ジベレリンの新しいイネ苗テスト “点滴法” および そのイネ、アサガオ抽出物への適用

村 上 浩*

Yutaka MURAKAMI*: A New Rice Seedling Test for Gibberellins, 'Microdrop Method',
and its Use for Testing Extracts of Rice and Morning Glory.

Received September 20, 1967

Abstract

A new bioassay is described which is based upon the elongation response of the second leaf sheath of rice plants to gibberellins. Rice seedlings, at their first leaf stage, were treated by applying gibberellins to coleoptils in a 1 μ l drop of 50% acetone using a micropipette. Agar blocks can be used in place of test solution.

By means of this method, five cultivars of rice, including one normal and four dwarfs of different simple recessives, were tested for their response to gibberellins A_1 to A_5 . Gibberellins A_1 and A_3 are of high potency in these cultivars. The dwarfs differ in the specificity of their response to gibberellins. For example, 'Tan-ginbozu' responds well but 'Waito-C' much less to Gibberellin A_5 . These dwarfs can be used as a 'multiple plant assay' to detect gibberellins with similar structures. Gibberellin A_3 can be bioassayed in the range from 0.05 up to 100 μ g using the 'Tan-ginbozu' dwarf.

The rice test using microdrop application was less susceptible to inhibiting substances such as Abscisin II, fusarinic acid, and indoleacetic acid than the test using the application in growing media. Because of this and because of the rapidity and high sensitivity of the test, it has been successfully applied to the estimation of gibberellin-like substances in extracts from small quantities of rice shoots and *Pharbitis nil* seeds.

The chromatographic behavior of the active zone of rice shoot material was similar to that of gibberellin A_3 . Bioassays on extracts of *Pharbitis nil* seeds using the 'Tan-ginbozu' and 'Waito-C' dwarfs indicated the presence of gibberellin-like substances with differential effects on the two dwarfs.

ジベレリンのバイオアッセイのために著者が考案したイネ苗テスト¹⁾は、操作が簡単であり、測定値の偏差が少い。しかし、この方法は、発芽させた籾を試験液に浸すために、精製していない植物抽出物や有機溶媒を含む試験液では、共存する阻害物や有機溶媒のために、発芽籾が枯死する場合がある。また、与えたジベレリン量と伸長との関係を、植物1株当たりとして正確に表現することが困難である。そこ

で、著者は、ジベレリンのエンドウテスト²⁾やトウモロコシテスト³⁾のように、試験液を葉に与えるイネ苗テストを試みた。

この新しいイネ苗テスト、点滴法を用いて、劣性の単一遺伝子による矮性イネについて、ジベレリン A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A_5 の活性を比較した。また、この方法による Abscisin II, フザリン酸, インドール酢酸の葉鞘伸長阻害についても検討した。さらに、イネの葉やアサガオの種子抽出物のジベレリン様物質の検出、定量に、この点滴法を適用した結果についても報告する。

* 農林省農業技術研究所 National Institute of
Agricultural Sciences, Kita-ku, Tokyo, Japan.

材料と方法

I. バイオアッセイ

比重 1.05 の食塩水で塩水選した粳を、0.1% ウスプルン液に 30 分～1 時間浸して殺菌した後、2 日間 32° の水に浸しておく、子葉鞘が現れてくる。内径 2.8 cm、高さ 6 cm の管びんに、1% 寒天を 5 cm の高さまで加えておく。子葉鞘の長さが 2 mm になった粳を選び、寒天の上に 1 びん当り 5 こずつ、子葉鞘を上にして植える。これを 5,000-7,000 ルックスの蛍光灯で連続照射している 32° に保った植物生育箱に入れ、45 時間後に、第 2 葉の先端が第 1 葉から 2 mm 出た状態まで育てる。この状態のイネ苗の子葉鞘と第 1 葉との間に、マイクロピペットで試験液 1 μ l を与える。被験物は 50% アセトンに溶かしておく。

試験液の代りに、オーキシンのアベナ屈曲テストに使用すると同じような寒天片に、試料を含ませて与えることも出来る。まず、1.5% の寒天液に同量の試料の水溶液を加え、よく混合させる。スライドガラスを 60° 前後に温めてから、水平板の上におく。

Fig. 1. Procedure of the new rice seedling test (microdrop method).

