

数種花きにおける花卉からの糖質の簡易迅速抽出法の確立

乗越 亮^{1,2}・今西英雄²・市村一雄^{1*}

¹ 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構花き研究所 305-8519 茨城県つくば市藤本

² 東京農業大学農学部 243-0034 神奈川県厚木市船子

A Simple and Rapid Method for the Extraction of Soluble Carbohydrate from Petals of Several Flowers

Ryo Norikoshi^{1,2}, Hideo Imanishi² and Kazuo Ichimura^{1*}

¹National Institute of Floricultural Science, National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki 305-8519

²Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, Kanagawa 243-0034

Abstract

For HPLC analysis of soluble carbohydrate concentration in petals, a simple and rapid extraction method using a centrifugal filter device was developed. Rose ‘Sonia’ petals were placed in a centrifugal filter device, frozen in liquid nitrogen and centrifuged. The resulting leached fluid was used as a soluble carbohydrate sample for HPLC analysis. The amount of leached fluid increased with the increasing duration of centrifugation, but reached a plateau after centrifugation for 30 min. When soluble carbohydrate composition of fluid obtained from this method was compared with that from a conventional extraction method using hot ethanol, there was no significant difference between the two methods. When leached fluid was held at room temperature, its sucrose concentration decreased with time, but this decrease was suppressed when the fluid was stored at 4°C. This suggests that soluble carbohydrate samples prepared by this method should be stored at a low temperature and analyzed as soon as possible. Soluble carbohydrate samples were extracted from rose ‘Madeleine’, ‘New Bridal’, ‘Rote Rose’, ‘Saturn’, carnations, *Eustoma* and *Oxypetalum* petals using this method and the compositions of these samples were compared with those obtained by the conventional method. There were no marked differences between the two methods. These results suggested that the extraction method using a centrifugal filter device is a simple and rapid method of determining soluble carbohydrate concentrations in the petals of various flowers.

Key Words : Carnations, *Eustoma*, *Oxypetalum*, Rose, Sugar analysis

キーワード : バラ, カーネーション, オキシペタルム, トルコギキョウ, 糖質分析

緒 言

葉で光合成によって生成された糖質は植物体の各器官に転流し、一部は花卉に蓄積する。花卉に蓄積された糖質は呼吸基質として細胞を維持するために代謝されるだけでなく、花卉の展開時に細胞壁合成基質や浸透圧調節物質としても働いていると考えられている (Halevy・Mayak, 1979)。また、切り花では、生け水に添加した糖質は呼吸基質や細胞の膨圧維持に働き、老化を遅らせるだけでなく細胞の肥大を促進し花を大きくする効果をもつ (Halevy・Mayak, 1979; Ichimura ら, 2003)。したがって、花卉の糖質の消長を分析することは、花持ちだけでなく花卉展開の機構を研究する上でも重要である。

花卉では展開にともない細胞が肥大する過程で、浸透圧

調節物質の蓄積が必要であることが示唆されている (Bialeski, 1993; Evans・Reid, 1988)。したがって、糖質が浸透圧調節にどの程度寄与しているかを論議するには、花卉中の糖質濃度を測定することが必要である。糖質の定性・定量には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が重用されている。また、花卉からの糖質抽出法としては熱エタノールを用いる方法が一般的である (Doi ら, 2000; Ichimura ら, 1997; 小山ら, 1995; 山根ら, 1991) が、操作が煩雑で抽出を完了するまでに長時間を必要とする。また、次の理由から熱エタノールを用いる抽出法は花卉における糖質の浸透圧調節効果を論議する場合には適当でないと考えられる。すなわち内部標準を添加することで、精製過程の糖質の損失を考慮せずに糖質含量を算出することができる (Ichimura ら, 1999; 山根ら, 1991) が、花卉中の糖質と内部標準として添加した糖質が等しく抽出されているという確証はない。さらに、この方法で抽出した分析結果は細胞壁など不溶性の物質を含む新鮮重あたりの糖質含量で表示することになる。

