

挿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

望岡亮介・濱路資治・堀内昭作・黒岡 浩

大阪府立大学農学部
(〒593 堺市学園町 1-1)

(1995年6月10日受付)

(1996年3月1日受理)

本実験は、挿木繁殖が困難である日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama)のマイクロプロパゲーションを目的として茎頂培養を行ったものである。

茎頂摘出をフェノール物質吸着剤である水溶性のポリビニルピロリドン(PVP)添加滅菌水中で行うと、茎頂の褐変防止に有効であった。シュートを生長させるには、初代培地として1/2 MS 液体培地(ショ糖3%, NAA 0.01 mg/l, BA 0.5 mg/lを含む)が寒天培地に比べて効果的であった。0.01~0.1%の不溶性ポリビニルポリピロリドン(PVPP)の寒天培地への添加は、茎頂の生存およびその後のシュート生長に有効であった。発根促進には、寒天培地へのPVPP添加が不可欠であり、IBA 250 mg/l(50%エタノールに溶解)でシュートの基部を5秒間浸漬処理した後、ホルモンフリー培地に植付けた場合が発根率、発根数および根長において最も有効であった。

1. 緒 言

わが国には現在、7種8変種の野生ブドウの自生が確認されている¹⁾。その中でクマガワブドウ(*Vitis kiusiana* Momiyama)は熊本県球磨河流域で発見された野生種であり、枝梢上に短い刺(腺毛)を有するという他の野生ブドウとは異なる形態を呈する²⁻⁴⁾。1983年10月に大阪府大グループが水俣河流域およびその支流(湯出~湯の鶴七滝)の比較的広範囲な地域で本種の分布調査を行ったところ、わずか4本の成木しか発見できなかったと報告している⁵⁾。また、クマガワブドウは日本自然保護協会刊行の「我が国における保護上重要な植物種(通称「日本版レッドデータブック植物編」)」においても危急種に挙げられており、今すぐ絶滅の危機に瀕することはないが、現状では確実に絶滅の方向に向かっていくと判断されている。この原因として、森林伐採、道路工事および園芸用の採集が挙げられている^{6,7)}。

また、本種は中国の毛葡萄(*V. quinqueangularis* Rehder)と同種^{4,6,7)}または変種⁸⁾ではないかと考えられている。毛葡萄は現在、すでに中国広東省永福県および山東

省博山県などの地域で利用・加工されており、その果実で醸造したワインはチョウセンヤマブドウ(*V. amurensis* Rupr.)のものより良好で、ワインの原料としては中国原産野生ブドウ中最優秀の評価を得ている^{9,10)}。また、わが国でワイン原料として利用されている日本原産野生種ヤマブドウ(*V. coignetiae* Pulliat)の果皮中に含まれるアントシアニンのマルビジン3,5-ジグルコシドはリノール酸の自動酸化を阻害することが知られており¹¹⁾、クマガワブドウはそのヤマブドウより高含量⁵⁾および多種類¹²⁾のアントシアニンを含有することから、現在わが国では全く顧みられていないクマガワブドウも、今後貴重な酒質資源として利用可能かも知れない。しかし、本種は挿木発根が極めて困難であり^{13,14)}、さらに、オーキシン処理による挿木発根性の向上も見られないため、繁殖は取木と毛葡萄実生への接木が一般的に行われている¹³⁾が、繁殖効率は低い。クマガワブドウも毛葡萄と同様、挿木発根が極めて困難であることが知られている(未発表)。したがって、クマガワブドウの個体再生は、遺伝資源の保護の面から、あるいは野生種を原料とした

ワイン生産などへの直接利用の面から、今後重要な課題となろう。

一方、果樹の大量増殖法の一つとして茎頂培養によるマイクロプロパゲーションが最近試みられており、ブドウ属においても、挿木発根の困難なマスカディン・ブドウ (*V. rotundifolia* Michx.) で成功例が報告されている¹⁵⁾。しかし、クマガワブドウおよび毛葡萄についての茎頂培養による繁殖例の報告は見当らない。

