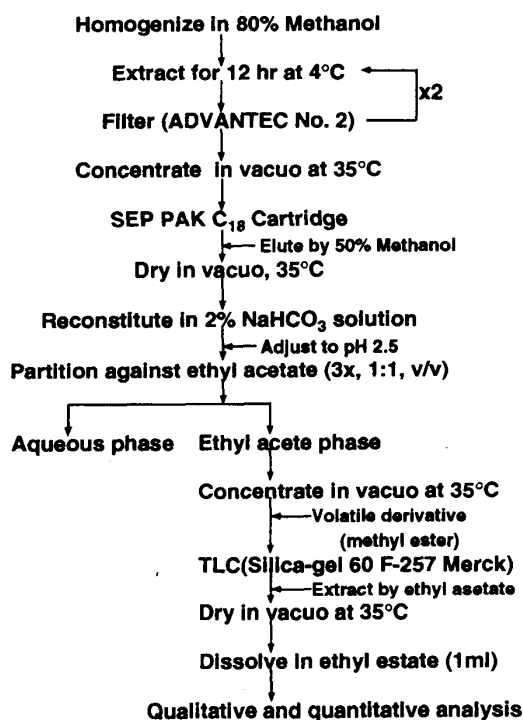


Fig. 1. Flow chart for the purification of ABA from pineapple extract.

精製法: 濃縮水溶液(約10ml)をSEP-PAK C18 カートリッジカラム(Waters Associates)にかけ, 50%メタノール3mlで溶出した. カートリッジカラムは, 使用前に2mlのエタノールを流し, 続けて5mlの蒸留水を流して平衡化した. 溶出液を減圧乾固した後, 残渣を2%NaHCO₃ 50mlに溶かし, 水溶液を5N HClでpH2.5に調製して水溶液と同量の酢酸エチルで三回分配した. 酢酸エチル層を集めて減圧濃縮し, 濃縮液を誘導化した後薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開した. 薄層プレートはシリカゲル60 F-257厚さ0.25mm(メルク社製)を使用し, 展開はトルエン:酢酸エチル:酢酸=25:15:2の混合溶媒を用いて飽和展開槽内にて行った. マーカーとして(±)-cis, trans-Abscisic Acid Methyl Ester (SIGMA化学, 以下(±)-ABA-Meとする)の酢酸エチル溶液(10ng・μl⁻¹)をあらかじめ展開した. 展開後マーカーのプレートに5%硫酸エタノールを散布し, 120°Cまで加熱すると黄色に発色して365nmの紫外線照射下で特徴的な黄緑色の蛍光を示した. このスポットを(±)-ABA-Meとし, Rf値を3.5-4.5とした. サンプルのプレートを展開後, Rf値3.5-4.5の部分の吸着剤を削り取って酢酸エチル10mlを加えよく攪はんした後, ガラスフィルター(11 G3.5)を用いて濾過した. 得られた酢酸エチル溶液は減圧乾固し, 残渣を1mlの酢酸エチルに溶かして分析用サンプルとした.

誘導化: ABAはそのままではガスクロマトグラフィーで分析できないため, ジアゾメタンを用いてABAをメチルエステル化した. ジアゾメタンの調製はKOH 1.2gを水2mlに溶かしてエタノール4mlを加えた溶液に, N-methyl-N-nitroso-p-toruen-sulfon-amide(和光純薬)4.3gをエーテル25mlに溶かしたものを加え60-70°Cの湯浴で暖めてジアゾメタンとエーテルを蒸留させた. これを別に氷冷しておいた蒸留エーテルにトラップさせてジアゾメタンのエーテル溶液を得た. サンプルにこのジアゾメタンのエーテル溶液を適量(5-7ml)加え, よく攪はんした後10分間放置して反応させた. なお, ABAは光照射によりcis-ABAが2-trans-ABAに変換される. 従って, 抽出, 精製過程でcis-ABAからtrans-ABAへの変換を防ぐため全行程は暗条件で行った.

