

## [研究報文]

## 茎頂培養による数種東アジア原産野生ブドウの植物体再生の難易度

望岡亮介<sup>1</sup>・濱路資治<sup>2</sup>・小野由布子<sup>1</sup><sup>1</sup> 香川大学農学部附属農場、〒769-2304 香川県さぬき市昭和字谷乙 300-2<sup>2</sup> 大阪府立大学農学部、〒599-8531 大阪府堺市学園町 1-1Difficulty-Difference in Plant Regeneration of Several Wild Grapes Native to East Asia by *In Vitro* Shoot Tip CultureRyosuke MOCHIOKA<sup>1</sup>, Motoharu HAMAJI<sup>2</sup> and Yuko ONO<sup>1</sup><sup>1</sup> University Farm, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Showa, Sanuki, Kagawa 769-2304, Japan<sup>2</sup> College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

Plantlets were regenerated by shoot tip culture of several wild grapes native to East Asia. When the meristems of the wild grapes were cultured in 1/2 strength modified Murashige and Skoog's (MS) liquid medium, differences in the percentage survival and the percentage of foliating plantlets were observed. In general, most of the wild grapes that were easy to root survived, however the percentage survival and the percentage of foliating plantlets in Campbell Early were higher than those in the wild species. All cultured meristems of the male plant of *Ryuukyuganebu* (*Vitis ficifolia* Bunge var. *ganebu* Hatusima) and the female plant of *Shiohitashibudou* (tentative name. *Vitis* sp.) withered. Insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP) was ineffective in improving both percentage survival of meristem and shoot growth of all wild grapes. Rooting was stimulated when the shoots were dipped into 50% aqueous ethanol containing 250mg/L IBA for 5 seconds and then incubated in a plant growth regulator-free medium containing PVPP.

**Key words:** Wild grape, *Vitis*, Shoot tip culture, Polyvinylpyrrolidone (PVPP), East Asia

## 緒 論

わが国には 7 種 8 変種の野生ブドウが分布しており (20)、局所的に自生するため絶滅が危惧されているものも多い。これらの中には、果皮中に含まれるアントシアニンの種類および量が栽培ブドウと比べて優っているものも多く認められ (16、21、22)、果実の直接的利用の他に、育種親 (14、24、25、26) や台木 (13) としての利用も検討されている。しかし、栽培品種と比べて挿し木発根が困難な傾向にある (10) ため、遺伝資源保護のためには効果的な増殖方法が重要である。筆者ら (15) は、日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) を用いて、発根の困難な原因の一つに枝梢内フェノール物質の量的な違いがあることを明らかにした。また、クマガワブドウの大量増殖法として茎頂培養が有効であり、寒天培地を用いる場合はフェノール吸着剤であるポリビニルピロリドン (PVPP) を培地に添加することが不可欠であることも明らかにした (11)。しかし、その他の日本原産野生ブドウの組織培養によるマイクロプロパゲーションの報告はヤマ

ブドウ (*V. coignetiae* Pulliat) のみで、その数も極めて少ない (8、27)。その他の野生ブドウの組織培養に関しても報告例は少なく、エビヅル [*V. ficifolia* Bunge var. *lobata* (Regel) Nakai=*V. thunbergii* Sieb. et Zucc.] の薬培養による不定胚誘導 (4) およびエビヅル葉片からのプロトプラスト培養 (9) 以外には見当たらない。

そこで、本研究では、クマガワブドウで開発した方法 (11) を用いて、茎頂培養による植物体再生の難易度が東アジア産野生ブドウ種間に認められるか調べた。

## 材料と方法

## 実験 1. 培養植物体の生存および生育に及ぼす PVPP の添加効果

供試材料には、大阪府立大学農学部実験圃場および香川大学農学部附属農場栽植のヤマブドウ (雌株)、チョウセンヤマブドウ (*V. amurensis* Rupr., 雌株、中国北東部原産)、サンカクヅル (*V. flexuosa* Thunb., 雌株)、エビヅル (雌株)、シチトウエビヅル (*V. ficifolia* Bunge var. *izu-insularis* Hara, 雌株)、リュウキュウガ