60° 前後に温めておいたメスピペットで溶けている寒天液の一定量を、スライドガラスにピペットを斜めに傾けて、周囲から流しはじめて中央部に至る方法で、ガラスの表面を寒天液でおおう。この寒天ゲルの厚さを 1.5 mm にするために、用いたスライドガラスの表面積から寒天液の使用量を決定する。寒天が固まってから、スライドガラスを方眼紙の上におき、安全カミソリの刃で 2×2 mm の間隔で縦横に切って、1.5×2×2 mm の寒天片をつくる。

使用したイネ (*Oryza sativa*) の品種は、正常種の農林 25 (Norin 25), 矮性イネの短銀坊主 (Tanganbozu), 小丈玉錦 (Kotake-tamanishiki), 矮稲-C (Waito-C), 紫大黒 (Murasaki-daikoku) である。これらの矮性イネは、いずれも、異なる単一劣性遺伝子によって草丈が矮性化したものである^{4,5)}。

この点滴法によるイネ苗テストを簡単に第 1 図に示した。

II. バイオアッセイに附した物質

1. 既知化合物

ジベレリン A₁, A₂, A₃, A₄ (GA₁, GA₂, GA₃, GA₄ と略する): 1960 年頃に、当時の東京大学農学部、住木諭介教授よりいただいた。

ジベレリン A₅ (GA₅ と略する): 東京大学農学部、高橋信孝博士よりいただいた。

Abscisin II (Ab II と略する): 京都大学農学部、小清水弘一博士よりいただいた。

フザリン酸: 1955 年頃に、現在の山梨大学工学部、林武教授よりいただいた。

インドール酢酸 (IAA と略する): 東京化成工業株式会社から購入した。

2. 植物抽出物

イネ (品種、農林 8 号) の苗: 苗代で約 1 ヶ月生育させ、草丈 28 cm になった苗 24 本の地上部 (生体重は 20g) を 200 ml の 70% アセトンにて磨碎し、1 日 攪拌する。布でしぼり、残りはもう一度 70% アセトンで抽出する。両抽出物をろ紙でこした後、減圧で濃縮してアセトンを除く。残留液をリン酸で pH 2.5 とし、1/3 量の酢酸エチルで 3 回抽出する。酢酸エチル層を 1/3 量の 1N のリン酸緩衝液 (pH 7) で 3 回抽出し、この緩衝液を再びリン酸で pH 2.5 とした後、酢酸エチルで 3 回抽出する。得られた酢酸エチルを無水硫酸ソーダで脱水した後、

減圧で濃縮してえた抽出物を、酸性酢酸エチル分画とし、薄層クロマトグラフィーに附した。

アサガオ (*Pharbitis nil*) の未熟種子: アサガオの成熟後期でまだ緑色の果実を真空凍結乾燥し、蒴を除いた種子から、イネの苗と同じように、含水アセトンによる抽出物をつくる。これを炭酸ソーダで pH 8.0 とし、酢酸エチルで 2 回抽出した後、水層の方をリン酸で pH 2.5 とする。この水層をクロロホルムで 3 回抽出し、酸性のクロロホルム分画とする。この濃縮物を、イソプロパノール: アンモニア: 水 (10:1:1) の混液でペーパークロマトグラフィーをおこなって得た R_F 0.6 附近の活性物質 (即ち、前報⁹第 7 図の No. 9 の分画に相当する) を、薄層クロマトグラフィーに附した。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

20×20 cm のガラスプレートに 0.25 mm の厚さの Silica Gel G の薄層をつくり、上昇法で 10 cm 展開した。展開剤としては、イソプロピルエーテル: 水酢酸 (95:5) の混液⁷⁾が使用された。