そこで、本研究はクマガワブドウの茎頂培養によるマイクロプロパゲーションを試みた。

2. 材料および方法

実験 1. 初代培地の検討

供試材料は、大阪府立大学農学部実験圃場栽植の10年生のクマガワブドウ雌株(‘デラウェア’台)を用いた。生長の盛んな7~8月にシュートを採取し、葉を除去した後、1節ごと(芽を含む)に3~4 cmの長さに切り、流水で30分間水洗した。その後、70%エタノールに数十秒間、続いて次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素1%)に10~15分間浸漬殺菌し、無菌室内で滅菌水を用いて3回洗浄した。予備実験として、この後直ちに茎頂(葉原基1~数枚を含む約0.5 mmの大きさ)を実体顕微鏡下で無菌的に摘出し、寒天培地に置床したところ、数十分後には茎頂が褐変し、やがて枯死した。そこで、本実験では、伊藤¹⁶⁾の方法を参考にして、褐変防止のためにフェノール物質吸着剤である水溶性のポリビニルピロリドン(PVP)1%添加滅菌水中で茎頂摘出を行った。なお、殺菌後の外植体は茎頂摘出時までPVP添加滅菌水中に沈ませておいた。

初代培養は、寒天培地と液体培地を用いて行った。この内、寒天培地には活性炭0.1%添加区、不溶性のポリビニルピロリドン(PVPP)0.1%添加区および吸着剤無添加区(対照区)の3区を設けた。培地の組成には1/2 MS¹⁷⁾を用い、ナフタレン酢酸(NAA)0.1 mg/l、ベンジルアデニン(BA)1 mg/l、ショ糖3%を添加した後、pH 5.8に調整して0.6%の寒天を加えた後、120°Cで12分間オートクレーブした。

一方、液体培地には培地組成を1/2 MSおよび、*Vitis labrusca*の茎頂培養で特に優れた効果を示したことで知られるC₂D¹⁸⁾培地の2種類を用い、さらに各培地にPVPP 0.1%添加区と無添加区を設けた。なお、液体培地では、寒天培地への添加濃度より低濃度の植物ホルモンで培養植物が生育することが知られているので、植物ホルモンの添加濃度はNAA 0.01 mg/lおよびBA 0.5 mg/lとした。これらの植物ホルモンおよびショ糖3%を培地に添加した後、寒天培地と同様の滅菌操作を行っ

た。

寒天培地の各区には1処理区につき茎頂20個体を、液体培地の各区には1処理区につき茎頂15個体を供試し、茎頂に緑色が残っている個体を生存個体、生存個体のうち葉が2枚以上展開した個体を生育個体とした。なお、寒天培地および液体培地各区とも、外植片からシュートが伸長し2~3枚展葉が見られた時点で、増殖培地(1/2 MS, ショ糖3%, BA 1.0 mg/l, pH 5.8, 寒天0.6%)に外植片の基部を挿して継代し、以下の実験3.に用いた。

すべての実験の培養条件は26°C, 16時間明期(照度約3,000 lx)とした。

実験 2. PVPP の培地添加濃度が茎頂および小植物体の生長に及ぼす影響

液体培養を長期間続けていると、植物体がガラス化し、乾燥による萎凋が甚だしくなるため、ある程度生長した植物体を寒天培地に継代する必要がある。そこで、培養植物体の生長に及ぼすPVPPの培地添加濃度を知るため、PVPP濃度を10, 1, 0.1, 0.01, 0%の5区とした。各区の培地は実験1.の寒天培地区の初代培地と同条件とした。なお、この実験では各区茎頂10個体を供試し、茎頂の調整は実験1.と同様の方法で行った。また、継代培養は茎頂植付け後から4週間ごとに同一培養条件で行い、各時期の生存率および茎頂植付け12週間後の小植物体の生長状況を調査した。

