各種培養条件によるクワ条カルスの再分化

押　金　健　吾

（信州大学繊維学部附属農場）

1. は じ め に

植物における形態形成，とくにカルス細胞からの再分化による植物個体の育成に関しては，草本植物に比べ木本植物は各種培養の結果から困難視されてきた。しかし，コノデカシワの胚軸カルスの培養から不定芽を分化させ[1]，幼植物の育成をみたのを嚆矢として，3倍体ポプラの根のカルス培養から不定芽が形成され[2]，さらにスギの胚軸カルスの培養においてABA添加により不定芽の形成[3]がみられている。またチヤの茎，表皮部分のカルス培養から不定芽の分化がみられ，植物体の再生[4]を成功させた。

クワ科植物における培養カルスの器官再分化については，クワと近縁種である。コウゾ（*Broussonetia kazinoki* SIEB）カルスから幼植物体の再生[5][6]，ハリグワ（*Cudrania triloba* HANCE）胚軸カルスより不定芽の形成などの報告[7]がみられる。他方，クワ培養カルスにおける再分化の研究は，他の木本植物に比較し極めて困難な状態である。

クワの枝条および種子，胚，胚乳のカルス培養における生長物質並びに各種添加物の影響[8][9]，および枝条からのカルス形成に及ぼす培地条件[10][11]，さらにはクワのカルス培養におけるエキスプラントの種類と再分化との関係および糖の種類と濃度の影響[12][13]についての報告がある。

しかしながらこれらの研究は，培養カルスからの再分化はいずれも不定根の形成のみにとどまり，不定芽の形成は認められていないのが現状である。

本研究は，上記培養成果との関連においてクワ枝条の培養カルスにおける再分化について，その品種間差異，オーキシンとサイトカイニンとの濃度別組合せとアブシジン酸（ABA）の添加など，培養条件の変化に伴う再分化への基礎的検討を行った結果について報告する。

2. 材料および方法

本実験においてカルス形成，生長調節剤の濃度別組合せおよび培養カルスの組織観察に用いた材料は，本学部附属農場の品種見本桑園に栽植されているつぎの品種を供試した。

1. 剣　　持：ヤマグワ系　　（2倍体）
2. 百 足 桑：〃　〃　　（〃）
3. 根　　紫：〃　〃　　（〃）
4. カニコボレ：〃　〃　　（〃）

5. 内田早生：〃〃 （〃）
6. 茶色早生：〃〃 （〃）
7. 鶯早生：〃〃 （〃）
8. 島の内：〃〃 （3倍体）
9. 赤芽熊鷹：カラヤマグワ系（2倍体）
10. 鼠返：〃〃 （〃）
11. 一の瀬：〃〃 （〃）
12. 仲間木：〃〃 （〃）
13. 清十郎：ログワ系 （2倍体）
14. 老人島：〃〃 （〃）
15. 金竜：ミヅホグワ系 （2倍体）
16. 米国一号：系統不明 （〃）
17. 白楮桑：〃〃 （〃）

これら品種の新梢を採取し，葉および芽を除き約4～5cm に切り，水道水で洗滌後70%アルコールで2～3回すすぎ，滅菌水で洗った後，5%サラシ粉沪液に約20～25分浸滅菌を行ない，条の表皮を剝ぎとった後，約0.8cm に切断し，フラスコ内の寒天培地に置床した。カルスの誘導培地は Murashige & Skoog の基本培地（M.S）に NAA5×10^{-6}M＋KIN10^{-6}M を添加したものをカルス形成用の1次培地とした。培養は26±1°Cの暗条件下で行ない，形成されたカルスの約20～30mg を移植体として1フラスコ当り4片ずつ移植し，25日ごとに継代培養を行った。なお継代用2次培地は，A培地：M.S＋NAA5×10^{-7}M＋KIN10^{-7}M. B培地：M.S＋NAA5×10^{-6}M＋KIN10^{-6}M, C培地：M.S＋NAA5×10^{-5}M＋KIN10^{-5}M の3種類とした。これらの3種類の培養カルスを10日毎直示天秤でその増加量を測定した。また同時にカルスをホルマリン・酢酸・アルコール混合液で固定を行ない，パラフィン切片法によりヘマトキシリン液にて染色し，カルスの内部組織を観察するとともに，一定面積内のカルス細胞数，仮導管様細胞数および不定根の原基数をそれぞれ測定した。その他，カルスの性状や発根数について肉眼的に調査した。

つぎに植物生長調節剤による培養カルスの再分化実験に関しては，(A)：濃度別組合せ培養による不定根形成，(B)：アブシジン酸（ABA）添加培地におけるカルス増殖と再分化（不定根）に分けて行なった。

(A)の場合：供試品種剣持における1次カルスを2次再分化用培地（生長調節剤の濃度別組合，Table 1）に移植，26±1°Cのもと光周条件として20L4D（20時間明，4時間暗）16L8D（16時間明，8時間暗）および24L（全周期明），24D（全周期暗）の4区との組合せを設定し，各区における再分化を調査した。

一方，Wolter & Skoog[14]（W. S）の基本培地に NAA5×10^{-6}M＋BA5×10^{-6}M(a) および NAA5×10^{-7}M＋BA5×10^{-6}M(b)を添加した2種類の培地で形成されたカルスを Table 2の濃度別組合せ培地に移植を行ない，26±1°C，12L12D（12時間明，12時間暗），24L，24Dの培養条件で培養し再分化の状態を調査した。

Table 1 Composition of M.S medium (No. 1-28) containing each concentration of growth regulators (NAA and BA).

Medium No.	IAA(NAA)	KIN(BA)	Medium No.	IAA(NAA)	KIN(BA)
1	0 M	0 M	15	10^{-6} M	0 M
2	〃	10^{-6}	16	〃	10^{-6}
3	〃	5×10^{-6}	17	〃	5×10^{-6}
4	〃	10^{-5}	18	〃	10^{-5}
5	〃	3×10^{-5}	19	〃	3×10^{-5}
6	〃	5×10^{-5}	20	〃	5×10^{-5}
7	〃	7×10^{-5}	21	〃	7×10^{-5}
8	10^{-7}	0	22	10^{-5}	0
9	〃	10^{-6}	23	〃	10^{-6}
10	〃	5×10^{-6}	24	〃	5×10^{-6}
11	〃	10^{-5}	25	〃	10^{-5}
12	〃	3×10^{-5}	26	〃	3×10^{-5}
13	〃	5×10^{-5}	27	〃	5×10^{-5}
14	〃	7×10^{-5}	28	〃	7×10^{-5}

Table 2 Composition of W.S medium (No. 1-5) containing each concentration of growth regulators (NAA and BA).

Medium No.	NAA	B A
1	10^{-7} M	3×10^{-7} M
2	5×10^{-7}	5×10^{-7}
3	5×10^{-7}	10^{-6}
4	3×10^{-6}	10^{-6}
5	5×10^{-6}	5×10^{-6}

(B)の場合：M. S 基本培地に NAA (IAA) とBA (KIN) を濃度別に添加したものに，ABA を濃度別に添加した組合せを設定した (Table 3)。これに M. S+NAA5×10^{-6}M+BA10^{-6}M培地から得られたカルスを置床，27±1°C，暗条件下で培養を行なった。このカルスについて30日ごとに増加量を秤り，増殖倍率を算出するとともに，培養カルスを固定しパラフィン切片を作りヘマトキシリン法によりカルスの

Table 3 Composition of each concentration of growth regulators in M.S medium with ABA.

	ABA concentration / NAA(IAA). BA(KIN) concentration	a	b	c	d
		10^{-7}M	5×10^{-7}M	10^{-6}M	5×10^{-6}M
A	NAA 5×10^{-6}M+BA10^{-6}M	1	5	9	13
B	NAA10^{-6}M+BA 5×10^{-6}M	2	6	10	14
C	IAA 5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M	3	7	11	15
D	IAA10^{-6}M+KIN 5×10^{-6}M	4	8	12	16

Table 4 Composition of M.S medium (No. 1-6) containing each concentration of growth regulators (NAA and BA・KIN).

Medium No.	NAA	BA (KIN)
1	10^{-7} M	10^{-7} M
2	2×10^{-7}	5×10^{-7}
3	5×10^{-7}	10^{-6}
4	5×10^{-6}	2×10^{-6}
5	10^{-6}	5×10^{-6}
6	0	0

内部組織を観察した。

さらにカルス片の移植期の検討については，供試品種鼠返および島の内を用い，M. S＋NAA5×10^{-6}M＋BA2×10^{-6}M培地の暗条件で形成されたカルスの6，14，20日目の小片を Table 4の培地に移植した。これらカルスを暗条件下で培養し，各区における再分化の状態を調べた。

3. 結　　果

3.1 カルス形成および不定根分化の品種間差異

3.1.1 カルス形成とその性状

a．1次培養における品種別のカルス形成状態

置床した新梢切片からのカルス形成状態をみると，置床後約7日目頃より切片の木質部表面に白い顆粒状のカルスが現れ始め，次第にその量を増加させつつ切片全体に広がり，2―3週間目には培地に接する部分や切片の上部に肥厚化したカルスが形成される。このカルス形成状態を品種別にみると，最も形成の良好であった清十郎および老人島では主に切片の培地に接する部分に肥厚化した黄茶褐色の色調を有するカルスが観察される。カルス形成が不良の仲間木，白楮桑は灰白色ないし褐色のカルスが切片の表面に僅か痕跡程度に形成されたにすぎなかった。他の根紫，百足桑，カニコボレ，内田早生，一の瀬，金竜，米国一号，茶色早生などは中位のカルス形成を示し，茶褐色から白黄色のものが多かった。

b．2次培養における品種別のカルス形成とその性状

3種類の2次培養培地（再分化培地）に移植したカルスの色調を観察した結果，各品種によりその態様は異るが概してAおよびB培地上のカルスは茶褐色から黄褐色を呈した。C培地上のカルスは茶褐色から黒味を帯びた茶褐色を示し，A，B培地と多少異っていた。また赤芽態鷹のC培地上のカルスは黒褐色をしていたが，40日目頃よりカルス表面の一部が灰白色を示したものなどもあった。A培地上の金竜のカルスの場合，一部に白色を帯びたものがあり，そのカルスからはやがて発根がみられた。

つぎに再分化培地における形成カルスの性質を調査した結果（Table 5），A，B培地とも大部分が固塊状カルス（Compact callus：C カルス）であったが，C培地上のカルスは柔軟状カルス（Friable callus: F カルス）が多くなる傾向を示した。またカルス増加量の高かった品種（後述）はCカルスであり，増加量の低い品種はカルス形成におけるCカルスとFカルスの割合が，Fカルスに高い（F＞C）ものか，Fカルスのみの場合であった。

ヤマグワ系品種の百足桑，カニコボレ，鶯早生，カラヤマグワ系品種の赤芽熊鷹，ミ

Table 5 Relationship between each of media and characteristic of growing callus in mulberry varieties.

