カキ‘夫婦柿’やく由来カルスからの不定芽形成と 再生個体のアイソザイム変異

田尾龍太郎・伊東わかば・杉浦 明

京都大学農学部 606 京都市左京区北白川追分町

Adventitious Bud Formation on Callus Derived from Anthers of Persimmon ‘Meotogaki’
and Isozyme Variations Observed in the Regenerated Plantlets

Ryutaro Tao, Wakaba Ito and Akira Sugiura

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

Summary

Anthers of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Meotogaki) were cultured on MS medium containing zeatin (0~10 μ M) in combination with IAA, NAA, or 2,4-D (0~10 μ M).

Prolific callus formation was induced in the dark on MS medium supplemented with zeatin (1~10 μ M)+IAA or NAA (1~10 μ M), or MS medium with zeatin 10 μ M+2,4-D (0.001~0.1 μ M). Those cultured under a 16-hr-day⁻¹ photoperiod formed few calli.

The calli formed in the dark on MS medium supplemented with 10 μ M zeatin+1 μ M IAA, 0.1 μ M NAA, or 0.1 μ M 2,4-D were subcultured in the dark on the same fresh medium. After 3~5 subcultures, the calli were subdivided and transferred onto three different kinds of differentiation medium, MS medium containing a) 10 μ M zeatin+0.1 μ M IAA, b) 10 μ M zeatin+0.01 μ M NAA, or c) 10 μ M zeatin+0.01 μ M 2,4-D, and cultured under a 16-hr-day⁻¹ photoperiod to induce adventitious buds. Organogenetic potential of the calli, which had been induced and subcultured on MS medium containing IAA or NAA, increased with increasing number of subcultures, whereas those which had been cultured in the presence of 2,4-D formed few adventitious buds. IAA or NAA in the differentiation medium was also more effective for adventitious bud formation than was 2,4-D.

Both histological observations of the development of anther callus and chromosome counts of the root tip cells of regenerated plantlets revealed that the calli originated not from pollen grains but from vascular bundle in the anthers.

Eight of 18 plantlets regenerated from the anther-derived calli showed different malate dehydrogenase isozyme banding patterns from the pattern of the ‘Meotogaki’ tree growing in the field. However, all 12 plantlets regenerated from calli derived from leaf primordia of dormant buds of ‘Meotogaki’, had the same banding patterns as ‘Meotogaki’. The potential use of the somaclonal variation observed in the regenerated plantlets from anther-derived calli is discussed in relation to the cultivar improvement of Japanese persimmon.

緒 言

果樹類の育種は、木本性で生長が遅く、個体が大き
いという特徴から従来効率が悪く、草本作物に比べて
大きなハンディを被ってきた。特にカキにおいては、

1992年2月13日 受理。本報告の概要は1991年園芸学会
春季大会において発表した。本研究は文部省科学研究費(課
題番号 02760016)の助成により行われた。

果実形質の遺伝解析がようやく始められたばかりであ
り(池田ら, 1985; 山田ら, 1988; Yamada ら, 1987),
交雑育種のための基礎的知見に乏しい。さらに、雄花
着生品種の数も少なく、交雑の組み合わせも制限され
ている。このような状況のなかにあって、やく培養に
よる半数体と純系の作出の育種的意義は非常に高いも
のと考えられる。また、やく培養により半数体が得ら

れない場合でも、培養により生じたソマクローナル変異を育種に利用することも可能である。

カキのやく培養に関する研究は、最近になってようやく2例の報告がなされたに過ぎず、草本園芸作物や他の果樹類に比べて大きく遅れているのが現状である。中村ら(1986)は、'西村早生'のやくからの白色カルスの形成を報告したが、不定芽や不定胚の分化には成功しておらず、また形成されたカルスの起源についても明らかにしていない。杉本ら(1989)は'次郎'×('花御所'×'晩御所')の実生個体を用いて実験を行い、やくからカルスが形成され、継代培養を行うことなくカルスから不定芽が形成されたと報告している。しかしながら、染色体数の調査は行っておらず、再生個体の起源ならびに倍数性については不明である。本研究では、'夫婦柿'のやく培養を行いカルスを経て植物体を再生させ、その染色体数を調査するとともに、アイソザイム分析やカルス形成過程の組織学的観察を通じて、再生個体の起源と変異について検討した。