展開の終わったプレートの原点から、展開方向に 1

cm の間隔 (イネ抽出物の場合には、第 1 番目のみ 0.5 cm の間隔で二分した) で、シリカゲルをかき取り、吸着物を 50% アセトンで小ビーカー中に溶出した。溶出物にヘヤドライヤーで熱風を送り、乾燥させた後、50 μ l の 50% アセトン液を加えて、再び溶出物を溶かす。この溶液 1 μ l を 1 本のイネ苗に与えて、上述の新しいイネ苗テストに附した。

GA₃ および GA₅ のクロマトグラム上の位置は、エタノール: 濃硫酸 (95:5) の混液を噴霧し、120° に 10 分間熱した後に現れる紫外線下の蛍光により定めた。

結果と考察

I. GA₃ の活性

第 1 表に、点滴法によってイネ苗テストを実施した場合の、正常種および矮性種の第 2 葉鞘の伸長と GA₃ の濃度との関係を表にして示した。この実験条件では、正常種の農林 25 は、植物体当り、0.5 m μ g、矮性種の短銀坊主、矮稲 C では、0.05 m μ g、小丈玉錦では、0.1 m μ g、紫大黒では 0.5 m μ g から有意差

Table 1. Response of one normal and four dwarfs of rice to GA₃.
(Mean length, mm, of 2nd leaf sheath)

Rice cultivar	GA ₃ (m μ g/plant)							
	Control	0.05	0.1	0.5	1	5	10	100
Norin 25 (normal)	30.9	31.5	32.8	36.0	40.6	47.6	51.6	60.5
Tan-ginbozu (dwarf)	16.4	18.2	18.8	23.8	26.4	34.8	40.4	53.6
Kotake-tamanishiki (dwarf)	19.2	20.4	21.0	25.4	27.4	37.0	43.4	53.4
Watio-C (dwarf)	15.4	17.0	17.8	25.0	27.8	43.4	47.3	54.8
Murasaki-daikoku (dwarf)	17.0	17.2	17.2	21.8	23.2	27.0	31.4	36.2

The test compound was dissolved in 50% acetone and a 1 μ l test solution was applied to the coleoptile of five rice seedlings at the first leaf stage. Three days later the lengths of the second leaf sheath were measured and summed for each seedling. The mean was determined for each set of five plants. Assay responses were not regarded as positive unless they were 10% or greater than over the controls. The same is the case with other tables and figures.

Table 2. Comparison of two methods in the 'Tan-ginbozu' dwarf rice test for gibberellins.

Application of test sol.	Days to complete prep.+test	Volume (μ l) of sol. per test unit	Sensitivity to GA ₃	
			Sol. concn. μ g/ml	Wt. of GA ₃ μ g/test unit
Growing medium	2+5	500	0.02-200	0.01-100
Microdrop	(2+2)+3	1	0.05-100	0.00005-0.1

のある伸長促進がみられた。イネには、穀粒の小円形な大黒型の矮性種が幾つか知られている。従来の浸漬法によるイネ苗テストでも、これらの矮性種の GA_3 に対する感受性はよくない⁸⁾。

短銀坊主によるイネ苗テストについて、点滴法と浸漬法とを比較し、Coombe⁹⁾がジベレリンの種々なバイオアッセイについてまとめた表にしたがって作成した結果が、第2表である。二つの方法を比較すると、籾を発芽させる時から結果を測定するまでの所要日数は、両方法とも7日である。しかし、点滴法を用いると、試験液で処理した後から測定までの日数は、約半分でよい。その代りに、試験苗をつくるのに手間がかかる。試験単位、即ち、浸漬法では管びん当り、点滴法では植物個体当り、の試験液量について比較すると、点滴法は浸漬法の1/500でよい。また、 GA_3 の絶対量からみると、点滴法は1/200で足り、貴重な試料の試験に適している。濃度からみた感度については、浸漬法は $0.02 \mu\text{g/ml}$ 、点滴法は $0.05 \mu\text{g/ml}$ の GA_3 から定量できる。したがって、希薄な試験液が多量にある場合には、従