	C	C > F	F > C	F
A medium	Mukadeguwa Kanikobore Uchidawase Chairowase Uguisuwase Rojinto Akamekumataka Beikokuichigo	Nemurasaki Suijuro Ichinose Shirokozoguwa Kinryu		
B medium	Mukadeguwa Kanikobore Chairowase Uguisuwase Akamekumataka Rojinto Nakamagi Kinryu Beikokuichigo	Nemurasaki Ichinose Seijuro Shirokozoguwa Uchidawase		
C medium	Mukadeguwa Uguisuwase Akamekumataka Kinryu	Kanikobore Chairowase Seijuro	Uchidawase Rojinto Beikokuichigo	Nemurasaki Ichinose Nakamagi Shirokozoguwa

C : Compact cullus　　F : Friable callus

ヅホグワ系品種の金竜などは何れの培地においてもCカルスを示し，カラヤマグワ系品種の仲間木，一の瀬，ログワ系品種の清十郎，老人島ではC＞Fカルスの傾向を示した。

以上，本実験の範囲内からCカルスはヤマグワ系品種，ミヅホグワ系品種，カラヤマグワ系品種の赤芽熊鷹で多く観察され，Fカルスを生じ易い品種はカラヤマグワ系品種，ログワ系品種および米国一号，白楮桑のような系統不明の品種に多く観察された。

3.1.2 カルスの増加量

3種類の再分化培地における培養7日ごとのカルス増加量を品種別にみると，ヤマグワ系品種（Fig. 1）のA培地で最も増加量の多かったのはカニコボレで，かつ日数との間に相関関係がみられた（$R^2=0.961$, $P<0.001$）。ついで茶色早生，内田早生，鶯早生および百足桑の順位の増加量となり，最も少なかったのは根紫であった。

B培地では，A培地と同様カニコボレが高く，茶色早生は最低となり，内田早生，鶯早生は中位となった。またC培地においては，全体的に増加量は劣ったが日数との間に相関がみられなかったのは内田早生（$R^2=0.190$, $P>0.05$）と茶色早生（$R^2=0.230$, $P>0.05$）であった。

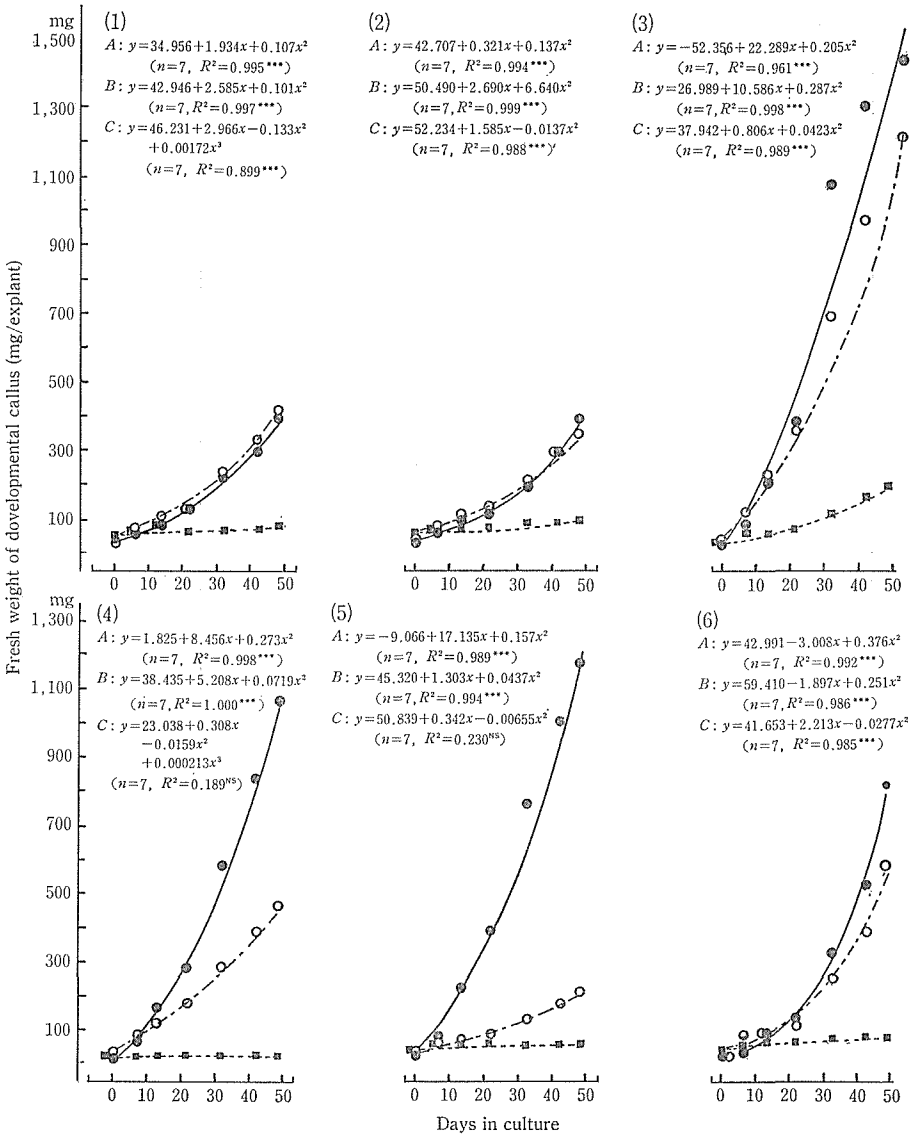


Fig. 1 Effect of three different media on development of callus in *M. bombycis* of mulberry.

(1) Mukadiguwa (2) Nemurasaki
(3) Kanikobore (4) Uchidawase
(5) Chairowase (6) Uguisuwase

A : medium (M. S+NAA5×10^{-7}M+KIN10^{-7}M). —●—
B : medium (M. S+NAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M). —•○•—
C : medium (M. S+NAA5×10^{-5}M+KIN10^{-5}M). - - ■ - -

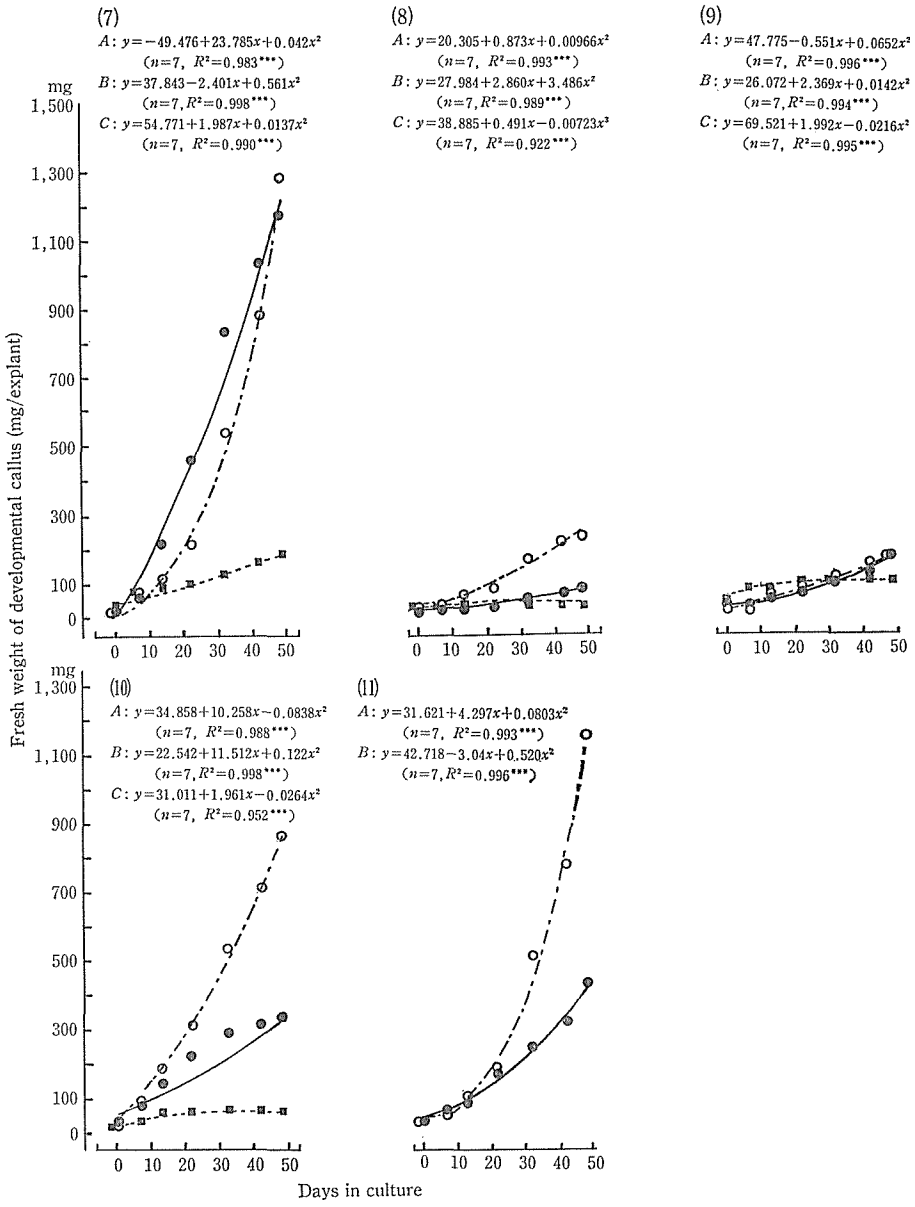


Fig. 2 Effect of three different media on development of callus in *M. alba* and *M. multicaulis* of mulberry.
(7) Akamekumataka (8) Ichinose
(9) Nakamagi (above *M. alba*) (10) Seijuro
(11) Rojinto (above *M. multicaulis*)