同定法: 同定はガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS, 島津GCQP1100EX)を用いて行った. GCのカラムは, キャピラリーカラムDB-1(30m×0.25mm J&W Scientific Inc.)を用いた. 移動相にはヘリウムガスを用いて流圧を50kPaに設定した. サンプル注入口温度は270°Cのスプリットレスモードで行い, カラム温度は, 初期設定温度を80°Cにして2分後に30°C/minの割合で250°Cまで上げる昇温分析で行った. イオン化法には電子衝撃イオン化法(EI)と, イソブタンを用いた化学イオン化法(CI)の二種類の方法で行った. スタンドードとして(±)-ABA-Meの酢酸エチル溶液を用いた. 同定用サンプルとして葉試料(生重約500g)を上記の方法で抽出, 精製し誘導化したABAとスタンドードをそれぞれ分析し, EI, CI法により得られた二種類のマススペクトルを比較, 検討し同定した(第2, 3図).

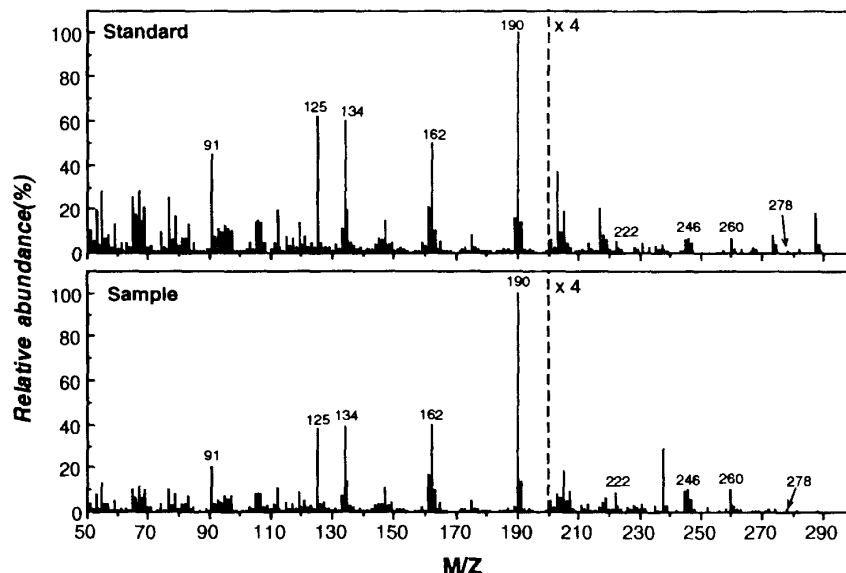


Fig. 2. Relative abundance of ABA with EI method for the standard and sample from pineapple leaves.

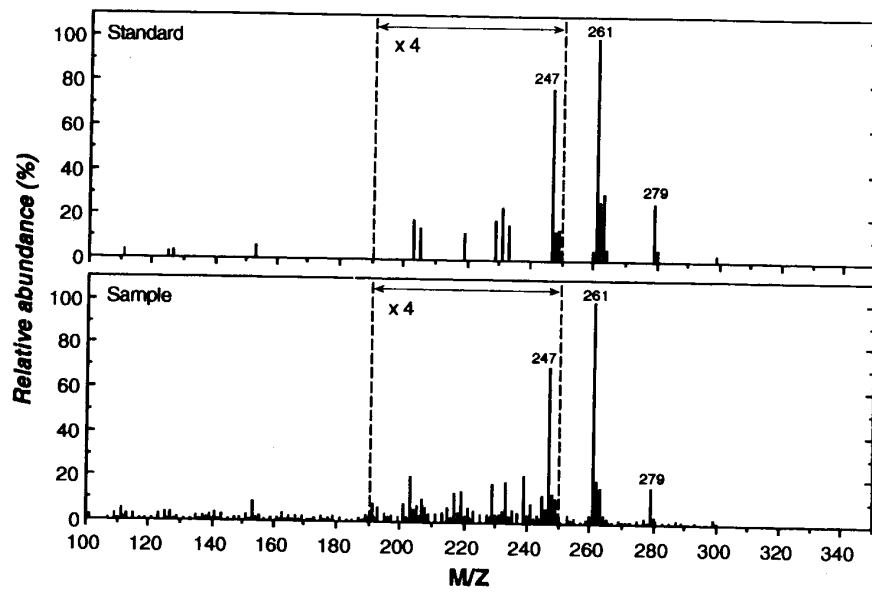


Fig. 3. Relative abundance of ABA with CI method for the standard and sample from pineapple leaves.

