光独立栄養条件および光混合栄養条件下で培養された アルファルファ小植物体の生長および光合成速度

谷 晃・清田 信・平 知明・相賀 一郎

大阪府立大学農学部

Growth and Photosynthesis of Alfalfa Plantlets Cultured *in vitro* under Photoautotrophic and Photomixotrophic Condition

Akira TANI, Makoto KIYOTA, Tomoaki TAIRA and Ichiro AIGA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai 591, Japan

In order to clarify the differences in growth characteristics between photoautotrophically and photomixotrophically grown plantlets, growth rate and net photosynthetic rate (P_N) of alfalfa plantlets were measured. These plantlets were cultured *in vitro* on hormone-free MS medium with different sucrose concentrations of 0, 1 and 3% in aerated vessels.

Chlorophyll content per unit leaf area of plantlets with 1% sucrose was the greatest ($61 \pm 2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) at all times (7, 14 and 21 days after treatments). Leaf area with 1% sucrose was 1.4 times greater than that with 0% 14 and 21 days after treatments. But that with 3% was lower. P_N values per unit leaf area with 0 and 1% sucrose were similar to each other. While those with 3% sucrose did not increase from the start of treatments and much lower than those with 0%.

These results suggest that photomixotrophic condition with optimal concentration of sucrose accelerate the growth of photosynthetic organs and enable alfalfa plantlets to acquire photosynthetic products, at least, as much as those acquired under photoautotrophic condition.

(Received March 28, 1991)

1991年3月28日受付

はじめに

小植物体の組織培養において、培養器内のガス環境を改善し小植物体の光合成を促進させる条件下では、培地に糖を含まない無糖培養法が適していると古在らによって指摘されている¹⁾。無糖培養の利点としては、糖による生理的ストレスを培養物に与えない、微生物による汚染の減少、作業の簡易性などがあげられる。

しかし、小植物体の生育促進という点について考えると、培地に適量の糖を含み、かつ CO_2 を十分に供給した光混合栄養条件で、光独立栄養条件と同様²⁾ があるいはそれより高い生長量^{3,4)} が得られている。これらの小植物体は光混合栄養条件下で、培地の糖と空気中の CO_2

の両方を炭素源として生長している。

ところで、光混合栄養条件および光独立栄養条件下で生長する培養小植物体の光合成速度についての報告はわずかにみられる^{5,6)} だけであり、培地のシヨ糖および光独立栄養生長を促進する光、 CO_2 が小植物体の光合成や生長に与える複合的な影響について検討する必要がある。

そこで、本研究では培養器内へ通気する方法を用いて、光独立栄養生長を促進する条件下で、培地に与えられたシヨ糖が、アルファルファ小植物体の同化器官の生長や光合成活性に与える影響について調査し、光独立栄養生長と光混合栄養生長の生育特性の差を比較した。

材料および方法

1. 培養方法

供試材料としてアルファルファ (*Medicago sativa* L. cv. Du Puits) を用い、その実生の切除茎を外植体として得た。まず、種子を1.5%の次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬滅菌し、植物培養用容器(植物組織培養 PCビン, 大日本プラスチック製: 以下培養器と呼ぶ)内のショ糖濃度が3%のMS培地⁷⁾に置床した。培養器は、底面積100 cm², 容積1,000 cm³のポリカーボネイト製であった。

培養器内の種子は25°C, 暗黒の条件下で発芽し、子葉を展開した。播種4日後、培養器を25°C, 光照射の条件下へ移した。光源には、冷白色蛍光灯(40W, 日立製)を用い、24時間連続照明下で25日間培養した。培養器内の植物体葉面での光合成有効光子束密度(PPFD)は、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ であった。播種から実生の培養が終了するまで培養器は無通気の状態であり、培養器の換気回数は0.5回 $\cdot\text{hr}^{-1}$ であった。

25日間の培養後、実生の茎を2枚の葉を付けて切除し、外植体を得た。外植体の生重は90 $\pm$ 10 mgであった。これらの外植体を植物材料として、ショ糖濃度がそれぞれ0, 1, および3%のMS培地を含む培養器に4個体ずつ植え付け処理を開始した。用いた培養器および温度、光の条件は実生の培養と同じであったが、培養器内へは、プレフィルター(ミリポア社製)および綿で濾過した無菌空気を通気した。通気量は0.2 l $\cdot\text{min}^{-1}$, CO₂濃度は340 ppmに設定した。培養器内の湿度は、水中でバブリングした空気を通気することによって85~90%に保った。