2005年8月8日 受付。2006年4月18日 受理。

本報告の一部は平成17年度園芸学会春季大会において発表した。

* Corresponding author. E-mail: ichimu@affrc.go.jp

一方、細胞の浸透ポテンシャルを測定する際には、液体窒素で組織を凍結後、遠心分離により回収した細胞液を用いる (Sakurai・Kuraishi, 1988)。この方法で抽出された細胞液中の糖質濃度を測定することにより、糖質が浸透圧調節にどの程度寄与しているかを明らかにすることが可能と考えられる。しかし、糖質組成は抽出過程で変化しやすいため、抽出条件を検討することが必要である。そこで数種類の花きを用いて、花卉中の糖質をモル濃度で表示するための簡易かつ迅速な抽出方法の確立を試みた。

材料および方法

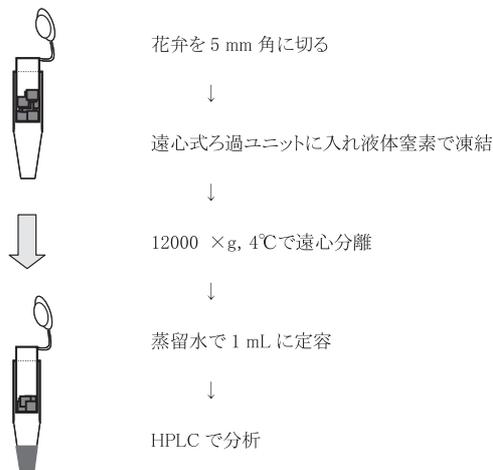
供試材料

バラ‘ソニア’は、外側の花卉が剣弁状になる程度に展開した段階のもの、‘マドレーヌ’、‘ニューブライダル’、‘ローテローゼ’ および ‘サターン’ はがく片がほぼ水平に開き、花卉の着色が見られる段階のものを供試した。これらは茨城県麻生町内の生産者より入手した。また、農研機構花き研究所ガラス室で栽培したカーネーション‘バーバラ’、トルコギキョウ‘あすかの波’、オキシペタルム (*Oxypetalum caeruleum* Decne.) の開花直後の小花の花卉を供試材料とした。

糖質抽出方法

花卉からの糖質の抽出には、筆者らの簡易迅速法と Ichimura ら (1997) による方法 (常法) とを用いた。簡易迅速法は、花卉を 5 mm 角程度に切り、遠心式ろ過ユニット (ウルトラフリー MC, フィルター孔径 0.45 μm , 日本ミリポア製) に入れ液体窒素で凍結した後 12,000 \times g, 4°C で遠心分離した液を蒸留水で 1 mL に定容する抽出法である (第 1 図)。本研究では特に断らない限り、新鮮重約 0.2 g の花卉を用いた。

バラ‘ソニア’、カーネーション、トルコギキョウおよびオキシペタルムの花卉を供試し、遠心時間を 10 ~ 60 分としたときの抽出液量を調べた。この実験において、バラ以外の花きでは新鮮重 0.1 g の花卉を供試した。また、バラ



第 1 図 花卉の糖質濃度を HPLC で分析するための簡易迅速抽出法

‘ソニア’花卉を供試し、遠心時間 30 分で得られた抽出液を 4°C および 20°C で 1, 2 および 3 時間保持したときの糖質組成の変動を調べた。さらに、バラ‘ソニア’花卉を液体窒素で凍結後、30 分間常温で放置した試料と、冷凍庫 (-4°C) で 1 時間保持した後、30 分間遠心して採取した試料の糖質組成を調べた。遠心前の花卉の保存性を検討するため、バラ‘ソニア’花卉をフィルターユニットに入れ液体窒素で凍結した後、直ちに遠心した抽出液、30 分間常温に放置・解凍して遠心分離した抽出液、ならびに 1 時間冷凍庫内で保存してから遠心分離した抽出液の糖質濃度を比較した。

常法では花卉を 80% エタノールに浸漬し 75°C で 20 分間加熱した後、内部標準として 10% ソルビトールを 25 μL 加えホモジナイズした。3,000 \times g で 5 分間遠心した後、上澄みを乾固し蒸留水 1 mL を加え、溶解した。試料によっては試料前処理用固相抽出カラム (Sep-Pak Plus C18 カートリッジ, Waters 製) で精製し、再度乾固した後 1 mL の蒸留水で溶解した。溶解した試料はメンブレンフィルター (DISMIC-13CP, 0.45 μm , アドバンテック東洋製) で除塵した。