実験 3. 発根に及ぼす植物生長調節物質の影響

供試材料には実験1.で増殖したシュートを用い、培地組成は1/2 MS(ショ糖3%, pH 5.8, 寒天0.6%)とした。発根実験は、NAAの寒天培地への添加処理および50%エタノールに溶解した高濃度インドール酪酸(IBA)5秒間浸漬処理、の2区を設けた。すなわち、NAAの寒天培地への添加処理区では、NAA 0.01 mg/l添加区(以下、NAA 0.01区)、NAA 0.1 mg/l添加区(以下、NAA 0.1区)、NAA 0.1 mg/lとフロログルシノール(PG)1 mMの混合添加区(以下、NAA+PG区)および植物生長調節物質無添加区(対照区)の4処理区を設けた。なお、各処理区にはPVPPを0.1%添加したが、PGはフェノール化合物であるので、PVPPへの吸着を避けるため、NAA+PG区のみPVPP無添加とした。また、熱によるPGの変性を避けるため、オートクレーブ後、温度が50°C程度に下がった培地にメンブランフィルター(ポアサイズ0.22 μm)を通して除菌添加した。各実験区とも20個体を供試し、継代6週間後に各処理区の生存率、発根率、発根数および根長を調査した。高濃度IBAの5秒間浸漬処理は、シュート塊より切

り取ったシュートの基部をメンブランフィルター(ポアサイズ 0.22 μm)を通して除菌した IBA 250 mg/l(50% エタノールに溶解)に 5 秒間浸漬し、溶媒が乾いた後ホルモンフリーの 1/2 MS 寒天培地に置床した(以下、IBA 区)。対照として、50% エタノール 5 秒間浸漬処理区(以下、エタノール区)、無処理区(滅菌水にシュート基部を 5 秒間浸漬)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 添加および無添加区を設け、1 処理区には 15 個体を供試した。なお、継代 6 週間後に NAA 添加区と同様、各処理区の生存率、発根率、発根数および根長を調査した。

各処理で得られた発根個体は、ハイポネックス(5-10-5)500 倍液で湿らせた無菌のパーミキュライトを入れたガラス容器に植付け、人工気象器の中に置き、枝葉の伸長状況に合わせて徐々に蓋を開け順化させた。

3. 結 果

実験 1. 初代培地の検討

寒天培地における、茎頂植付け 4 週間後の茎頂生存率および茎頂植付け 6 週間後のシュート伸長個体率を **Table 1** に示した。対照区では、培養 4 週間後には 20% の茎頂が緑色を呈していたが展葉は見られず、シュートの伸長も認められなかった。活性炭添加区では、25% の茎頂が生存していたが、葉が 1 枚展開した後に褐変を開始し、培養 6 週間後には全個体が褐変枯死した。一方、PVPP 添加区では培養 4 週間後では 25% の茎頂が生存しており、培養 6 週間後では生存個体のすべてからシュートが伸長し、2, 3 枚の展葉が認められた。

液体培地における初代培地の影響を **Table 2** に示した。茎頂植付け 6 週間後の生存率および生長した個体の率とともに液体培地が寒天培地の 25% よりも優れていたが、

Table 1. Influence of two phenol adsorbents added into agar-solidified media on survival and growth of shoot apices in *Vitis kiusiana**¹.

Treatment	% of survival after 4 weeks of culture	% of foliating plantlet after 6 weeks of culture
Cont.	20.0	0
Charcoal(0.1%, W/V)	25.0	0
PVPP* ² (0.1%, W/V)	25.0	25.0

*¹ Twenty explants per treatment.

*² Polyvinylpyrrolidone.

Table 2. Influence of different basal liquid media and PVPP on survival and growth of shoot apices in *V. kiusiana* after 6 weeks of culture*.

Medium	% of survival	% of foliating plantlet
With 0.1% (W/V) PVPP		
1/2 MS	40.0	33.3
C ₂ D	33.3	26.6
Without PVPP		
1/2 MS	43.3	30.0
C ₂ D	23.3	13.3

* Fifteen explants per treatment.