つぎにカラヤマグワおよびログワ系品種（Fig. 2）においては，赤芽熊鷹のA，B培地ともに増加量が高く，ついで老人島，清十郎のB培地で高い増加量を示したほかは，

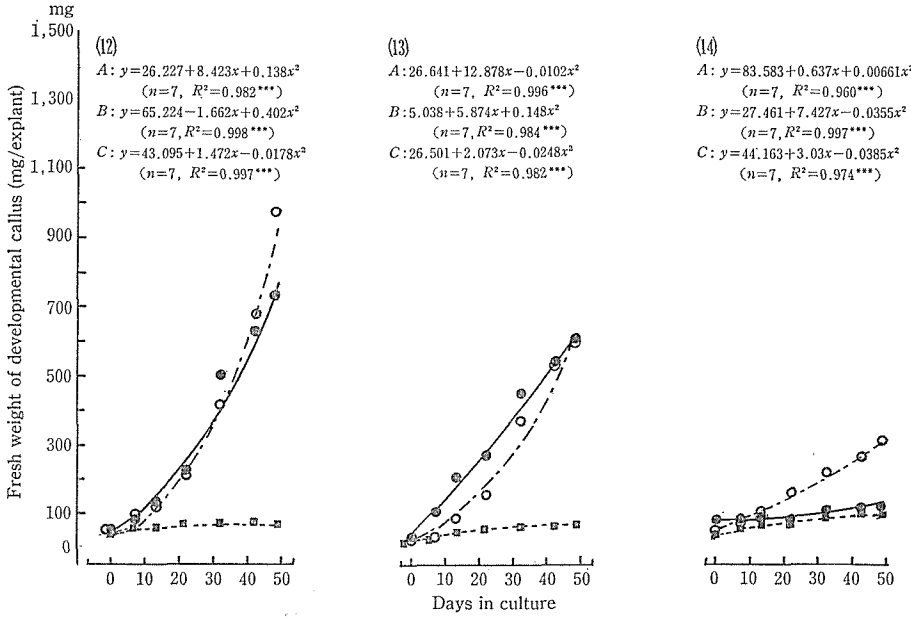


Fig. 3 Effect of three different media on devepopment of callus in *M. mizuho* and other varieties of mulberry.
(12) Kinryu (*M. mizuho*) (13) Beikokuichigo
(14) Shirokozoguwa

一の瀬，仲間木ともにA，B培地とも最も劣った。またC培地では各品種にわたって低い値を示した。さらにミヅホグワ系の金竜は，A，B培地ともに中位の増加量を示したが，系統不明の米国一号，白楮桑は各培地とも増加量が低い値を示した（Fig. 3）。

以上，各品種におけるカルス増加量と培養日数との相関は，ヤマグワ系の茶色早生，内田早生を除き，それぞれの品種に認められた。

また，培地別のカルスの増加率について置床49日目における各品種別の状態をみると，A培地では約82倍，B培地では約70倍，C培地では約6.0倍となり，C培地が最も劣った。なかでも赤芽熊鷹ではA培地で約57倍，B培地で約70倍，C培地で約4倍となる。カニコボレではそれぞれ約46倍，36倍，6倍となっているが，一の瀬ではそれぞれ約4，7，1倍という低い状態であった。

これらの結果から品種間におけるカルス増加量と増加率を培地別にみると概ねA＞B＞C培地のパターンとB＞A＞C培地のパターンに大別される。即ち前者に相当する品種は，根紫，カニコボレ，百足桑，鶯早生，内田早生，茶色早生であり，後者では一の瀬，仲間木，白楮桑，米国一号，赤芽熊鷹，金竜，清十郎，老人島の各品種であった。これを系統別にみると，前者はヤマグワ系，後者はカラヤマグワ，ログワ，ミヅホグワ系と系統不明の品種に分けられた。

3.1.3　カルス細胞数および仮導管様細胞数

再分化A培地におけるCカルスを形成した百足桑，内田早生，茶色早生，鶯早生，赤芽熊鷹および仲間木などはカルス細胞が密に配列し，一定面積内における細胞数が多い（Fig. 4，A）。

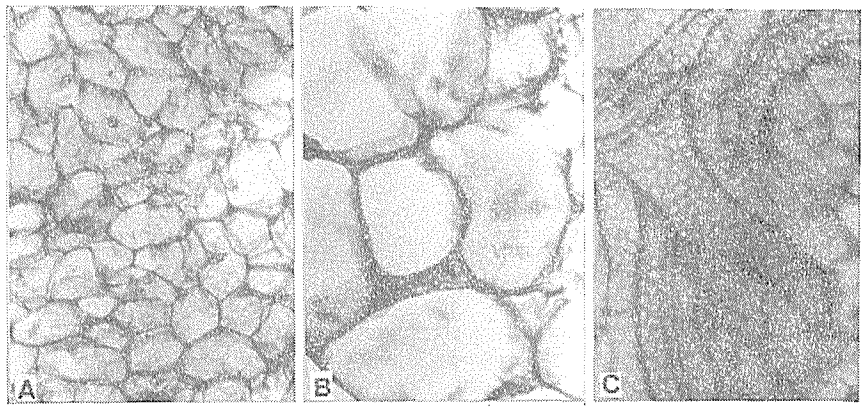


Fig. 4　Shows callus tissue of each close and rough forms, and shape-like tracheid cells in the region of callus.
A : Close shape.　B : Rough shape.
C : Shape-like tracheid cells.

またCカルス中にFカルスが混在（C＞F）する根紫，清十郎，一の瀬，金竜，白楮桑などでは大小のカルス細胞が粗く配列し，一定面積内の細胞数は少なかった（Fig. 4，B）。仮導管様細胞の形成は各品種とも観察され（Fig. 4，C），形成数の多いものに内田早生，少ないものに清十郎がそれぞれ認められたが，数的の差は少なかった。

B培地におけるCカルスおよびC＞Fカルスの品種別の細胞配別並びに一定面積内細胞数，仮導管様細胞数は，A培地に比較して各品種間の差が大きく，なかでも茶色早生，米国一号ではカルス細胞数が密に配列し，その数も多く，仮導管様細胞数も多かった。また一の瀬および清十郎では比較的カルス細胞が粗に配列し，一定面積内の数も少なく，仮導管様細胞の形成数も少なかった。つぎにC培地におけるカルスの性質（Table 5）は，CカルスからFカルスにわたり，カルス細胞も粗，密にわたり配列した。Cカルスの形成をみた百足桑，鶯早生，金竜などでは一定面積内の細胞数が多く，Fカルスの一の瀬および根紫では少なかった。仮導管様細胞数は鶯早生および白楮桑などで多く，根紫，茶色早生，仲間木などでは少なかった。なお，一の瀬，赤芽熊鷹，米国一号などでは仮導管様細胞の形成は認められなかった。

3.1.4　不定根の発根数と原基数

A培地の場合：不定根の発根は1次培養カルスを再分化培地（2次培養）は移植後約15日目頃より始まり，根先を上向きに伸長するのが観察された。発根は全品種でみられ，とくに多かった品種はカニコボレ，茶色早生，金竜，米国一号，百足桑などで，これらは移植後約40日目頃より支根を形成した。発根の少なかったものは一の瀬，清十郎，白楮桑などであった（Fig. 5，I）。

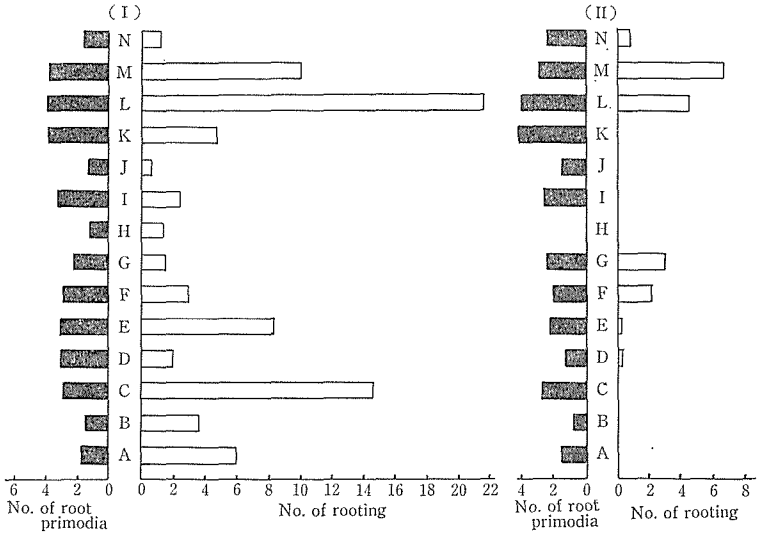


Fig. 5 Relationship between rooting and root primodia in callus culture of each variety.
(I) A medium (M.S+NAA5×10^{-7}M+KIN10^{-7}M)
(II) B medium (M.S+NAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M)
A : Mukadeguwa B : Nemurasaki C : Kanikobore
D : Uchidawase E : Chairowase F : Uguisuwase
G : Akamekumataka H : Ichinose I : Nakamagi
J : Seijuro K : Rojinto L : Kinryu
M : Beikokuichigo N : Shirokozoguwa

カルス細胞群中に形成された不定根の原基数を算えた結果（Fig. 5, I），発根数はカニコボレ，金竜，米国一号に多く，発根数の少なかったのは一の瀬，清十郎であった（Fig. 6, A, B)。

系統別にみると，ミヅホグワ系品種の金竜が発根数，原基数とも最多となり，ついでヤマグワ，カラマヤグワ，ログワ系品種の順であった。

このことからA培地上におけるカルスの発根数とカルス細胞群中にみられる根の原基数とはほぼ平行的関係にあるものと思われる。

B培地の場合：B培地上におけるカルスの発根性とその品種的関係をみると，A培地で発根性の高かった金竜，米国一号などの品種に中位の発根がみられたほかは発根性に乏しく，一の瀬を始め仲間木，清十郎，老人島，カニコボレ，根紫，百足桑などは全く発根がみられなかった（Fig. 5, II)。また，根の原基数は発根がみられなかった品種においても原基の形成が観察されたことから，経日にしたがい発根するものと思われる(Fig. 6, c)。

C培地の場合：C培地においてはいずれの品種でもカルスよりの発根は認められなかった。また根の原基形成が不明瞭なもの（赤芽熊鷹）とみられないもの（老人島）とが混在し（Fig. 6, D, E), A, B培地とはカルスの状態を異にした。