なお、培地は滅菌する前に1 NのHClまたはNaOHでpH 6.0に調整し、0.2%のジェルライト(ジェランガム, 三栄化学工業)を加えて、100 ml ずつ培養器に分注した。培地の滅菌は、オートクレイブ(1.2気圧, 30分間)で行った。

2. 光合成速度の測定

光合成速度および暗呼吸速度の測定は、処理開始時および7, 14, 21日目に培養器をグロースチャンバー(光源: 白熱ランプ, 蛍光水銀ランプ, 蛍光ランプの混合光)内へ移して行った。CO₂濃度の測定は赤外線ガス分析計(ZALDA, 富士電機製)を用いて、開放式同化箱法で行った。同化箱として培養器をそのまま用い、蓋に2本の塩ビチューブを取り付け、一方のチューブからCO₂濃度が340 ppmの空気を通気し、他方のチューブから排出した。

測定は、PPFDが100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ および暗黒の光条件下で行い、培養器入り口と出口のCO₂濃度差 ΔC_P (ppm)を測定した後、小植物体の地上部(茎葉部)を切除し地下部(根部)のみを残し、暗黒下でのCO₂濃度差 ΔC_R (ppm)を測定した。次に根を抜き取り寒天だけのCO₂濃度差 ΔC_G (ppm)を求めた。

小植物体地上部当りの純光合成速度 P_N (mgCO₂ $\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$)は、以下の式に代入して求めた⁸⁾。

$$P_N = \frac{44 \times 10^3}{22.4} \times (\Delta C_P - \Delta C_R) \times 10^{-6} \times V \times 60 \times \frac{273}{273 + T} \times \frac{1}{N}$$

ここで、 V (l $\cdot\text{min}^{-1}$)は培養器への通気量、 T (°C)は培養器内の気温、 N は培養器内の小植物体数である。ただし小植物体が発根していない場合は、上式の ΔC_R の代りに ΔC_G を用いた。

通気量は0.5 l $\cdot\text{min}^{-1}$, グロースチャンバー内の温度は25 $\pm$ 2°Cに設定した。各測定日に、処理区当り培養器4~5個ずつを測定に用い、計16~20個の小植物体の平均値を求めた。

3. 生長量の測定

光合成測定に用いた小植物体の地上部生重、発根植物体数、地下部生重、葉面積および葉部のクロロフィル量を測定した。葉面積は、3種類の形状と10段階の大きさに区分けした面積計測用型紙を用い、それらに該当する葉の個数を記録することによって求めた。葉部のクロロフィル量は、80%アセトンで抽出し、波長645および663 nmでの吸光度を分光光度計(U-BEST50, 日本分光製)を用いて測定し、その値をArnon⁹⁾の式に代入して求めた。

結 果

1. 培地のショ糖濃度と光合成速度

Table 1に、小植物体地上部当りの光合成速度および暗呼吸速度の経日変化を示す。光合成速度は、PPFDが100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ のいずれの条件下でも、各ショ糖濃度区で処理後日数の経過とともに増加した。光独立栄養生長区の0%区と比較して、1%区での光合成速度は、14日目にPPFD 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ で1.4倍(1.04 mgCO₂ $\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$), 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ で1.5倍(1.83 mgCO₂ $\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$)になった。また、ショ糖濃度3%区での光合成速度は、0%区の0.5~0.9倍であった。

一方、暗呼吸速度も日数の経過とともに増加したが、

Table 1 Net photosynthetic rate (P_N) per shoot of alfalfa plantlets cultured *in vitro* with different concentrations of sucrose in the medium.

PPFD ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$)	Sucrose concentration (%)	Net photosynthetic rate, P_N ($\text{mgCO}_2\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$)		
		Days after treatments		
		7	14	21
100	0	$0.55\pm0.01^*$	0.73 ± 0.07	1.02 ± 0.14
	1	0.61 ± 0.03	1.04 ± 0.13	1.05 ± 0.18
	3	0.25 ± 0.06	0.43 ± 0.16	0.49 ± 0.06
300	0	—	1.23 ± 0.11	1.82 ± 0.20
	1	—	1.83 ± 0.26	2.12 ± 0.29
	3	—	—	1.06 ± 0.17
Dark	0	-0.14 ± 0.04	-0.26 ± 0.01	-0.26 ± 0.01
	1	-0.15 ± 0.02	-0.27 ± 0.04	-0.48 ± 0.03
	3	-0.15 ± 0.02	-0.21 ± 0.03	-0.26 ± 0.05

P_N was measured under PPFD of 0 (dark), 100 and $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

* Standard error, $n=4\sim5$.

