

クワの冬芽および下胚軸培養における不定芽形成

押 金 健 吾

(信州大学繊維学部附属農場)

1. はじめに

植物の組織培養による器官再分化に関する研究は、全能性の解明上多くの植物で試みられ、形態形成の検討という点から生理および育種学的基礎研究として重要な課題である。

木本性植物における移植体よりの再分化は草本性植物に比べ困難で、実験例も少なく今後の研究に期待される点が多い。とくに移植片より不定器官が再生化された例は、樹木中被子植物で37種、裸子植物で18種であるとされている¹⁾。

なかでも分離葉および子葉から不定芽形成に成功した例としては、コノデカシワ²⁾、マツ属³⁾、Redcedar⁴⁾、ベイマツ⁵⁾、などの針葉樹やブドウ⁶⁾があるほか、クワでは冬芽の分離葉片および培養実生葉、胚軸からの不定芽形成に関する研究⁷⁾および組織培養における不定芽形成の品種間差異⁸⁾などの報告があるにすぎない。

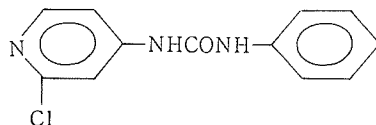
一方、クワ培養カルスからの不定芽形成は極めて困難で、これまでに得られた研究業績⁹⁾⁻¹²⁾はエキスプラントの差にもよるが僅か2、3例にとどまっている現状である。

本研究は、育種の見地から *in vitro* におけるクワ幼苗の大量増殖技術と器官形成の解明を目的として、冬芽の分離培養および交雑実生の下胚軸培養から不定芽の形成を試みたので報告する。

2. 材料および方法

冬芽の分離培養については、2倍体である水沢 (*Morus bombycis* KOIDZ), 枝垂桑 (*M. alba* LINN. var. *pendula* DIPPEL) および22倍体のクロミグワ (*M. nigra* LINN.) の3品種を供試した。まず供試品種の桑条を3月下旬伐採し、5°Cの冷蔵庫に保管したものを出庫後、冬芽を枝条より分離、鱗片を剥ぎ30分水洗を行ない、70%アルコールで2、3回すすいだ後次亜鉛素酸ソーダの2~3%溶液で20分間消毒を行なった。その後クリーンベンチ内にて芽の茎頂を含む組織を取り出し、無菌的に100mlのフラスコ内のMS培地に置床した。供試培地は1次培養(前培養)としてMS+BA1.0mg/lを、2次培養(不定芽形成用)として尿素系サイトカイニンの一種であるKT-30をMS培地に含ませたもの即ち、MS+KT-30 5 mg/l(A)およびMS+KT-30 10mg/l(B)の2種類を用いた。

因にKT-30¹³⁾は化学名を1-(2-クロル-4-ピリジル)-3-フェニル尿素と呼び、比較的新らしいサイトカイニンで構造式は次の通りである。



これらの所定培地に置床した分離芽を3,000lux, 16L8D (16時間明, 8時間暗), 27±1°Cの人工気象器内で培養を行った。

また, 下胚軸培養については, 2倍体品種水沢, 一ノ瀬 (*Morus alba* LINN.), 清十郎 (*M. multicaulis* KOIDZ.), 枝垂桑より採種した自然交雑種子を用い, 水洗後70%アルコールで2, 3回すすぎ, 3%次亜鉛素酸ソーダで25分間消毒した無菌種子をMS+KT-30 2, 5, 10mg/l培地 (C, D, E,) に播種し, 27±1°Cの暗条件下で発芽させた。その発芽種子を培地ごと3,000lux, 16L 8 D, 27±1°Cの人工気象器に移し, 14日間前培養を行った。各培地における芽生につきその下胚軸を5~6 mmの長さに切り, 前培養と同じ培地に置床, 暗条件下で2次培養を行った。

培養中の分離芽および下胚軸については, その形状変化を観察するとともに, 両者の不定芽形成に関する供試品種および培地間の差の検定は2元配置の分散分析法により行った。また, 不定芽形成の組織的観察には経日的に培養組織をFAA固定液 (ホルマリン・酢酸・アルコール混合液) で固定し, パラフィン切片法により12μmの切片を作り, ハイデンハイン鉄明パンヘマトキシリンにより染色し鏡検した。なお, 下胚軸培養から形成された不定芽を分離し, MS+NAA0.2mg/lの発根培地に移植を行ない, 発育した個体の染色体数についてホイルゲン核染色法により鏡検, 変異個体の有無を調査した。

3. 結 果

3.1 培養条件と不定芽形成

3.1.1 分離芽における不定芽形成

MS+BA1.0mg/l培地で前培養を30日間行った各品種の培養芽は, その発育に多少の品種間差異はみられたが正常でかつカルスの形成は全く観察されなかった。

Table 1 Effect of the adventitious bud formation into each variety of mulberry under different media *in vitro*.

