

カキ数品種のin vitroでのシュート増殖と発根

誌名	園藝學會雑誌
ISSN	00137626
巻/号	581
掲載ページ	p. 55-61
発行年月	1989年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



カキ数品種の *in vitro* でのシュート増殖と発根

村山秀樹*・田尾龍太郎・田中辰美**・杉浦 明

京都大学農学部 606 京都市左京区北白川追分町

In Vitro Shoot Proliferation and Rooting of Several Japanese Persimmon Cultivars

Hideki MURAYAMA, Ryutaro TAO, Tatsumi TANAKA and Akira SUGIURA

Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606

Summary

Using 7 Japanese persimmon cultivars ('Hiratanenashi', 'Jiro', 'Hana-gosho', 'Aizumishirazu', 'E-gosho', 'Kurogaki' and 2 strains, normal and dwarf, of 'Nishimura-wase'), optimal micropropagational conditions for culture establishment, shoot proliferation and rooting were investigated.

1. For culture establishment, both the types (N^6 -Benzyladenine: BA or N^6 -Isopentenyladenine: 2iP) and concentrations ($1\sim 20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of cytokinin were tested with dormant bud explants of 'Jiro' and 'Kurogaki' on modified MS medium with nitrates reduced to half strength ($\text{MS}(1/2\text{ NO}_3)$). Optimum concentrations of BA and 2iP for 'Jiro' were $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and $5\sim 20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively, and those for 'Kurogaki', $2\sim 5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and $5\sim 20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Explants of 'Jiro' produced more shoots than those of 'Kurogaki' during this stage and were established more easily. Other cultivars except 'Hana-gosho' could be established readily on the $\text{MS}(1/2\text{ NO}_3)$ medium supplemented with $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA.

2. For shoot proliferation and elongation also, both the types (BA or 2iP) and concentrations ($1\sim 20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) of cytokinin were tested with 'Jiro', 'Aizumishirazu', 'E-gosho', 'Kurogaki' and 2 strains of 'Nishimura-wase' explants which had been established and subcultured on $\text{MS}(1/2\text{ NO}_3)$ medium supplemented with $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA. BA was more effective for shoot proliferation, while 2iP was better for shoot elongation. In most cases, optimum concentration of each cytokinin was $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. The dwarf strain of 'Nishimura-wase' was more responsive to either cytokinin than the normal strain.

3. For rooting, periods of dark treatment ($0\sim 15$ days) and 3-indolebutyric acid (IBA) concentrations ($0\sim 1000\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) for acute exposure were tested with 'Hiratanenashi' shoots which had been elongated at $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ 2iP in the $\text{MS}(1/2\text{ NO}_3)$ medium. More than 6 days of darkness enhanced rooting, with the highest rooting percent being 9 days of treatment. Optimum IBA concentration for rooting was $250\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Shoot cuttings of 5 cvs, 'Hiratanenashi', 'Jiro', 'Aizumishirazu', 'E-gosho' and 'Kurogaki' rooted with final rootings of 96%, 80%, 74%, 44% and 8%, respectively, by this best combination of darkness and IBA treatment.

緒 言

近年、温帯果樹から熱帯果樹に至るまで多くの果樹について *in vitro* での栄養繁殖の成功例が相次いで報告

されるようになってきている。

カキはオウトウ、アーモンド、クリ、クルミなどと並んで挿木による繁殖がきわめて困難な果樹であり、従来、実生を育成してそれに接木することによって栽培品種の繁殖がはかられてきた。従って、*in vitro* 繁殖が実用化されれば遺伝的に斉一な自根樹の育成も可能である。また、最近探索が進められているわい性台木の開発(7)が実現すれば、容易にその優良台木系統を大量増殖する