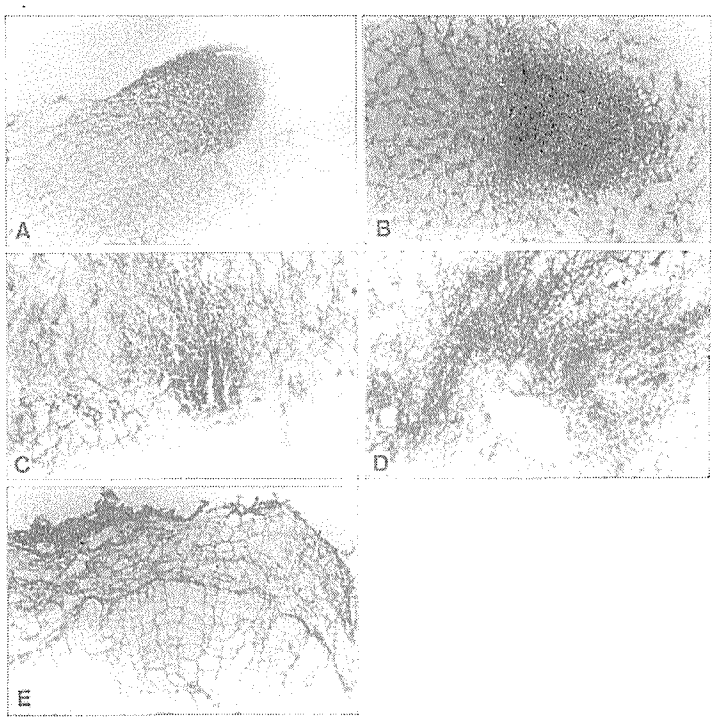


Fig. 6　Root primodia in the region of callus cell.
A : Beikokuichigo　B : Kanikobore　C : Ichinose
D : Akamekumataka (no evident)
E : Rojinto (not produce)

以上の結果から，培養カルスにおける再分化，とくに不定根分化について仮導管様細胞数，原基数および発根数の各種要因を培養条件のA培地においてその品種間差異をみると（Fig. 7），ヤマグワ系品種の茶色早生，ミヅホグワ系の金竜および系統不明の米国一の号は，根の原基数，発根数，仮導管様細胞数はいずれも多く，カラヤマグワ系の一瀬はそれぞれ少なかった。ログワ系の老人島はほぼ中間を示した。このようにカルスからの不定根分化に関しては，根の原基数と仮導管様細胞数はともに平行的関係にあるものと考えられる。なお全実験を通じて不定芽の形成に関する要因は全く認られなかった。

3.2　生長調節剤による不定根の分化

3.2.1　各種生長調節剤の濃度別組合せと不定根分化

i）　濃度別組合せと光周期

不定根分化に及ぼすIAA-KINの濃度別組合せと光周条件*についてみると（Fig. 8，

*本報告の大要は日本蚕糸学会中部支部発表会[15]において発表した。

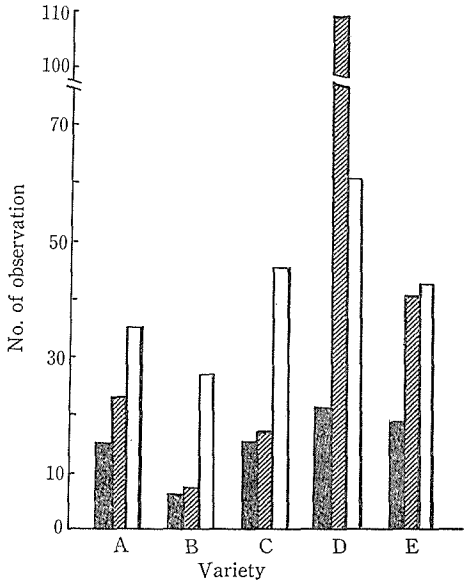


Fig. 7 Developmental effects of root primodia, rooting and shape-like tracheid cells among each of varieties in mulberry on callus culture.
▩ : No. of root primodia.
▨ : No. of rooting.
□ : No. of shape-like tracheid cells.
A : Chairowase B : Ichinose C : Rojinto
D : Kinryu E : Beikokuichigo

A)，全明区（L）における発根数の順位は培地No. 16 (IAA10^{-6}M+KIN10^{-6}M), No, 22 (IAA10^{-5}M), No. 23 (IAA10^{-5}M+KIN10^{-6}M), No. 2 (KIN10^{-6}M), No. 8 (IAA 10^{-7}M) となり，他の培地では発根が認められなかった。

つぎに全暗区 (D) では発根数の多い方からみると，培地 No. 16, No. 22, No. 23, No. 15 (IAA10^{-6}M) No. 9 (IAA10^{-7}M+KIN10^{-6}M)，No. 24 (IAA10^{-5}M+KIN5×10^{-6} M)，No. 8, 10, 2 の順位となった。また16L8D区（16時間明，8時間暗）では，No. 16, 22, 23, 25 (IAA10^{-5}M+KIN10^{-5}M)，そして No. 8 の順位で発根数の多少がみられる。

これらの3区を通じて発根数の多かったのは，光条件の如何にかかわらず，IAA10^{-6} M+KIN10^{-6}M および IAA10^{-5}M (only) の2つの培地であったことから，不定根の分化に必要な培地の条件としてのオーキシンレベルは IAA10^{-5}M～IAA10^{-6}M の範囲であると考えられた。

またNAA-BA の濃度別組合せの場合 (Fig. 8，B) も IAA-KIN の場合と同様の傾向にあったが，全暗および20L4D区（20時間明，4時間暗）では，NAA10^{-6}M 単独 (No. 15) 培地が発根数最多となり，NAA10^{-7}M+BA10^{-6}M (No. 9) 培地が最少となった。

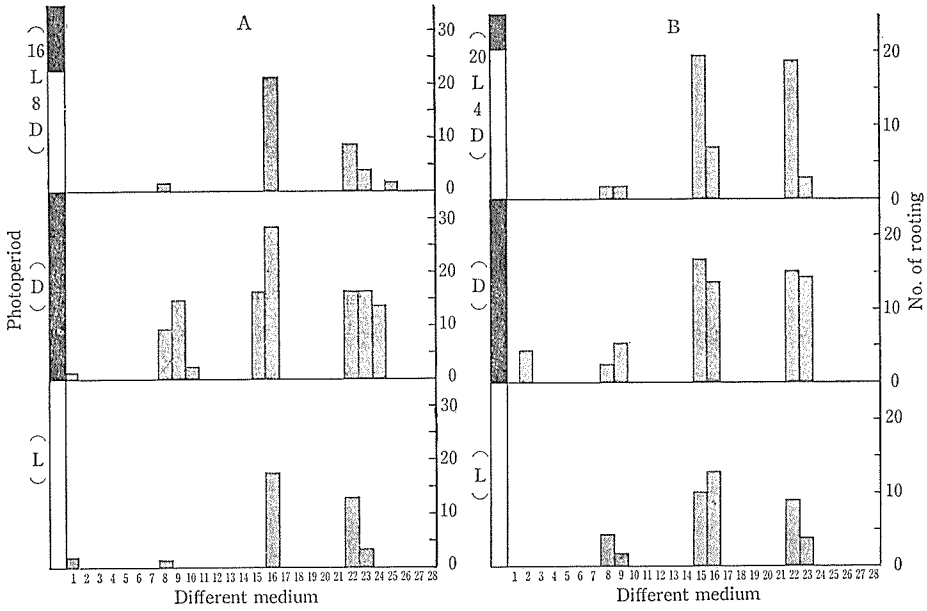


Fig. 8 Effect of protoperiod on redifferentiation of adventitious root in different media containing of auxin and cytokinin.
A：IAA-KIN　B：NAA-BA

これらの3区を通じ不定根分化のための培地は光条件の如何にかかわらず，NAA10^{-6}M～NAA10^{-5}Mを含むことが必要条件と考えられた。

オーキシンであるIAAとNAA，サイトカイニンであるKINおよびBAの濃度別組合せにおけるカルスからの発根数は，各区平均してIAA+KINはNAA+BAに比べ約7％程度多い状態を示した。

クワ培養カルスからの不定根の分化にはオーキシンの存在が必須で，その濃度もM.S培地の場合10^{-6}M程度が最適と思われた。またサイトカイニンとの共存は不定根の分化を促進させたが，その濃度は10^{-6}M程度がよかったので，それ以上に濃度を増すとオーキシン，サイトカイニンとも分化を阻害した。なお，不定根の分化に対する光条件としては，全暗条件（24D）が最良であった。

つぎにWinton[2]が3倍体ポプラのカルスより不定芽の形成に成功したW.S培地を用いて実験を行なった。

a（NAA5×10^{-6}M+BA5×10^{-6}M），b（NAA5×10^{-7}M+BA5×10^{-6}M）両区より暗条件で誘導されたカルスをさらに2次培養としてNAA+BAの組合せ培地に移植し，光条件として24L，24D，12L12D（12時間明，12時間暗）を設け，その不定根の形成状態を観察した。

その結果，2次培養を全暗状態で行った区では，カルスの約60～100％が発根し，なかでもNAA5×10^{-7}M+BA5×10^{-7}MおよびNAA3×10^{-6}M+BA10^{-6}M培地での発

Table 6 Effect of callus formation and rooting by different concentrations of NAA and BA in W.S medium.