Variety	Pre-culture	Secondary culture	No. of Explant cultured	Thickness rate in buds cultured (%)	Formation rate adventitious buds (%)	Days of ad. bud formation (%)
Shidareguwa	MS+BA 1.0mg/l	(A)	20	60.1	12.5	55~60
		(B)	20	65.3	37.5	55~60
Mizusawa	MS+BA 1.0mg/l	(A)	20	55.3	12.5	60
		(B)	20	71.3	10.0	65
Kuromiguwa	MS+BA 1.0mg/l	(A)	20	50.3	11.3	68
		(B)	20	65.4	10.0	72

A and B in secondary culture column represent MS+5mg/l KT-30 and MS+10mg/l KT-30 respectively

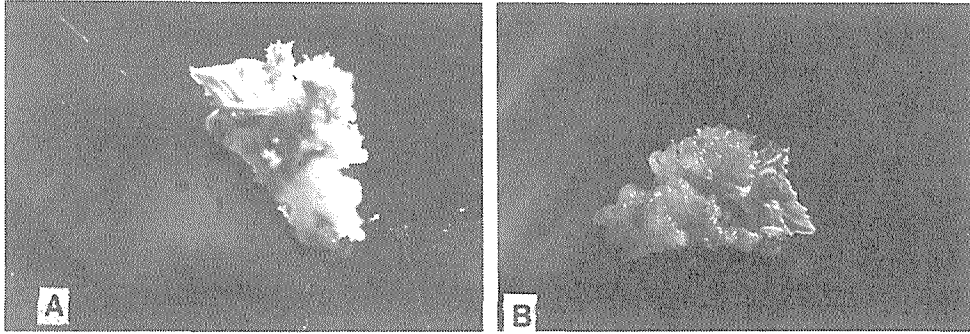


Fig. 1 Adventitious bud developing from frame-work in *Shidareguwa* (*M.alba* LINN. var. *pendula* DIPPEL)

A : its bud elongating from the midrib of frame-work.
B : its bud from the vein.

これら培養芽について2次培養をKT-30の所定濃度を含む培地で反復実験を行った結果から、培養芽の不定芽形成の割合をみると (Table 1)、品種ならびに培地間で差異が認められた。枝垂桑の場合、2次培養のA、B 2培地で培養された置床後55~60日幼葉が展いた葉面の主および支脈上より前者が12.5%、後者が37.5%の割合で不定芽の形成がみられた。また水沢およびクロミグワにおいて2次培養のA培地では両者とも枝垂桑と差異は認められなかったが、B培地ではともに10%の形成率となり、枝垂桑と比較し著しく減少している。

これらの結果から不定芽形成の品種間差異とみると、枝垂桑と水沢およびクロミグワ間においては有意差が認められ ($F_0=11.267$, $P<0.05$)、枝垂桑の形成率が高いことを示した。また水沢 (11.3%) とクロミグワ (10.7%) ではその有意差は認められなかった ($P>0.05$)。さらにKT-30濃度の差によるA培地 (12.1%) とB培地 (19.2%) 間の比較ではB培地が勝り、その有意差が認められた ($F_0=6.422$, $P<0.05$)。

一方、培養芽の肥厚化割合は品種間に大差は認められなかったが、培地間ではB培地が肥厚化を促進させる傾向がみられた。なお、肥厚化と不定芽形成との間には関係性は認められなかった。

不定芽の形成状態とみると、枝垂桑の場合、葉の主、支脈の表面に叢生状の突起物が現れ、それが次第に肥大生長して緑化された芽状体となり、やがて不定芽になることが観察された (Fig 1)。これらの不定芽を生長の段階で分離し同一培地上で培養を行なったが、約7~10日後に枯死した。また水沢およびクロミグワにおいても置床後前者は60~65日、後者は68~72日目に不定芽が形成されやがて展葉した。その形成状態は枝垂桑の場合と同様であった。

これらのことから、供試品種枝垂桑は不定芽を形成し易い形質を有することが示唆された。

3.1.2 下胚軸における不定芽形成

KT-30 の 2, 5 および 10 mg/l 濃度で前培養された交雑各品種の芽生は, 根の伸長抑制と胚軸の肥厚化が目立ち, その長さも濃度により差を生じ, 対照区は平均 4.7 cm に対し 2 mg/l では 1.1, 5 mg/l は 0.7, 10 mg/l では 0.4 cm となり, それぞれ肥厚短縮が著しかった。