定量法：パイナップルの葉(生重10g)を上記の方法で抽出，精製を行い定量用サンプルとして分析した。定量分析には同定法と同様の機種と条件でイオン化法はEI法で行い，GC/SIM法により行った(第4図)。スタンダードには同定法と同様の(±)-ABA-Meの酢酸エチル溶液を使用し，濃度とマスクロマトグラフィーのピーク面積により検量線を作成した。

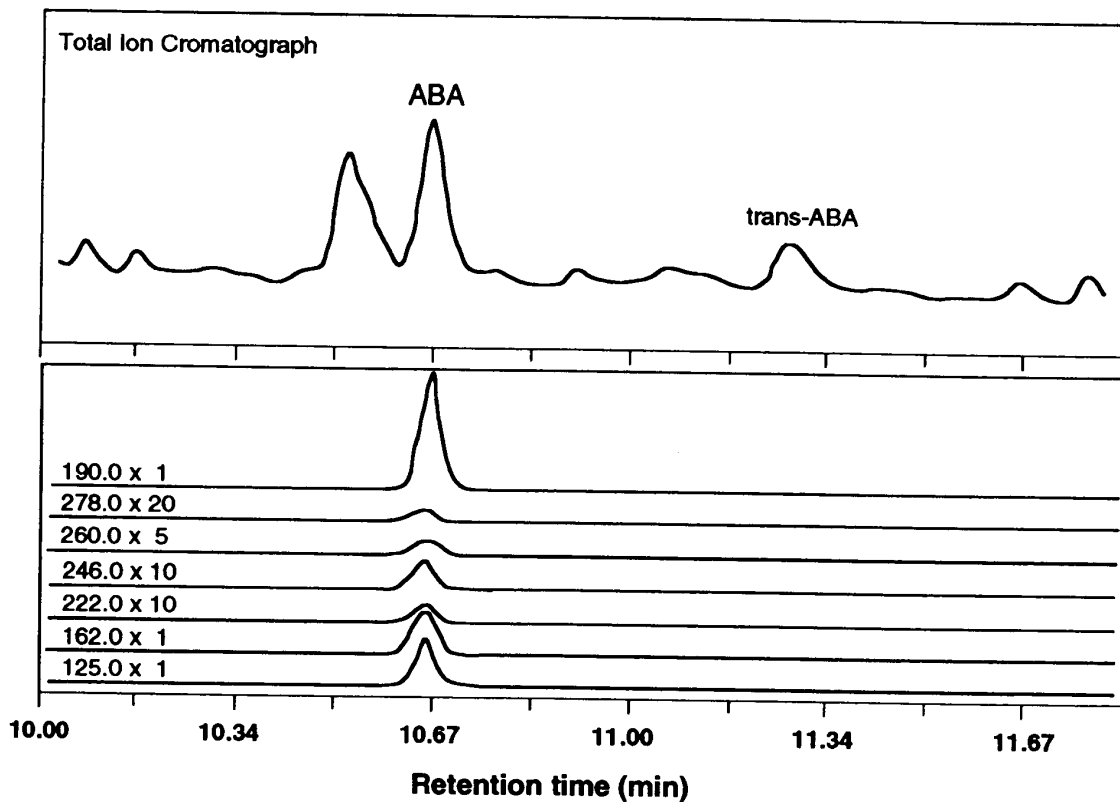


Fig. 4. Chromatographs for the principal ion of ABA with EI method.

回収率調査：本精製法でのABAの回収率調査は抽出液，濃縮液，SEP-PAKカラム溶出液，分配後の酢酸エチル溶液の4つの溶液にそれぞれ(±)-ABA(和光純薬)10ngの添加区と無添加区を設け回収率を検討した。この回収率調査の手順の概略は第5図に示した。

結 果

1. 抽出, 精製法

葉試料を80%メタノールと共に磨碎し，12時間浸漬したところ磨碎液が変色していた。これは主に磨碎液中の物質が空気酸化を受けたものと思われたため，防酸化剤としてBHTを80%メタノール1リットル当り40mg加えたところ変色は見られなかった。