材料および方法

京都大学農学部附属京都農場植栽のカキ(*Diospyros kaki* L.)'夫婦柿'成木より、花粉のステージが四分母期を経て一核期に達していると思われる花らいを採取した。これらの花らいを0.1% (v/v) Tween 20加用の次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素0.1%)に15分間浸漬滅菌し、続いて滅菌水で数回洗浄した。滅菌した花らいよりやくを切り出し、寒天培地に置床した。

実験は、やくからのカルス誘導と不定芽形成に及ぼす条件、ならびに形成されたカルスとシュートの起源と変異について明らかにするために、以下のように行った。

植物調節物質がカルス形成に及ぼす影響をみるために、サイトカイニン1種と数種のオーキシシンについてさまざまな濃度で組み合わせて添加したMS培地にやくを置床した。すなわち、サイトカイニンとしてはゼアチンを、また、オーキシシンとしては2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), あるいは3-indoleacetic acid (IAA)を使用し、それぞれ第1表に示した濃度で培地中に添加した。培養は暗黒あるいは16時間日長条件下で行い、光条件がカルス形成に及ぼす影響についても併せて検討した。培養30日後に、カルス形成率と形成されたカルスの大きさ(callus index: 1=カルス径2mm以下, 2=カルス径2~

4mm, 3=カルス径4~6mm, 4=カルス径6~8mm, 5=カルス径8mm以上)について調査した。培養数は各区試験管10本とし、各試験管にやく4個を置床した。また、カルス形成過程の組織学的観察を行うため、ゼアチン(10 μ M)+(IAA 1 μ M, NAA 0.1 μ M, あるいは2,4-D 0.1 μ M)の暗黒区については、上記実験に加えてさらに各区につき試験管50本分の植え付けを行った。置床したやくを培養開始後5日間隔でFAAで固定し、30-100%のエタノールシリーズを用いて脱水後、Acrytoron E(三菱レイヨン)に包埋し、回転式マイクロームを用いて厚さ4 μ mの切片を作成し、トルイジンブルーによる染色ののち、光学顕微鏡による観察を行った。

ゼアチン(10 μ M)+オーキシシン(IAA 1 μ M, NAA 0.1 μ M, あるいは2,4-D 0.1 μ M)を添加したMS培地を用いて暗黒条件下で誘導したカルスについては、同種の培地、同条件で継代培養を続けた。これらカルスを3~5回継代培養した後、それぞれゼアチン(10 μ M)+オーキシシン(IAA 0.1 μ M, NAA 0.01 μ M, あるいは2,4-D 0.01 μ M)を添加したMS培地に継代し、16時間日長条件下で培養し、不定芽を誘導した。培養数は各区試験管24~25本とし、各試験管に約150mgのカルス片1個を植え付けた。培養60日後に不定芽の調査を行った。

形成された不定芽の一部はゼアチン5 μ Mを添加したMS培地を用いて16時間日長条件下で培養し、シュートの伸長と増殖をはかった。これらシュートのGlucose phosphate isomerase (GPI), Phosphoglucosyltransferase (PGM), Malate dehydrogenase (MDH)アイソザイムをTaoら(1989)の方法に従ってデンブング電気泳動法により分析した。対照として、圃場植栽の'夫婦柿'成木より採取した成葉およびTao・Sugiyura(1992)の方法に従って'夫婦柿'休眠枝えき芽中の葉原基由来カルスより再生させたシュートの分析を行った。

増殖したシュートについて、村山ら(1989)の方法に従って、1.25mM 3-indolebutyric acid(IBA)50%エタノール水溶液で浸漬処理し、1/2MS(1/2N)培地に植え付けた。10日間の暗黒処理を行った後、16時間日長条件下で培養し、発根を促した。これら発根シュートの根端分裂細胞の染色体数を、庄ら(1990)の報告に従って酵素解離法乾法によって調査した。