(A)

	concentration		No.of explants	a → 24 D							b → 24 D						
	NAA	BA		No. of callus formation						rooting callus (No. of rooting)	No. of callus formation						rooting callus (No. of rooting)
				−	+	++	+++	++++	+++++		−	+	++	+++	++++	+++++	
1	10^{-7}M	2×10^{-7}M	30		3	15	12			30(153)			14	16			30(105)
2	5×10^{-7}	5×10^{-7}	30				9	18	3	30(228)				15	12	3	30(159)
3	5×10^{-7}	10^{-6}	30			6	12	6	6	30(42)				15	12	3	30(120)
4	3×10^{-6}	10^{-6}	30			6	15	9		21(186)				12	9	9	30(234)
5	5×10^{-6}	5×10^{-6}	30				6	15	9	21(52)				6	12	12	30(90)

Sample in primary medium (a, b) was maintained under dark condition (24D).

a : W.S+NAA 5×10^{-6}M+BA 5×10^{-7}M

b : W.S+NAA 5×10^{-7}M+BA 5×10^{-6}M

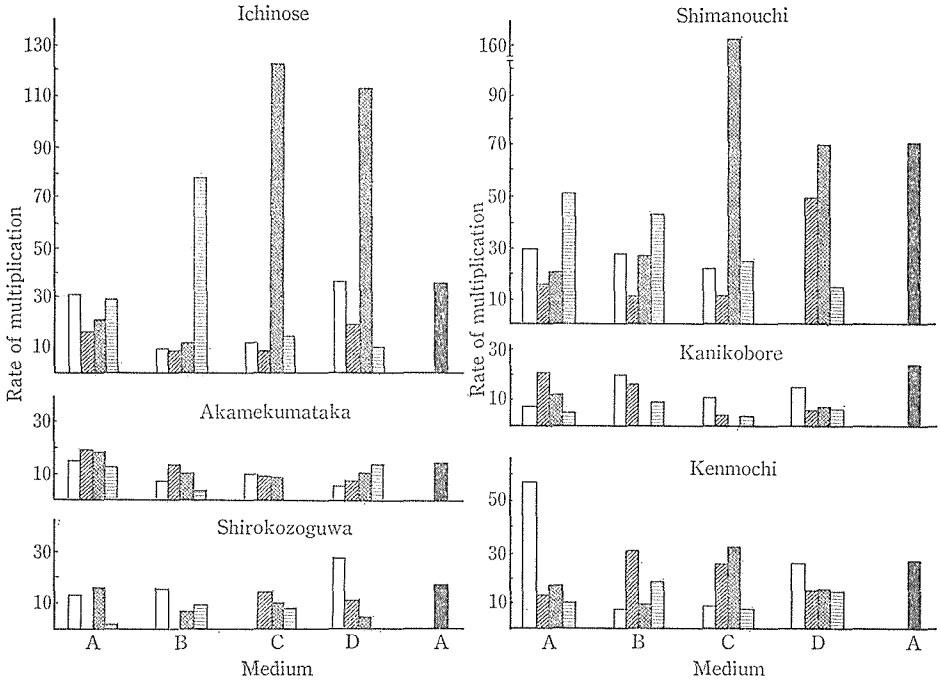
(B)

	concentration		No. of explants	a → 24 L							a → 12 L 12 D							b → 12 L 12 D						
	NAA	BA		No. of callus formation						rooting callus (No. of rooting)	No. of callus formation						rooting callus (No. of rooting)							rooting callus (No. of rooting)
				−	+	++	+++	++++	+++++		−	+	++	+++	++++	+++++		−	+	++	+++	++++	+++++	
1	10^{-7}M	2×10^{-7}M	30		6	24				3(8)		12	18				5(18)	2	13	15				3(7)
2	5×10^{-7}	5×10^{-7}	30		12	18				8(15)		9	15	6			8(14)		21	9				7(7)
3	5×10^{-7}	10^{-6}	30	3	15	12				5(10)		9	11	10			6(11)	3	21	6				5(9)
4	3×10^{-6}	10^{-6}	30	6	21	3				8(12)		6	24				10(12)	6	21	3				9(10)
5	5×10^{-6}	5×10^{-6}	30		15	15				8(8)		9	15	6			10(10)		15	15				9(10)

根数は最多であった。一方，NAA5×10^{-6}M+BA5×10^{-6}M 培地は最少となった（Table 6．A)。

また2次培養を24L，12L12Dで行った場合（Table 6．B）発根カルスおよび発根数とも各培地間で一様に少なく，ことに b→12L12D の条件下では最少であった。Table 6. A，Bからカルス形成およびカルスからの不定根の再生は光条件により大きく左右され，暗条件下において根数の多いことがわかった。

以上の通り本実験では各区にあたって不定根の形成は認められたが，不定芽の形成はみられなかった。



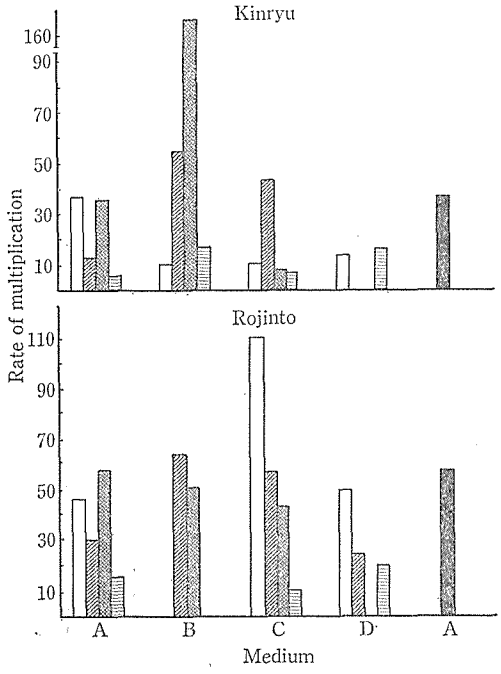


Fig. 9 Relationship between different media containing growth regulator and developmental callus in each variety (Primary culture period : 60 days).
Concentration of growth regulators.

A : NAA5×10^{-6}M+BA10^{-6}M
B : NAA10^{-6}M+BA5×10^{-6}M
C : IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M
D : IAA10^{-6}M+KIN5×10^{-6}M

: ABA free
: ABA 10^{-7}M
: ABA 5×10^{-7}M
: ABA 10^{-6}M
: ABA 5×10^{-6}M

ii) アブシジン酸（ABA）の添加によるカルス形成と再分化

a．濃度別組合せによるカルス増加率の品種間差異

従来，クワの新梢（条）カルスからの再分化はオーキシンとサイトカイニンを種々な濃度で組合せた実験が行われているが，以上の実験例からもわかるように，不定根の形成は認められているが不定芽の形成は全く認められず，分化能の困難さに対応させる研究が今後の課題とされている現状である。

培養カルスからの再分化実験のなかで，培地に ABA を添加したダイズ子葉の培養カルスから芽状体の形成が認められた報告[16]から，Table 3による ABA と他の生長調節剤との濃度別組合せ培地で試験した。

その結果，NAA，IAA および BA，KIN と ABA との濃度別組合せによる供試品種間のカルス増加率の差異をみると（Fig. 9），剣持，カニコボレ，白楮桑，老人島などでは ABA の比較的低濃度（10^{-7}M，5×10^{-7}M・Table 3）で増加率が高く，島の内，一の瀬では ABA の比較的高濃度（10^{-6}M，5×10^{-6}M・Table 3）で増加率が高い。また金竜における最高増加率は NAA10^{-6}M＋BA5×10^{-6}M・B の ABA10^{-6}M・c にあったが，全体的からみると，ABA の低濃度の方が増加率は高い傾向にある。赤芽熊鷹では各区間に大差は認められなかった。

さらに本実験に供試した8品種について，培地に添加したオーキシン，サイトカイニンおよび ABA との相互関係をみると，島の内，一の瀬，白楮桑，老人島などにおいて比較的増加率の高いのは，IAA と KIN との組合せによる培地であったのに対し，剣持，カニコボレ，金竜などでは NAA と BA の添加培地がカルス増加率を高める傾向を示した。赤芽熊鷹では各区間に差を認め難かった。

b．濃度別組合せによる不定根形成の品種間差異

NAA＋BA，IAA＋KIN と ABA との濃度別組合せによる不定根の形成実験を行ないいつぎの結果を得た（Table. 7）。

Table 7 Effect of adventitious root formation in each of varieties by M.S medium containing ABA.

Variety \ Medium No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	MSA
Kenmochi	±	−	++	−	−	±	+	±	−	−	−	−	−	−	−	−	++
Shimanouchi	−	±	−	−	−	−	+	−	±	−	±	±	−	−	−	−	++
Kanikobore	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Shirokozoguwa	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Ichinose	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Akamekumataka	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Rojinto	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Kinryu	−	−	++	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	++

Each medium of No. 1 to 16 is the same as those of Table 3.
MSA (M.S＋NAA 5×10^{-6}M＋BA10^{-6}M) is used to control.

カニコボレを除いた7品種とも多，少に差はあるが不定根の形成が認められた。すなわち，剣持では IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M に ABA10^{-7}M 添加区（培地No. 3）で比較的多くの発根がみられたほか，培地No. 7に多少，No. 1，6，8に僅少ながら認められたが，他培地では発根が不能であった（Fig. 10，A～F）。島の内では No. 7に多少，NO. 2，9，11，12に僅かの発根がみられたのみで他は認められなかった。また，白楮桑，一の瀬，赤芽熊鷹，老人島では No. 3 のみに多少の発根が認められた。金竜では No. 3 に比較的多く，No. 7 に多少の発根のほかは全くみられなかった。対照区としてのM.

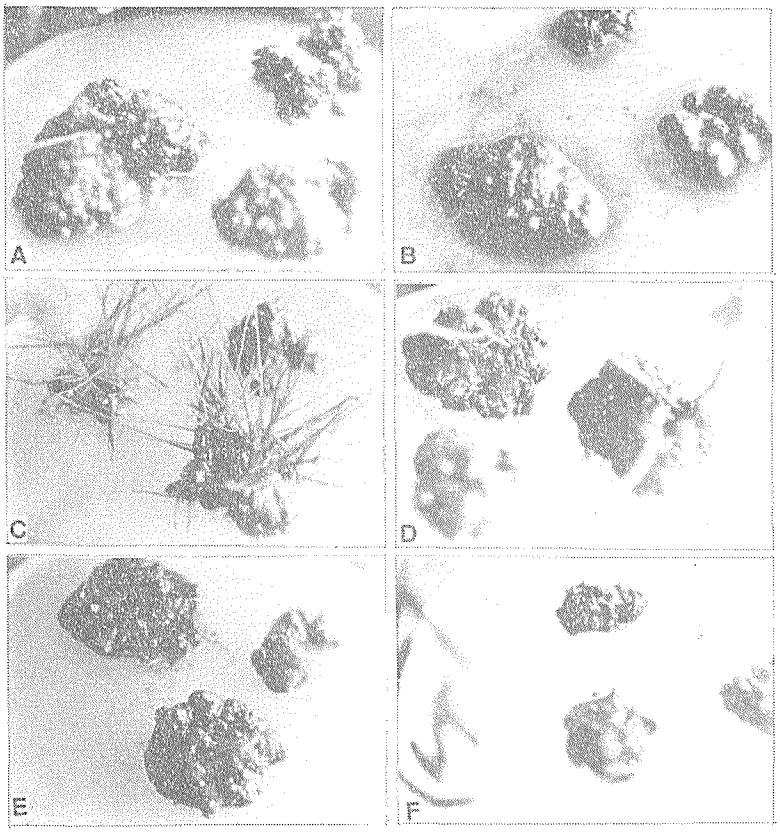


Fig. 10　Developmental callus and rooting in different media containing ABA of growth reguators (Kenmochi).