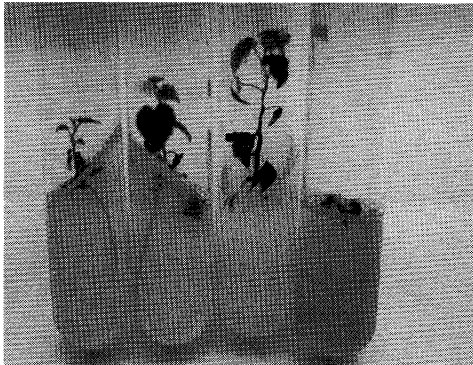
Table 3. Influence of various concentrations of PVPP added into agar-solidified media on survival and growth of shoot apices in *V. kiusiana**¹.

PVPP conc. (% W/V)	% of survival after		No. of leaflets per survived shoot after third subculture* ²
	first subculture	second subculture	
10	60.0	30.0	+
1	50.0	40.0	++
0.1	40.0	40.0	+++
0.01	60.0	60.0	+++
0(cont.)	50.0	50.0	dead

*¹ Ten explants per treatment. The cultures were subcultured every 4 weeks.

*² Symbols : +, 1-2 leaflets; ++, 3-4 leaflets; +++, more than 4 leaflets.

PVPPの培地への添加効果はほとんど認められなかった。また、培地の種類では、生存率、生長個体の率のいずれに対しても1/2 MS培地がC₂D培地より優れていた。



Cont. NAA 0.01 mg/l NAA 0.1 mg/l NAA 0.1 mg/l + PG 1 mM

Fig. 1 Influence of plant growth regulator (PGR) concentrations on shoot growth and rooting of *Vitis kiusiana* shoot cuttings.

Table 4. Influence of various concentrations of plant growth regulator (PGR) added into media on survival and rooting of *V. kiusiana* shoot cuttings after 6 weeks of subculture*¹.

PGR conc.	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	Root length (mm)
NAA 0.01 mg/l	30.0	5.0	1	5.9
0.1 mg/l	70.0	20.0	3.3±0.9* ²	3.0±0.6
NAA 0.1 mg/l+PG* ³ 1 mM	5.0	0	0	0
Cont.	40.0	5.0	1	18.2

*¹ Twenty explants per treatment. All media except the one with 0.1 mg/l NAA+1 mM PG contained 0.1% (W/V) PVPP.

*² Mean±SE.

*³ Phloroglucinol.

Table 5. Influence of IBA pretreatment (250 mg/l for 5 sec.) on survival and rooting of *V. kiusiana* shoot cuttings after 6 weeks of subculture*¹.

Treatment	% of survival	% of rooting	No. of roots per shoot	Root length (mm)
With 0.1% (W/V) PVPP				
IBA 250 mg/l	73.3	60.0	3.6±0.3 * ²	82.4±7.0
Ethanol 50%	66.7	6.7	2.0±0.0	20.0±0.0
Cont.	40.0	6.7	2.0±0.0	35.0±0.0
Without PVPP				
IBA 250 mg/l	40.0	33.3	3.6±1.0	86.8±9.3
Ethanol 50%	0	0	0	0
Cont.	0	0	0	0

*¹ Fifteen explants per treatment.

*² Mean±SE.

実験2. PVPPの培地添加濃度が茎頂および小植物体の生長に及ぼす影響

クマガワブドウの小植物体は、第2回継代培養終了時まではPVPP 10%添加区以外の処理区で生存率に差異が見られなかったが、対照区の小植物体の生長は悪く、第3回継代終了時には対照区の小植物体は褐変・枯死した(**Table 3**)。また、PVPP 10%添加区では培地が他の処理区よりかなり硬いためか、小植物体の生長が劣った。これに対し、PVPP 0.01~1%添加区では茎頂の生存率は高く、その後の小植物体の生長も対照区と比べて優れていた。