つぎに前培養を行った下胚軸を約 4~5 mm に切り, その移植片を前培養と同じ培地で 2 次培養を行ない, KT-30 の濃度差による胚軸の肥厚化と不定芽の形成について調査した (Table 2)。2 次培養に置床した移植片の肥厚化は KT-30 の濃度により程度は異なるが, 概して 7 日目頃より次第に肥厚化が始まり, 約 14 日位で胚軸全体または切断部に顕著にみられた。ただし前培養時に肥厚化が著しかった 10 mg/l 区では他区に比べ劣った。

即ち, C, D 培地では肥厚化が約 50~75% にわたり認められたが, E 培地の場合約 25~40% と低かった。これは前培養において肥厚化が促進されたため, 2 次培養での影響は他区に比較して少なかったものと考えられる。品種間では清十郎が他の水沢, 一ノ瀬, 枝垂桑に比べ肥厚化し易い傾向が認められた。

つぎに培地並びに品種的差異から不定芽の形成について分散分析の結果からみると, C 培地では水沢, 一ノ瀬, 清十郎ともに 4~6% の形成率で品種間差異は認められなかった ($P > 0.01$)。枝垂桑の場合, 他の 3 品種に比較し 19% と約 3~5 倍高く有意差が認められた ($F_0 = 86.185$, $df = 6$, $P < 0.01$)。

また D 培地では枝垂桑と水沢の 2 品種に形成されたのみで他には認められなく, E 培

Table 2 Effect of adventitious bud formation by each medium containing different concentrations of KT-30 (growth regulators) in mulberry variety.

Variety	Medium	No. of Explant cultured	Thickness rate in hypocotyls (%)	Formation rate adventitious buds cultured (%)
<i>Shidareguwa</i>	C	20	60.0	19.0
	D	20	50.0	5.0
	E	20	40.0	0
<i>Mizusawa</i>	C	20	60.0	4.0
	D	20	55.5	5.0
	E	20	30.0	0
<i>Ichinose</i>	C	20	65.0	5.0
	D	20	50.0	0
	E	20	25.0	0
<i>Seijuro</i>	C	20	75.0	6.0
	D	20	60.0	0
	E	20	40.0	0

C, D and E in medium column represent MS+2mg/l KT-30, MS+5mg/l KT-30 and MS+10mg/l KT-30 respectively.

地においては各品種にわたり形成されなかった。さらに形成割合の培地間差異は、C培地はD、E培地に比較し有意差が認められた ($P < 0.01$) が、D、E培地間ではその差がみられなかった。

これらの不定芽はいずれも2次培養に移植後約15~26日に形成されたC培地のものが大部分を占め、下胚軸の切口が肥厚隆起した緑色部位よりの発生が観察された (Fig. 2, A, B, C, D)。とくに枝垂桑では不定芽の発生が多芽状となる傾向がみられた (Fig. 2.D)。

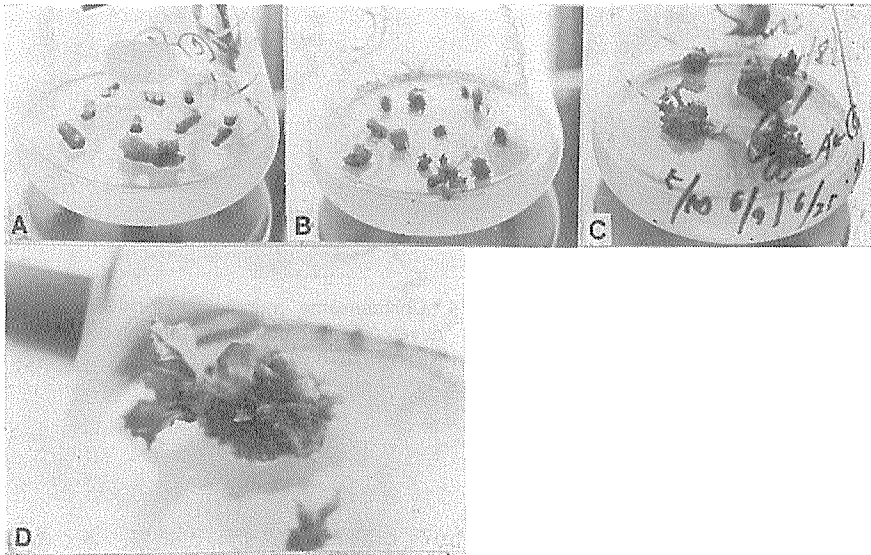


Fig. 2 Adventitious bud formation from cultured hypocotyl in each variety of mulberry.