Table 2 Chlorophyll (Chl) content per unit leaf area of alfalfa plantlets cultured *in vitro* with different concentrations of sucrose in the medium.

Sucrose concentration (%)	Chl content ($\mu\text{gChl}\cdot\text{cm}^{-2}$)			
	Days after treatments			
	7	14	21	Mean
0	$50\pm4^*$	47 ± 8	57 ± 3	50^b
1	59 ± 8	63 ± 4	62 ± 3	61^a
3	41 ± 5	44 ± 8	53 ± 7	47^b

Different letters indicate significant difference at 5% level in *t* test.

* Standard error, $n=4\sim5$.

処理7日目では、培地のショ糖濃度にかかわらず $-0.14\sim-0.15\ \text{mgCO}_2\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ と同様な値であった (Table 1). しかし、処理21日目になると、1%区で $-0.48\ \text{mgCO}_2\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ と著しく高い値を示した。

2. 培地のショ糖濃度と生長量

2-1. クロロフィル含量および葉面積

培養器内に植え付けられた外植体は、数日後葉腋からシュートを伸長させて生長した。Table 2に、単位葉面積当りのクロロフィル含量の変化および平均値を示す。単位葉面積当りのクロロフィル含量は、処理開始時 $28\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ であったが、7日目には、 $41\sim59\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ と高くなった。ショ糖濃度1%区では、7日目に $59\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 、それ以降も $62\sim63\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ と処理区中最も高くなり、全測定日の平均値では5%水準で0%区と比較し

Fig. 1 Leaf area of alfalfa plantlets cultured *in vitro* with different concentrations of sucrose in the medium.

Each value is relative to that with 0% sucrose (=100%) same days after treatments. Values in parentheses indicate leaf area ($\text{cm}^2\cdot\text{shoot}^{-1}$) with 0% sucrose. Different letters indicate significant difference at 5% level in *t* test.

て有意差が認められた。0%区および3%区では、処理後の日数の経過とともに値は増加し、0%区では21日目になって $57\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ と1%区の値に近づいた。また、3%区では葉のクロロシスがみられたが、クロロフィル含量は0%区と比べて有意差が認められなかった。

小植物体当りの葉面積も、培地のショ糖濃度に左右され、処理14日目には明確な差を示した (Fig. 1)。ショ糖濃度0%区における葉面積は、日数の経過とともに増加し、21日目には $7.5\ \text{cm}^2$ となった。0%区の値に対す

る相対値を用いて1%区における葉面積を表すと、7日目には増加は認められなかったが、14日目になると1.4倍と有意な増加を示し ($p<0.05$), 21日目でも同様な値となった。しかし、ショ糖濃度3%区における葉面積は、各測定日とも0%区の0.8倍であった。

2-2. 生重, S/R(shoot/root) 比および発根率

小植物体当りの生重については、処理21日目に培地のショ糖濃度間で明白な違いが認められた (Fig. 2)。ショ糖濃度0%区の生重は、処理開始時 90 mg であったが、7日目には、220 mg, 21日目には 570 mg で開始時の6.3倍になった。光混合栄養生長区における生重を、0%区の値に対する相対値で表すと、ショ糖濃度1%区では、7日目に1.1倍、14日目に1.2倍であったが、21日目になって1.6倍と5%水準で有意差がみられた。ショ糖濃度3%区における生重は、各測定日とも0%区の0.8倍であった。

Table 3 に光合成測定に用いた小植物体の発根率および S/R 生重比の変化を示す。培地には発根促進のため

Fig. 2 Fresh weight of alfalfa plantlets cultured *in vitro* with different concentrations of sucrose in the medium. Each value is relative to that with 0% sucrose (=100%) same days after treatments. Values in parentheses indicate fresh weight (mg·shoot⁻¹) with 0% sucrose. Different letters indicate significant difference at 5% level in *t* test.

Table 3 Root initiation ratio and shoot/root ratio in fresh weight (S/R) of alfalfa plantlets cultured *in vitro* with different concentrations of sucrose in the medium.