実験3. 発根に及ぼす植物生長調節物質の影響

NAAの寒天培地添加処理において、NAA+PG区では新たなシュートの伸長は認められず、継代2週間後には培養小植物体の多くが褐変・枯死し始め、生存率は5%と低い値であった(**Table 4**)。また、NAA 0.01区および対照区では培養小植物体の生存率は30~40%、発根率は5%と低い値を示し、発根している個体でも、発根数は1本と少なかった。これに比べて、NAA 0.1区では生存率が70%、発根率が20%、発根数が3.3本

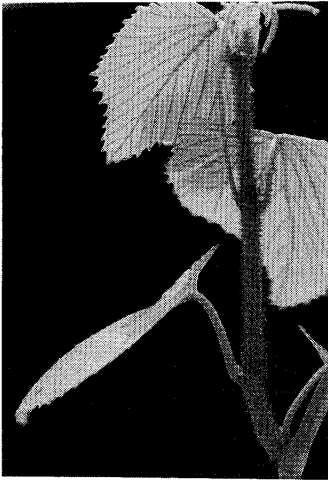


Fig. 2 The shoot of a regenerated plant growing in soil one year after acclimation.

となり、寒天培地区では最も優れていた (Fig. 1).

一方、IBA の瞬間浸漬処理では PVPP の培地への添加効果は高く、各処理区で生存率が大幅に高まった (Table 5). その中で、PVPP 添加培地における IBA 区で発根率が 60% と高かった。これに比べ、エタノール区および対照区では、PVPP 無添加培地で 0%、PVPP

添加培地で 6.6% と低い発根率であった。また、発根数および根長においても IBA 区は優れていた。

このことから、シュートの基部を IBA 250 mg/l (50% エタノールに溶解) で瞬間浸漬処理した後、ホルモンフリーの PVPP 添加寒天培地に植付ける方法が、生存率、発根率、発根数および根長ともに優れることが明らかとなった。

順化した個体をその後、屋外に移したところ順調に生長し、順化の翌年には、春枝に多数の短い刺(腺毛)を着生し、クマガワブドウの特徴ある形態を示した (Fig. 2).

4. 考 察

Yu と Meredith¹⁹⁾ は、*V. vinifera* L. の 8 品種を茎頂培養したところ、茎頂中の全フェノール量と茎頂の生存率の間に負の相関関係があることを認めた。また、木本植物は草本植物と比べてフェノール物質が多く、培養中にしばしば褐変枯死しやすいため、液体培地中での一日前培養²⁰⁾、培地へのアスコルビン酸添加²¹⁾、Fe 濃度を低下させた組成培地の使用²¹⁾、ペーパーウィック法の利用²²⁾および培地への活性炭添加²³⁾等の方法により褐変物質の除去および生成抑制の試みがなされている。特に、モモの茎頂培養における活性炭の添加は、1.0 mm 以下の小さな茎頂の生存率を高めるためには不可欠な処理で

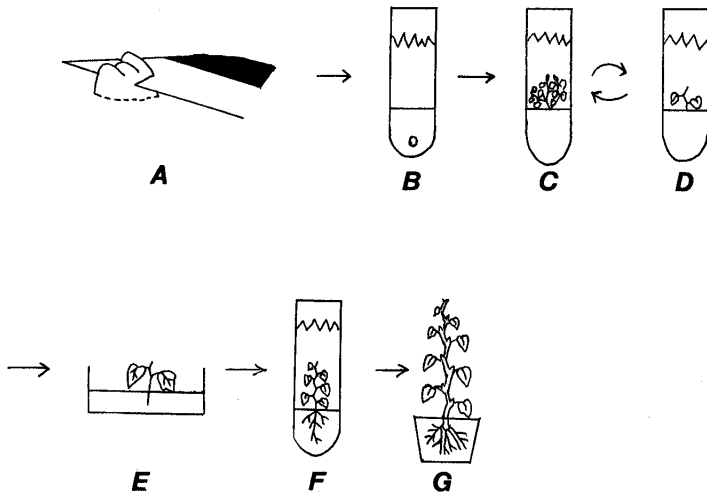


Fig. 3 Schematic diagram for plant regeneration from shoot apex of *V. kiusiana*.

