

# カキ葉組織からの不定芽形成による植物体再生

西村 浩一郎\*・山田 員人\*\*

## Plantlet Regeneration of Japanese Persimmon from Leaf Segment through Adventitious Bud Formation

Koichiro NISHIMURA and Kazuto YAMADA

### I. 諸 言

近年、果樹における *in vitro* での増殖の成功例が多く報告されるようになってきている。しかし、これらは主として茎頂培養系を利用したものであり、体細胞組織から直接に植物体を再生させることに成功した例は少ない。茎頂培養系は培養中における遺伝的変異の発生が少ない有利な点をもっているが、体細胞組織からの植物体の再生系は増殖効率のよさ、材料入手の容易さにおいて大きな利点がある。また、将来の細胞レベルでの操作系、若しくは形質転換系に向けての培養条件を確立するためには、それらの前段階として、体細胞組織からの再生系を明らかにしておくことが重要になってくる。カキについても近年、茎頂培養系を利用した栽培品種の増殖は、実用上有用と考えられる「わい性台木」系統を含めて多く報告されているが、体細胞組織からの再生系についてはほとんど報じられていない<sup>3)</sup>。山田ら<sup>1)</sup>は種子内胚軸組織部位を用いて不定芽形成を行い、YOKOYAMAとTAKEUCHI<sup>2)</sup>は実生にて得られた比較的幼齡の本葉を材料として不定芽形成に成功した。また、福井ら<sup>4)</sup>は茎頂培養由来のシュートの本葉を材料として不定芽形成を行っている。しかし、前2報については実生由来に起因する遺伝的特性の点で問題があり、後1報についてはサイトカイニンとして非常に高濃度のゼアチンを用いることにより成功しているため、いずれも実用上の点で問題が残る。

そこで本報では、より実用的で効率のよいカキの再生系を検討し、その系を利用したカキの大量増殖体系

を確立することを目的として、茎頂培養に由来するシュートの本葉を材料に用い、果樹類としては比較的低濃度のサイトカイニンを利用することにより、組織からの不定芽の直接形成、発根から植物体への再生条件等について検討を行ったので報告する。

なお、本研究の一部は農林水産省の地域バイオテクノロジー研究開発促進事業による助成を受けた。また、協和発酵工業株式会社にはホルクロールフェニユロンの提供を受けた。ここに記して感謝の意を表す。

### II. 試験方法

材料として用いる外植片は、当场果樹圃場に栽植されている2品種「西条」と「富有」及び1系統「台木用実生1号」(以下「実生1号」)の休眠芽の茎頂を培養し、再生した小植物体の葉部(展開葉の上位3~6葉, 1~4 cm長)を約5 mm角切片に調製して用いた。すなわち、培養中の小植物体は無機窒素濃度を1/2に改変したMS培地<sup>5)</sup>(1/2NMS)に、ショ糖2%, N6-Benzyladenine(BA)を1mg/lの濃度で添加して、寒天0.8%で固化した培地上で1年間継代培養したものである。また、培養に用いた共通の培地として1/2NMS培地にショ糖2%を添加し、寒天0.8%で固化したものである。培養は25°Cで2,500lx, 16時間日長の条件下で行った。

外植片は各区20個体を用い、葉の裏面を上にして置床した。調査は培養45日後に行い、外植片の枯死数、不定芽を形成した外植片当たりの平均不定芽形成数、カルス化した個体数(組織の全体又は一部がカルス化)、カルス色

の指標の平均値を調査して不定芽形成の判定に供した。

#### 1. 不定芽形成に及ぼすサイトカイニン及びオーキシンの影響

外植片は「西条」を用いた。供試するサイトカイニンは、BA, ゼアチン(ZEA), カイネチン(KIN), N6-(2-isopentenyl) adenine(2ip), 1-(2-Chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea(Forchlorfenuron)とし、供試濃度は0.02, 0.2, 2.0, 20mg/lとした。オーキシンは1-Naphthaleneacetic acid(NAA), Indole-3-acetic acid(IAA)と2,4-Dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D)を用い、濃度をサイトカイニンと同一にした。