Days after treatments	14			21		
	Sucrose concentration (%)	0	1	3	0	1
Root initiation ratio (%)	73	93	50	80	80	60
S/R ratio	6.67	3.47	2.89	4.10	2.04	2.80

の生長調節物質を添加しなかったが、処理7日目以降、多くの小植物体の基部から発根がみられた。14日目の小植物体の発根率は、0%区で73%, 1%区で93%であった。3%区では21日目でも60%の発根率であった。一方、発根後はショ糖培地で根の生長が促進され、S/R比の値はショ糖培地で無糖培地に比べて小さくなった。

3. 生長量と光合成速度

小植物体の葉部のクロロフィル量 (以下クロロフィル量とする) とクロロフィル量当りの光合成速度 (以下 P_{chl} とする) との関係を用いて、処理区間での小植物体の光合成能を比較した (Fig. 3)。クロロフィル量は単位葉面積当りのクロロフィル含量に葉面積を乗じた値である。各処理区ともクロロフィル量が増加するほど P_{chl} は低下する傾向がみられた。ショ糖濃度0%区での P_{chl} は、処理開始時、7日目および14日目とほぼ同じ値 ($3.3 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$) を示し、クロロフィル量が 0.43 mg となる21日目になって低下した。ショ糖濃度1%区では処理7日目に開始時の0.8倍に低下したが、クロロフィル量が 0.41 mg である14日目にはそれ以上

Fig. 3 Relationship between net photosynthetic rate (P_N) per chlorophyll (Chl) amount and Chl amount in leaves per plantlet. P_N was measured under $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ PPFD. Figures around the marks indicate days after treatments.

Fig. 4 Relationship between net photosynthetic rate (P_N) per unit leaf area and leaf area per plantlet. P_N was measured under $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ PPFD. Figures around the marks indicate days after treatments.

の低下はみられず、クロロフィル量がほぼ同じ値である0%区21日目の P_{chl} と同等な値を示した。また、3%区ではクロロフィル量の増加にともなう P_{chl} の低下が著しかった。

次に、小植物体当りの葉面積と単位葉面積当りの光合成速度（以下 P_{LA} とする）との関係をFig. 4に示す。ショ糖濃度0%区での P_{LA} は、処理開始時 $9.2 \text{ mgCO}_2\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{hr}^{-1}$ であったのが、葉面積の増加につれて7日目には開始時の1.6倍、14日目には1.7倍で $15.5 \text{ mgCO}_2\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{hr}^{-1}$ と測定日中最も高い値を示し、21日目に低下した。ショ糖濃度1%区でも0%区と類似の傾向を示し、全葉面積が 6.4 cm^2 となる14日目に $16.3 \text{ mgCO}_2\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{hr}^{-1}$ と最も高かった。Fig. 3でみられた1%区7日目での P_{chl} の低下は、単位葉面積当りのクロロフィル生成量（Table 2）の高い値を乗ずることによって打ち消され、 P_{LA} には差として現れなかった。また、3%区での P_{LA} は0%区と比べて著しく低く、処理開始時から増加しなかった。

生重と光合成速度との関係（図示していない）においても同様の傾向がみられた。

一方、生重と地上部暗呼吸速度との関係ではショ糖濃度間での明白な違いはみられず、

$$y = -5.83 \times 10^{-2}x - 4.41 \times 10^{-4} \quad (r=0.97)$$

で表される直線に近似され、Table 1でみられた1%区21日目での高い暗呼吸速度は、小植物体の生重の増加によるものであった。ここで x は生重（mg）、 y は暗呼吸速度（ $\text{mgCO}_2\cdot\text{shoot}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$ ）を示す。

考 察

従属栄養の側面の強い条件で生長したアルファルファ小植物体を切除して、その莖葉部を異なるショ糖濃度の培地に植え付けると、ショ糖濃度1%の培地で、葉部でのクロロフィルの生成が処理7日目から促進され（Table 2）、葉面積が14日目に0%区の1.4倍になった（Fig. 1）。クロロフィル量の増加にかかわる最適なショ糖濃度は、光混合栄養生長する細胞の培養あるいはカルスの培養で報告されており、タバコのカルスでは0.3%¹⁰⁾、ジャガイモの細胞では0.25%¹¹⁾であった。しかし、*in vitro*で光混合栄養生長する小植物体に関する報告はみられない。

クロロフィル量当りの光合成速度は、ショ糖濃度1%で7日目に低下したが、これは、RuBPカルボキシラーゼ活性の低下によるものかもしれない⁶⁾。

一方、1%区と0%区では葉の生長に伴う単位葉面積当りの光合成速度に差はみられなかった（Fig. 4）。同様に、*in vitro*で培養したタバコの実生およびシュートの単位葉面積当りの光合成速度は、ショ糖濃度2%および0%の培地で差が認められなかった⁵⁾。

シュート当りの光合成速度は1%区で高くなる傾向がみられた（Table 1）。これは、葉面積の増加にともなう単位葉面積当りの光合成速度が0%区と同様であり、しかも14および21日目に葉面積が0%区より有意に高くなったためである。したがって、処理開始から終了までに1%区での小植物体は、同化産物を0%区と同等かあるいはそれ以上に獲得して生長していたと考えられる。