糖質分析

抽出した試料の糖質を HPLC で分析した。カラムは Shodex SUGAR SP0810, 検出器は示差屈折計, 移動相は蒸留水を使用し, 流量 0.8 mL \cdot min⁻¹, カラム温度 80°C, 試料注入量 50 μL の条件で測定した。

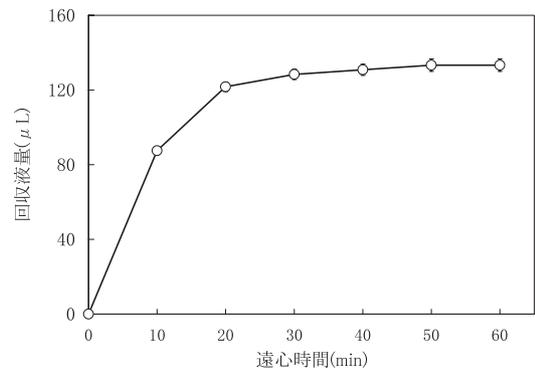
結 果

遠心時間と回収液量の関係

簡易迅速法の最適遠心時間を求めるため、バラ‘ソニア’花卉を供試し、遠心時間と回収液量との関係を調べたところ、最初の 10 分間の遠心で最終的な回収液量の約 70% (新鮮重の 44%) が回収され、遠心が長くなるほど回収液量は増加したが、30 分を越えると回収できる液量はほぼ一定となった。このため、以後の実験では遠心時間は 30 分とした (第 2 図)。

糖質組成の比較

バラ‘ソニア’花卉より抽出した試料の糖質を HPLC で

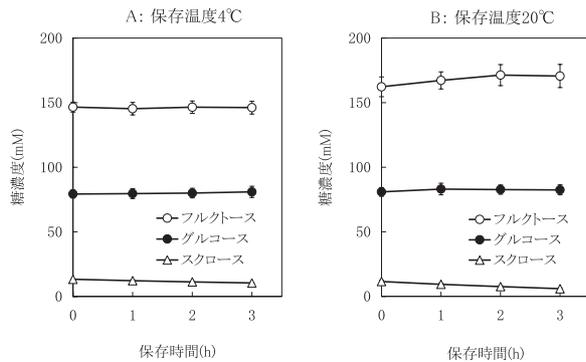


第 2 図 バラ花卉における遠心時間と回収液量との関係 誤差線は標準誤差を示す

第1表 バラ‘ソニア’花卉における簡易迅速法と常法で得られた抽出試料の糖質組成比較

	糖質組成 (%)					
	スクロース	メチルグルコシド	グルコース	キシロース	フルクトース	ミオイノシトール
簡易迅速法	6.0	3.5	32.5	7.3	48.5	2.3
常法	7.1	3.6	31.8	6.2	49.4	1.9
有意性 ²	NS	NS	NS	NS	NS	*

²NS および * は Mann-Whitney の U 検定の結果, 5% の水準で簡易迅速法と常法の糖質構成比に有意差がない, および有意差があることを示す



第3図 簡易迅速法で得られたバラ花卉抽出試料を異なる温度で保存した場合の時間経過による糖質組成の変化 誤差線は標準誤差を示す

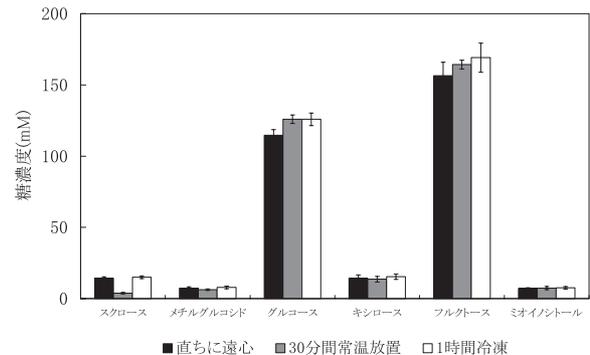
分析したところ, 簡易迅速法からは常法と同様にスクロース, メチルグルコシド, グルコース, キシロース, フルクトースおよびミオイノシトールが検出された. HPLC のクロマトグラムの面積値を合計が100%となる相対値で表し, Mann-Whitney の U 検定で比較したところ, ミオイノシトールを除くすべての糖質において5%水準で二つの抽出法に有意差はなかった(第1表). なお, 遠心残渣には花卉全体の3~25%の糖質が存在した(データ略).