#### 2. 外植片の由来品種、系統が不定芽形成に及ぼす影響

「西条」、「富有」、「実生1号」の外植片を、ホルクロールフェニユロンを0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10mg/l及びNAAを0.002, 0.02, 0.2mg/lの濃度で添加した培地に置床した。

#### 3. 外植片の葉位及び葉部位が不定芽形成に及ぼす影響

「西条」について、葉位別(展開葉の上位1~7葉)及び葉部位別に区別して調製した外植片を、ホルクロールフェニユロン2.0mg/l及びNAA 0.02mg/lの濃度で添加した培地上に置床した。

培養45日後の外植片の葉位、葉部位別における生存及び枯死の状態、カルス化の状態、不定芽誘導の状態

を調査して不定芽形成の判定に供した。

#### 4. シュートの生育に及ぼすサイトカイニンの影響

材料は第2項において葉部から形成して得られた「実生1号」のシュートで、丈が約7 mmまで生育したものを一芽毎に切り離して用いた。これらをサイトカイニン(BA, 2ip又はホルクロールフェニユロン)を0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20mg/l添加した培地上に挿芽した。培養シュート数は各区10個体とし、培養60日後の草丈の平均値、シュートの平均数、展開葉の平均数、最大葉長の平均値、奇形の有無を調査してシュート生育の判定に供した。

#### 5. シュートの発根条件の検討

材料は第4項において得られた「実生1号」のシュートで、丈が約5 cmまで生育したものである。これらを2ipを2.0, 5.0mg/l及びβ-Indolebutyric acid(IBA)を0, 0.1, 0.5, 1.0mg/lの濃度で調製した培地上に挿芽した。培養シュート数は各区10個体とし、培養90日後の生存数、発根した個体数、発根した個体当たりの根数の平均値、根長の平均値を調査して発根条件の判定に供した。

### III. 試験結果

#### 1. 不定芽形成に及ぼすサイトカイニン及びオーキシンの影響

第1表 サイトカイニン及びオーキシンが不定芽形成に及ぼす影響

添加ホルモン濃度 (mg/l)		NAA				IAA			
ホルクロールフェニユロン	オーキシン	枯死数	不定芽形成 個体数	カルス形成 固体数	カルス形成 程度**	枯死数	不定芽形成 個体数	カルス形成 固体数	カルス形成 程度**
0.02	0.02	15	0	—	0	—	3	0	—
0.02	0.2	12	0	—	5	0.4	2	0	—
0.02	2.0	20	—	—	—	—	4	0	—
0.02	20.0	20	—	—	—	—	7	0	—
0.2	0.02	18	0	—	0	—	10	0	—
0.2	0.2	11	0	—	8	1.5	1	0	—
0.2	2.0	6	0	—	14	4.2	0	0	—
0.2	20.0	17	0	—	2	1.5	1	0	—
2.0	0.02	10	10	8.6	8	0.3	12	6	5.3
2.0	0.2	10	8	2.5	10	2.5	11	4	2.8
2.0	2.0	3	0	—	17	5.0	4	8	1.8
2.0	20.0	12	0	—	8	3.1	13	0	—
20.0	0.02	10	10	4.2	7	0.8	4	8	1.3
20.0	0.2	13	3	1.0	7	1.5	3	10	2.0
20.0	2.0	6	0	—	14	5.0	8	7	1.6
20.0	20.0	15	0	—	5	2.5	7	0	—

注) 1. \* カルスを伴って形成された不定芽形成個体を含む  
 2. \*\* 個体を0(無)~5(大)の指数で表したものの平均値  
 3. 調査は培養約45日後に実施、供試個体数 20/区  
 4. サイトカイニンのBA, ZEA, KIN, 2ip及びオーキシンの2,4-Dについては不定芽形成が認められなかったの  
 でデータを省略