- A : *Mizusawa*
- B : *Ichinose*
- C : *Seijuro*
- D : *Shidareguwa*

ついでこれらの不定芽を継代培養後、MS+NAA0.2mg/l培地に移植し発根を促進させた結果、水沢、一ノ瀬、清十郎および枝垂桑の各品種から幼苗を各1個体ずつ育成することができた (Fig. 3)。この幼苗は未熟葉を着生しているが、発根状況を見ると、各品種とも根長は約7.0~10.0cm、主、支根数は5~10本、細根数は13~25本となり、一ノ瀬がやや多かった。

さらに各幼苗の体細胞染色体数について、ホイルゲン法により染色体出現の20細胞を鏡検した結果、いずれも $2n = 28$ の染色体数を有する2倍体であることを確認した (Fig. 4)。なお培養個体にみられる異数性などの異常細胞は観察されなかった。

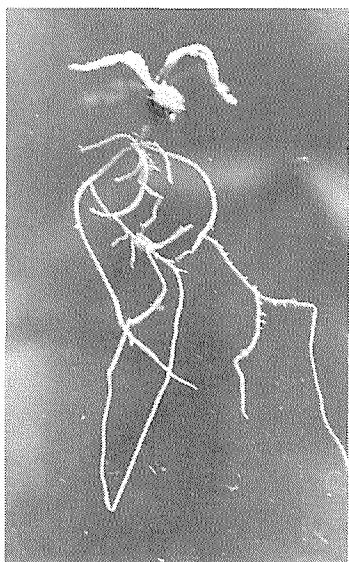


Fig. 3 Development of plantlet from adventitious bud formation on cultured hypocotyl in *Shidareguwa*.

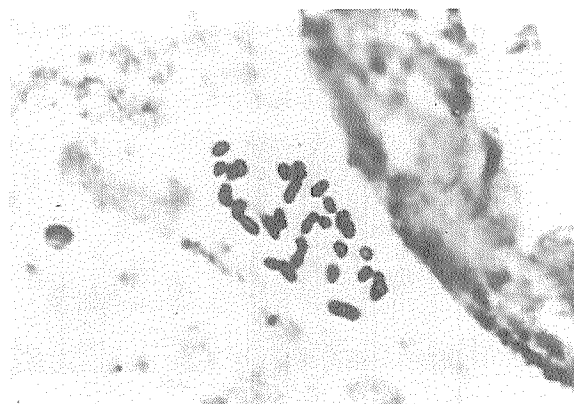


Fig. 4 Chromosome numbers ($2n=28$; $2x$) of developmental plantlet from hypocotyl in culture (*Mizusawa*).

3.2 不定芽形成における組織的観察

3.2.1 分離芽培養の場合

不定芽の形成が多くみられた枝垂桑について組織的観察を行った結果、多くの関係像が認められた。即ち培養50~60日目のB培地における葉脈組織をみると、主、支脈の表面分裂組織周囲の細胞が膨大化し、空洞状の像が観察される (Fig. 5A, B) ほか、支脈表皮に突出した不定芽原基 (Fig. 5C) はやがてドーム状の葉原基となり肉眼的にも認められるように発達する (Fig. 5D, E)。また、葉脈より不定芽形成に関係すると思われる原基が、厚膜組織のカルス化に伴ない、その内部に埋没された状態で多発的な不定芽の原基になっていることが観察された (Fig. 6 F)。さらにこの不定芽形成がカルス起源であるか否かの決め手となる像は、カルスの内部形態の観察結果では見当らなかった (Fig. 5G)。

3.2.2 下胚軸培養の場合

不定芽の形成に関する培養下胚軸の内部組織について経日的に観察した結果、各品種とも前培養した下胚軸の総べてに、また2次培養後7日目のやや肥厚化胚軸には不定芽の原基は全く観察されなかった (Fig. 6A)。しかし置床後15~26日にかけて不定芽の形成が認められた枝垂桑の組織的变化をみると、いずれも切断された表皮の分裂組織より形成される像が観察され (Fig. 6B)、周辺分裂組織の活発化に伴ない隆起状の細胞群中にドーム状の不定芽葉原基が形成されているのが認められた (Fig. 6C, D, E, F)、また不定芽の原基は緻密な小細胞群よりなり、活発な生長を示す分裂中の染色体