1988年2月18日 受理

本研究の概要は昭和61年度園芸学会秋季大会(琉球大学)において発表した。

* 現在 山形県園芸試験場

** 現在 (株)宇部興産宇部研究所

ことも可能である。

前記挿木発根の困難な果樹においてすでに *in vitro* 繁殖の成功例がいくつか報告されている(2, 13, 15, 17)。カキについての研究例は未だきわめて少く, Yokoyama と Takeuchi(19, 20) が胚培養及びカルスからの器官分化を初めて報じたが, 実用化の段階には至らなかった。最近, Cooper と Cohen(1) がカキ数品種について新梢の茎頂及び腋芽を含む若い節の培養による繁殖に成功したのが実用的な研究の最初である。筆者ら(16)は Cooper と Cohen の報文に接するまでに全く別な方法により‘平核無’の *in vitro* 繁殖を試み, その結果を報告した。

本報告は‘平核無’について得られた前報(16)の手法が他品種の繁殖にも適用できるかどうかをさらに検討するとともに, 前報において十分でなかった増殖シュートの発根率を高める方法について若干の検討を行ったものである。

材料及び方法

京都大学農学部附属京都農場のカキ品種保存園植栽の6品種(‘平核無’, ‘次郎’, ‘花御所’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’)及び‘黒柿’の成木より休眠枝を12月下旬に採取して0℃で貯蔵し, その腋芽(冬芽)を随時培養に供した。また, ‘西村早生’2系統(普通系統及びわい性系統)の休眠枝を滋賀県農業試験場園芸分場より譲渡を受け, 上記と同様に貯蔵して培養に供した。

供試腋芽は有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液(展着剤 Tween 20 を0.1%加用)で10分間浸漬滅菌し, 滅菌水で4回洗浄したのち実体顕微鏡下でりん片及び幼葉を除去して頂端部を無菌的に摘出し, カミソリで約2mm長(茎頂及び葉原基数枚を含む)に調整して寒天培地上に置床した。

実験は外植片の定着, シュート増殖及び発根の3段階に分け, それぞれに対して好適な培養条件を明らかにするため以下のように行った。

1. 外植片の定着段階

サイトカイニンが外植片の定着に及ぼす影響を明らかにするために, その種類(ベンジルアデニン: BA, イソペンチルアデニン: 2iP)と濃度(1, 2, 5, 10及び20 mg・l⁻¹)について検討した。基本培地としては‘平核無’での前報の成績(16)で最も良い結果の得られたMS培地(12)のNH₄NO₃とKNO₃の濃度を1/2としたMS(1/2 NO₃)培地を用いた。培養数は各区20個体とし, 培養40日後の外植片の枯死率, カルス化率(外植片が完全にカルス塊になったものの割合)及び外植片当りシュート数を調査して定着の判定に供した。

2. シュート増殖段階

シュートの増殖実験には‘次郎’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’, ‘黒柿’及び‘西村早生’(2系統)の5品種を, BA 5 mg・l⁻¹を含むMS(1/2 NO₃)培地に定着させたのち, 約1か月毎に同種の培地で継代培養を行い, 継代3代目以後のよく揃ったシュートを用いた。なお, ‘花御所’はBA 5 mg・l⁻¹添加培地での定着がよくなかったため, 増殖段階の実験は中止した。

シュートの増殖及び生長に対するサイトカイニンの効果をみるため, MS(1/2 NO₃)培地にBA及び2iPをそれぞれ所定の濃度(1, 2, 5, 10及び20 mg・l⁻¹)になるように添加した。培養数は各区20個体とし, 培養30日目にシュート数と最大シュート長を調査した。

3. 発根段階

前報(16)において‘平核無’の増殖シュートの発根率は60%程度であったので, さらに発根率を高めるために暗黒処理とインドール酪酸(IBA)処理濃度の効果を検討した。

まず, ‘平核無’を供試し, BA 5 mg・l⁻¹添加MS(1/2 NO₃)培地で増殖を行い, これを2iP 5 mg・l⁻¹添加MS(1/2 NO₃)培地で1~2cmに伸長させたシュートを実験に用いた。