来の浸漬法がすぐれている。また、クロマトグラフィーをおこなったならば、点滴法では、ろ紙、シリカゲルなどの吸着剤から、溶出、濃縮の操作を、バイオアッセイに附する前にする必要がある。

II. GA_1 — GA_5 の活性

第2図から第6図までは、イネの正常種および各矮性種について、 GA_1 — GA_5 の感度曲線を示したものである。これらの図は、イネ第2葉鞘の長さの対数を各ジベレリンの投与量の対数に対してプロットして作成した。

正常種、矮性種とも、最もよく反応するジベレリンは GA_1 と GA_3 である。各ジベレリンの $\log$ -投与量と $\log$ -反応の直線の勾配は、紫大黒を除く各品種で大きな差がなく、殆んど直線は平行である。しかし、小丈玉錦や特に矮稲Cにおける GA_5 の勾配が、他のジベレリンの勾配に比べてゆるやかなことが特徴的である。これらの図から、 $10 \text{ m}\mu\text{g}$ の投与量における GA_3 の活性を100とした場合の比活性を求めて、第3表にまとめてみた。この表でも明らかなように、

Fig. 2. Potency of gibberellins in the new rice seedling test using Norin 25.

Fig. 3. Potency of gibberellins in the new rice seedling test using Tan-ginbozu.

Fig. 4. Potency of gibberellins in the new rice seedling test using Kotake-tamanishiki.

Fig. 5. Potency of gibberellins in the new rice seedling test using Waito-C.

Fig. 6. Potency of gibberellins in the new rice seedling test using Murasaki-daikoku.

GA₅の比活性が、矮性イネの間でかなり異なっている。短銀坊主では、GA₅はGA₃の約1/3の活性をもっているが、矮稲Cや紫大黒では、1/10~1/20の弱い活性しかない。また、小丈玉錦では、両者の中間で、約1/5の活性である。

このような矮性突然変異体間の各種ジベレリンに対する感受性の差異は、すでに、トウモロコシの場合に知られている。例えば、トウモロコシd₁突然変異体では、GA₅の活性が非常に低く、d₅突然変異体ではGA₃と同じく高い^{10,11)}。GA₅のトウモロコシd₁, d₅に対するこのような活性の差を利用して、植物の抽出物中に、GA₅の存在の有無が議論されている^{12,13,14)}。ジベレリンの種類の判定のために、トウモロコシの突然変異体を利用すると同じように、短銀坊主と矮稲Cの同じ試料に対する伸長促進の差を利用することが可能である。その適用例を、後述するアサガオ未熟種子の抽出物についての実験結果の項に記する。

橋本と八巻¹⁵⁾によると、正常種の農林29を用いたときのジベレリンの活性は、GA₁≧GA₃≧GA₄>GA₂の順序であった。また、小川¹⁶⁾は矮性種の小丈玉錦を使用し、GA₃>GA₁>GA₇>GA₂>GA₅>GA₄>GA₉>GA₈の活性の順序を報告している。GA₂とGA₄の活性について、両者の間に不一致がみられる。著者の本実験結果は、橋本と八巻の結果に似ており、小川のGA₂の活性がGA₄よりも高い結果は得られなかった。このような不一致の生ずる原因の一つとして、試験した標品の純度をあげねばならないだろう。

III. 寒天法

最近、オーキシンのアベナ屈曲テストのように、茎の先端などから移動してくる所謂“拡散性ジベレリン”を寒天片に集めることがおこなわれている¹⁷⁾。

多くは、寒天片から再び有機溶媒によって、ジベレリンを抽出した後、バイオアッセイを実施している。ただ、Cohenら¹⁸⁾が、直接寒天片を矮性エンドウの茎につけて、拡散性ジベレリンの定量が可能であることを報告している。点滴法に使用したイネ苗は、アベナ屈曲テストに用いる子葉鞘と同じ程度の大きさであるから、試験液の代りに、オーキシン定量用の寒天片を、イネ苗の子葉鞘と第一葉との間に載せることが出来る。