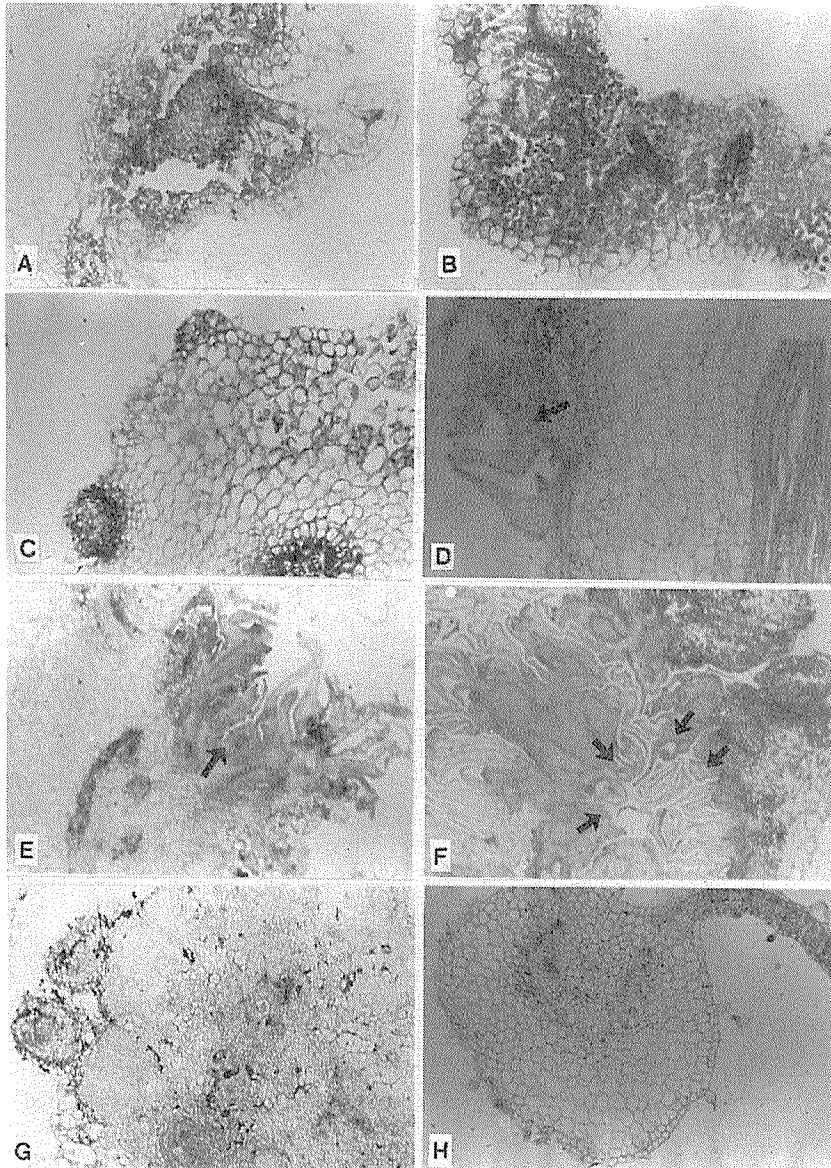


Fig. 5 Histological features of adventitious bud developing from the frame-work of leaves in experienced mulberry.

A, B: Hypertrophy in cell of meristem into vein and its peripheral cavities.

C : primordia of adventitious bud on vein.

D, E : dome-like primordia (arrow) of ad. bud and its growing state.

F : a groupe of primordia of ad. bud occurred in meristem.

G : callus developing on frame-work.

H : tissue of frame-work shortly after cultivation.