サイトカイニン及びオーキシンの外植体からの不定芽形成に及ぼす影響を検討した結果は第1表に示した。

まず、サイトカイニンの影響をみると、不定芽はホルクロルフェニユロンを添加した区においてのみ、培養約25日後から形成するのが認められた。しかし、他のBA, ZEA, KIN, Zipを添加した区では、不定芽の形成は認められなかった。不定芽形成のためのホルクロルフェニユロンの添加濃度は2.0, 20mg/lで、これにNAAを0.02, 0.2mg/l添加した区において不定芽形成が観察された。特に、ホルクロルフェニユロンが2.0 mg/l及びNAAが0.02mg/l付近においては、カルスがほとんど形成されないで、不定芽が組織から直接誘導される傾向がみられた。また、ホルクロルフェニユロンを添加した試験区においては、緑色のコンパクトな形状のカルスが形成されたが、これらは、NAAを低濃度にした培地上に移植して培養することにより再生が可能であった。しかし、他のサイトカイニンを添加した区においては、白色の柔らかいカルスが形成される傾向にあり、再生はしなかった。

一方、NAA以外のオーキシンでは、ホルクロルフェニユロン存在下で、IAAが比較的低濃度で添加された時、すなわち、ホルクロルフェニユロンが2.0~20mg

/l, IAAが0.02~2.0mg/lの濃度範囲において不定芽の形成が認められた。また、2,4-Dについては、不定芽が全く形成されなかった。

不定芽形成のためのオーキシンの濃度範囲はIAAがNAAよりも広がったが、外植片当たりの不定芽の平均形成数は、IAAよりもNAAが多く、生育も早かった。比較的低濃度のIAA添加区では、カルス形成がほとんど行われず、組織から直接に不定芽が形成された。また、比較的高濃度のIAA添加区において形成されたカルスは、NAAの場合と同様緑色のコンパクトな形状をしており、低濃度で継代培養をすることにより再生可能であった。

2. 外植片の由来品種、系統が不定芽形成に及ぼす影響

カキの葉組織からの不定芽誘導に関しては、ホルクロルフェニユロン及びNAAの系が有効であることが明らかになったので、ホルクロルフェニユロンを0.5~10.0 mg/l及びNAAを0.002~0.2mg/lの濃度範囲で条件を設定して詳細な試験を行い、その結果を第2表に示した。

供試した品種及び系統である‘西条’、‘富有’、‘実生1号’の全てにおいて不定芽の形成が認められ

第2表 不定芽形成に関する品種、系統間差異

Table with 15 columns: 添加ホルモン濃度 (mg/l), 西条 (枯死数, 不定芽形成数, カルス形成数, 程度), 富有 (枯死数, 不定芽形成数, カルス形成数, 程度), 台木用実生1号 (枯死数, 不定芽形成数, カルス形成数, 程度). Rows show data for concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/l for bothホルクロルフェニユロン and NAA.

注) \*, \*\*印は第1表に同じ、調査は培養後約45日後、供試個体数 20/区

た。‘西条’に関しては、ホルクロルフェニユロンが0.5~2.0mg/l及びNAAが0.002~0.2mg/lの範囲において効率よく、しかも、組織から直接に不定芽が誘導された。特に、不定芽形成の良好な試験区は、ホルクロルフェニユロンが2.0mg/l及びNAAが0.002~0.02 mg/lの範囲であった。‘実生1号’に関しては、‘西条’と同様の濃度範囲で不定芽が形成されたが、ホルクロルフェニユロンが0.5~1.0mg/lの範囲では外植片が枯死する頻度が非常に高かった。しかし、ホルクロルフェニユロンが2.0mg/l及びNAAが0.002~0.2mg/lの範囲においては‘西条’と同様に、組織から直接に効率よい不定芽形成が行われた。‘富有’に関しても、‘西条’と同様な濃度領域で不定芽が形成された。しかし、カルスについては非常に形態が異なり、緑色の固いカルスと褐色の非常に柔らかいカルスが混在していた。

3. 外植片の葉位及び葉部位が不定芽形成に及ぼす影響

外植片に用いる展開葉の葉部位に関しては、上位から1~2葉目においては葉全体がカルス化し、同3~4葉目の展開葉においては、葉内の全部位の組織から不定芽が直接形成された。また、5~6葉目の展開葉では葉基部から約2分の1の部位において不定芽の形成が認められ、それ以下の展開葉ではほとんどが枯死する傾向にあった(データ省略)。