暗黒処理が発根に及ぼす影響を調べるため, シュート塊より切り取ったシュートの基部をIBA 250 mg・l⁻¹(50%エタノールに溶解)に15秒間浸漬し, 溶媒が乾いてから基本培地を2倍に希釈したホルモンフリーの寒天培地[1/2 MS(1/2 NO₃)培地]に置床した。置床後0, 3, 6, 9, 12及び15日間の暗黒処理(28℃)をしたのち16時間日長下で培養した。

次に, IBAの浸漬処理濃度の影響を調べるため, 滅菌水, IBA 0, 50, 100, 250, 500及び1000 mg・l⁻¹溶液でシュート基部を15秒間浸漬処理して前記ホルモンフリーの寒天培地に置床した。なおこの際, 6日間暗黒処理をしたのち16時間日長下で培養した。

培養数は両実験とも各区25個体とし, 2日毎に発根の有無を調査した。

次いで, ‘次郎’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’及び‘黒柿’の増殖シュートについて, IBA浸漬処理(250 mg・l⁻¹)と暗黒処理(9日間)とを組合せて, 品種間の発根率の比較を行った。培養数は‘次郎’は25個体, 他の3品種はそれぞれ50個体とした。

以上の1, 2, 3の実験で用いた培地にはすべてショ糖3%, 寒天(和光純薬製細菌培地用)0.8%を加用した。培地は連続分注器で20mlずつ試験管(2.3×15cm)に分注した。培地のpHは5.7に調整し, 12分間

Table 1. Effect of BA and 2iP at different concentrations on culture establishment of dormant bud explants from cvs Jiro and Kurogaki. Twenty explants per treatment.

Cytokinin concn (mg · liter ⁻¹)	Jiro ^z			Kurogaki ^z		
	Death rate (%)	Callusing ^y rate (%)	No. of shoots per explant	Death rate (%)	Callusing ^y rate (%)	No. of shoots per explant
BA	1	100	0	10	0	1.0±0.1 ^x
	2	24 ^w	0	10	0	1.8±0.2
	5	0	0	25	0	1.9±0.3
	10	5	0	55	0	0.9±0.3
	20	5	0	90	0	0.1±0.1
2iP	1	100	0	0	65	0.4±0.1
	2	90	0	0	35	0.7±0.1
	5	6 ^v	0	0	0	1.3±0.1
	10	0	0	0	0	1.1±0.1
	20	0	0	10	0	0.9±0.1

^z Data taken after 40 days in culture.

^y Callusing rate indicates percentages of explants that developed into callus masses.

^x Mean±SE.

^w Three explants contaminated.

^v Two explants contaminated.

加圧滅菌 (120°C, 1.2 kg·cm⁻²) した。培養は発根実験を除き他のすべては全日長, 光度 20 μEm⁻² sec⁻¹, 温度 27°C 下で行った。

実験結果

1. 外植片の定着

初代培養における外植片の定着を調べた結果は第1表のとおりである。‘次郎’についてみると外植片の枯死率はBA, 2iP いずれも 1~2 mg·l⁻¹ の低濃度で高かったが, 5~20 mg·l⁻¹ の範囲ではきわめて低かった。外植片当りのシュート数は 5 mg·l⁻¹ BA で最も多く, 次いで 10 mg·l⁻¹ であった。他方, 2iP の 5~20 mg·l⁻¹ の間ではシュート数に濃度間の差がみられなかった。なお, いずれのサイトカイニンでも外植片が完全にカルス化する現象はみられなかった。‘黒柿’のサイトカイニンに対する反応は‘次郎’とはやや異なり, BA 濃度が高くなるにつれて枯死率が高まり, 20 mg·l⁻¹ では90%にも達した。定着期間中のシュート増殖率は‘次郎’に比べて低く, 枯死率を考慮すれば 2 mg·l⁻¹ が好適濃度で, 5 mg·l⁻¹ がそれに続いた。2iP では 5~10 mg·l⁻¹ で外植片の枯死もカルス化も全くなかったが, シュート数はBA に比べてやや劣った。