第7図は、所定のGA₃を含ませた6μl (1.5×2×2mm)の0.75%の寒天片をイネ苗に与えた場合の第2葉鞘の伸長を示したものである。短銀坊主を試験植物として選んだ場合には、0.05mgのGA₃を含んだ寒天片で、約20%の伸長促進が認められた。この程度の感度は、オーキシンのアベナ屈曲テストの感度¹⁹⁾に相当し、拡散性ジベレリンの測定に利用できるものとおもう。

IV. Abscisin II, フザリン酸, インドール酢酸の伸長阻害作用

小清水ら²⁰⁾は、ルーピンの未熟な莢からAb IIを単離するためのバイオアッセイとして、浸漬法によるイネ苗(品種、小丈玉錦)の第2葉鞘の伸長阻害を利用している。第8図は、点滴法のイネ苗テストにおけるAb IIの葉鞘伸長阻害を示したものである。

農林25, 短銀坊主を用いた場合、20mg (20ppm)から伸長阻害が認められ、伸長を完全に停止させるには、2μg (2,000ppm)を必要とした。小清水ら²⁰⁾による浸漬法での結果では、点滴法では阻害作用のない濃度の2.5ppmで伸長が完全に停止している。点滴法によるAb IIの葉鞘伸長抑制作用は、濃度からみると、浸漬法の約1/800である。

イネ馬鹿苗病菌(*Fusarium moniliforme*)の代謝産物の一つであるフザリン酸は、浸漬法のイネ苗

Table 3. Potency of gibberellins on different rice dwarfs at the concentration of 10 μg, expressed as percentage of GA₃-activity.

Gibberellins	Norin 25	Tan-ginbozu	Kotake-tamanishiki	Waito-C	Murasaki-daikoku
GA ₁	80	100	100	80	100
GA ₂	5	10	10	10	10
GA ₃	100	100	100	100	100
GA ₄	10	30	20	20	10
GA ₅	20	30	20	5	10

Fig. 7. Elongation of the 'Tan-ginbozu' dwarf rice induced by agar blocks containing GA₃. The amount of GA₃ was supplied in 1.5×2×2 mm agar blocks.

Fig. 8. Inhibitory effect of Abscisin II on the elongation of second leaf sheath of rice seedlings.

テストで、5 ppm から阻害を示し、100 ppm で殆んど伸長を止めてしまう²¹⁾。しかるに、点滴法での結果は、第4表のように、1μg (1,000 ppm) でわずかに伸長が阻害される程度である。

イネ葉鞘の切片の伸長生長は、子葉鞘の場合と異なり、IAAのようなオーキシンによって阻害されることを、著者はすでに指摘した²²⁾。また、浸漬法によるイネ苗テストでも50 ppm 前後から、葉鞘の伸長阻害がみとめられる⁹⁾。そこで点滴法によってイネに IAA を与えた場合の影響を実験してみた。その結果は、第5表のようで、葉鞘の伸長阻害がおこるには、1μg (1,000 ppm) 以上の濃度が必要であった。

このように、点滴法によるイネ苗テストは、阻害物質による葉鞘の伸長抑制の程度が、浸漬法よりも低く、植物抽出物中のジベレリン様物質の検出のためには好都合である。

V. 植物組織の抽出物の結果

イネの苗条：イネ(品種、農林8)の5葉期の苗の酸性酢酸エチル分画を TLC に附した後、短銀坊主を使用してバイオアッセイを実施した結果は、第9図のようなヒストグラムになった。この図で明らかなように、GA₃の移動した位置、No. 2 (R_F 0.1~0.2) に活性があらわれた。この活性は、GA₃に換算すると、約0.5 mμg に相当する。TLC からの溶出物を 50 μl に希釈し、その 1 μl を1本のイネ苗に与えてアッセイをしたわけであるから、実験に供したイネ苗条、20 g、24 株は、約 25 mμg GA₃ 当量の活性物質を含有している計算となる。この値は、著者²³⁾が、浸漬法によるイネ苗テストで、イネ地上部のジベレリン様物質を測定した値と大体同じである。