4. シュートの生育に及ぼすサイトカイニンの影響

サイトカイニン濃度が‘実生1号’のシュートの生育に及ぼす影響を示したのが第3表である。

草丈はZipが優れ、ホルクロルフェニユロンがこれに次ぎ、BAはやや劣った。Zipでは1.0~10.0mg/lの広い濃度範囲において良好に伸長した。次いで、ホルクロルフェニユロンは1.0~5.0mg/lの範囲が、また、BAにおいても同様の範囲で良好であった。展開葉数に関してもZipが最もよく、2.0~10.0mg/lの範囲で多かった。BAでは2.0~10.0mg/lが、ホルクロルフェニユロンでは濃度によらずほぼ一定の値を示した。ま

第3表 カキ‘台木用実生1号’のシュートの生育に及ぼすサイトカイニンの影響

Table with 7 columns: サイトカイニン, 濃度 (mg/l), 平均草丈 (mm), 平均シュート数, 平均展開葉数, 平均最大葉長 (mm), 奇形有無. Rows show data for concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l for BA and Zip, and 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l for ホルクロルフェニユロン.

注) 培養約60日後に調査、供試個体数 (10/区)

た、奇形シュートは、BAが20.0mg/l、ホルクロルフェニユロンが5.0~20.0mg/lの比較的高いサイトカニン濃度の範囲において発生したが、他の範囲では正常な生育を示した。

#### 5. シュートの発根条件の検討

シュートからの発根に及ぼす2ip及びIBAの影響を示したのが第4表である。

第4表 カキの不定芽由来シュートからの発根に及ぼす2ip, IBAの影響

2ip (mg/l)	IBA (mg/l)	生存数	発根 個体数	平均 発根数	平均根長 (mm)
2.0	0	7	1	2	7
2.0	0.1	6	2	1.5	6
2.0	0.5	7	2	2	8
2.0	1.0	7	3	2.3	10
5.0	0	8	2	1.5	7
5.0	0.1	7	2	1.5	8
5.0	0.5	7	3	3	18
5.0	1.0	7	2	2.5	12
5.0	2.0	6	3	3	15

注) 培養約90日後に調査, 供試個体数 (10/区)

置床したシュートの生存率は、どの濃度範囲においても60~80%であった。また、生存個体の発根率は、ほとんどの濃度範囲において20~50%であった。しかし、個体当りの発根数及び根の伸長に関しては、2ipが5.0mg/lで、IBAは0.5~2.0mg/lにおいて優れていた。根の発生時期の調査は90日後に行ったが、早い個体では約45日で発根したものもあり、一般に不揃いで長期に渡って続く傾向にあった。

#### IV. 考 察

カキの組織培養による大量増殖や細胞操作系、形質転換を開発する場合、効率がよく、しかも、遺伝的変異が少ない再生系の確立が必要となってくる。カキの茎頂培養を利用した増殖体系の研究は、1980年代半ばになってからSUGIURA<sup>9)</sup>及びCOOPERとCOHEN<sup>11)</sup>によって始められた。したがって、研究の時期が比較的新しいこと、そして、植物自体の難発根性や培養途中の組織の突然の褐変化や根の物理的障害に極端に弱い

ことなどにより、発根段階に関しては十分確立した技術までには至っていない。近年、福井ら<sup>2,3)</sup>、村山ら<sup>9)</sup>及び立松ら<sup>10)</sup>はかなり効率のよい発根条件を明らかにしているものの、増殖体系全体としては、未だ実用段階までは至っていない。効率のよい不定芽増殖系や再生系が明らかにされれば、研究分野における基礎技術の確立や農業上における実用化への展望が開けることになる。