2. シュートの増殖と生長

BA 5 mg·l⁻¹ 添加の MS (1/2 NO₃) 培地で定着させ, 継代を続けた5品種のシュート増殖と生長に及ぼすBAと2iPの濃度の影響は第1, 2図に示すとおりである。シュート増殖に対するサイトカイニンの効果はいずれの品種でも2iPに比べてBAの方が大きく, 好適濃度

はおおむね 5 mg·l⁻¹ であった。ただ, ‘次郎’と‘西村早生’わい性系統では 5~10 mg·l⁻¹, ‘西村早生’普通系統では 2~10 mg·l⁻¹ の範囲で同程度の効果を示した(第1図)。なお, ‘西村早生’2系統間では普通系統に比べてわい性系統の方がBAに対する反応が大であった。

一方, シュートの伸長に対するサイトカイニンの効果を最大シュート長で比較すると(第2図), BAに比べて2iPでその効果が大きく, ‘西村早生’を除く4品種では 5 mg·l⁻¹ が好適濃度であった。‘西村早生’2系統の2iPの好適範囲は 5~10 mg·l⁻¹ 付近であり, また, わい性系統の方が普通系統よりも強く反応する傾向がみられた。なお, ‘黒柿’は2iP 1 mg·l⁻¹ の低濃度でもよく伸長した。

3. 発根

予備実験において発根に好適な培地を検討したところ, MS (1/2 NO₃) の2倍希釈培地がおおむね良好な結果を示したので, 本実験ではこれを基本培地とした。

IBA 250 mg·l⁻¹ 処理をした‘平核無’シュートの発根に及ぼす暗黒処理の結果は第3図のとおりである。置床後6日間以上暗黒処理した場合, 発根は著しく促進され, 9日間処理で最高発根率を示した。しかし, 暗黒期間が12日間以上になるとシュートが黄化し衰弱する傾向が認められた。

次に, 暗黒処理(6日間)とIBA処理(5濃度)とを組合せて発根に及ぼす影響をみた結果は第4図のとおりである。溶媒(50%エタノール)処理のみでもかなり発根が認められたが, IBA 50~250 mg·l⁻¹ の間では濃

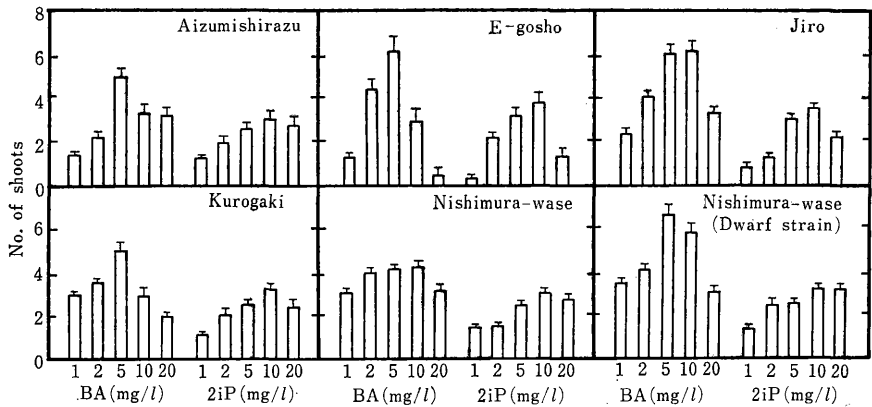


Fig. 1. Effect of BA and 2iP at different concentrations on shoot proliferation of 5 Japanese persimmon cultivars. Data taken after 30 days in culture. Vertical bars indicate SE. Twenty cuttings per treatment.