次に，減圧濃縮により得られた濃縮水溶液をポリビニルポリピロリドン(PVPP)カラムにかけ，溶出液を酢酸エチルと2%NaHCO₃により溶媒分配を重ねて酢酸エチル可溶性酸性分画を得た後にTLCにより精製して分析した。しかしこの方法では回収率が低く，再現性も悪いため定量法としては問題が残った。これはPVPPカラムでは回収率が低く，また不純物を効果的に除去できていないために分配過程で多量の共存物質がABAの分配に影響を与えたためだと予想された。またこの精製法には長時間を要しこの間にABAの変質，分解が起こった可能性もあった。この点を改良するため濃縮水溶液を短時間で効率よく分離，精製することができる逆相分配型のオクタデシルシリカゲル(ODS)を充填したSEP-PAK C18 カートリッジカラムを使用し，大幅な回収率，再現性の向上を図った。

次に，TLCにより精製したABAを別に調製したジアゾメタンのエーテル溶液によりメチルエステル化して分析したところ多くのピークがABAによるピークと重なっていることが解った。これは，ジアゾメタンの調製過程に生じた副産物や共雑物が影響したためだと予想され，この点を改良するためにTLC精製前にABAをメチルエステル化してABA-MeとしてTLCにより単離した。

2. 同 定

GC/MSによる同定はまずGCによるリテンションタイム10.6(min)にスタンダードのピークが見られ，パインアップルの葉より抽出したサンプルにもほぼ同様なリテンションタイムにピークが見られた。従ってこのリテンションタイムでのスタンダードとサンプルのマススペクトルを検討した。EI法によるマススペクトルではスタンダードとサンプルの双方で分子イオン(m/z 278 M⁺)によるピークは小さいもののm/z190(M-88)がベースピーク(準安定イオン)となっており，脱水体のm/z260(M-18)，脱メタノール体の246(M-32)やその他のABA-Meの代表的なフラグメントイオンであるm/z222(M-56)，162(M-114)，125(M-153)もほぼ同様なピークを示していることがわかった(第2図)。しかし，EI法では

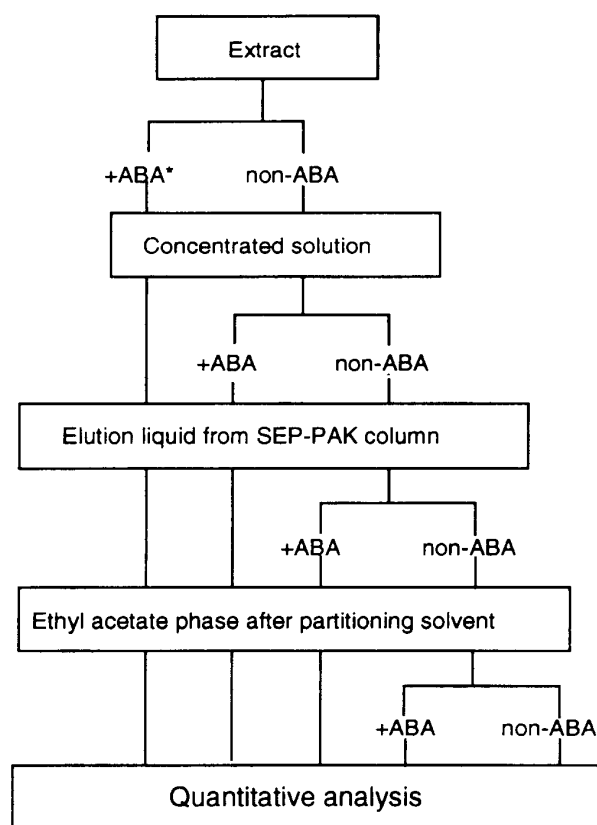


Fig. 5. Flow chart for the recovery of (±)-ABA in purification process.

*Add (±)-ABA as the internal standard.

分子イオンがほとんど検出されなかったため、イソブタンを用いたCI法によりマススペクトルを再検討した(第3図)。CI法によるマススペクトルではスタンダードとサンプルの双方で脱水体の m/z 261(MH-18)がベースピークとなっており、分子イオンピークである m/z 279(MH⁺)や脱メタノール体の m/z 247(MH-32)もほぼ同じ割合で検出された。以上の点においてスタンダードとサンプルを同定した(第1表)。

3. 定量法

EI法でのマススペクトルにより m/z 190が準安定イオンであることが確認され、この m/z 190のイオンを選択的にモニタリングするGC/S

IM法を用いて定量分析を行った(第4図)。スタンダード(±)-ABA-Meの濃度を

4. 回収率調査

本研究の精製過程における(±)-ABAを用いたABAの回収率は、全過程で67.5%であった。また、ABAはSEP-PAKカラムによる精製で7.8%、TLCによる精製で11.7%消失していることも明らかになった(第2表)。