A：NAA5×10^{-6}M+BA10^{-6}M+ABA10^{-7}M (No. 1 medium)
B：NAA10^{-6}M+BA5×10^{-6}M+ABA10^{-7}M (No. 2 medium)
C：IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M+ABA10^{-7}M (No. 3 medium)
D：IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M+ABA5×10^{-7}M (No. 7 medium)
E：IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M+ABA10^{-6}M (No. 11 medium)
F：IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M+ABA5×10^{-6}M (No. 15 medium)

S+IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M 培地（MSA）培地においては，各品種とも発根がみられ，剣持，島の内，金竜の3品種は発根が著しかった（Table. 7）。

以上の結果から，M.S を基本とした IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M 培地に低濃度の ABA 添加（10^{-7}M）では大部分の品種に不定根の形成をみたが，同レベルでの NAA+BA+ABA の場合には僅少の品種にのみ不定根が形成されること，および ABA の濃度が高くなるにつれ，不定根形成が抑制されることが認められた。

c．培養カルスの組織観察

各種生長調節剤の濃度別組合せによる培養カルスにおける内部の組織的観察から，その再分化への状態をみると，カルス内部の各所に仮導管様細胞の形成が観察された。この仮導管様細胞の形成は前述（カルス細胞と仮導管様細胞の形成）の場合と類似していた。しかしながら不定芽の原基像はいずれの培地でも観察されなかった。

継代培養60日目の白楮桑におけるカルス組織を培地別に観察した結果，IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M 培地におけるいずれの ABA 濃度（培地 No, 3, 7, 11, 15）でもカルス細胞は大形で，内容物に乏しく，その中に仮導管様細胞が散在しているのがみられる

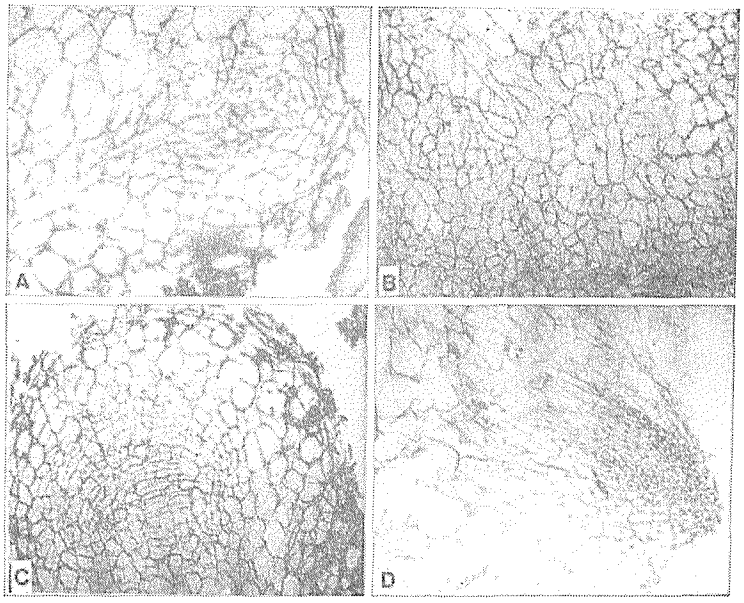


Fig. 11 Histological observation of cultured callus in different medium containing ABA of growth regulators (Explant incubating for M.S+IAA 5 ×10^{-6}M+KIN10^{-6}M medium in Shirokozoguwa).

A : ABA 5 ×10^{-7}M
B : ABA 10^{-6}M
C : ABA 5 ×10^{-6}M
} A, B and C are mixture of shape-like tracheid cells.

D : ABA 10^{-7}M D is formation of adventitious roots primodia.

(Fig. 11, A～C)。しかしカルス細胞が小形で，しかも細胞質が充実し，核のあるカルス分裂組織の存在は少なかった。また組織中不定根の原基も観察されたが，その数は前述のもの（カルスの発根数と原基数）に比較し少なかった（Fig. 11, D)。

これに対し，NAA5×10^{-6}M+BA10^{-6}M 培地における ABA 添加の場合は，カルス細胞の形は比較的小さくかつ細胞が密に配列し，カルス周縁分裂組織の細胞群が多く観察された（Fig. 12, A～D)。また前述の IAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M 培地にみられた不定根の原基像は認められなかった。

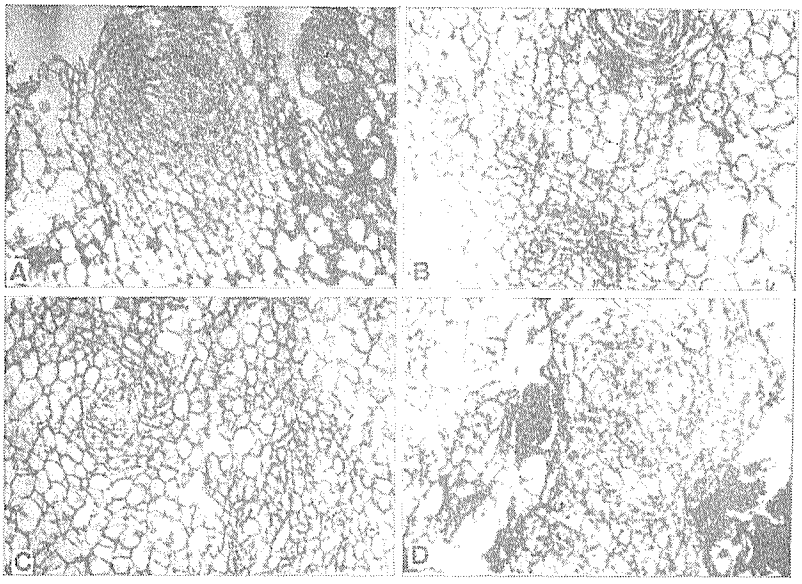


Fig. 12 Histological observation of cultured callus in different medium containing ABA of growth regulators (Explant incubating for M. S+NAA 5 ×10^{-6} M+BA10^{-6}M medium in Shirokozoguwa).

A : ABA 10^{-7}M
B : ABA 5 ×10^{-7}M
C : ABA 10^{-6}M
D : ABA 5 ×10^{-6}M

Under each medium, not produce of adventitious root primodia and shape-like tracheid cells respectively.

3.3 カルス片の移植期と再分化

クワ品種鼠返および島の内の1次培養カルスについて，2次培養（再分化培地）への移植期と再分化の状態を調べた。

3.3.1 品種鼠返の場合

暗条件による1次培養（M. S+NAA 5×10^{-6}M+BA2×10^{-6}M）の形成カルスを6，14，20日目に2次培養として NAA+BA，NAA+KIN の濃度別組合せ培地に移植し，再分化（不定根）について調査した（Table. 8)。

Table 8 Relationship between planted period and adventitious root after formation of callus in Nezumigaeshi.

Planted Period		Concentration		No. of explants	No. of callusing						No. of rooting	Concentration		No. of callusing						No. of rooting
		NAA	BA		−	+	++	+++	++++	+++++		NAA	KIN	−	+	++	+++	++++	+++++	
6 Days	1	10^{-7}M	10^{-7}M	30		3	24	3			0	10^{-7}M	10^{-7}M		9	9	12			0
	2	2×10^{-7}	5×10^{-7}	30			9	9	9	3	0	2×10^{-7}	5×10^{-7}		6	21	3			0
	3	5×10^{-7}	10^{-6}	30			9	15	6		0	5×10^{-7}	10^{-6}			6	15	6	3	0
	4	5×10^{-6}	5×10^{-6}	30				9	21		0	5×10^{-6}	5×10^{-6}				9	12	9	0
	5	10^{-6}	5×10^{-6}	30				12	9	9	0	10^{-6}	5×10^{-6}				12	15	3	0
	6	0	0	30	20	10					0	0	0	24		3	3			0
14 Days	1	10^{-7}M	10^{-7}M	30		3	21	6			0	10^{-7}M	10^{-7}M		12	15	3			0
	2	2×10^{-7}	5×10^{-7}	30			6	15	6	3	0	2×10^{-7}	5×10^{-7}		6	12	12			0
	3	5×10^{-7}	10^{-6}	30				15	15		0	5×10^{-7}	10^{-6}			3	18	9		0
	4	5×10^{-6}	2×10^{-6}	30				9	9	12	0	5×10^{-6}	2×10^{-6}			3	3	18	6	0
	5	10^{-6}	5×10^{-6}	30			3	3	18	6	0	10^{-6}	5×10^{-6}				15	15		0
	6	0	0	30	18	12					0	0	0	21		6	3			0
20 Days	1	10^{-7}M	10^{-7}M	30			14	16			19(49)	10^{-7}M	10^{-7}M		6	8	16			21(50)
	2	2×10^{-7}	5×10^{-7}	30			12	15	3		10(33)	2×10^{-7}	5×10^{-7}			10	20			15(31)
	3	5×10^{-7}	10^{-6}	30			9	21			10(20)	5×10^{-7}	10^{-6}		3	9	12	6		21(45)
	4	5×10^{-6}	2×10^{-6}	30				6	24		0	5×10^{-6}	2×10^{-6}			5	10	15		5(5)
	5	10^{-6}	5×10^{-6}	30				21	9		0	10^{-6}	5×10^{-6}			6	12	12		0
	6	0	0	30	24	6					0	0	0	19		9	2			0

In the case of this experiment, the callus culture of primary medium M.S+NAA5×10^{-6}M+BA2×10^{-6}M was kept under dark condition. The parenthesis indicates rooted numbers.

カルス形成後6，14日目に再分化培地に移植したカルス片からは，各区とも不定根の分化は認められなかった。しかしカルス形成後20日後に移植した場合，NAA10^{-7}M+BA10^{-7}M，NAA10^{-7}M+KIN10^{-7}M の培地からはカルスの約60～70%にわたって発根がみられた。また NAA2×10^{-7}M+BA (KIN)5×10^{-7}M，NAA5×10^{-7}M+BA (KIN) 10^{-6}M 培地でも発根をみた。しかし添加濃度の増加に伴い発根数は減少し，分化不能の状態がみられるようになった。

3.3.2 品種島の内の場合

カルス形成後14，20日目に移植した場合，各培地全体から不定根の発生をみたが，とくに14日目移植区が顕著であった（Table 9）。また鼠返と同様 NAA10^{-7}M+BA

Table 9 Relationship between planted period and adventitious root after formation of callus in Shimanouchi.