実験を通じて、培地には0.8% (w/v) 寒天(和光純薬製細菌培地用寒天末)と3% (w/v)を添加した。培

養温度は 27℃とし、また明条件での光強度は $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ とした。

結 果

1. やくからのカルス誘導と不定芽形成

1)カルス誘導 いずれの区においても、培養 30 日目までに、不定胚や不定芽などの器官形成は認められず、カルスのみが形成された(第 1 表)。カルスは主にやくの基部付近から形成され始め、カルス形成のすぐれた区では培養 30 日目にはやくが完全にカルスで覆われた。光条件についてみると、カルスの形成は 16 時間日長区よりも暗黒区ですぐれた(第 1 表)。暗黒区のカルス形成に及ぼす植物調節物質の影響については、オーキシンのみの区よりもゼアチン添加区ですぐれ、ゼアチン (1あるいは $10 \mu\text{M}$) + IAA あるいは NAA

(1あるいは $10 \mu\text{M}$) 添加区、およびゼアチン ($10 \mu\text{M}$) + 2,4-D ($0.001 \sim 0.1 \mu\text{M}$) 区で、特にカルス形成が促進された。これらの区では形成されたカルスの大きさを示す、Callus Index はいずれも 2.5 以上であり、またカルス形成率もすべて 50 % 以上であった。3 種類のオーキシンの効果について比較すると、暗黒区では 2,4-D 添加区のカルス形成率は、IAA や NAA 添加区に比べて劣り、最高でも 63 % にとどまったが、16 時間日長区では他の 2 種類のオーキシンよりもカルス形成がすぐれる傾向がみられた。最もカルス生育が促進されたのは $1 \sim 10 \mu\text{M}$ IAA 添加の暗黒区であり、Callus Index は 3.0~3.6 の値をとった。IAA と NAA 添加培地上では固い小粒状のカルスが形成されたが、2,4-D 添加培地上で形成されたカルスは水浸状の脆い

Table 1. Effect of plant growth regulators in the culture medium and light on callus formation from anthers of Japanese persimmon 'Meotogaki'. There were 28~40 anthers per treatment. Data taken after 30 days of culture.

Zeatin concn. (μM)	% of anthers forming callus (Callus index ^z)					
	Auxin concn. (μM)					
	0	0.001	0.01	0.1	1	10
Dark						
	2,4-D					
0	0	0	0	0	0	5 (1.5)
1	33 (2.5)	10 (1.5)	28 (2.3)	33 (2.9)	25 (2.7)	10 (2.0)
10	40 (2.4)	63 (2.9)	58 (2.5)	55 (3.6)	30 (2.4)	33 (2.0)
	NAA					
0	—	0	0	0	0	0
1	—	28 (1.7)	30 (1.8)	48 (1.4)	88 (2.5)	75 (2.9)
10	—	30 (1.6)	17 (1.7)	28 (1.6)	85 (2.7)	88 (2.8)
	IAA					
0	—	—	0	0	0	13 (1.0)
1	—	—	50 (2.3)	63 (2.3)	58 (3.0)	53 (3.6)
10	—	—	53 (2.4)	38 (2.5)	65 (3.4)	85 (3.4)
16hr-Light						
	2,4-D					
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	3 (1.0)	33 (2.8)	22 (2.0)	5 (2.0)
10	0	3 (1.0)	3 (1.0)	13 (1.0)	28 (2.4)	22 (1.1)
	NAA					
0	—	0	0	0	0	0
1	—	0	0	0	36 (1.2)	25 (1.5)
10	—	0	0	0	13 (1.0)	13 (1.0)
	IAA					
0	—	—	0	0	0	0
1	—	—	0	0	3 (1.0)	11 (1.0)
10	—	—	8 (2.0)	0	8 (1.7)	25 (1.7)

^z Mean callus index of the responsive explant (1: Callus diameter ≤ 2 mm, 2: Callus diameter = 2~4 mm, 3: Callus diameter = 4~6 mm, 4: Callus diameter = 6~8 mm, 5: Callus diameter ≥ 8 mm).