ヒストグラムの原点に、イネ苗の伸長を阻害する物質がみられる。Ab II は、ここに使用した溶媒系では、R_F 0.6 附近に移動したから、原点附近の阻害は Ab II によるものではない。

アサガオの未熟種子：アサガオの未熟種

子からのジベレリン様物質を TLC に附した後、シリカゲルからの溶出物について、短銀坊主と矮稲 C を用いてバイオアッセイをおこなった。その結果を第 10 図にヒストグラムとして示した。

二つの矮性イネで、No. 2 (R_F 0.1~0.2) および No. 4~No. 5 (R_F 0.3~0.5) の 2 箇所活性があらわれた。前者の活性は、同時に展開した GA_3 の位置であり、後者ののは GA_5 の位置である。上図の短銀坊主を用いたアッセイの結果では、No. 2 の活性は 2.5 $m\mu g$ の GA_3 に相当する。しかるに、下図の矮稲 C による結果では、0.05 $m\mu g$ GA_3 当量であり、約 1/50 の弱い活性にすぎない。すでに第 1 表に示したように、 GA_3 は短銀坊主、矮稲 C に同程度の伸長反応を示すことから、No. 2 の活性は、 R_F は同じでも、 GA_3 そのものによるのではない。

No. 4~No. 5 のジベレリン様物質は、 GA_5 に相当する R_F 値である。その活性は、短銀坊主のアッセイでは、約 100 $m\mu g$ GA_5 に相当し、矮稲 C を用いた場合にも、約 100 $m\mu g$ GA_5 で、二つのアッセイで、ほぼ同じ値を示した。 GA_3 に換算すると、前者では約 20 $m\mu g$ 、後者では約 2 $m\mu g$ である。つ

Table 4. Inhibitory effect of fusarinic acid on the elongation of second leaf sheath of rice Norin 25.

Fusarinic acid μg /plant	Length of 2nd leaf sheath, mm
0	29.0
0.01	28.8
0.1	29.0
1	25.2

Table 5. Inhibitory effect of indoleacetic acid on the elongation of second leaf sheath of rice Tan-ginbozu.

Indoleacetic acid μg /plant	Length of 2nd leaf sheath, mm
0	16.0
0.1	15.0
1	14.2
10	10.6

ORYZA SATIVA

Fig. 9. Histogram showing gibberellin activity of acidic ethyl acetate fraction from rice shoots (cv. Norin 8) after TLC development with isopropyl ether: acetic acid (95:5).

A 1 μl aliquot, which was applied to each rice seedling, corresponded to the extract obtained from 0.4 g fresh weight of shoot material at the 5th leaf stage.

まり, No. 4~No. 5 の活性物質は, 矮稲Cよりも短銀坊主に対して非常に強い活性をもったジベレリンである. なお, この活性物質は, トウモロコシ d_5 に対する伸長促進作用が d_1 に対するよりも約10倍も強かった⁸⁾. 最近, 高橋ら²⁴⁾は, アサガオの未熟種子から, トウモロコシ d_5 に対して活性の強い *Pharbitis* Gibberellin (PG) を単離し, その構造は, GA_5 のA環の飽和した (4a, 7-dihydroxy-1-methyl-8-methylene gibb-1, 10 β -dicarboxylic

acid 1 $\rightarrow$ 4a-lactone) であると発表した. 高橋²⁵⁾によると, GA_5 と PG とは, TLC で分離出来なかったから, 第10図の No. 4~No. 5 の活性は, GA_3 あるいは PG によるものであろう.

む す び

植物個体の 苗条伸長 促進作用に基づいたジベレリンのバイオアッセイのうち, GA_3 の絶対量からみて最も感度の高いものは, 矮性 エンドウを用いる

Fig. 10. Histograms showing gibberellin activity of acidic chloroform fraction from immature seeds of *Pharbitis nil* after TLC development with isopropyl ether: acetic acid (95:5).