ネブ (*V. ficifolia* Bunge var. *ganebu* Hatusima、雌株および雄株)、シラガブドウ (*V. shiragai* Makino、雌株)、シオヒタシブドウ (仮称) (*V. sp.*、雌株)、ダイサンカクヅル (仮称) (*V. sp.*、雌株、韓国原産) およびタイワンケサンカクヅル (仮称) (*V. sp.*、雌株、台湾原産) を用い、対照に栽培品種 ‘キャンベル・アーリー’ (*V. labruscana* Bailey、両全株) を用いた。

シュートの調製、茎頂の摘出方法は既報 (11) によった。初代培地には、クマガワブドウの茎頂培養で効果の高かったナフタレン酢酸 (NAA) 0.01mg/L、ベンジルアデニン (BA) 0.5mg/L およびシヨ糖 3% を添加した 1/2MS (19) 液体培地を用い (11)、PVPP 0.1% (W/V) 添加区および無添加区を設けた。各処理区は、pH を 5.8 に調製した後、120℃で 12 分間オートクレーブした。

1 処理区には 20 個体を供試し、2 反復した。培養 6 週間後に生存率および再生個体率を調査した。なお、生存個体は培養植物体の一部に緑色が残っているもの、再生個体は生存個体のうち 2 枚以上の展葉が認められたものとした。

**実験 2. 発根に及ぼす IBA 瞬間浸漬処理の効果**

実験 1. で得られた再生個体の一部を 1/2MS 増殖固形培地 (シヨ糖 3%、pH 5.8、寒天 0.6%、BA 1.0 mg/L、PVPP 0.1% 添加) に継代し、シュート塊の増殖を行った。その後、クリーンベンチ内で培養シュートを、葉のついた状態で 1~2cm に無菌的に切

り分け、メンブランフィルター (ポアサイズ 0.22 μm) により除菌したインドール酪酸 (IBA) 250 mg/L 溶液 (50% エタノールに溶解) にシュート基部を 5 秒間浸漬し、溶媒が乾いた後、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地 (シヨ糖 3%、pH 5.8、寒天 0.6%) に置床した (以下、IBA 区)。対照として、50% エタノールに 5 秒間シュート基部を浸漬処理した後、同ホルモンフリー培地に植付けた区 (以下、エタノール区) および滅菌水に 5 秒間シュート基部を浸漬処理した後、同ホルモンフリー培地に植付けた区 (以下、対照区) を設けた。また、浸漬処理後に植付けるホルモンフリー培地には、PVPP 0.1% 添加区および無添加区を設け、1 処理区には 20 個体供試し、3 反復した。ホルモンフリー培地植付け 6 週間後に、各処理区における植物体の生存率、発根率、発根数、最大根長を調査した。

**結果**

**実験 1.**

各野生ブドウの培養植物体の生存率、再生個体率および PVPP の添加効果は Table 1 に示した。対照の ‘キャンベル・アーリー’ の生存率および再生個体率が PVPP 添加、無添加に関わらず 55~70% であったのに対して、供試した野生ブドウの大部分が低い値となった。特に、サンカクヅル、リュウキュウガネブ雄株、シオヒタシブドウおよびダイサンカクヅルでは生存・生育が極めて悪く、中でも、リュウキ

Table 1. Influence of PVPP<sup>2</sup> on survival and growth of shoot apices in several grapes after 6 weeks of culture<sup>1</sup>.