Planted Period	区	Concentration		No. of explants	No. of callusing						No. of rooting	Concentration		No. of callusing						No. of rooting
		NAA	BA		−	+	++	+++	++++	+++++		NAA	KIN	−	+	++	+++	++++	+++++	
14 Days	1	10^{-7}M	10^{-7}M	30			21	9			18(96)	10^{-7}M	10^{-7}M			5	25			30(295)
	2	2×10^{-7}	5×10^{-7}	30				15	15		12(20)	2×10^{-7}	5×10^{-7}			3	18	6	3	9(15)
	3	5×10^{-7}	10^{-6}	30				15	15		12(24)	5×10^{-7}	10^{-6}				6	12	12	21(105)
	4	5×10^{-6}	2×10^{-6}	30			3	21	6		3(3)	5×10^{-6}	2×10^{-6}			6	18	6		12(72)
	5	10^{-6}	5×10^{-6}	30				24	6		3(3)	10^{-6}	5×10^{-6}			25	5			3(3)
	6	0	0	30	3	21	6				9(12)	0	0	2	18	10				25(101)
20 Days	1	10^{-7}M	10^{-7}M	30			10	20			10(20)	10^{-7}M	10^{-7}M			10	20			20(100)
	2	2×10^{-7}	5×10^{-7}	30			3	21	6		6(18)	2×10^{-7}	5×10^{-7}			5	20	5		15(90)
	3	5×10^{-7}	10^{-6}	30				21	9		8(12)	5×10^{-7}	10^{-6}				20	10		17(63)
	4	5×10^{-6}	2×10^{-6}	30			3	15	12		6(10)	5×10^{-6}	2×10^{-6}				5	25		5(24)
	5	10^{-6}	5×10^{-6}	30			6	15	9		2(3)	10^{-6}	5×10^{-6}				5	25		2(4)
	6	0	0	30	20	10					0	0	0	18	10	2				0

The callus culture of primary medium was the same as those of Nezumigaeshi.

(KIN) 10^{-7}M, NAA5×10^{-7}M+BA (KIN)10^{-6}M 培地での発根数が最も多かった。不定根の形成は14, 20日目移植の2区から認められたが, 20日目区は14日目区に比べ約半減していることから, 鼠返と異なりその移植期はカルス形成後14日目が適していると考えられた。

以上の点から, カルス形成後の再分化培地への移植時期は器官分化を適正に行うための重要な役割りを演じ, この時期を的確にとらえることが再分化の成否を決定する重要な条件であることがわかった。とくにカルス移植の適期が鼠返品種（20日目）と島の内品種（14日目）とで異なるというように, これには品種固有の自発的性質が関係しており, 品種毎にそれらの適正時期を明らかにすることが, 再分化を成功させるための重要な事項であると考えられた。なお, 本実験では14, 20日の移植期を通じ, 不定芽の分化は全くみられなかった。

4. 考　　察

各種培養条件下におけるクワの条カルスの形成から不定根分化に至る過程について考察してみたい。

培地中におけるオーキシンとサイトカイニンの濃度別組合せにより形成されたカルスの性状からこれをクワ品種の系統的にみた場合, NAA5×10^{-7}M+KIN10^{-7}M（A培地）

添加濃度においてカルス増殖が良く，Cカルス化の傾向にあるものはヤマグワ系品種が多かった。また NAA5×10^{-6}M＋KIN10^{-6}M 添加濃度においてカルス増殖が良好で，Fカルス化の傾向を有するものはカラヤマグワ，ログワ，ミヅホグワ系の品種が属していた。

培養カルスにおけるカルスの性状について，細胞の肥大化によるFカルスの形成[17]はオーキシン濃度の高いときに生じることが知られている。また2・4-D とNAA が10^{-4}M 添加のときにFカルスの形成がみられ，Cカルスはみられない。しかし，オーキシン濃度が高いのみでなく，無機塩濃度の低い場合や，硝酸塩に比べてアンモニウム塩加用のときにFカルス化が容易となっている。さらにイースト抽出物あるいはカゼイン加水分解物の添加によってFカルスの生成を抑え，F，Cカルスの割合に差を生じるなどの報告[10]がある。また，仮導管様細胞，不定根原基などの形成はCカルス化された分裂組織中に観察されている。これに関し，イネの胚起源カルスの組織学的観察において，分裂性の高い細胞群が発生する部位の周囲に仮導管的細胞群が形成される場合が多く，Cカルス組織において維管束系の発達がみられるとの報告[18]がみられる。

クワ培養カルスの性状とカルス組織にみられる形態形成に関する品種的相関についての報告は見当らないが，本実験において観察されたカルス増殖，仮導管，カルス細胞，不定根原基，発根などの数的関連事項からその品種間差異をみると，およそつぎのパターンに大別された。すなわち，発根数の多い品種は，カルス増殖率および原基数がともに高く，カルス細胞が密に配別するもの（Cカルス）で，これに属するものはヤマグワ系に多くみられ，カニコボレ，百足桑，茶色早生，鶯早生および米国一号であった。つぎにカルス増殖率は高いが発根数が少ないもので，ヤマグワ系の内田早生，カラヤマグワ系の赤芽熊鷹がこれに属していた。またカルス増殖率は低いが発根数の多いもので，これにはミヅホグワ系の金竜が入っていた。さらにカルス増殖率および発根数ともに低いもので，これにはカラヤマグワ系の一の瀬，仲間木，ログワ系の清十郎，老人島の各品種が属していた。

一方，桑樹萎縮病抵抗性品種とカルス発根性との関係を調査した結果[19]，カルス形成量と発根数との関係は平行的で，ヤマグワ系品種は発根数多く，カルス形成量の少ないログワ系品種では発根数が極めて少なかった。

このことから発根性の難易が品種的特性と関係あることが認められた。

つぎに，培養カルスにおけるオーキシンとサイトカイニン濃度との量比により分化型（根，芽）に差異の生ずることは Skoog & Miller[20] の実験により明らかにされている。本研究において不定根分化に関与するオーキシンの濃度範囲は，5×10^{-7}M～3×10^{-6}M，サイトカイニンの濃度範囲は，5×10^{-7}M～10^{-6}M 程度であると考えられた。これに関し，クワ培養カルスにおける不定根分化の生長調節剤濃度は IAA（NAA）は0.2mg/l（≒10^{-6}M），KIN は0.02mg/l（≒10^{-7}M）が適当であるとの報告[8]，またはIAA が2.0mg/l（≒10^{-5}M），KIN は0.02mg/l（≒5×10^{-7}M）の場合，古条，新梢，葉柄からのカルスは発根しないが，子葉，胚軸カルスでは著しい発根を認められる[12]。つぎに，クワ枝条におけるカルス培養においてその不定根発生に関する2・4-D濃度は2, 5, 8ppm の範囲で高濃度になるほど発根を増加させたとの報告[9]もある。これらにお

ける見解の相違は供試品種，エキスプラント，培養条件の差によるものと考えられるが，本実験の範囲内から考えれば，不定根分化に関するオーキシンおよびサイトカイニンの濃度は，高濃度よりむしろ上述した低濃度側に傾くことが好ましいものと考えられた。

さらに不定根分化における光の影響をみると，調節剤濃度 10^{-6}Mレベルでの全暗区（24D）が他の全明区（24L）および光周条件（20L4D，16L8D）に比べ最も発根数が多く，その伸びも良好であった。また，クワのカルス形成ならびに不定根分化に関し，全暗区が全明区に勝ること[8]，キクイモ塊茎組織からの発根におけるシベレリンの効果をみると，明所では阻害されるが暗所では促進されると報告[21]がある。

クワの培養カルスからの再分化に関しては，各種培養条件下において実験を反覆しても不定根のみの分化に終り，不定芽分化は全く観察されず個体の再生など不可能に近い現状から，クワは全能性の低い植物に属するものとして評価されている。そこで休眠誘起や落葉促進などの作用を有するアブシジン酸（ABA）を用い，オーキシンとサイトカイニンとの濃度別組合せによる桑条カルスに及ぼす再分化への影響について実験した。

ABA の再分化への効果については，植物の種類や品種により異る結果が得られている。山口，合阪[16]は不定根形成は容易であるが，不定芽形成は困難とされているダイズ子葉を起源とするカルスの再分化において，ABA の0.1mg/l 添加培地から不定芽原基が形成されたことを報告している。さらにサツマイモの組織培養において ABA は不定根形成を抑制させ，不定芽の形成を誘起させる[22]としている。また，ABA はベゴニヤの不定芽分化やカルスの増殖は促進するが，トウモロコシのカルスでは不定芽分化を抑制するという報告[23]もある。

木本植物においては Ishikawa[3] がスギの胚軸カルスの培養から ABA 1.0mg/l 添加による不定芽形成を報告している。

本実験では，今までクワのカルス培養に用いられなかった ABA を培地中にとり入れ，その効果について調べた結果，カルス増殖に対する ABA 添加の品種間差異をみると，カニコボレ，島の内，赤芽熊鷹，金竜などはカルス増殖の比較的高い品種であったが，ABA の添加により抑制される傾向がみられた。なかでもカニコボレはそれが顕著なことから他の品種に比べ，ABA に対する感受性が高いものと考えられる。また前述のとおり，カルスよりの不定根分化に適する生長調節剤の濃度範囲 5×10^{-7}M～10^{-7}M 程度であったが，ABA 添加による不定根形成との関係をみると，その濃度が増すにつれ不定根形成は著しく抑制されることが明らかになった。例えばヤマグワ系の剣持およびミヅホグワ系の金竜は発根性の高い品種として知られているが，ABA10^{-7}M 程度ではその影響はみられなかったが，5×10^{-7}M程度から激減し，10^{-6}M 以上では全く形成がみられない状態となった。またカニコボレも不定根形成の多い品種であるが，ABA の濃度組合せ培地では全く形成は認められないことから，カルスの場合と同様その感受性が高いことが示唆された。