5. 定量結果

本定量法を用いてパイナップルの葉のABA含量を測定したところ、明かな日変化が見られた(第3表)。パイナップル葉のABA含量は、Phase 3において最も高くなり、Phase 1, Phase 4の順に低い値を示した。この結果は、気孔拡散伝導度の日変化の結果と対応していた。

しかし、気孔が開いているPhase 1, Phase 4においてABA含量に差が認められ、ABA以外の関与が示唆される。

Table 1. ABA identified by GC/MS analysis with methyl ester in the purified extract in Pineapple leaves.

	Ionization	Rt (min)	Principal ions and relative abundance (% of base peak)
Standard	EI	10.65	278(M+0.4), 260(3.1), 246(2.8), 222(2.0) 190(100), 162(36.0), 134(33.6), 125(31.3)
	CI (iso-C ₄ H ₁₀)	10.66	279(MH+25.9), 261(100), 247(19.2)
Sample	EI	10.65	278(M+0.5), 260(2.6), 246(2.6), 222(2.3) 190(100), 162(40.6), 134(39.4), 125(39.0)
	CI (iso-C ₄ H ₁₀)	10.68	279(MH+16.1), 260(100), 247(17.9)

Table 2. Recovery in the (±)-ABA analysis.

Process	Recovery (%)
Total	67.5±3.2
After in vacuo	71.1±4.6
After SEP-PAK C18	78.9±2.8
After partition against ethyl acetate	88.3±1.3

Table 3. Comparisons of ABA content among the phases in pineapple leaves.

Sampling Time	ABA content (ng·g ⁻¹ FW)	
	Actual value	Theoretical value
21:00 (Phase 1)	20.1±7.1	26.6*
11:00 (Phase 3)	34.6±9.8	45.8
17:00 (Phase 4)	1.6±0.4	2.1

* Calculated based on the recovery.

考 察

本研究では、パインアップルの葉から抽出したABAの同定, 定量法を確立し, 更に, ABA含量の日変化を測定し気孔開閉との関連を検討した。

ABAは比較的低極性の弱酸性物質(pKa4.7)であり, その抽出, 精製の際にはいくつか注意すべき点がある。例えば, 植物は萎縮すると, その水ストレスの程度に応じてABAが増加する⁴⁾, 光によって2位二重結合が異性化し2-trans体となる, 条件によっては空気酸化を受ける, 複合型のABA代謝物質が抽出過程に酵素により加水分解されることがある¹⁰⁾ などである。従って, 本実験において葉試料は採取後直ちに液体窒素で凍結固定し, 水ストレスによるABAの増加を防いだ。また, 光による異性化を防ぐため全抽出, 精製過程は暗条件で行い, 空気酸化を防ぐために防酸化剤としてBHTを使用した。本実験で用いたメタノールには酵素を失活させる作用もあるため, 抽出過程におけるABAの代謝をある程度防ぐことができたと思われる。

一般に, ABAの精製では抽出液を濃縮後, 濃縮水溶液をHClやKOHを用いてpH調製し有機溶媒を用いて順次分配する。その後, 数種のカラムクロマトグラフィーによりABAを精製して単離する¹³⁾。しかし, 複合型ABAの中でABA-1-O-β-グルコシドエステル(ABA-GE)などの糖結合型代謝物質は酸や塩基により容易にABA-Meとグルコースに分解することが確認されている⁸⁾。従って, pH調製の時点でABA-GEがABA-Meとグルコースに分解され定量に影響する可能性があった。しかしABA-GEなどの糖結合型代謝物質は高極性であるため, 物質の極性の違いにより精製するSEP-PAKカラムによりpH調製前にABAとABA-GEを分離できたと推察され, ABA-GEによる影響はないと考えられる。カラム充填剤のうち活性炭³⁾, アンバーライト¹³⁾, ポリビニルピロリドン¹⁴⁾などは不純物を大幅に減ずることができる反面, ABAの回収率が低いため定量目的の場合問題となる。近年用いられているセファデックスLH₂Oや, ゲル濾過剤¹³⁾は優れた分離能と回収率を持つが, 分離に長時間を有し簡便性に問題があった。SEP-PAKカラムは分離能こそセファデックスLH₂Oやゲル濾過剤に劣るものの極めて短時間に効率よく試料を精製できるため定量目的でこれを用いることは有効だと考えられる。