Japanese name	Gender	Scientific name	With 0.1% (W/V) PVPP		Without PVPP	
			% survival	% foliating plantlets	% survival	% foliating plantlets
Yamabudou	female	<i>Vitis coignetiae</i>	27.5	22.5	35.0	32.5
Chousen-yamabudou	female	<i>V. amurensis</i>	73.5	61.5	65.0	58.5
Sankakuzuru	female	<i>V. flexuosa</i>	5.0	5.0	0	0
Ebizuru	female	<i>V. ficifolia</i> var. <i>lobata</i>	32.5	22.5	37.5	25.0
Shichitoubizuru	female	<i>V. ficifolia</i> var. <i>izu-insularis</i>	32.5	30.0	21.5	17.5
Ryuukyuganebu	female	<i>V. ficifolia</i> var. <i>ganebu</i>	30.0	22.5	25.0	17.5
	male		0	0	0	0
Shiragabudou	female	<i>V. shiragai</i>	62.5	37.5	90.0	55.0
Shiohitashibudou (tentative name)	female	<i>V. sp.</i>	0	0	0	0
Daisankakuzuru (tentative name)	female	<i>V. sp.</i>	7.5	2.5	2.5	0
Taiwan-kesankakuzuru (tentative name)	female	<i>V. sp.</i>	37.5	30.0	47.5	40.0
'Campbell Early'	hermaphrodite	<i>V. labruscana</i>	70.0	62.5	62.5	55.0

<sup>1</sup>: Polyvinylpyrrolidone.

<sup>2</sup>: 40 explants per treatment.

ユウガネブ雄株およびシオヒタシブドウでは摘出した茎頂がほとんど生育せず、やがて全個体が褐変・枯死した。

また、PVPP 添加効果は野生種により異なり、チョウセンヤマブドウ、サンカクヅル、シチトウエビヅル、リュウキュウガネブ雌株およびダイサンカクヅルで生存率および再生個体率の向上が認められたが、その他の野生種ではほとんど効果がないか、あるいはかえって生育が抑制された。なお、‘キャンベル・アーリー’では PVPP 添加により生存率および再生個体率が向上した。

## 実験 2.

各野生ブドウおよび‘キャンベル・アーリー’の

発根に及ぼす各処理の結果を Table 2~8 に示した。生存率および発根率は、概して PVPP 添加培地の IBA 区で高くなった。エタノール区では IBA 区に対して生存率、発根率の低下が見られたが、PVPP の培地添加により培養植物体の生育回復が認められた。

個々の野生種について見ると、チョウセンヤマブドウ (Table 2) では PVPP を培地に添加することにより生存率が向上したが、発根率および最大根長はやや低下した。発根数については IBA 処理で増加したが、その際の PVPP 添加効果は認められなかった。

エビヅル (Table 3) では、生存率および発根率に及ぼす培地への PVPP 添加効果がごくわずか認められる程度で、全体的に生存率および発根率が高く、

Table 2. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Chousen-yamabudou shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>z</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	93.3	31.7	3.8 ± 0.8 <sup>y</sup>	26.6 ± 5.6
Ethanol 50%	90.0	23.3	2.1 ± 0.4	14.0 ± 4.7
Cont.	95.0	31.7	2.1 ± 0.3	31.9 ± 5.3
Without PVPP				
IBA 250mg/L	91.7	40.0	3.1 ± 0.5	31.1 ± 5.5
Ethanol 50%	80.0	35.0	2.1 ± 0.5	31.5 ± 5.3
Cont.	90.0	31.7	2.2 ± 0.4	27.7 ± 5.7

<sup>z</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

Table 3. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Ebizuru shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>z</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	88.3	83.3	4.7 ± 0.7 <sup>y</sup>	40.5 ± 8.8
Ethanol 50%	71.7	56.7	3.6 ± 0.7	43.8 ± 11.4
Cont.	83.3	75.0	3.1 ± 0.4	33.5 ± 8.8
Without PVPP				
IBA 250mg/L	88.3	81.7	4.6 ± 0.8	45.2 ± 9.7
Ethanol 50%	68.3	51.7	4.0 ± 0.5	45.6 ± 10.1
Cont.	80.0	73.3	2.9 ± 0.5	37.1 ± 8.2