茎頂培養による増殖系は、不定芽増殖系と比較し、体細胞変異が少なく有利であるが、増殖効率が極めて劣り、かつ、材料の入手が困難で不利な点も多い。そこで、体細胞組織から脱分化過程を経ることなく直接に不定芽を誘導することが可能になれば、増殖効率はかなり向上し、体細胞変異も容認できる程度まで抑制できるものと考えられる。そして、それに続くシュートの培養、発根の効率化などの点でも、茎頂培養と比較して、相違点がないかどうか検討することが必要となってくる。

本報では、不定芽を経由する再生系を検討し、これまでに報告されているよりも非常に効率よく不定芽を誘導することに成功した。しかも、この方法はカルスの段階を経ることなく葉組織から直接に不定芽が形成されることから、変異の誘発頻度も少ないと考えられる。

カキ葉組織から不定芽を誘導するためのサイトカニンはホルクロルフェニユロンが唯一有効で、BA、ZEAでは不定芽は全く形成されなかった。一般的にBA、ZEA等は草本類に対して効果的であり、これらを果樹類に利用するときには比較的高濃度で用いる傾向にある。果樹類に対してはLANEら<sup>7)</sup>がニホンナシでN-Phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron; TDZ) が有効であったと報告したのと同様に、ホルクロルフェニユロンというフェニルウレア系化合物の方が効果的であると推察される。しかし、福井ら<sup>9)</sup>、YOKOYAMAとTAKEUCHI<sup>10)</sup>は、BA、ZEAを用いて不定芽の誘導に成功しており、筆者らの結果とは異なっていた。すなわち、福井らは茎頂培養後、継代維持している培養個体葉を材料として、ZEAが $10^{-4}$ M、IAAが $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ M及びNAAが $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$ Mの比較的高いサイトカニン濃度の領域で不定芽を誘導することに成功している。しかし、筆者らはZEA及びNAAを0.02~20.0mg/l ( $=9.1 \times 10^{-8}$ ~ $9.1 \times 10^{-5}$ M)の濃度で供試したが、不定芽の誘導には至らなかった。また、YOKOYAMAとTAKEUCHIは、BAを2.0mg/l及びNAA

は0.02mg/lの条件で成功したが、本報においてはBAでは誘導されなかった。その原因としては、供試材料が由来する品種及びその生理状態の相違等が考えられる。すなわち、福井ら及びYOKOYAMAとTAKEUCHIは‘富有’を供試したが、本報は‘西条’であり品種が異なっていた。また、培養材料について、YOKOYAMAとTAKEUCHIは実生にて得られた4歳までの幼齡葉を、福井らは本報と同様に茎頂培養由来シュートの葉を用いたものの、継代培養で供試した生長調節物質が、YOKOYAMAとTAKEUCHIはBAが1.0mg/lで、福井らはZEAが $10^{-5}$ M ( $=2.2$ mg/l)であり相違があった。

以上から、不定芽の誘導にはホルクロルフェニユロンの使用が決定的要因となることがわかったので、その時に共存するオーキシンの種類と濃度の影響を検討した。NAA、IAAとも不定芽誘導効果において大きな差異はみられなかった。しかし、NAAの方がIAAよりも培養片当りの不定芽数がやや多く、また、シュートの生育も早いことからNAAが効果的であることが明らかとなった。しかし、2,4-Dでは不定芽は全く形成されず、カルス形状を観察すると、NAA等に比較して $10^2$ 以上の濃度でカルス誘発性が強力であると判断された。そこでサイトカニンはホルクロルフェニユロンを、オーキシンはNAAを用いて、より詳細な試験区で不定芽形成の条件及び品種、系統間差異について検討した。供試品種、系統全てにおいて不定芽が形成され、‘西条’及び‘実生1号’では効率よく不定芽が形成された。特に、ホルクロルフェニユロンが2.0mg/l及びNAAが0.002~0.02mg/lの試験区においては、葉組織から直接に葉原基が多数形成され、多芽状にまで発達していく様子が観察された。しかし、‘富有’では状態が異なり、外植片の約半分から褐色の柔らかいカルスが誘導され、残り約半分からは緑色の硬いカルスが誘導され、同時に多数の不定芽も形成された。茎頂培養においても、村山ら<sup>9)</sup>は茎頂培養後の継代培養における生育についての報告で、供試品種、系統間で難易性のあることを指摘している。福井ら<sup>9)</sup>も約140種ものカキ及びその近縁種について検討し、カキ品種の甘波による培養の難易性について分類を行っている。本報においても同様に、カキ品種の甘波によりかなり異なる結果になったものと推察される。