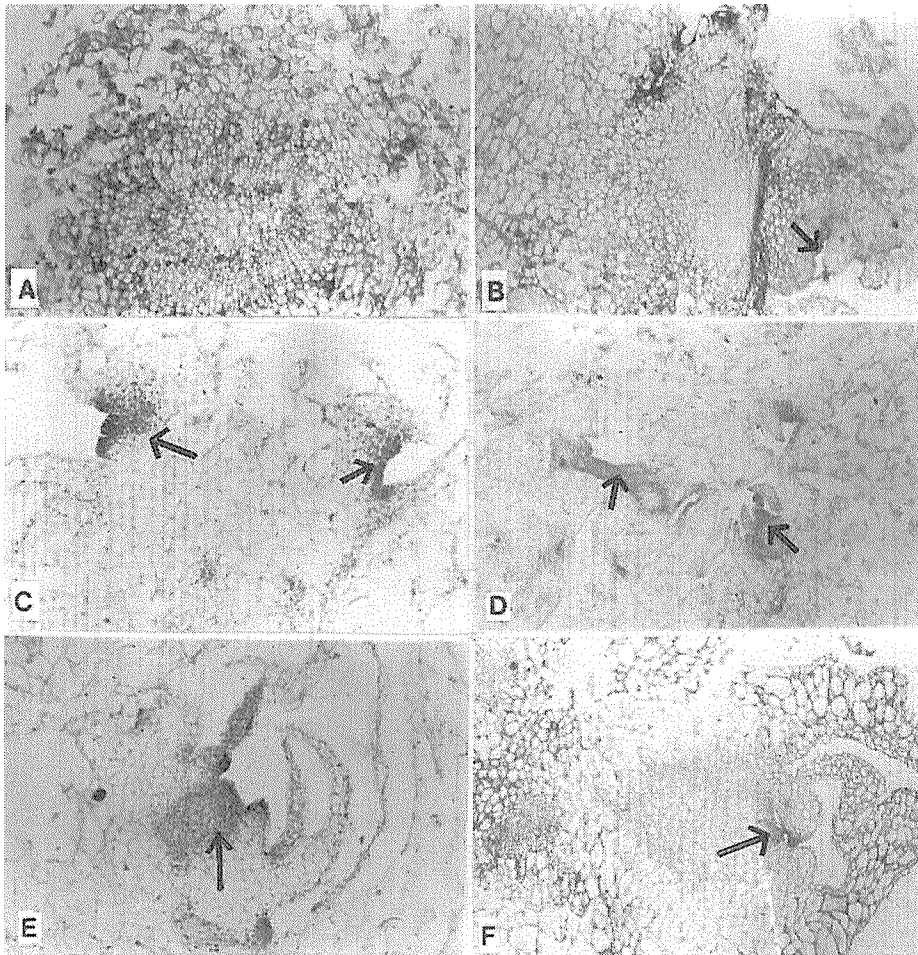


Fig. 6 Histological features of adventitious bud formation on cultured hypocotyl.

These photographs show adventitious bud in *Seijuro* after 7 days (A) and 16 days (B) from transfer to secondary culture; but there is no appearance of adventitious bud primordia in the former (A).

C : dome-like primordia (arrow) of ad. bud occurred 20 days in *Mizusawa*.

D : 25 days in *Ichinose*.

E : 16 days in *Shidareguwa*.

F : 25 days in *Shidareguwa*.

像などもみられた。

なお、これらの不定芽形成の組織的観察結果は、分離芽の培養の場合とほぼ同様であると考えられた。

4. 考 察

木本植物における培養条件下で外植体である分離葉および子葉などから不定芽の形成に関する研究は比較的少なく、コノテカシワ²⁾、マツ属³⁾、Redcedar⁴⁾およびベイマツ⁵⁾などの針葉樹やブドウ⁶⁾における実験例があるほか、クワでは岡⁷⁾による冬芽の分離葉片および培養実生葉からの不定芽形成があるにすぎない。この中で岡⁷⁾は培養葉片からの不定芽形成について研究を行ない、MS培地に加用するBA濃度が10mg/lの場合は異常葉の葉脈上に不定芽が形成され、1 mg/lの場合は普通葉の葉柄除去による切断部に不定芽が形成されることを認めた。そしてこれらの形成過程を比較した結果、前者では著しく発達した葉脈の分裂組織から、後者は葉柄切断部近傍における表皮組織の肥大化に伴ない不定芽を形成することを報告している。

筆者は最近不定芽形成に効果的であると報告されているフェニール尿素系サイトカインのKT-30を用い、冬芽の分離培養および交雑実生の下胚軸培養を行ない、不定芽の形成過程を試験した。

分離芽の培養から不定芽形成に効果的であると考えられる培養条件は、前培養をMS+BA 1 mg/lで行ない、2次培養をKT-30 10mg/l加用とした不定芽形成率の品種間差異は、枝垂桑(38%)、水沢(10%)クロミグワ(10%)の順位となり、枝垂桑が水沢およびクロミグワに比べ約3.8倍高く、枝垂桑の品種の有意差が認められた。しかし水沢とクロミグワの品種間およびA、B培地間では有意差はみられなかった。

岡⁷⁾はクワの培養葉片からの器官形成においてBA10mg/lで育成させた個体の葉片について、培地中にNAA0.1mg/lを加えたBA 0~50mg/lの濃度別組合せにおいて、いずれの区からも不定芽の形成がみられなかったことを認め、NAAの添加は不定芽を抑制し、単独加用では不定根の形成を促進すると報告している。筆者も本研究の予備実験として前培養の培地中にBAにNAA0.2mg/lを加用し、2次培養をKT-30 5mg/lで行った場合、不定芽の形成は各品種とも著しく抑制されたこと認めている。