<sup>z</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

Table 4. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Shichitoubizuru shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>2</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	56.7	55.0	6.0 ± 0.7 <sup>y</sup>	50.0 ± 6.0
Ethanol 50%	26.7	21.4	2.0 ± 0.2	21.4 ± 11.2
Cont.	13.3	11.7	4.3 ± 0.8	31.6 ± 10.1
Without PVPP				
IBA 250mg/L	73.3	73.3	4.5 ± 0.8	43.1 ± 5.9
Ethanol 50%	20.0	20.0	2.6 ± 0.4	23.3 ± 8.6
Cont.	11.7	11.7	3.2 ± 0.8	39.6 ± 8.1

<sup>2</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

Table 5. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Ryuukyuganebu shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>2</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	93.3	80.0	4.1 ± 0.3 <sup>y</sup>	52.4 ± 4.7
Ethanol 50%	75.0	48.3	2.2 ± 0.2	31.5 ± 3.3
Cont.	66.7	35.0	2.8 ± 0.3	36.0 ± 5.1
Without PVPP				
IBA 250mg/L	86.7	80.0	3.7 ± 0.3	60.6 ± 4.9
Ethanol 50%	68.3	50.0	1.9 ± 0.2	36.7 ± 3.5
Cont.	53.3	28.3	2.2 ± 0.4	37.8 ± 6.8

<sup>2</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

Table 6. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Shiragabudou shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>2</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	91.7	28.3	3.3 ± 0.7 <sup>y</sup>	23.8 ± 4.8
Ethanol 50%	75.0	6.7	2.8 ± 0.9	15.5 ± 5.6
Cont.	58.3	10.0	1.2 ± 0.2	14.5 ± 4.9
Without PVPP				
IBA 250mg/L	80.0	16.7	3.2 ± 0.8	9.5 ± 3.5
Ethanol 50%	63.3	3.3	2.5 ± 0.5	10.5 ± 5.5
Cont.	61.7	3.3	1.5 ± 0.5	36.0 ± 1.0

<sup>2</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

対照区でも 70%以上の発根が見られた。しかし、エタノール区では生存率、発根率ともに他の区より劣った。発根数および最大根長は PVPP の添加の有無

に関わらず IBA 区およびエタノール区で優れ、対照区で劣った。

シチトウエビヅル (Table 4) では、IBA 区を除い

た他の区で生存率および発根率に及ぼす PVPP 添加効果がわずかに認められた。しかし、生存個体の発根率は、PVPP 無添加培地ではすべての処理区で 100%であったのに対し、PVPP 添加培地ではやや低い値となった。同一培地条件下で見ると、発根数および最大根長は、IBA 区、対照区、エタノール区の順に優れていた。

リュウキュウガネブ雌株 (Table 5) では、生存率に対する培地への PVPP 添加効果がわずかに認められた。発根率に対しては PVPP 添加効果が対照区を除いて認められず、IBA 区、エタノール区、対照区の順に発根率は高い値を示した。発根数および最大根長は PVPP 添加培地、無添加培地ともに IBA 区で最も優れた。

シラガブドウ (Table 6) では、生存率および発根

率に対する培地への PVPP 添加効果が認められた。しかし、発根率は PVPP 添加培地の IBA 区でも約 30%と低い値であった。発根数は IBA 区とエタノール区に大きな差異は認められず、PVPP 添加培地では最大根長において処理区間で顕著な差は認められなかった。

タイワンケサンカクヅル (Table 7) では、生存率および発根率に対する培地への PVPP 添加効果が認められた。発根率は IBA 区、対照区、エタノール区の順に高い値を示した。発根数は IBA 区で優れたが、最大根長は PVPP 添加培地の処理区間で顕著な差は認められなかった。