- A: Excision of meristem in sterilized 1% (W/V) PVP solution.
- B: 1/2 MS liquid medium supplemented with 0.01 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA.
- C, D: Multiplication and division of shoot on 1/2 MS agar medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.01-0.1% (W/V) PVPP.
- E: Basal part of shoot cutting immersed in 50% aqueous ethanol with 250 mg/l IBA for 5 seconds.
- F: Treated cutting placed on PGR-free 1/2 MS agar medium containing 0.01-0.1% (W/V) PVPP.
- G: Acclimation.

あるとされている²³⁾。しかし、本実験では培地への活性炭添加は茎頂の生存率を向上させたものの、茎頂植付け6週間後のシュートの生長にはかえってマイナスの効果が認められた。この現象は、活性炭の無選択的吸着作用によるものと考えられる。すなわち、活性炭は褐変物質以外にも植物ホルモンなどの茎頂の生長に不可欠な物質も無選択に吸着するため、茎頂植付け4週間後以降には植物ホルモンなどの不足状態になり、茎頂はやがて枯死に至ったのではないかと推察される。

これに対し、PVPPは選択的にフェノール物質を吸着する性質があるので、茎頂植付け6週間以降においてもシュート生長に効果が認められた。しかし、寒天培地へのPVPP添加濃度と小植物体の生長との関連については、フェノール物質の吸着とともにPVPPによる培地硬化の影響も考慮しなければならないことが明らかとなった。すなわち、PVPP 10%添加区では培地が他の処理区より硬くなる。そのため培地から植物体への養水分の移動が円滑に行われず、本実験のように生長不良をもたらしたのではないかと推察される。一方、液体培地ではフェノール物質の酸化が起こりにくいいため、PVPP無添加でも生存、生長個体が比較的多くなったものと思われる。

発根培地においては、寒天培地へのPVPPの添加が重要で、その効果は、生存率向上の影響によるものと考えられる。また、PGはオーキシシンと相互作用をもち、リンゴ²⁴⁾、リンゴ台木^{25,26)}、ナシ²⁷⁾およびモモ²⁸⁾の組織培養での発根促進効果およびブドウ²⁹⁾において発根部位でのカルス形成がみられない、*in vitro*での挿木後発根までの期間が短くなるなどのさまざまな添加効果が認められているが、本実験において効果が全く認められず、かえって生存率を低下させた。この原因は、PGの吸着を避ける目的で培地にPVPPを添加しなかったことにより、枯死個体が増加したためであると考えられる。

以上のことから、クマガワブドウの茎頂培養は、Fig. 3に示すように、まず、褐変防止のためにフェノール吸着剤であるPVP添加水溶液中で茎頂を摘出し(A)、初代培地には1/2 MS液体培地を用い(B)、PVPP添加の寒天培地で増殖した後(C, D)、増殖シュートの基部をIBA 250 mg/l(50%エタノール溶液)に5秒間浸漬処理(E)し、ホルモンフリーのPVPP添加寒天培地に植付ける(F)と発根率が高くなり、その後、順化(G)することにより効率良く繁殖できることが明らかとなった。

なお、今回、増殖培地へのBA添加濃度は多くのブドウ品種で用いられている1 mg/lのみとしたが、クマガワブドウの場合、BA 1 mg/lでは短い腋芽が多数発生し、