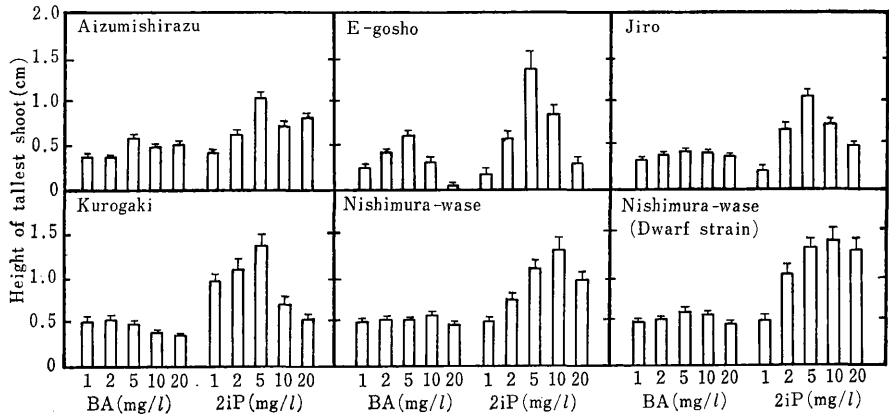


Fig. 2. Effect of BA and 2iP at different concentrations on shoot elongation of 5 Japanese persimmon cultivars. See legend for Fig. 1.

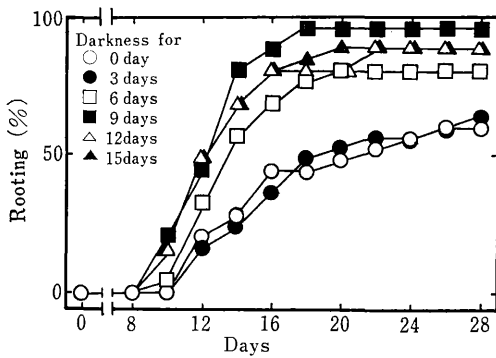


Fig. 3. Effect of dark treatment on rooting process of 'Hiratanenashi' shoot cuttings. Cuttings pretreated with IBA at 250 mg·l⁻¹. Fifty percent ethanol used for the solvent of IBA solution. Twenty-five cuttings per treatment.

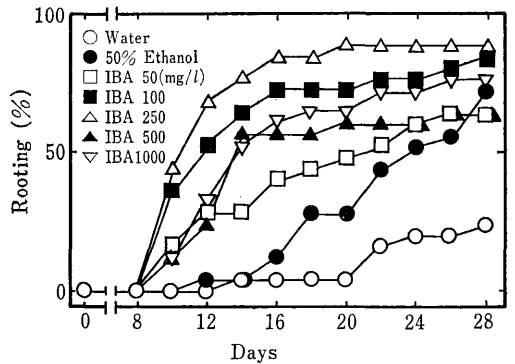


Fig. 4. Effect of IBA concentrations on rooting process of 'Hiratanenashi' shoot cuttings. Dark treatment applied during the first 6 days of culture. Twenty-five cuttings per treatment.

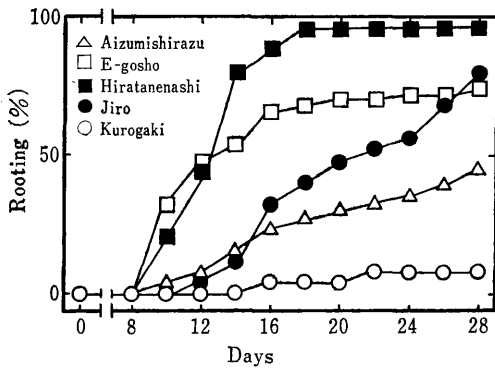


Fig. 5. Effect of IBA concentrations on shoot growth and rooting of 'Hiratanenashi' shoot cuttings.

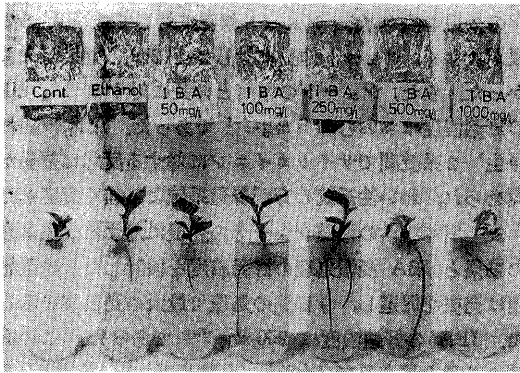


Fig. 6. Effect of dark treatment (9 days) in combination with IBA pretreatment ($250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) on rooting process of 5 Japanese persimmon cultivars. Fifty cuttings each used for 'Aizumishirazu', 'E-gosho' and 'Kurogaki' and 25 for 'Jiro'. Data for 'Hiratanenashi' redrawn from Fig. 3.