‘キャンベル・アーリー’ (Table 8) では、エタノール区を除いて、生存率および発根率に対する培地への PVPP 添加効果が認められた。発根率は、全

Table 7. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of Taiwan-kesankakuzuru shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>z</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	75.0	48.3	4.0 ± 0.4 <sup>y</sup>	41.0 ± 5.3
Ethanol 50%	55.0	26.7	2.1 ± 0.2	56.2 ± 9.6
Cont.	71.7	43.3	2.7 ± 0.4	49.2 ± 6.8
Without PVPP				
IBA 250mg/L	53.3	38.3	3.4 ± 0.7	34.8 ± 6.5
Ethanol 50%	45.0	20.0	1.6 ± 0.2	42.8 ± 8.6
Cont.	71.7	38.3	2.0 ± 0.3	35.0 ± 6.0

<sup>z</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

Table 8. Influence of IBA pretreatment (250mg/L for 5 sec.) on survival and rooting of 'Campbell Early' shoot cuttings after 6 weeks of subculture<sup>z</sup>.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	The longest root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250mg/L	85.0	78.3	8.2 ± 0.8 <sup>y</sup>	21.5 ± 2.8
Ethanol 50%	66.7	61.7	3.7 ± 0.4	42.2 ± 7.5
Cont.	80.0	76.7	6.3 ± 0.5	47.5 ± 5.9
Without PVPP				
IBA 250mg/L	75.0	75.0	7.7 ± 0.8	30.7 ± 4.7
Ethanol 50%	76.7	73.3	5.8 ± 0.6	34.2 ± 4.7
Cont.	73.3	73.3	6.2 ± 0.6	43.1 ± 4.1

<sup>z</sup>: 60 explants per treatment. 1/2 MS agar media without plant growth regulator were used.

<sup>y</sup>: Means ± standard error.

処理区で 61.7~78.3%と幅があったが、生存個体の発根率で見ると、90%以上の高い値を示した。発根数は IBA 区で最も優れたが、最大根長は逆に IBA 区が劣った。

### 考 察

ブドウの茎頂培養において、茎頂中の全フェノール含量と茎頂の生存率の間には負の相関関係があるとされている (28)。また、挿し木発根の困難な植物にはタンニン等のフェノール物質が多く含まれることも認められている (7, 15)。このことから、一般に挿し木発根の容易な植物ほど茎頂培養も容易で、挿し木発根の困難な植物を茎頂培養する際には各種の処理が必要である (2, 5, 6, 13, 18)。植物体の褐変はフェノール物質の酸化によるため、褐変防止には、フェノール物質の除去以外に、内生フェノール物質の生成抑制および酸化防止も有効である。液体培養は、植物体内に含まれる生育抑制物質を順次液体培地中に浸出させ、内生生育抑制物質を希釈させるのと同時に、植物体と空気の接する機会を減少させ、酸化を起りにくくする培養法である。生存率および再生個体率に対して PVPP の培地添加効果に明らかな差異が見られない場合が多かったのは、培養植物体が液体培地中に水没していたため、フェノール物質の酸化が起りにくかったのではないかと考えられる。

本実験で比較的生存率の高かった野生種は、挿し木の場合においても発根の良いものが多く、挿し木発根の悪いものは茎頂培養の生存率が低い傾向にある (未発表)。サンカクヅルおよびダイサンカクヅルでは、極めてわずかではあったが再生植物体が得られた。しかし、リュウキュウガネブ雄株およびシオヒタシブドウでは、実験 1 の液体培地中ですべての茎頂の褐変が発生し、再生個体を得ることはできなかった。両野生種の挿し木発根はクマガワブドウより容易であるが栽培ブドウよりは発根率が低く、シオヒタシブドウの休眠枝中には、クマガワブドウほどではないが生育抑制物質が多く含まれていることも認めている (未発表)。Ui ら (23) がブドウ '甲州' のプロトプラスト培養における種々の培地添加剤の効果を調査したところ、活性炭以外にベントナイトおよびアンバーライト XAD-4 にプロトプラ