溶媒分配を行う場合, 目的の物質の分配係数が重要となるが, Cihara²⁾によるとpH2.5の水と酢酸エチルにおけるABAの分配係数は10.0であり, 1回の分配でABAは水層に約9%残る。また, 多量の共存物質がABAの分配に影響を与えると予測できるため, 本研究では分配を3回行うことによりほとんどのABAを酢酸エチル層に移行することができた。

本精製法によるABAの回収率の低下の原因として, まず, 減圧濃縮過程にABAが分解された可能性がある。またABAは多数の官能基があるため精製過程に反応, 変質したことも考えられる。実際に Hirai³⁾は, 8'-ヒドロキシABA(HO-ABA)の存在を明かにし, ABAが抽出過程に変化することを示唆している。また, TLCによる精製過程にある程度の空気との接触は避けられず, ABAがこの間に空気酸化された可能性も考えられる。このため, これらの問題点を今後検討し改良する必要がある。

本研究において, パインアップルの葉から抽出したABA-MeのEI法によるマススペクトルは, Tietz¹⁶⁾が報告しているマススペクトルとほぼ一致した。また, CI法においても, Takeda¹⁵⁾が報告しているマススペクトルとほぼ一致している。以上の点においても本研究におけるABAの同定は再現性の高いものであると考えられる。

ABA含量は, Phase 3, Phase 4において比較すると, 気孔が閉じているPhase 3において高く, 開いているPhase 4において低くなることがわかった。また, Phase 1とPhase 3を比較した場合, Phase 3において増加していることが明らかになった。以上より, Phase 3における気孔閉鎖にABA含量が関与していることが示唆される。

ABAが気孔を閉鎖させることは, これまで様々な報告により立証されている。小葉田⁶⁾は, 切断

した水稻葉身の蒸散流により各種濃度のABA溶液を吸収させ、ABA濃度を高くすると気孔伝導度が低下することを確認している。CAM植物においてもJewerら⁵⁾が、コダカラベンケイソウの表皮を各種濃度のABAを含む緩衝液に漬け、ABAをある濃度以上に設定すると気孔開度が急速に低下することを報告している。

また、本研究で得られた結果のうち、Phase 3とPhase 4の間にABA含量の急激な低下がみられた。この原因としてZeevaartら¹⁸⁾は、放射性同位体でラベルした(2-14C)-ABAを植物に投与した場合、ラベルしたABAがファゼイン酸(PA)やデヒドロファゼイン酸(DPA)などのABA代謝物質に代謝されることを確認している。従って、本研究においてもPhase 3において増加したABAがPhase 4に至るまでに急激に代謝されたとも考えられるため、今後、ABAの代謝物質であるPAやDPAも同時に測定する必要がある。

本研究でパイナップルの気孔開閉にABA含量が影響を与えている可能性が大きいことが示された。しかし、気孔が開いているPhase 1、Phase 4においてABA含量に大きな差があること、Phase 1、Phase 3においての変化が小さいことから、気孔閉鎖にはABA含量だけでなく何か他の要因も関与していることも考えられる。これに関連して近藤⁷⁾は、ABAによる気孔開度及び孔辺細胞の浸透圧がpHにより変化することを示唆している。また、島崎¹²⁾は、様々な光による気孔開閉を孔辺細胞のクロロプラストを用いて調査し、光が気孔開閉に重要な役割を占めていることを報告している。また、葉内CO₂濃度により気孔のABA感受性が変化する可能性¹³⁾も示唆されている。今後、これらの要因とABA含量との関連性を検討することが、パイナップルの気孔開閉の制御要因を解明する上で重要であると考える。

摘 要

パイナップルの葉の内生ABAの抽出、精製法を確立し、サンプルを同定、定量する方法を確立した。また、CAM植物であるパイナップル葉のABA含量に日変化があるか調べた。得られた結果は以下のように要約できる。