次いで外植体が由来する葉位、葉部位が不定芽形成に及ぼす影響を検討したところ、かなりの差異が認められた。すなわち、上位展開葉では不定芽は形成されずにカルスが非常に形成され易く、中位展開葉では効

率よい不定芽形成が行われ、また、下位展開葉では外植片が枯死する割合が高かった。これは茎頂により近い葉位の方がオーキシン活性が高く、下位になるにしたがい低くなることに起因するものと考えられる。福井ら<sup>9)</sup>も言及しているのと同様に、本報における培養シュートの中位展開葉までの葉は、YOKOYAMAとTAKEUCHIの述べた実生4年齢までの若い時期に相当するものと考えられる。

以上述べた方法により、多数のシュートを得ることができた。これらをすでに確立していると考えられる茎頂培養系に組み込むことが可能であるかどうか重要な問題となる。そこで、‘実生1号’の培養シュートをサイトカニンを含む培地で培養したところ、2ipを2~10mg/l添加した系の伸長が最良であった。これは村山ら<sup>9)</sup>が‘黒柿’と‘次郎’について、シュート増殖に関してはBA (5mg/l)の効果が大きい、シュート伸長に関しては2ip (約5mg/l)の方が効果が大きいとした結果と一致する。しかし、FUKUIら<sup>8)</sup>が、‘西村早生’についてはZEA ( $10^{-5}$ M)添加区が最もよく、次いでBAであり、2ipはわずかに促進効果が認められるに過ぎなかったと報告した内容とは異なるものであった。

発根条件について村山ら<sup>9)</sup>、福井ら<sup>9)</sup>及び立松ら<sup>10)</sup>は、1-Naphthyl acetamide (NAM)粉剤の希釈物又は有機溶媒で溶解したIBAを用い、非常に高濃度で浸漬処理することにより、発根が促進することを認めている。しかし、本報でこれらの方法を試みたところ、シュートの切り口から多くのカルスが形成されるか、若しくは残留溶媒のために枯死する傾向が強かった。そこで、より簡便な方法として、2ip (2.0~5.0mg/l)を添加した培地にIBAを比較的低濃度 (0~2.0mg/l)で共存させることにより、発根が促進されるかどうか検討した。その結果‘実生1号’では、2ipが5.0mg/l、IBAは0.5~2.0mg/lで、生存個体のうちの約30~50%において発根が認められ、対照区 (IBA無添加)と比較すると、わずかではあるが効果がみられた。この数字は既報における最高値と比較すると小さいが、品種、系統間においてかなりの差異 (8~96%)の存在が示唆されている<sup>9)</sup>ことから、品種間差も多分に影響しているのではないかと考えられる。いずれにしても、より効率がよく、しかも、安定した発根条件の解明を行う必要がある。

本報で確立された方法によれば、ホルクロルフェニユロンを2.0mg/l及びNAAを0.002~0.02mg/lの濃度

で添加することにより、効率よく不定芽を誘導することができる。このような低コストの植物生長調節物質を比較的低濃度で目的が達せられるだけでなく、カルス過程を経由しないので、変異の誘発頻度もかなり低いものと考えられ、より実用的な系であると考えられる。また、'実生1号'の不定芽増殖体系が示されたことも、実用上非常に有益なことで考えられる。