時間経過による糖質組成の変化

簡易迅速法による抽出液の保存性を検討するため, バラ‘ソニア’花卉の抽出液を4°Cと20°Cに保ち, 1時間ごとにHPLCで分析して糖質組成の変動を調べたところ, フルクトースとグルコース濃度は保存温度4°C, 20°Cともに大きな変動はみられなかったが, スクロース濃度は低下する傾向にあり, その程度は20°Cで大きかった(第3図A, B). メチルグルコシド, キシロースおよびミオイノシトールの濃度には大きな変化はみられなかった(データ略).

凍結した花卉の取り扱い

遠心前の花卉の保存方法による糖質濃度の変化を検討するため, バラ‘ソニア’花卉を異なる条件下で保存した後, 得られた抽出液の糖質濃度を直ちに遠心した場合と比較した(第4図). 30分間常温に置いてから遠心した場合, スクロース濃度の著しい低下とグルコース濃度の上昇がみられた. また, 1時間冷凍庫内で保存して遠心した場合, グルコース濃度はやや上昇する傾向を示した.



第4図 遠心前のバラ花卉の保存法と糖濃度との関係 誤差線は標準誤差を示す

バラ4品種における糖質組成の比較

花卉から抽出した試料の糖質をHPLCで分析したところ, すべての品種において簡易迅速法からは常法と同じ糖質が検出された. HPLCのクロマトグラムの面積値を合計が100%となる相対値で表し, Mann-WhitneyのU検定で比較したところ, ‘マドレーヌ’のキシロースとミオイノシトール, ‘ニューブライダル’のフルクトース, ‘サターン’のフルクトースとミオイノシトールを除くすべての糖質において二つの抽出法の間5%水準で有意差はなかった(第2表). また, 本実験では, ‘ニューブライダル’と‘サターン’ではキシロースが, ‘ローテローゼ’ではメチルグルコシドとキシロースが検出されなかった.

カーネーション, トルコギキョウおよびオキシペタルムにおける遠心時間と回収液量の関係

カーネーション, トルコギキョウおよびオキシペタルムについて簡易迅速法の最適遠心時間を求めるため, 遠心時間と回収液量との関係を調べた. すべての供試材料で回収液量は遠心時間とともに増加した. カーネーションとオキシペタルムでは30分を越えると回収できる液量はほぼ一定となったが, トルコギキョウでは50分まで増加し続けた(第5図).

カーネーション, トルコギキョウおよびオキシペタルムにおける糖質組成の比較

花卉から抽出した試料の糖質をHPLCで分析したところ, 簡易迅速法からはすべての供試試料において常法と同じ糖質が検出された. HPLCのクロマトグラムの面積値を合計が100%となる相対値で表し, Mann-WhitneyのU検定

第2表 バラ4品種における簡易迅速法と常法で得られた抽出試料の糖質組成比較

	糖質組成 (%)					
	スクロース	グルコース	フルクトース	ミオイノシトール	メチルグルコシド	キシロース
マドレーヌ						
簡易迅速法	14.2	14.9	48.3	7.0	8.9	6.7
常法	17.0	13.5	45.0	10.4	9.3	4.8
有意性 ^z	NS	NS	NS	*	NS	*
ニューブライダル						
簡易迅速法	11.3	33.4	47.1	3.7	4.5	ND ^y
常法	10.9	31.7	49.4	3.5	4.4	ND
有意性	NS	NS	*	NS	NS	—
サターン						
簡易迅速法	16.8	25.6	46.2	5.1	6.2	ND
常法	17.4	23.5	42.3	8.8	7.9	ND
有意性	NS	NS	*	*	NS	—
ローテローゼ						
簡易迅速法	38.8	19.1	34.2	7.9	ND	ND
常法	38.9	18.9	33.0	9.1	ND	ND
有意性	NS	NS	NS	NS	—	—