Table 2. Effect of auxin in the culture medium and number of subcultures on adventitious bud formation from anther callus of Japanese persimmon 'Meotogaki'. All media contained 10 μ M zeatin. There were 25 explants per treatment. Data taken after 40 days of culture.

Type and concn. of auxin in the differentiation medium (μ M)	Adventitious bud formation (%)								
	Auxin in the callus medium								
	2,4-D 0.1 μ M			IAA 1 μ M			NAA 1 μ M		
	No. of subcultures			No. of subcultures			No. of subcultures		
	3	4	5	3	4	5	3	4	5
2,4-D 0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IAA 0.1	0	4	0	20	24	36	36	48	80
NAA 0.01	8	0	0	20	28	48	20	48	75

ものであった。

2) 不定芽形成 2,4-Dを除く2種類のオーキシシン添加区で誘導および継代したカルスは、その継代回数の増加とともに不定芽形成率が高まった(第2表, 第1図A)。しかしながら、2,4-Dで誘導および継代したカルスの不定芽形成率は低かった。IAAとNAAを比較するとカルスの誘導および継代にはNAAを培地に添加した方がIAAを用いるよりも不定芽形成は若干すぐれるようであった(第1図B)。継代培養中のカルス生育速度は、2,4-D添加培地で、他の2種類のオーキシシンを添加した培地に比べて、早い傾向がみられた。また誘導段階同様、IAAあるいはNAA添加培地上ではカルスは固い小粒状の形態を示したが、2,4-D添加培地上では水浸状の脆い形態を示した。次に、不定芽形成培地中のオーキシシンの影響についてみると、カルスの誘導ならびに継代段階同様に、IAAやNAAで不定芽形成がすぐれ、2,4-Dではまったく不定芽形成はみられなかった(第2表, 第1図C)。

2. カルスの起源と再生個体の変異

1) カルスの起源 いずれのオーキシシンを用いて培養した区においても、培養開始5日目にはすでに内容物を失っていると思われる花粉粒がみられ、15日目になると萎縮した花粉粒も観察された(第2図)。一方、カルスは花粉粒からではなく、やくの切り口付近の維管束組織から形成されていた(第2図)。すなわち、このやく由来カルスはやく中の花粉粒由来ではなく、体細胞組織由来のものであることが示された。

2) 再生個体の根端分裂細胞の染色体数 再生個体の根端分裂細胞の染色体数は、調査した13個体においてすべて $2n=90$ であり、染色体数45の半数

Fig. 1. Main effects of the number of subcultures (A), auxin in the callus medium (B), or auxin in the differentiation medium (C) on adventitious bud formation from anther-derived callus of Japanese persimmon 'Meotogaki'. Data redrawn from Table 2. There were 225 explants per treatment.

体は1個体もみられなかった(第3図)。この事実からも、やく由来カルスからの再生個体は、花粉起源ではなくやく壁などの体細胞由来であることが強く示唆された。

3) アイソザイム分析 アイソザイム分析を行ったやく由来カルスからの再生シュート18個体のGPIとPGMアイソザイムはすべて圃場成木と同様のパターンを示した。しかしながら、MDHアイソザイムにおいて8個体で圃場成木とは明らかに異なるパターンがみられた(第4図)。また、変異のみられた8個体の中でもいくつかの異なるパターンがみられた。これらMDHアイソザイムの変異は、すべてバンド数が減少する変異であった。対照として分析した‘夫婦柿’の葉原基由来カルスからの再生シュートのGPI、MDH、PGMアイソザイムパターンは、調査12個体すべてにおいて圃場成木と同じパターンを示した。