## V. 摘 要

カキの茎頂培養に由来する小植物体の葉片を材料として、不定芽形成に及ぼす植物ホルモンの種類 (BA, ZEA, ホルクロルフェニユロン, KIN, Zip/NAA, IAA, 2,4-D) と濃度 (0.02~20mg/l/0.02~20mg/l) の影響、供試品種、系統 ('西条', '富有', '実生1号') の影響、外植体の葉位、葉部位の影響について検討した。不定芽形成はサイトカイニンのホルクロルフェニユロンを、オーキシンではNAA若しくはIAAを添加したときのみに認められた。濃度については、ホルクロルフェニユロンが2.0mg/l及びNAAが0.002~0.02mg/lの付近で、効率よく不定芽がカルスの段階を経ることなく、組織から直接に形成された。これは、多少の差異はあるものの、全ての供試品種、系統において認められた。また、上位の展開葉ではカルスが形成され易く、中位では不定芽が効率よく形成され、低位では外植片が枯死する傾向にあった。'実生1号'のシュートの伸長は、Zipを2~10mg/l添加した区が優れていた。また、生育したシュートの発根は、Zipが2.0~5.0mg/l, IBAが0.5~2.0mg/lの範囲で約30~50%の率で発根した。以上のとおり、カキの葉組織からの不定芽形成による再生系を確立することができた。

## 引用文献

1) COOPER, P.A. and D.COHEN(1984): Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros*

- kaki*). Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society 34: 118 - 124.
- 2) 福井博一・西元和男・村瀬一生・中村三夫(1988): カキの*in vitro*での発根に及ぼす処理方法と培地中のショ糖濃度の影響。岐阜大農研報53: 133 - 137.
- 3) 福井博一(1989): カキにおけるバイオテクノロジーの利用と問題点。園学平1 秋シンポ要旨; 10 - 17.
- 4) 福井博一・野崎国芳・中村三夫(1989): カキ '富有' の培養シュートの葉からの不定芽形成。園学雑 58別2. ; 58 - 59 .
- 5) FUKUI H., M. SUGIYAMA and M. NAKAMURA (1989): Shoot Tip culture of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* THUNB.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 58: 43 - 47.
- 6) 福井博一・西元和男・中村三夫(1990): カキの茎頂培養における品種間差異。園学雑59: 51 - 57 .
- 7) LANE, W.D.・林 健樹・池谷祐幸(1989): ニホンナシ栽培品種の培養系における不定芽形成。園学雑. 58別2; 60 - 61 .
- 8) 村山秀樹・田尾龍太郎・田中辰美・杉浦 明(1989): カキ数品種の*in vitro*でのシュート増殖と発根。J. Japan Soc. Hort. Sci. 58: 55 - 61.
- 9) SUGIURA, A., R. TAO, H. MURAYAMA and T. TOMONA (1986): *In vitro* propagation of Japanese persimmon. Hort Science 21:1205 - 1207.
- 10) 立松伸夫・平野三男・細野満典・河野 満(1988): カキの組織培養に関する研究 (第1報) カキ台木の大量増殖。園学要旨. 昭63秋; 162 - 163.
- 11) 山田員人・松本敏一・春木和久(1987): カキの種子内胚軸部からの不定芽形成。園学要旨. 昭62秋; 154 - 155 .
- 12) YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI(1988): Relationship between Ontogenic Age and Formation of Bud from Leaf Segments in Japanese Persimmon, *Diospyros kaki*, THUNB. Plant Tissue Cult. Lett. 5: 6 - 10.

## Summary

Using the leaf segment of the plantlet of Japanese persimmon which derived from shoot tip culture, the influence of kinds and concentrations of plant growth regulators (BA, ZEA, Forchlorfenuron, KIN and Zip/NAA, IAA and 2,4-D), kinds of varieties, and leaf part and position on the stem upon the adventitious bud formation was investigated.

No adventitious bud was formed but adding Forchlorfenuron as cytokinin, and NAA or IAA as auxin. In this case, the one was formed directly from the leaf tissue no through Callus formation for all varieties with more or less difference. In the upper position of the leaf, Callus was apt to be formed. In the middle, adventitious bud was formed efficiently and in the lower, the explants were almost die.

When the growth condition of shoots induced was examined by using of BA, Forchlorfenuron and Zip, the addition of 2.0~10mg/l of Zip showed the best growth. For the rooting of these shoots, adding Zip(2.0~5.0mg/l) and IBA (0.5~2.0mg/l) obtained good results i.e. rooting rate 30~50%. As above mentioned, the propagation system through adventitious bud formation was attained finally.