度の上昇に伴って発根が促進され、 $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ で最大となった。しかし、 $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以上になると効果は低下し、また、シュートの生長が抑制され奇形化する傾向が認められた (第5図)。

以上のように、「平核無」では $\text{IBA } 250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と9日間暗黒処理で最も高い発根率が得られたので、この条件で「次郎」、「会津身不知」、「絵御所」及び「黒柿」について発根実験を行った。その結果は第6図のとおりである。いずれも最も発根率のすぐれた「平核無」(96%)には及ばず、最終発根率は「次郎」80%、「絵御所」74%、「会津身不知」44%であり、「黒柿」はわずか8%であった。

なお、以上の発根実験で得られた発根個体を予備的にパーミキュライト、パーライト、ピートモスなどの用土(単用または混用)を用いて鉢上げを試みたが、その生

存率は50%程度かそれ以下であった。今後は培養によって得られた個体の鉢上げ馴化方法を確立する必要がある。

考 察

Murashige(11)は *in vitro* での繁殖を外植片の定着、シュートの増殖、発根の3段階に分けているが、これに鉢上げの段階を加えて *in vitro* での繁殖法が確立するものといえる。筆者らは前報(16)において「平核無」休眠芽について Murashige が分けた3段階に対する培養条件を検討し、 $\text{BA } 5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加の $\text{MS } (1/2 \text{ NO}_3)$ 培地で外植片の定着とシュート増殖をはかり、発根直前の段階で $2 \text{ iP } 5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加培地に移してシュートを伸長させ、IBA 処理により発根を促して個体の増殖をはかる方法を提示した。

本報では、まず「平核無」について得られた上記方法が他の品種に対しても適用できるかどうかを確かめるための実験を行った。定着段階でのサイトカイニンの影響を「次郎」と「黒柿」について検討した結果、「平核無」とほぼ同様の傾向を示し、好適濃度の範囲は品種間でやや異なったが、BA、 2 iP いずれでも良く定着した。また、シュートの増殖実験に供試した他の3品種(「会津身不知」、「絵御所」、「西村早生」2系統)も $\text{BA } 5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 添加培地で順調な定着を示した。しかし、供試品種中「花御所」はBA添加培地での定着が不良であったので、定着困難な品種についてはさらに詳細な検討を要する。

次に、シュート増殖段階におけるサイトカイニンの効果を検討した結果、「平核無」の場合と同様に供試5品種のシュート増殖は 2 iP に比べてBAですぐれた。しかし、BA添加培地ではシュートはあまり伸長せず、前報同様 2 iP 添加培地で良好な伸長がみられた。リンゴ「Golden Delicious」の茎頂培養においてもシュート増殖にはBAが、伸長には 2 iP が有効であることが報告されている(10)。

なお、「西村早生」2系統間ではサイトカイニン(BA、 2 iP)に対する反応がやや異なり、わい性系統の方が普通系統に比べて強く反応する傾向がみられた。同様な反応の違いはゼアチンに対するシュート伸長においても認められている(4)。このような樹勢の強弱間でのサイトカイニンに対する反応の違いはリンゴでも報告されており(8,9)、カキのわい性台木を *in vitro* 系を利用して探索する方法は検討してみる価値があると思われる。

増殖シュートの発根率を高めるため、暗黒処理期間とIBAの処理濃度を検討した。「平核無」では6日間以上の暗黒処理で発根が促進され、9日間処理で最も高い発根率が得られた。暗黒処理が発根に効果的であることは