ストの生育効果を認めたが、フェノール物質の吸着剤であるポリビニルピロリドン (PVP)、PVPP、ポリクラーAT には全く効果が見られなかったことから、ブドウ・プロトプラストの分裂阻害物質はフェノール化合物とは異なる物質である可能性が高いとしている。さらに、クリ枝梢中の発根抑制物質には、フェノール物質以外に、芳香族環を持たない鎖状の炭素結合を持つ酸の存在も認められている (3)。これらのことから、茎頂培養の困難な野生種はフェノール物質以外の生育抑制物質を多く含んでいるのではないかと推測される。なお、PVPP 添加により褐変が軽減された培養植物体ほど発根が優れる傾向にあった。

一方、実験 1 で生存率の低かった野生種は、摘出する茎頂部分を大きくしても生存率の向上はほとんど見られず、摘出直後から褐変が始まっていた (データ未載)。今後は、生育抑制物質の吸着剤および茎頂生存率を高める摘出方法を検討する必要がある。

また、ブドウの培養植物体の発根に関して、ホルモンフリーの固形培地に継代すると容易に発根する例も認められ (1)、'キャンベル・アーリー' においても同様の結果となったが、供試した野生種の大部分は IBA 無処理区 (対照区) および 50%エタノール区で発根率が低下した。

以上の結果、茎頂培養による植物体再生の難易度には種間差が認められた。また、野生ブドウの培養植物体を発根させるには IBA 瞬間浸漬処理が効果的であり、その際、発根培地に PVPP を添加すると処理したシュートの生存率が向上することが確認された。

なお、未同定の野生ブドウでタイワンケサンカクヅルはキルンブドウ (*V. kelungensis* Momiyama) (17) と、ダイサンカクヅルは中国の華東葡萄 (*V. pseudoreticulata* W. T. Wang) (12) との共通点もあり、また、シオヒタシブドウはクマガワブドウとエビツルの自然交雑種の可能性もあるため (10)、これらの未同定種についてはさらなる研究が必要である。

### 要 約

野生ブドウの大量増殖を行う際の基礎資料とするため、茎頂培養による植物体再生の難易度の種間差を調査した。

各野生ブドウを 1/2MS 液体培地で茎頂培養したところ、生存および生育に種間差が見られた。概して、挿し木発根が容易な野生種ほど生存率は高かった。しかし、‘キャンベル・アーリー’の生存率、再生個体率と比較すると、大部分の野生ブドウは低い値であった。特に、リュウキュウガネブ雄株、シオヒタシブドウでは、培養全個体が褐変・枯死した。また、培地への PVPP 添加効果は野生種により異なり、効果が認められる種と認められない種があった。

発根処理は培養シュートを IBA 250mg/L (50%エタノール溶液に溶解) に瞬間浸漬処理することが効果的であり、その際、発根培地に PVPP を添加すると処理シュートの生存率が向上した。