考 察

まず、培養条件がやくからのカルス形成に及ぼす影響については、本実験において暗黒条件下の方が明条件下よりもすぐれた(第1表)。同様のことは、カキの休眠枝えき芽中の葉原基由来カルスにおいても報告されており(Taoら, 1988)、カキにおけるカルス生育は明条件下よりも暗黒条件下の方がすぐれるものと考えられた。他方、オーキシンの影響についてみると、2,4-D添加培地においては16時間日長区でも比較的高率でカルスが形成された(第1表)。また、2,4-Dを培地添加オーキシンとして用いると、継代培養中のカルス生育速度も早かった。2,4-DはIAAやNAAと比較して化学的に安定で活性の高いオーキシンであるため、カキのカルス誘導に不適な明条件下においてもカルス形成がすぐれ、また継代培養中のカルスの生育速度も早かったものと思われる。しかしながら、2,4-Dを用いてやくから誘導および継代したカルスの不定芽形成能は低く(第2表, 第1図B)、また不定芽形成時に2,4-Dを培地に添加すると不定芽形成はまったくみられなかった(第2表, 第1図C)。高濃度の2,4-Dを培養に用いると、突然変異が生じ易いことが知られている(Deambrogio・Dale, 1980)。2,4-Dの化学的安定性に加えて、このような突然変異の誘発がカルスの不定芽形成能を低下させたのかも知れない。

本実験において、カルスの不定芽形成能は継代回数の増加とともに高まった(第1A図)。継代回数の増加につれて不定芽形成能が高まる現象は‘次郎’の葉原基由来カルスにおいても認められている(Tamuraら,

Fig. 2. Callus formation from vascular bundle in the anther of Japanese persimmon 'Meotogaki' after 15 days of culture. P=Pollen grain. C=Callus.

Fig. 3. Somatic chromosomes in root tip cell of the plantlet regenerated from anther-derived callus of Japanese persimmon 'Meotogaki'.

Fig. 4. MDH isozyme phenotypes observed in the plantlet regenerated from anther-derived callus of Japanese persimmon 'Meotogaki' (Lane 1~5) and the 'Meotogaki' tree grown in the field (Lane 6). Note that the two anther-derived plantlets (Lane 2 & 3) showed different MDH banding patterns from the field grown tree (Lane 6).

1992)。本実験で、やくから形成されたカルスは花粉由来ではなくやく中の維管束組織由来であることが明らかになった。すなわち、このカルスは‘夫婦柿’の体細胞由来のカルスであり、‘次郎’の葉原基由来カルスと同様に、培養開始時には細胞のエッジが成木相にあるものと思われる。一般に、胚や幼若実生など幼木相にある外植体の器官形成能は高いことが知られている。成木由来のシュート培養において、継代培養を続けると Rejuvenation 現象が生じ、形態変化を生じたり (Mullins ら, 1979)、発根性が良くなる現象 (Srisankarajah ら, 1982) が認められている。カルスからの不定芽形成時にもこのような Rejuvenation 現象が生じるのかも知れない。

次に、カルスと再生個体の起源と変異についてであるが、本実験でやくからカルスを経て分化した不定芽は培養途中でシュートの生育が止まって枯死したり、あるいは生存していても生長が非常に遅く発根が困難であった。その中で発根したものの根端を採取し、染色体数の調査を行ったところ、調査した 13 個体すべてにおいて $2n=90$ であり半数体はまったく認められなかった (第 3 図)。藤井ら (1989) はリンゴのやく培養を行い、培養途中で枯死した個体の中に生育の劣る半数体が含まれている可能性を示している。すなわち、発根個体の染色体数の調査だけでは、培養途中で枯死してしまった個体の中に半数体が含まれている可能性は捨てきれない。また、やく培養においては、培養過程で染色体数が自然倍加した Dihaploid がしばしば形成されることが報告されている (Colby ら, 1980)。再生個体の染色体数の調査だけでは、 $2n=90$ の個体が花粉起源の Dihaploid であるのか、あるいはやく壁などを起源とする‘夫婦柿’のクローンであるのかについては明らかではない。そこで、カルス形成過程の組織学的観察も行ったところ、本実験においてカルスは花粉からではなく、やくの維管束組織より形成されることがわかった (第 2 図)。また、カルスが花粉由来のものであるのなら、花粉が分裂し増加するにつれて、やく壁を突き破っていく様子が観察されるはずである。しかしながら、本実験では、カルスはすべてやくの切り口付近より形成された。以上の事実より、本実験で形成されたカルスや再生個体は、すべてやく中の維管束組織由来の‘夫婦柿’のクローンであることが明らかになった。