^zNS および*は Mann-Whitney の U 検定の結果, 5%の水準で簡易迅速法と常法の糖質構成比に有意差がない, および有意差があることを示す

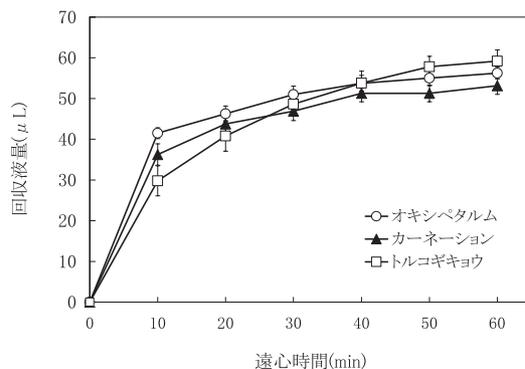
^y 検出限界以下を示す

第3表 トルコギキョウ, カーネーションおよびオキシペタルムにおける簡易迅速法と常法で得られた抽出試料の糖質組成比較

	糖質組成 (%)					
	スクロース	グルコース	ボルネシトール	ピニトール	フルクトース	ミオイノシトール
トルコギキョウ						
簡易迅速法	46.8	46.5	6.7	ND ^y	ND	ND
常法	48.8	43.4	7.9	ND	ND	ND
有意性 ^z	NS	NS	NS	—	—	—
カーネーション						
簡易迅速法	10.3	33.5	ND	15.8	37.1	3.3
常法	11.4	31.6	ND	15.5	39.2	2.3
有意性	NS	NS	—	NS	NS	NS
オキシペタルム						
簡易迅速法	13.5	35.2	ND	ND	49.1	2.3
常法	13.3	35.5	ND	ND	49.0	2.3
有意性	NS	NS	—	—	NS	NS

^zNSは Mann-Whitney の U 検定の結果, 5%の水準で簡易迅速法と常法の糖質構成比に有意差がないことを示す

^y 検出限界以下を示す



第5図 花弁の遠心時間と回収液量との関係
誤差線は標準誤差を示す

で比較したところ, 二つの抽出法の間で全供試試料の糖質組成に有意差はなかった (第3表)。

考 察

バラ‘ソニア’を材料とした場合, 新鮮重 0.2 g の花弁を 1 時間遠心しても回収液量は 125 μL と新鮮重の約 64% であったこと (第2図), 遠心残渣には花弁全体の 3~25% の糖質が存在した (データ略) ことなどから, 遠心によって花弁の全糖質を抽出することは不可能であることが示された。しかし, 糖質濃度を調べることを目的とする場合, 抽出液の糖質組成が花弁全体の糖質組成と差がなければ, 全糖質を抽出する必要はないと考えられる。そこで, 簡易

迅速法と常法の抽出液の糖質分析結果を比較した。得られる結果の単位が簡易迅速法では糖質濃度であるのに対して常法では糖質含量であり、値を直接比較することが不可能なため、二つの抽出法のクロマトグラム面積値を合計が100%となる相対値に変換し、Mann-WhitneyのU検定で比較した。

バラではグルコース、フルクトース、スクロース以外にキシロース、メチルグルコシドおよびミオイノシトールが構成糖質であることが報告されているが (Ichimura ら, 1997), 本実験では二つの抽出法の間でほとんどの糖質の構成比率に有意差がなかった (第1表, 第2表)。いくつかの糖質の構成比率には簡易迅速法と常法の間で5%水準で有意差がみられたが、その差はわずかであった。これらのことから、簡易迅速法は花卉の糖質濃度を確実に測定するための試料抽出に利用できる方法であると考えられる。さらに、本方法では糖質濃度を分析するための試料を得るのに10分程度の遠心時間で充分と考えられるため (第2図)、花卉の調製からHPLCに注入するまでの作業を30分以内に完了することが可能である。したがって、常法では1日以上かかっていた抽出に比べ時間を大幅に短縮できるだけでなく、抽出作業も簡単である。