リンゴ(3, 18, 22), ナシ(21), スモモ(5), ツバキ(14)などでも報告されている。暗黒の好適期間はリンゴ, ナシでは通常4日から1週間程度であるが, ツバキでは18日以上暗黒処理で始めて効果をあらわすものが報告されている。また, この暗黒期間の長さは根源体が分化する期間とほぼ一致している(14, 18)。

発根に及ぼす IBA の濃度を調べたところ, 250 mg・l⁻¹ の濃度で最高の発根率が得られた。500 mg・l⁻¹ 以上は高濃度に過ぎ, シュートの衰弱と奇形化がみられた。ただ, 50%エタノール処理だけでも発根がかなり促進されたことは IBA の効果以外に内生の発根阻害物質を除去する効果もあったのではないかと考えられる。なお, IBA 処理方法として浸漬処理ではなく低濃度で培地に添加する方法も試みたが, 浸漬処理にまさる結果は得られなかった。

以上の‘平核無’の発根実験で最良と考えられた培養条件で4品種の発根を試みたところ, 発根率に品種間差異がみられ, とくに‘黒柿’は発根率が低かった。‘平核無’に好適な条件が他品種にとっては好適でなかったのか, あるいは, 元来発根性の悪い品種であったのか, さらに検討する必要があると考えられる。外植片の定着の良否にも同様のことが考えられ, 品種・系統ごとに好適な培養条件を検討する必要があるのかも知れない。

なお, 培養に用いる外植片の採取部位について触れておきたい。Cooper と Cohen(1)によるカキでの実験や挿木困難な他の果樹での培養実験では発育中の新梢の茎頂部を外植片として用いているのが殆どである。筆者らはカキの新梢茎頂部は BA ではよく定着するが, 2iP ではカルス化が著しいことをみている(16)。Cooper と Cohen は新梢の腋芽を含む節の培養にも成功しているが, ゼアチンを用いた場合にのみ成功しており, BA では成功していない。サイトカイニンのうちゼアチンはとくに高価であるので, 繁殖という実用性を考慮すれば安価な BA でゼアチンの作用を代替し得れば望ましいことである。また, カキの茎頂部は萌芽後約1か月前後で枯死脱落してしまうので(6), 萌芽後短期間のうちに培養を行わなければならないという欠点がある。それに対して休眠芽は解剖顕微鏡下でのりん片剥皮等に時間を要するという欠点はあるが, 低温での長期貯蔵によって随時実験に供しうる利点があり, 実験の遂行上できわめて有利といえる。

摘 要

カキ7品種(‘平核無’, ‘次郎’, ‘花御所’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’, ‘黒柿’及び‘西村早生’—普通系統とわい性系統)の休眠芽を供試して, *in vitro* での茎頂部外

植片の定着とシュート増殖に対するサイトカイニンの影響, 及び増殖シュートの発根に対する IBA と暗黒処理の影響を検討した。

1. MS 培地の NO₃²⁻ を半量とした基本培地を用いてサイトカイニンの種類(BA と 2iP)と濃度(1~20 mg・l⁻¹)が‘次郎’及び‘黒柿’の外植片の定着に及ぼす影響を調べた。その結果, 定着に好適な濃度は, ‘次郎’では BA 5 mg・l⁻¹, 2iP 5~20 mg・l⁻¹, ‘黒柿’では BA 2~5 mg・l⁻¹, 2iP 5~10 mg・l⁻¹ であり, 品種間で多少の相違が認められた。定着の程度は‘黒柿’でやや劣った。また, その他の品種も BA 5 mg・l⁻¹ 添加培地でよく定着したが, ‘花御所’のみ定着不良であった。

2. BA 5 mg・l⁻¹ 添加培地で定着させ, 継代を続けた‘次郎’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’, ‘黒柿’及び‘西村早生’2系統のシュート増殖と伸長に対するサイトカイニンの効果を調べた。シュート増殖に対しては BA の効果が大きく, シュート伸長に対しては 2iP の効果が大きかった。また, シュートの増殖と伸長に対する BA, 2iP の好適濃度はおおむね 5 mg・l⁻¹ であった。なお, ‘西村早生’2系統間でサイトカイニンに対する反応に差異が認められ, わい性系統の方が普通系統より強く反応した。