アイソザイム分析によっても、花粉由来の半数体や半数体の倍加した個体とやく壁由来の個体との識別が

ある程度は可能である。例えば、Colby ら (1988) は、アスパラガスで Peroxidase と Shikimic acid dehydrogenase のアイソザイム分析を行い、花粉由来のホモ個体とやく壁由来のヘテロ個体の識別を行っている。本研究においても、MDH においてバンド数の減少する変異がみられた (第 4 図)。バンド数の減少自体は再生個体が花粉由来のホモ個体であることを強く示唆するものである。しかしながら、先の染色体数の調査やカルス形成過程の組織学的観察結果、あるいは GPI や PGM アイソザイムにまったく変異が認められなかったことなどを考慮すると、この変異は Epigenetic なのあるいはソマクローナル変異により生じたものであると考えるのが適当であろう。ただ、‘夫婦柿’葉原基由来カルスからの再生個体にはアイソザイム変異がまったくみられなかったことより、Epigenetic な変異というよりは、むしろやくからの再生個体にはソマクローナル変異が生じ易いと結論づけるのが妥当であろう。なお、これら MDH アイソザイムに変異が認められた個体の培養過程に一定の傾向はなく、いずれの植物調節物質を用いて培養した区においても変異は認められた。このことは、やくを外植体として用いて培養すること自体がソマクローナル変異の発生を誘発することを示すものであろう。Tao ら (1989) は枝変わりにより生じた品種間ではアイソザイムパターンに差異は認められないことを報告している。‘夫婦柿’やく由来カルスからの再生個体に MDH アイソザイム変異がみられたことは培養で生じるソマクローナル変異は枝変わり等の突然変異とは変異の幅が異なることを示すのかも知れない。

本研究において、カキ半数体の育成には成功しなかったが、やく由来カルスからの再生個体には高頻度でアイソザイム変異が生じることが明らかになった。また、葉原基由来カルスからの再生個体には変異は認められないことも明らかになった。これらの事実は、ソマクローナル変異を利用したカキの育種を行う際にはやく壁由来カルスを用いるのが適当であることを示し、一方変異の発生が不都合な場合には葉原基由来カルスを用いるのが適当であることを示すものであろう。いずれにせよ、再生個体を鉢上げ育成し、アイソザイム変異のみならず園芸上有用な変異が生じるものかどうか検討する必要がある。

摘 要

‘夫婦柿’のやく培養を行い、カルスを経て植物体を再生させ、その染色体数を調査するとともに、アイソザ

イム分析やカルス形成過程の組織学的観察を通じて、再生個体の起源と変異について明らかにした。

カルス誘導段階では、培地中の植物調節物質と培養条件がカルス形成に及ぼす影響について検討した。オーキシンのみの区よりもゼアチン添加区でやくからのカルス形成がすぐれ、ゼアチン (1 あるいは $10 \mu\text{M}$) + IAA あるいは NAA (1 あるいは $10 \mu\text{M}$) 添加区、およびゼアチン ($10 \mu\text{M}$) + 2,4-D ($0.001 \sim 0.1 \mu\text{M}$) 区で、特にカルス形成が促進された。また光条件については、16時間日長区よりも暗黒区でカルス形成がすぐれた。