また、品種的には枝垂桑が他の水沢、クロミグワに比較して不定芽形成の割合が後述の下胚軸培養の場合と同様高いことから、組織培養における再分化や器官形成に関与する遺伝的要因によるものと考えられる。因みに枝垂桑はカラヤマグワ系の変種であるダットン桑(*Morus alba* L. var. *tatalica* LOUDON)の実生苗中から選出されたもので、枝条は下垂し、種々の裂葉を呈する観賞用としての形質を有している。

つぎにクワの下胚軸における不定芽形成に関し、大山、岡¹⁴⁾は、KT-30とBAとの比較においてKT-30は不定芽の誘導効果が大きいことを報告しているが、筆者もまた品種的要因はあるもののその効果を認めた。

まず胚軸からの不定芽誘導についてKT-30の濃度別培地で前培養された胚軸は、その濃度勾配により短縮肥厚化し、とくに5、10mg/lは著しかった。これら肥厚化胚軸からの不定芽形成は各品種とも前培養および2次培養をKT-30 2 mg/lで行ったもの

の枝垂桑に多く、品種間の有意差が認められた。しかし他の水沢、一ノ瀬、清十郎の3品種間では有意差が認められなかった。これらの結果は分離芽の場合と同様で、枝垂桑は不定芽を形成し易い形質を保持しているものと考えられた。

クワの組織培養において不定芽の形成は移植体のカルス、組織、器官などから一般的に困難とされている。この中でKT-30による器官培養からの不定芽形成は興味あるものと思われる。しかし培養カルスからの不定芽形成はその実例をみていない。したがって木本類におけるKT-30の不定芽形成における移植体との関係については多くの実験結果にまつところが大きいものと考えられる。

最近、果樹類の組織培養にこのKT-30を用いた実験例がみられ、志村¹⁵⁾はキウイフルーツの節間培養において、MS培地にKT-30の2mg/lを添加したものは、カルスの形成量やシュートの分化率がNAAおよびBAに比べ高いと報告している。植松、秋浜ら¹⁶⁾はアーモンドの茎頂培養における増殖と発根条件のなかで、KT-30 2mg/lの添加がBA, 2ipに比べその生存率が高いことを報告している。さらに秋浜ら¹⁷⁾はカキの茎頂培養における茎条の生育と増殖に対するKT-30 (4 PU)の効果をしらべ、4 PU 0.1mg/l区では他のBA, 2ipに比較しグリーンシュートの形成率が抜群に高いと述べている。また、平林ら¹⁸⁾はブドウ葉肉組織から不定胚形成能を維持するカルス系の作出を試みた結果、基本培地(NN)に2.4-D/ μ MとBA, KIN, ZA, 2ip, KT-30, TAGの各種サイトカイニンの濃度別組合を行ない、不定胚形成のカルスを作成したなかで、KT-30の5, 10 μ M区は他のサイトカイニンに比べ高いことを報告している。

このように尿素系サイトカイニンであるKT-30は、シュートおよび不定胚形成を高める効果があり、その使用濃度もほぼ0.1~2.0mg/lが有効範囲にあると考えられ、クワの下胚軸培養における不定芽形成の濃度に一致している。

一方、このKT-30を開花生理の研究に利用した一例として、高橋ら¹⁹⁾はレンブ(*Eugenia javanica* LAM.)の花そうにKT-30(成分4.0%)の0.2, 0.5, 1.0および2.0ppmの希釈液を処理した結果、濃度1.0ppm以下で果実の肥大化を促進し、花そうを着生する新梢葉の発育を増進させる効果があると報告している。

つぎに不定芽の形成過程について岡⁷⁾は、葉脈上にみられる不定芽は表皮系組織より形成される部類に属し、カルス経由のものでないと指摘している。そして葉脈上に形成された分裂組織の表皮層は表皮起源、内層は表皮下組織起源と考えるのが妥当であるとのべている。筆者もまた分離芽および下胚軸培養における組織観察の結果から、不定芽形成に関してはカルス経由でなく、岡と同様、表皮下組織の分裂と分離組織の隆起(ドーム状)の経過から不定芽の形成がされるものと考えられる。

5. 摘 要

クワ培養カルスからの不定芽形成は極めて困難であるが、冬芽および下胚軸を移植体とした培養について各種条件下で行なった結果、不定芽の形成を誘起させた。それらの検討内容は下記に要約される。

(1) 供試クワ品種における分離芽(冬芽)および下胚軸の培養から、比較的不定芽の形成が多かったのは枝垂桑であった。

(2) 不定芽の形成に効果的であった植物生長調節剤は1-(2-クロル-4-ピリジル)-3-フェニル尿素(KT-30)で、その濃度は分離芽の場合10mg/l、下胚軸では2 mg/l のとき、その形成率が高かった。