なお、培養器を同化箱として用いて光合成測定を行う場合、その容積が小さいため、流入空気中の CO_2 濃度が同一でも固定される CO_2 の量の違いによって内部濃度が異なる現象を無視できない。本実験では、PPFD $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ で内部濃度の違いが処理区間で最大30 ppmと小さかったが、生長量かなり異なる小植物体の光合成速度を比較するような場合にはこのことを考慮する必要がある。

1%区では小植物体の発根も0%区と同様におこり（Table 3）、3%区のような培地のショ糖による阻害的な影響は認められなかった。そして、発根後の根の生長量は高く、0%区と比べてS/R比が小さかった（Table 3）。また、アルファルファ実生を用いた実験でも、2,000 ppm CO_2 および340 ppm CO_2 通気時においてショ糖濃度3%区での根の生重および乾物重は、0%区のそれより高かった¹²⁾。

一方、3%ショ糖培地での小植物体は、光合成活性の

低下や葉の黄化、発根の遅延が認められ、21日目での生長量も低かった。これは培地の水ポテンシャル^{13,14)}と関連する生理的ストレスによるものかもしれない。

以上のことから次のことがいえる。光混合栄養条件下でのアルファルファ小植物体の培養において、培地に与えられた最適な濃度のショ糖は、光独立栄養条件以上に光合成器官の発達を促し、しかも葉面積の増加にともなう小植物体の光合成活性を阻害しなかった。そのため、小植物体はショ糖を吸収し炭素源として生長するだけでなく、光合成産物を少なくとも光独立栄養生長区と同等に獲得して生長していたであろう。

なお、本研究で用いた培養器内通気システムはフィルターで濾過した無菌空気を通気することから培養中の微生物による汚染を防止できる。また、培養器内部の空気が流動することから葉面拡散抵抗が小さくなり光合成が促進される可能性があり¹⁵⁾、簡易培養装置として利用できる。

文 献

- 1) 古在豊樹. 1988. 植物組織培養による種苗急速大量生産における環境調節. 「植物組織培養における環境調節」シンポジウム 23-31.
- 2) 古在豊樹・久保田知恵利・渡部一郎. 1990. 異なる培地基礎成分を用いて光独立栄養培養および光混合栄養培養したカーネーション小植物体の生長. 生物環境調節 28: 21-27.
- 3) 古在豊樹・岩波好恵・富士原和宏. 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium* Hybrid) の小植物体の生長に及ぼす影響. 植物組織培養 4: 22-26.
- 4) KOZAI, T., H. OKI, and K. FUJIWARA. 1987. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. Symposium on Plant Micropropagation in Horticultural Industries. Arlon, Belgium 134-141.
- 5) SOLAROVA, J., J. POSPISILOVA, J. CATSKY, and J. SANTRUCEK. 1989. Photosynthesis and growth of tobacco plantlets in dependence on carbon supply. Photosynthetica 23: 629-637.
- 6) 渡邊浩一郎・渡邊幸雄・嶋田典司. 1990. 通気培養におけるスパティフィラム小植物体の生育、みかけの光合成およびブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼに及ぼす培地ショ糖濃度の影響について. 植物組織培養 7: 74-79.
- 7) MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A reversed medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 8) 清田 信. 1987. 光合成速度・呼吸速度の測定. 1 同化箱法による測定. 「農業環境実験法」(渡部一郎編) 99-105, サイエンスハウス, 東京.
- 9) ARNON, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1-15.
- 10) CSEPLE, A. and P. MEDGYESY. 1986. Characteristics symptoms inhibition by herbicides are expressed in photomixotrophic tissue cultures of *Nicotiana*. Planta 168: 24-28.
- 11) LAROSA, P. C., P. M. HASEGAWA, and R. A. BRESSAN. 1984. Autotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth. Physiol. Plant. 61: 279-286.
- 12) 清田 信・谷 晃・平 知明・相賀一郎. 1989. *in vitro* でのアルファルファ実生およびシュート培養幼植物体の成長におよぼす二酸化炭素、光、糖の影響. 日本農業気象学会近畿支部大会講演要旨: 13-14.
- 13) BROWN, D.C.W., D. W.M. LEUNG, and T. A. THORPE. 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant. 46: 36-41.
- 14) KIMBALL, S. L., W. D. BEVERSDORF, and E. T. BINGHAM. 1975. Influence of osmotic potential on growth and development of soybean tissue cultures. Crop Sci. 15: 750-752.
- 15) 矢吹萬壽. 1985. 葉面拡散抵抗. 「植物の動的環境」111-130, 朝倉書店, 東京.