簡易迅速法で得られた抽出液の時間経過による糖質組成の変化を調べたところ、バラ‘ソニア’花卉では保存温度4°C、20°Cともに3時間までは糖質濃度に大きな変動はみられなかったが、20°Cでは4°Cに比べスクロース濃度の低下が大きかった (第3図)。バラの花卉におけるインペルターゼ活性は比較的高いことが報告されていることから (Ho・Nichols, 1977)、この低下はインペルターゼによるスクロースの分解が原因と考えられる。したがって抽出液は低温で保存し、短時間のうちに分析することが必要であると考えられた。また、花卉をフィルターユニットに入れ液体窒素で凍結処理した後、30分間常温に置いて花卉を解凍し遠心したところ、スクロース濃度の著しい低下とグルコース濃度の上昇がみられた (第4図)。これも、インペルターゼによるスクロースの分解が原因と考えられる。凍結処理直後の10分間程度の遠心でも多くの抽出液が得られることから (第2図)、花卉は遠心中に解凍されることが示唆され、凍結処理後の花卉の解凍は不要である。これらの結果から、凍結処理後は直ちに遠心する必要があると考えられる。

トルコギキョウ、カーネーションおよびオキシペタルムについても、30分間の遠心で新鮮重の47~56%が、また60分間遠心した場合の82~91%が抽出できたことから (第5図)、糖質組成を調べる実験の遠心時間は30分間とした。カーネーションではグルコース、フルクトース、スクロースおよびミオイノシトール以外にピニトールが構成糖質であることが明らかにされている (Ichimura ら, 1998)。また、トルコギキョウではグルコースとスクロースが主要な構成糖質で、他にボルネシトールが含まれていることが

報告されている (市村ら, 1997)。本研究の結果、簡易迅速法においてもこれらの糖質は検出され、その組成には常法との間に有意差が認められなかった (第3表)。オキシペタルムの糖質組成を調べた報告は見当たらないが、本研究の結果、グルコース、フルクトース、スクロースおよびミオイノシトールが構成糖質であることが見出され、簡易迅速法と常法との間に糖質組成に有意差は認められなかった。したがって、本法は花卉の構成糖質とその濃度を明らかにできると考えられる。

細胞の浸透ポテンシャルは、液体窒素で組織を凍結後、遠心分離により得られた細胞液をオズモメーターで測定することが一般的である (Sakurai・Kuraishi, 1988)。しかし、花卉細胞の浸透ポテンシャル測定にあたっては細胞液の抽出方法について検討した報告は見当たらない。細胞液の常温での保持によるスクロースの分解はその浸透ポテンシャルを低下させることから、本研究で確立した抽出法は細胞の浸透ポテンシャルを測定する際にも有用であると考えられる。さらに、花卉の浸透ポテンシャルと糖質濃度を本法により定量すれば、浸透ポテンシャルへの糖質の寄与度を簡易に評価することが可能である。多くの花きにおいて、花卉が展開する過程で糖質濃度は上昇することから、糖質は浸透圧調節物質として寄与していると考えられている (van Doorn ら, 1991)。本研究で確立した方法により、花卉細胞の浸透ポテンシャルと糖質濃度を同時に測定すれば、糖質が浸透圧調節にどの程度寄与しているか明らかにすることが可能である。したがって、本法は、少なくとも供試した花きでは、花卉の糖質を簡易迅速に抽出できるだけでなく、糖質の浸透圧調節物質としての機能を調べる場合に有用な方法であると考えられる。

以上の結果から、花卉を液体窒素で凍結後、遠心分離により糖質分析試料を抽出できることが確認された。また、遠心分離による抽出法と常法とで糖質の構成比率に大きな差はみられなかった。したがって、花卉を液体窒素で凍結後、遠心分離により糖質分析試料を採取する方法は、糖質をモル濃度として示すための迅速かつ簡便な抽出法であると結論づけられる。