(3) 不定芽の形成に関する培養条件としては移植体の前培養が効果的で、分離芽の場合はMS+BA 1 mg/l、下胚軸ではMS+KT-30 2 mg/l のとき形成率が高かった。

(4) 枝垂桑における不定芽形成の状態をみると、分離芽では2次培養置床後約55~60日目、下胚軸の場合は置床後約15~26日目に前者では葉脈上から、後者では胚軸表皮からそれぞれ不定芽が形成された。

(5) 不定芽形成の組織的観察の結果、表皮の周辺分裂組織中にドーム状の葉原基が出現し、ついで不定芽の形成が認められた。

(6) 下胚軸培養における不定芽の形成により得られた幼若個体の染色体数は $2n=28$ で2倍体であった。

文 献

- 1) 大山勝夫：植物バイオテクノロジー，45-54，東京化学同人，1986
- 2) KONAR, R. N. and OBEROI, Y. P. : Phytomorph., 15, 137-140, 1965
- 3) SOMMER, H. E., BROWN, C. L. and KORMANIK, P. P. : Bot. Gaz., 136, 196-200, 1975
- 4) COLEMAN, W. K. and THORPE, T. A. : Bot. Gaz., 138, 298-304, 1977
- 5) WINTON, L. L. : Abst. XI, Inter. Bot. Cong., 241, 1969
- 6) FAVRE, J. M. : Ann. Amelior. plantes, 27, 151-169, 1977
- 7) 岡 成美：蚕糸試験場研報，29, 6, 748-852, 1985
- 8) 片桐幸逸・西口達郎：日蚕雑，55(1), 79-80, 1986
- 9) 押金健吾：日蚕学会，43講要，87, 1973
- 10) 山本有彦・中西節子：京都工芸織大繊維学部研報，8, 2, 1-6, 1977
- 11) 押金健吾：Jou. Fac. Text. Seri. & Tech., Shinshu Univ., No. 107, Ser. E. Agri. and Serie., No. 11, 41-54, 1989
- 12) 遊佐富士雄・渡辺四志栄：東北蚕糸研報，14, 59-60, 1989
- 13) 協和醸酵 K. K. : KT-30 の物理化学的性状，1985
- 14) 大山勝夫・岡 成美：日蚕学講要，51, 5, 1981
- 15) 志村 勲・樋口幸男・石川駿二・沢登早苗：園芸学会講要，94-95, 1986
- 16) 植村千代美・秋浜友也・猪熊千恵・藤平 薫：育種学会講要，71, 58-59, 1987
- 17) 秋浜友也・植村千代美・尾関健・荒川英治：育種学会講要，71, 56-57, 1987
- 18) 平林利郎・松田長生・小崎 格：育種学会講要，71, 72-73, 1987
- 19) 高橋登美雄・広瀬友二：東京農大農場研報，5, 11-14, 1988

Summary

Adventitious Bud Formation on Isolated Bud and Hypocotyl Culture in Mulberry.

Kengo OSHIGANE

Attached Facility in Experimental Farm Faculty of Textile
Science and Technology, Shinshu University, Ueda 386, Japan.

It is established fact that morphogenesis of adventitious bud *in vitro* is very difficult by callus culture of mulberry. However, its development had been induced using bioassay procedures which was based on stimulation of isolated bud and hypocotyl of several variety in mulberry. The results obtained by this experiment are as follows.

1. *In vitro* in the culture of isolated bud and hypocotyl, the probability to develop into the adventitious bud in *Shidareguwa* (*Morus alba* L. var. *pendula* DIPPEL) was found to be higher than any other experienced strains in mulberry.
2. The effectively plant growth regulator to develop the adventitious bud was 1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea (KT-30). When it treated with a concentration of 10mg/l in the case of on isolated bud and of 2mg/l in that of hypocotyl, the rates of adventitious bud were sensitive to both doses (see Table 1, 2).
3. The preculture of explants which had been effectively produced the adventitious bud was MS+BA 1.0mg/l and MS+KT-30 2.0mg/l; the former was suitable to the case of isolated bud, the latter did to that of hypocotyl respectively.
4. In this experiment, the adventitious bud in *Shidareguwa* was induced larger than thoses other strains. Ovserving the tissure of bud, there was developed into the vein of explant after 55~60 days under a secondary culture in the case of isolated bud. Further that in the hypocotyl come out to the radicle epidermis after 15~26 days under the same culture as that of isolated bud.
5. In view of histological observations it was recognized that the occurence of adventitious bud depended on the development of dome-like primodia in the peripheral meristem of epidermis.
6. The somatic cells of the plantlet which were produced by each of adventitious bud under culture of hypocotyl consisted of the diploid ($2n=28$) chromosome number.