3. ‘平核無’の増殖シュートの発根に対する暗黒処理の効果と IBA 浸漬処理の好適濃度を検討した。暗黒処理は発根を促進し, 9日間の処理で最大の発根率を示した。IBA の好適濃度は 250 mg・l⁻¹ であった。この好適2条件を組合せて‘次郎’, ‘会津身不知’, ‘絵御所’及び‘黒柿’のシュートを発根させたところ, 最終発根率はそれぞれ80%, 74%, 44%, 8%となり, 品種間で大きな差異が認められた。

引用文献

1. COOPER, P. A. and D. COHEN. 1984 (Publ. 1985). Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 34: 118-124.
2. DRIVER, J. A. and A. H. KUNIYUKI. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. HortScience 19: 507-509.
3. DRUART, P., C. KEVERS, P. BOXUS and T. GASPARD. 1982. In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Z. Pflanzenphysiol. 108: 429-436.
4. 文室政彦・村山秀樹・田尾龍太郎・村田隆一・杉浦 明. 1988. カキのわい性台木の育成に関する研究(第1報). 組織培養による西村早生わい性系統の繁殖. 滋賀農試研究報告 29: 20-32.
5. HAMMERSCHLAG, F. 1982. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus ceracifera*

- Ehrh.). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 44-47.
6. 原田 久, 1984. カキにおける新梢生長, 腋芽発育と花芽分化の関係. 園学雑. 53: 271-277.
 7. 木村伸人・河瀨明夫・青木松信・岡田詔男・真子伸生・須崎静夫. 1985. カキわい性樹の探索と利用(第1報)わい性樹の生育特性と収量性. 愛知農総試研報. 17: 273-281.
 8. LANE, W. D., N. E. LOONEY, and F. MÅGE. 1982. A selective tissue culture medium for growth of compact (dwarf) mutants of apple. Theor. Appl. Genet. 61: 219-223.
 9. LANE, W. D. and J. M. MCDUGALD. 1982. Shoot tissue culture of apple: Comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Can. J. Plant Sci. 62: 689-694.
 10. LUNDERGAN, C. A. and J. JANICK. 1980. Regulation of apple shoot proliferation and growth in vitro. Hort. Res. 20: 19-24.
 11. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annu. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
 12. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
 13. RUGINI, E. and D. C. VERMA. 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch) cultivar. Plant Sci. Let. 28: 273-281.
 14. SAMARTIN, A., A. M. VIEITEZ and E. VIEITEZ. 1986. Rooting of tissue cultured camellias. J. Hort. Sci. 61: 113-120.
 15. SNIR, I. 1982. In vitro propagation of sweet cherry cultivars. HortScience 17: 192-193.
 16. SUGIURA, A., R. TAO, H. MURAYAMA and T. TOMANA. 1986. In vitro propagation of Japanese persimmon. HortScience 21: 1205-1207.
 17. VIEITEZ, A. M., A. BALLESTER, M. L. VIEITEZ and E. VIEITEZ. 1983. In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. J. Hort. Sci. 58: 457-463.
 18. WELANDER, M. 1983. In vitro rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. Physiol. Plant. 58: 231-238.
 19. YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI. 1976. Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Phytomorphol. 26: 273-275.
 20. YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI. 1981. 1981. The induction and formation of organs in callus cultures from twigs of mature Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 557-562.
 21. 吉田 要・伴野 潔・林 真二・田辺賢二. 1986. ニホンナシ品種の組織培養による繁殖について. 園学要旨. 昭61秋. 70-71.
 22. ZIMMERMAN, R. H. 1984. Rooting apple cultivars in vitro: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant Cell Tissue Organ Culture 3: 301-311.