1. パイナップルの葉におけるABAの抽出、精製法が確立できた(第1図)。
2. サンプルのABA-Meと、スタンダードの(±)-ABA-MeをGC/MSの2種類のイオン化法により同定した(第2, 3図)。その結果、GCによるリテンションタイムが10.6minであり、ベースピーク(準安定イオン)がm/z190であることが確認された(第1表)。
3. このm/z190のイオンをGC/SIM法により測定し(第4図)、スタンダードの濃度とm/z190によるマスプロトグラフのリテンションタイム10.6におけるピーク面積が比例することが確認できた。従って、スタンダードの濃度とピーク面積により検量線を作成した。
4. 本精製法における内部標準物質(±)-ABAの回収率は67.5%であり、ABAが精製過程である程度消失していることが認められた(第2表)。
5. パイナップルの葉におけるABA含量を測定した結果、明かな日変動が見られた(第3表)。これは気孔伝導度の日変化とほぼ対応していた。

以上より、CAM植物の気孔の日変化には、ABAも関与していることが示唆された。

引用文献

1. Anderson, B.E., J.M. Ward and J.I. Schroeder 1994. Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelia* guard cell. *Plant Physiol.* 104:1177-1183.
2. Ciha, A.J., M.L. Brenner and W.A. Brun 1977. Rapid separation and quantification of

- abscisic acid from plant tissues using High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiol.* 59: 821-826.
3. Hirai, N., H. Fukui and K. Koshimizu 1978. A novel Abscisic acid metabolite from seeds of *Robinia pseudacacia*. *Phytochemistry* 20:1867-1869.
 4. Jackson, G.E., J. Javine, J. Grace and A.A.M. Khalil 1995. Abscisic acid concentrations and fluxes in droughted conifer saplings. *Plant Cell Environ.* 18:13-22.
 5. Jewer, L.D. Incoll and G.L. Howarth 1981. Stomatal responses in isolated epidermis of the Crassulacean Acid Metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perr. *Planta* 153: 238-245.
 6. 小葉田享・原 慎一 1993. 水稻葉身へのABA溶液吸収にともなう気孔閉鎖反応. *日作紀* 62(別1): 142-144.
 7. 近藤矩朗 1986. ABAによる気孔開閉の調節. *植物の化学調節* 21:25-34.
 8. Koshimizu, K., M. Inui and T. Mitsui 1968. Isolation of (+)-Abscisyl- β -D-glucopyranosid from immature fruit of *Lupinus Luteus*. *Agr. Biol. Chem.* 32:789-791.
 9. Meidner, H. and T.A. Mansfield 1968. *Physiology of stomata*. McGRAW-HILL Publishing Company Limited.
 10. Milborrow, B.V. and R. Mallaby 1975. Occurrence of methyl (+)-abscisate as an artefact of extraction. *J. Exp. Bot.* 94:741-748.
 11. Osmond, C.B. 1978. Crassulacean Acid Metabolism: A curiosity in context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29:379-414.
 12. 島崎研一郎 1986. 気孔開閉と孔辺細胞の生理. *化学と生物* Vol. 24:645-654.
 13. 高橋信孝・増田芳雄 共編 1994. *植物ホルモン・ハンドブック [下]*. 培風館. p.1-118.
 14. Takayama, T., T. Toyomatu, H. Yamane, N. Murofushi and H. Yajima 1993. Identification of gibberellins and abscisic acid in bulbs of *Lilium elegans* Thunb. and their quantitative changes during cold treatment and the subsequent cultivation. *J. Japan. Soc. Hort. Sei.* 62:189-196.
 15. Takeda, N., K. Harada, M. Suzuki, A. Takematsu, N. Hirai and K. Koshimizu 1984. Structural characterization of abscisic acid and related metabolites by Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Agric. Biol. Chem.* 48:685-694.
 16. Tietz, D., K. Dorffling, D. Wöhrle, I. Erxleben and F. Liemann 1979. Identification by combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry of phaseic acid and dihydrophaseic acid and characterization of further abscisic acid metabolites in Pea seedlings. *Planta* 147:168-173.
 17. Zeiger, E., G.D. Farquhar and I.R. Cowan 1987. *Stomatal function*. Stanford University Press, Stanford, California.
 18. Zeevaart, J.A.D. and B.V. Milborrow 1976. Metabolism of abscisic acid and the occurrence of epi-Dihydrophaseic acid in phaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 15:493-500.