A $1\mu l$ aliquot, which was applied to each rice seedling, corresponded to the extract obtained from 10 mg dry weight of seed material.

Cohen ら¹⁸⁾の方法や、矮性アサガオを用いる広野ら²⁶⁾の方法である。いずれも、約 $0.1 \text{ m}\mu\text{g}$ の GA_3 から検出可能であると、報告されている。ここに報告した点滴法によるイネ苗テストは、これらと同程度の GA_3 量の検出が出来る。

また、この方法は、次の様な利点がある。

- (1) 植物 個体の 苗条 伸長 促進を利用するバイオアッセイは、一般に、試験液で処理後、測定まで1週間前後を必要とする。しかし、点滴法によるイネ苗テストは2〜3日でよい。
- (2) 試験液が微量で足りるから、貴重な試料のアッセイに適している。
- (3) 試料が生長点に直接ふれないために、試料中に含まれる阻害物による苗の枯死が起りにくい。
- (4) 試験液の代りに、寒天片を使用し、拡散性ジベレリンの検出が可能である。

将来、さらに多くのジベレリンについて比活性が測定されれば、イネの矮性突然変異体を利用することのイネ苗テストは、トウモロコシテストのように、ジベレリンの同定に役立つであろう。

文 献

- 1) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 70: 376 (1957).
- 2) Radley, M., Ann. Bot. 22: 297 (1958).
- 3) Phinney, B. O., and West, C. A., In Encyclopedia of Plant Physiol., 14. Edited by W. Ruhland. p 1188. Springer-Verlag, Berlin, (1961).
- 4) Morinaga, T., and Fukushima, E., Gakugei Zasshi 10: 301 (1943).
- 5) Murakami, Y., and Suge, H., unpublished.
- 6) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 79: 315 (1966).
- 7) MacMillan, J., and Suter, P. J., Nature, 197: 790 (1963).
- 8) Murakami, Y., unpublished.
- 9) Coombe, B. G., Cohen, D., and Paleg, L. G., Plant Physiol. 42: 113 (1967).
- 10) West, C. A., and Phinney, B. O., J. Am. Chem. Soc. 81: 242 (1959).
- 11) Brian, P. W., Hemming, H. G., and Lowe, D., Ann. Bot. 28: 369 (1964).
- 12) Blumenthal-Goldschmidt, S., and Lang, A., Nature 186: 815 (1960).
- 13) Hayashi, I., Blumenthal-Goldshmidt, S., and Rappaport, L., Plant Physiol. 37: 774 (1962).
- 14) Butcher, D. N., J. Expt. Bot. 14: 272 (1963).
- 15) Hashimoto, T., and Yamaki, T., Bot. Mag. Tokyo 73: 64 (1960).
- 16) Ogawa, Y., ibid. 80: 27 (1967).
- 17) Jones, R. L., and Phillips, I. D. J., Nature 204: 497 (1964).
- 18) Cohen, D., Robinson, J. B., and Paleg, L. G., Aust. J. Biol. Sci. 19: 535 (1966).
- 19) Kuraishi, S., and Yamaki, T., Bot. Mag. Tokyo 77: 199 (1964).
- 20) Koshimizu, K., Fukui, H., Mitsui, T., and Ogawa, Y., Agr. Biol. Chem. 30: 941 (1966).
- 21) Yabuta, T., and Hayashi, T., J. Imp. Agr. Exp. Sta. 3: 365 (1940).
- 22) Murakami, Y., Bot. Mag. Tokyo 69: 258 (1956).
- 23) ———, ibid. 73: 186 (1960).
- 24) Takahashi, N., Murofushi, N., Yokota, T., and Tamura, S., Tetrahedron letters, No. 12, 1065 (1967).
- 25) Takahashi, N., Personal communication.
- 26) Hirono, Y., Ogawa, Y., and Imamura, S., Plant & Cell Physiol. 1: 81 (1960).