#### 引用文献

1. Barlass, M. and K. G. M. Skene. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340 (1978).
2. Fukui, H., M. Sugiyama and M. Nakamura. Shoot tip culture of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 58: 43-47 (1989).
3. 畑野健一・佐々木恵彦. 樹木の生長と環境. pp. 25-26. 養賢堂, 東京 (1987).
4. Hirabayashi, T., I. Kozai and T. Akihama. *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. *HortScience* 11: 511-512 (1976).
5. 細井寅三. 果樹優良台木の *in vitro* における維持・増殖の効率化. (昭和 63 年度科学研究費総合研究成果報告書: 代表 林 真二). pp. 48-58 (1989).
6. 石原愛也. 植物組織培養の世界. 樋口春三監修. pp. 258-261. 柴田ハリオ硝子, 東京 (1988).
7. 町田英夫. さし木のすべて. pp. 14-17. 誠文堂新光社, 東京 (1974).
8. 松本敏一・山田員人. ヤマブドウの組織培養による増殖. 近畿中国農研. 90: 13-16 (1995).
9. Mii, M., Y.-M. Zou, T. Sugiyama, S. Yanagihara and M. Iizuka. High-frequency callus formation from protoplasts of *Vitis labruscana* Bailey and *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc. by embedding in gellan gum. *Scientia Hort.* 46: 253-260 (1991).
10. 望岡亮介. 日本原産野生ブドウの特性による分類ならびに利用に関する研究. 大阪府立大学学位論文 (1996).
11. 望岡亮介・濱路資治・堀内昭作・黒岡 浩. 挿し木発根困難な日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) の茎頂培養による個体再生. *植物組織培養* 13: 139-145 (1995).
12. 望岡亮介・堀内昭作・李 世誠・山澤通子・松井弘之. 日本及び中国原産野生ブドウの比較検討. 第 1 報. シラガブドウと華東葡萄の形態学的特性について. *園学雑*. 60 (別 1): 130-131 (1991).
13. 望岡亮介・堀内昭作・松井弘之・黒岡 浩・村井泰広・原田 久. 日本原産野生ブドウの台木利用に関する研究. *農業生産技術管理学会誌* 3(2): 41-44 (1996).
14. 望岡亮介・堀内昭作・松井弘之・村井泰広・山口雅篤・黒岡 浩. 日本原産野生ブドウ, エビヅル及びリュウキュウガネブの育種材料としての検討. *近畿中国農研*. 91: 36-42 (1996).
15. 望岡亮介・小田容子・椿本美也子. 日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) の挿し木発根の困難性と枝梢内フェノール物質との関係. *日本ブドウ・ワイン学会誌* 13: 2-8 (2002).
16. 望岡亮介・山口雅篤・堀内昭作・松井弘之・黒岡 浩. 日本原産野生ブドウの果皮中アントシアニン色素による化学的分類. *園学雑*. 64: 463-470 (1995).
17. 初山泰一. 日本には *Vitis lanata*, ROXBURGH はない. *日本生物地理学会会報* 5 (3): 199-207 (1935).
18. 宗形 隆. モモのフリー母樹育成技術. *バイオホルティ* 2: 109-113 (1989).
19. Murashige, T. and F. Skoog. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497 (1962).
20. 中川昌一・堀内昭作・松井弘之・湯田英二・山田省吾・村井泰広・小松春喜. 日本原産野生ブドウの分布ならびに葉の形態的特性. *園学雑*. 60: 31-39 (1991).
21. 新保国之・市 隆人・植木啓司・岡本五郎. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) 色素の化学構造および熱・光安定性. *日本農芸化学会 2002 年度大会講演要旨集*, p.239 (2002).

22. 植木啓司・青木秀之・岡本五郎・平野 健. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) 果実の成熟に及ぼす葉数の影響と果汁の成分的特徴. 日本ブドウ・ワイン学会誌 12 : 58-65 (2001).
23. Ui, S., K. Yamada, S. Hyuga and H. Seki. Effects of the addition with various adsorbents on the protoplast culture of grape. *Plant Tissue Culture Letters* 10: 172-175 (1993) .
24. 山川祥秀・守屋正憲・穴水秀教. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう“ヤマ・ソービニオン”の品種特性について. 山梨大発研報. 24 : 15-24 (1989).
25. 山川祥秀・守屋正憲・穴水秀教. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう‘ヤマ・メルロー’の品種特性について. 山梨大発研報. 25 : 27-37 (1990).
26. 山川祥秀・田中浩毅. 交雑新品種・赤ワイン用ぶどう‘ヤマ・セミヨン’ (山ブドウ×セミヨン)の品種特性について. 山梨大発研報. 26 : 27-34 (1991).
27. 吉岡裕治・石原愛也. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae*) のミクロ繁殖. 園学要旨. 昭 62 秋. 800 (1987) .
28. Yu, D. and C. P. Meredith. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111: 972-975 (1986) .