ゼアチン ($10 \mu\text{M}$) + (IAA $1 \mu\text{M}$, NAA $0.1 \mu\text{M}$, あるいは 2,4-D $0.1 \mu\text{M}$) を添加した MS 培地を用いて暗黒条件下で誘導したカルスについては、同種の培地、同条件で継代培養を続けた。3～5回の継代培養の後、それぞれゼアチン ($10 \mu\text{M}$) + (IAA $0.1 \mu\text{M}$, NAA $0.01 \mu\text{M}$, あるいは 2,4-D $0.01 \mu\text{M}$) を添加した MS 培地に継代し、16時間日長条件下で培養し不定芽を誘導した。その結果、IAA および NAA 添加区で誘導および継代したカルスは、その継代回数の増加とともに不定芽形成率が高まることが明らかになった。一方、2,4-D 添加区で培養したカルスの不定芽形成能は低かった。不定芽形成時の添加オーキシンとしては IAA あるいは NAA がすぐれ、2,4-D ではまったく不定芽形成はみられなかった。

カルス形成過程の組織学的観察結果と再生個体の根端分裂細胞の染色体数の調査から、これらやくからの再生個体は、花粉由来ではなくやくの体細胞由来であることが明らかになった。また再生個体のアイソザイム分析の結果、やく由来カルスからの再生個体には MDH アイソザイムに高頻度でソマクローナル変異が生じることが明らかになった。一方、休眠枝えき芽中の葉原基由来カルスからの再生個体にはアイソザイム変異はまったく認められなかった。これらの事実から、ソマクローナル変異を利用したカキの育種を行う際にはやく壁由来カルスを使用するのが適当であり、一方変異の発生が不都合な場合には葉原基由来のカルスを用いるのが適当であることが明らかになった。

引用文献

- Colby, L. W. and L. C. Peirce. 1988. Using an isozyme marker to identify doubled haploids from anther culture of asparagus. HortScience 23 : 761-763.
- Deambrogio, E. and P. I. Dale. 1980. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley (*Hordeum vulgare*) cultivar 'Akka' and on genetic variability between them. Cereal Res. Commun. 8 : 417-424.
- 藤井芳一. 1989. リンゴやく培養における不定胚形成と植物体再生. 育種 39 (別 1) : 68-69.
- 池田 勇・山田昌彦・栗原昭夫・西田光夫. 1985. カキの甘渋の遺伝. 園芸雑. 54 : 39-45.
- Mullins, M. G., Y. Nair and P. Sampt. 1979. Rejuvenation *in vitro*: Induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. Ann. Bot. 44 : 623-627.
- 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* でのシュートの増殖と発根. 園学雑. 58 : 55-61.
- 中村三夫・福井博一・杉山峰夫・野原定夫. 1986. 組織細胞培養によるカキの育種に関する研究. (第 2 報). カキのやくからのカルス形成. 園学要旨. 昭 61 秋 : 162-163.
- Sriskandarajah, S. M., M. G. Mullins and Y. Nair. 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. Plant Science Letters 24 : 1-9.
- 杉本和宏・武藤正義・篠田 環・野原定夫. 1989. カキやく培養における再分化. 育種 39 (別 2) : 78-79.
- Tamura, M., R. Tao and A. Sugiura. 1992. Highly stable adventitious bud formation from long term callus cultures of Japanese persimmon callus. HortScience 27 : 1048.
- Tao, R., H. Murayama, K. Moriguchi and A. Sugiura. 1988. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience 23 : 1055-1056.
- Tao, R. and A. Sugiura. 1992. Adventitious bud formation from callus cultures of Japanese persimmon. HortScience 27 : 259-261.
- Tao, R., T. Tetsumura and A. Sugiura. 1989. Use of leaf isozyme to discriminate among Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) cultivars. Mem. Coll. Agric., Kyoto Univ. No. 135 : 31-42.
- 山田昌彦・池田 勇・山根弘康・平林利郎. 1988. カキのヘタすきと果頂裂果の遺伝. 園学雑. 57 : 8-16.
- Yamada, M., H. Yamane and T. Hirabayashi. 1987. Yearly fluctuations of two types of fruit cracking in seedling populations of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 56 : 287-292.
- 庄 東紅・北島 宣・石田雅士・傍島善次. 1990. 栽培カキの染色体数について. 園学雑. 59 : 289-297.