これらに関連して生長調節剤の濃度組合せ培地の中で，比較的発根がみられた IAA5 $\times10^{-6}$M＋KIN10^{-6}M 培地における不定根形成とカルス増殖に関する品種的関係性を総合的にみた場合，つぎのパターンが考えられた。

(1)　ABA 濃度が低い場合，不定根形成は多いが，カルス増殖は劣る。逆に ABA 濃

度が高くなると不定根形成が減少し，カルス増殖は向上する。さらにABA濃度を増した場合（5×10^{-6}M）は不定根形成もカルス増殖も低下する。このように不定根の形成とカルス増殖が反比例的関係を示す品種は，島の内，金竜，剣持，一の瀬などである。

(2) ABA濃度が低い場合，不定根形成およびカルス増殖も高いが，ABA濃度を増すにつれ不定根の形成がみられなくなり，カルス増殖も低下する。このように不定根とカルス増殖が平行的関係にあるもので，老人島，白楮桑，赤芽熊鷹などがこの部類に入る。カニコボレはカルス増殖が低下すると同時に不定根形成もみられなかった。

さらに本実験においてABA添加が不定根形成を抑制したことは，サツマイモの不定芽形成実験[24]にみられたように，オーキシンとABAとの拮抗作用の結果から生じたものと考えられた。すなわち，休眠誘起や落葉促進および生長阻害効果のあるABAは，オーキシンの生理作用を阻害し，さらに不定根の形成を抑制するとともにサイトカイニンの細胞分裂と細胞拡大および未分化組織の分化促進に対する生理作用を充分に果すとすれば，不定芽形成の導入に効果的であると推測できる。

今回の実験で不定芽形成がみられなかったのは，不定芽形成までに至る各種の要因について検討すべき問題が数多く残されている。例えば供試品種のあるもの（一の瀬，島の内）は，比較的高濃度のABAによって発根は抑制されるが，カルスの増殖は促進されたこと。またある品種（カニコボレ）はABA添加によりカルス増殖の低下と同時に不定根の形成は全くみられないなど，ABAに対する品種的の感受性も多様である点を充分に考慮しなければならない。

つぎに培養カルスにおける組織学的観察から，オーキシンおよびサイトカイニンが10^{-6}M以下のCカルスの細胞は小形でその細胞群も緻密に配列し，仮導管様細胞および不定根原基の形成が分裂組織中に観察された。Fカルスは細胞群の構造がCカルスに比べ極めて粗く，こられの組織群中には品種により仮導管様細胞，不定根原基の形成は少なく，10^{-5}M以上ではこれらは存在しなかった。これらのことからカルスの性状と不定根原基形成から発根に至る過程の関連をみると，Cカルス→仮導管様細胞形成→不定根基形成→発根のパターンが考えられる。

すなわち，カルスの生長に関する周辺分裂組織が細胞分裂を活発化し，仮導管的細胞群の形成から維管束様の構造を出現させ，不定根原基の形成に伴い発根を誘起させるものと考えられた。

また，ABA添加によるカルス組織の観察では，無添加の発根培地に比べカルス細胞は大形で内容物に乏しく，仮導管様細胞や不定根原基の形成も極めて少いことから，ABAの高濃度の添加は不定根発生に関与する形態形成を抑制していることも考えられた。しかし培養条件と供試品種との相関については更に検討が必要であると考えられた。

5. 摘　　要

クワの培養カルスの器官再分化は極めて困難とされている。本実験は，クワ枝条のエキスプラントから形成されカルスの培養を行ない，その増殖と再分化（不定根）における各種培養条件を検討し，つぎの結果を得た。

(1) 培養カルスの品種的性状は，Cカルス（固塊状）はヤマグワおよびミヅホグワ系

品種に多く，Fカルス（柔軟性）はカラヤマグワおよびログワ系品種に多い傾向にある。

(2) M.S培地におけるオーキシンとサイトカイニンとの濃度別組合せが比較的低い（A：NAA5×10^{-7}M+KIN10^{-7}M），中位（B：NAA5×10^{-6}M+KIN 10^{-6}M），高い（C：NAA5×10^{-5}M+KIN10^{-5}M）ものについて，カルス増殖量の系統的品種間の差異を調べた。その結果，A＞B＞Cに偏向して増殖量の高いものはヤマグワ系品種が，B＞A＞Cに偏向するものはカラヤマグワ，ログワおよびミヅホグワ系品種であった。

(3) 培養カルスにおける品種別の不定根形数および原基数は，A培地ではミヅホグワ（金竜），ヤマグワ，カラヤマグワおよびログワ系品種の順位となり，B，C培地ではA培地に比べそれぞれが著しく劣った。

(4) 不定根分化におけるオーキシンとサイトカイニンの濃度は，両者ともに 5×10^{-7}M～10^{-6}M の範囲が良好で，全暗条件が優った。

(5) オーキシンおよびサイトカイニンとアブシジン酸（ABA）の濃度別組合せにおけるカルスの増殖は，ABA 濃度の高，低によりそれぞれの品種によって差異がみられた。

(6) 不定根の形成に対する ABA の添加は，その濃度が高くなるにしたがい著しい抑制が認められた。また不定芽の分化は認められなかった。

(7) 1次培養カルスの再分化培地への移植期は，品種的にその対応は異るが，カルス形成後14～20日の経日範囲のものに不定根形成が最多となった。

謝　　辞

本研究を行うに当り種々ご指導と論文のご校閲を賜った九州大学農学部教授縣　和一先生，同大学名誉教授坂口文吾先生，同上本俊平先生，筑紫春生先生並びに信州大学繊維学部教授嶋崎昭典先生に対し，深甚なる感謝の意を表します。

文　　献

1) Konar, R.N. and Oberoi, Y.P.：phytomorph., 15, 137-140, 1965
2) Winton, L.L.：Abst. XI. Inter. Bot. cong., 241, 1969
3) Ishikawa, H.：Bot. Mag., Tokyo, 87, 73-74, 1974
4) Kato, M.：Jap. Jou. Breed., 35, 317-322, 1985
5) 岡　成美・大山勝夫：育種雑，23，別2，10，1973
6) 押金健吾：日蚕中部講要集，XXIX，22，1973
7) 関　博夫・武田正男：日蚕中部講要集，XXXI，17，1975
8) 関　博夫・武田正男・堤　和敏・宇敷義道：日蚕雑，40，2，81-85，1971
9) 山本有彦・蒲田昌治：京都工芸繊大繊維学部学術報告，6，2，108-121，1971
10) 岡　成美・大山勝夫：日蚕雑，42，4，317-324，1973
11) 岡　成美・大山勝夫：日蚕雑，45，5，385-391，1976
12) 南沢吉三郎・平野　久：日蚕雑，43，1，51-57，1974
13) 南沢吉三郎・平野　久：日蚕雑，43，1，94-97，1974
14) Wolter & Skoog：Amer. Jou. Bot., 53(3), 263-269, 1966
15) 押金健吾：日蚕中部講要集，XXVII，4，1971
16) 山口俊彦・合阪純一：作物の形態形成論，55-62，1979

17) Gautheret, R. J. : Ann. Rev. plant. physiol. 6, 433-484, 1955
18) 前田英三：日作紀, 36, 369-376, 1967
19) 関 博夫・押金健吾：日蚕雑, 38, 3, 249-259, 1969
20) Skoog, F. and Miller, C. O. : Symp. soc. Expt., I, Biol., 11, 118-131, 1957
21) Gautheret, R. J. : North-Holland publishing Co., 55-95, 1966
22) 山口俊彦・中島哲夫：日作紀, 41, 531-532, 1972
23) 原田 宏・駒嶺 穆：植物細胞組織培養, 80, 1987, 理工学社
24) Yamaguchi, I. and Nakajima, T. : Hirokawa publishing Co. Ltd. Tokyo, 1121-1127, 1974

Summary

On the Redifferentiation of Shoot Callus to Different Culture in Mulberry.

Kengo OSHIGANE

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

The redifferentiation of callus culture *in vitro* has been formerly regarded as a difficult problem in mulberry history.

In this study, there was carried out on the influences of multiplication and redifferentiation of the callus calture in mulberry shoot maintaining under a few of experimental conditions.

The results obtained were summarized as follows.

1. The charactaristics of primary callus which were developed into callus culture had been found to be different among the strains in mulberry.

   In which some strains belonging in a certain race of *Morus bomycis* and *M. mizuho* produced the form of C callus, but other strains of *M. alba* and *M. multicaulis* did F callus, respectively.

2. The composite concentrations of auxin and cytokinin in M. S medium were confirmed to be induce a large difference of callus multiplication among each of strains in mulberry.

   Under each experimental M. S medium containing NAA5×10^{-7}M+KIN 10^{-7}M(A), NAA5×10^{-6}M+KIN10^{-6}M+KIN10^{-6}M(B) and NAA5×10^{-5}M+KIN 10^{-5}M(C), the rate of multiplication in a few races of *M. bombycis* increased orderly such as A>B>C. On the contrary, *M. alba*, *M. multicaulis* and *M. mizuho* were tended to be promoted in B medium than those of A and C, respectively.

3. The numbers of adventitious root and primodia which developed into callus culture were not only shown differences between each of

varieties in mulberry, but did between each of different media, respectively.

In such a callus culture, it was recognized that A medium made successful in order such as *M. mizuho*, *M. bombycis*, *M. alba* and *M. multicaulis*. In most case of B and C media, however, it was not recognized to be an effective culture of the callus in these varieties.

4. When all samples were kept under the experimental condition of continuous darkness, the redifferentiation of adventitious root was effectively subjected to the concentration of 5×10^{-7}M to 10^{-6}M in both auxin and cytokinin.
5. The differences among each of varieties in the callus culture would be estimated under some conditions which had kept with these combined substances of auxin, cytokinin and ABA into the medium. Under such a condition the multiplicated callus was discovered to be different among each variety with reference to the quantities of ABA involving in a medium.
6. The callus culture over a certain limits of the quantity of ABA was controlled the development of adventitious root. In addition the differentiation of adventitious bud could not be induced, too.
7. The primary callus that had held under the first culture during 14～20 days was increasingly induced the formation of adventitious root in the second culture. The times rest in the callus culture however was different among each variety.

正　誤　表

		誤	正
13p	上から11行目	である。コウソ	であるコウソ
47p	上から17行め	ↄカルス	Cカルス
52p	下から11行目	C.	c.