シュート伸長が抑えられた(データ省略)。今後は、増殖に最適なサイトカニン条件について調査するつもりである。

文 献

- 1) 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, 1991. 園学雑, **60**: 31-39.
- 2) 榎山泰一, 1935. 植物研究雑誌, **11**: 525-529.
- 3) 榎山泰一, 1935. 日本生物地理学会会報, **5**(3): 199-207.
- 4) 榎山泰一, 1989. 日本の野生植物. 木本II(佐竹義輔ほか編), p. 58-60, 平凡社, 東京.
- 5) 中川昌一, 湯田英二, 堀内昭作, 松井弘之, 1986. 昭和59年度科学研究費補助金(一般研究B)研究成果報告書(課題番号58480043), p. 1-32.
- 6) 岩槻邦男, 1992. 滅びゆく日本の植物50種, p. 184, 築地書館, 東京.
- 7) 日本植物分類学会, 1993. レッド・データ・ブック・日本の絶滅危惧植物, p. 95, 農村文化社, 東京.
- 8) 李世誠, 堀内昭作, 望岡亮介, 山澤通子, 松井弘之, 1991. 園学雑, **60**(別1): 132-133.
- 9) 胡若冰, 王 發明, 1987. 落葉果樹, **1**: 24-28.
- 10) 李世誠, 堀内昭作, 望岡亮介, 松井弘之, 1992. 農および園, **67**: 1277-1280.
- 11) Igarashi, K., K. Takahashi, M. Makino, T. Yasui, 1989. J. Food Sci. Technol., **36**: 852-856.
- 12) 望岡亮介, 山口雅篤, 堀内昭作, 松井弘之, 黒岡 浩, 1995. 園学雑, **64**: 463-470.
- 13) 馬 守信, 黄 汝豊, 李 建台, 尚 広興, 邨 政永, 1986. 落葉果樹, **4**: 15-18.
- 14) Li, S., P. Jin, H. Li, 1989. Proceedings of Inter. Symp. Hort. Germ., 234-241.
- 15) Lee, N., H. Wetzstein, 1990. J. Amer. Soc. Hort. Sci., **115**: 324-329.
- 16) 伊藤一弥, 1990. バイオホルティ, **6**: 36-37.
- 17) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 18) Gray, D. J., C. M. Benton, 1991. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **27**: 7-14.
- 19) Yu, D., C. P. Meredith, 1986. J. Amer. Soc. Hort. Sci., **111**: 972-975.
- 20) Fukui, H., M. Sugiyama, M. Nakamura, 1989. J. Japan. Soc. Hort. Sci., **58**: 43-47.
- 21) 細井寅三, 1989. 昭和63年度科学研究費補助金総合研究(A)研究成果報告(課題番号61304017)(代表: 林 真二), p. 48-58.
- 22) 石原愛也, 1988. 植物組織培養の世界(樋口春三監修), p. 258-261, 柴田ハリオ硝子, 東京.
- 23) 宗形 隆, 1989. バイオホルティ, **2**: 109-113.
- 24) Jones, O. P., S. G. S. Hatfield, 1976. J. Hort. Sci., **51**: 495-499.
- 25) James, D. J., I. J. Thurbon, 1979. J. Hort. Sci., **54**: 309-311.
- 26) James, D. J., I. J. Thurbon, 1981. Z. Pflanzenphysiol., **105**: 11-20.
- 27) Banno, K., K. Yoshida, S. Hayashi, K. Tanabe, 1989. J. Japan. Soc. Hort. Sci., **58**: 37-42.
- 28) 傍島善次, 1989. 昭和63年度科学研究費補助金総合研

Summary

Plant Regeneration of Difficult-to-root Native Wild Japanese Grape, *Vitis kiusiana* Momiyama, through *In vitro* Shoot Tip Culture

Ryosuke MOCHIOKA, Motoharu HAMAJI, Shousaku HORIUCHI
and Hiroshi KUROOKA

*College of Agriculture, Osaka Prefecture University,
Gakuen-cho, Sakai, Osaka 593, Japan*

Plantlets were regenerated from shoot tip cultures of difficult-to-root native wild Japanese grape, *Vitis kiusiana* Momiyama.

When the meristem was excised in sterilized PVP solution (1%, W/V), it was prevented from browning. The shoot growth of plantlets cultured in liquid 1/2 strength modified Murashige and Skoog's (MS) medium as primary culture was better than that cultured in agar-solidified 1/2 MS medium. To add insoluble PVPP (0.01-0.1%, W/V) into the agar medium was effective for improvement of both survival rate of meristem and shoot growth. Rooting was stimulated when the shoots were dipped in IBA solution (250 mg/l) for 5 seconds and then incubated on a plant growth regulator-free medium containing PVPP.