摘 要

花卉の糖質をモル濃度で表示するための試料の簡易迅速抽出法の開発を試みた。バラ‘ソニア’の花卉を遠心フィルターユニットに入れ、液体窒素で凍結後、遠心したところ、細胞液が抽出できることが確認された。抽出量は遠心時間が長くなるほど多くなったが、30分間の抽出でほぼ一定となった。この方法で抽出した試料の糖質組成を熱エタノールで抽出した場合 (常法) と比較したところ、著しい差はみられなかった。抽出した試料を常温で保持したところ、時間の経過にともないスクロース濃度は低下した。しかし、4°Cでの保持によりこの低下は抑制された。したがって、抽出した試料は低温で保持し、できる限り短時間で分析す

ることが必要であることが示された。バラ‘マドレーヌ’、‘ニューブライダル’、‘サターン’、‘ローテローゼ’、カーネーション、トルコギキョウおよびオキシペタルム花卉の糖質組成に簡易迅速法と常法との間で大きな差はみられなかった。以上の結果から、花卉を液体窒素で凍結後、ただちに遠心することにより糖質を含む細胞液を採取する方法は糖質をモル濃度として定量するための迅速かつ簡易な方法であると考えられた。

引用文献

- Bielecki, R. L. 1993. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiol.* 103: 213–219.
- Doi, M., Y. Hu and H. Imanishi. 2000. Water relations of cut roses as influenced by vapor pressure deficits and temperatures. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69: 584–589.
- Evans, R. E. and M. S. Reid. 1988. Changes in carbohydrates and osmotic potential during rhythmic expansion of rose petals. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 884–888.
- Halevy, H. and S. Mayak. 1979. Senescence and postharvest physiology of cut flowers, part 1. *Hort. Rev.* 1: 204–236.
- Ho, L. C. and R. Nichols. 1977. Translocation of ^{14}C -sucrose in relation to changes in carbohydrate content in rose corollas cut at different stages of development. *Ann. Bot.* 41: 227–242.
- Ichimura, K., Y. Kawabata, M. Kishimoto, R. Goto and K. Yamada. 2003. Shortage of soluble carbohydrates is largely responsible for short vase life of cut ‘Sonia’ rose flowers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 292–298.
- Ichimura, K., K. Kohata, M. Koketsu, M. Shimamura and A. Ito. 1998. Identification of pinitol as a main sugar constituent and changes in its content during flower bud development in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *J. Plant Physiol.* 152: 363–367.
- Ichimura, K., K. Kohata, M. Koketsu, Y. Yamaguchi, H. Yamaguchi and K. Suto. 1997. Identification of methyl β -glucopyranoside and xylose as soluble sugar constituents in roses (*Rosa hybrida* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1734–1735.
- 市村一雄・木幡勝則・是永 勝・久松 完. 1997. トルコギキョウの切り花の品質保持に及ぼすスクロース処理の影響ならびにその糖組成. *園学雑.* 66(別2): 614–615.
- Ichimura, K., K. Kojima and R. Goto. 1999. Effects of temperature, 8-hydroxyquinoline sulphate and sucrose on the vase life of cut rose flowers. *Postharv. Biol. Technol.* 15: 33–40.
- 小山佳彦・宇田 明・和田 修・藤野守弘. 1995. つぼみ切りカーネーションの前処理液が長期貯蔵後の切り花品質に及ぼす影響. *園学雑.* 63: 835–842.
- Sakurai, N. and S. Kuraishi. 1988. Water potential and mechanical properties of the cell wall of hypocotyls of dark-grown squash (*Cucurbita maxima* Duch.) under water-stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 29: 1337–1343.
- Van Doorn, W. G., G. Groenewegen, P. A. van de Pol and C. E. M. Berkholst. 1991. Effects of carbohydrate and water status on flower opening of cut Madelon roses. *Postharv. Biol. Technol.* 1: 47–57.
- 山根健治・河鱈実之・崎山亮三. 1991. グラジオラス花被の生長に伴う水分生理, 炭水化物含量および酸性インベルターゼ活性の変化. *園学雑.* 60: 421–428.