

# クワ下胚軸の培養カルスにおける 不定芽形成と幼苗の育成

押 金 健 吾  
(信州大学繊維学部附属農場)

## 1. はじめに

各種培養条件によるクワ条カルスの再分化実験を行ない(前報<sup>1)</sup>、供試クワ品種におけるカルス増殖ならびに植物生長調節剤の培養カルスへの濃度別効果と再分化について検討した。

その結果、培養カルスからはいずれも不定根の形成にのみとどまり、不定芽形成は全く認められなかった。

本実験においては、これに関する従来の研究<sup>2)~6)</sup>過程をふまえ、エキスプラントを条から交雑種子の下胚軸に代え、形成されたカルスを用いて再分化の実験を行った結果、今まで困難視されていた不定芽形成が誘起され\*、さらにクワ幼苗にまで育成することができたので報告する。

## 2. 材料および方法

クワ品種、水沢、一の瀬および清十郎の自然交雑種子を供試材料とし、それらの種子は水洗後、70%アルコールを用い2~3回すすぎ、滅菌水で洗った後、5%サラン粉溶液で約20~25分消毒、滅菌水で洗滌した。この種子をフラスコ内の寒天培地(15%スクロース+1%寒天)に播種して無菌的に発芽させた。この芽生の下胚軸を約5~7mmの長さに切り、Linsmaier & Skoog (L.S<sup>9)</sup>)基本培地に  $NAA5 \times 10^{-6}M + KIN10^{-6}M$  を添加したものに置床し、 $27 \pm 1^{\circ}C$ 、暗条件でカルスを誘導させた。ここで形成されたカルスを再分化培地に移植し、暗条件のまま25~30日ごとに継代培養を続けてカルスからの再分化を促した。

再分化培地はL.S基本培地を用い、つぎの3つの培地に限定して行なった。

- (1) L.S+NAA $5 \times 10^{-6}M$ +KIN $10^{-6}M$
- (2) L.S+NAA $5 \times 10^{-7}M$ +KIN $5 \times 10^{-6}M$
- (3) L.S+IBA $5 \times 10^{-6}M$ +KIN $10^{-6}M$

上記の使用培地のほかに、NAA、KIN、BAの濃度別組合せ培地やA(adenine)を添加した培地( Table 1)ではカルスの性質および内部形態(組織)について観察、調査した。

カルスの形態的観察については、カルスをホルマリン酢酸アルコールで固定し、パ

\* 本報告は日本蚕糸学会(437, 448)回)において発表した。

Table 1 Composition of different concentrations of growth regulators in L.S medium (Hypocotyl callus was kept under 16L8D and 24D).

Medium No.	A (16L 8 D)				Medium No.	B (24D)			
	NAA	KIN	BA	A		NAA	KIN	BA	A
1	0	$10^{-6}$			1	0	$10^{-6}$		
2	$10^{-6}$	$10^{-7}$			3	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$		$10^{-5}$
3	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$			4	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$		
4	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$			4'	$5 \times 10^{-7}$	$10^{-6}$		
5	0	$10^{-6}$		$10^{-5}$	9'	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$		
7	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$		$10^{-5}$	1 1	$10^{-7}$	$10^{-7}$		
8	$10^{-7}$	$3 \times 10^{-7}$							
9	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-7}$							
B 1	0		$10^{-6}$						
B 2	0		$10^{-7}$						

A ; Adenine

ラフィン切片を作り、ハイデンハイン鉄明ばんヘマトキシリンならびにサフラニン・ライトグリーン染色法で染色して、その内部を鏡検した。また、不定芽形成により育成されたクワ個体が約10cm に達したとき、多量要素水耕液に移しプラントルックス蛍光灯下で伸長を促進させた。

この幼苗の体細胞染色体の観察には、幼根の先端を0.002M, 8オキシキノリン液で前処理を行った後、酢酸アルコールで固定し、ホイルゲン核染色またはオルセイン染色法により分裂中期像の染色体数を算えた。

### 3. 結 果

#### 3.1 不定芽の形成状態とクワ個体の育成

水沢、一の瀬、清十郎各交雑種子の下胚軸エキスプラントより、置床後10日目頃より胚軸の切口周辺から黄白色の固塊状カルス（Cカルス）が形成され、次第にその量が増加した（Fig. 1, A）。

この形成20日目のカルス片約100mgを3種（前記(1), (2), (3)）の再分化培地に移植し、 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗条件で継代培養を続行させた。

その結果、L.S+NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M培地(1)の継代2代目（置床後50日目）の清十郎品種のカルスから、つぎに3代目（置床後70日目）の一の瀬、5代目（置床後110日目）の水沢にそれぞれ僅少なから不定芽の分化がみられた（Fig. 1, B）。また、L.S+NAA $5 \times 10^{-7}$ M+KIN $5 \times 10^{-6}$ M培地(2) L.S+IBA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M培地(3)における継代5代目の清十郎カルスからも不定芽形成が認められた。

Table 2 Adventitious buds formation following with the growth of cultured callus in hypocotyl of mulberry.

Medium	Cultured in days	50D			70D			110D			Total		
		Variety			Variety			Variety			Variety		
		Mizusawa	Ichinose	Seijuro	Mizusawa	Ichinose	Seijuro	Mizusawa	Ichinose	Seijuro	Mizusawa	Ichinose	Seijuro
1	L. S+NAA $5 \times 10^{-6}$ M +KIN $10^{-6}$ M	0	0	4	0	1	0	2	0	0	2	1	4
2	L. S+NAA $5 \times 10^{-7}$ M +KIN $5 \times 10^{-6}$ M	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
3	L. S+IBA $5 \times 10^{-6}$ M +KIN $10^{-6}$ M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Total		0	0	4	0	1	0	2	0	3	2	1	7

上記の培地別ならびに継代別(日数)にみられた不定芽形成数は Table 2 の通りである。不定芽の形成数を品種別にみると、水沢が 2、一の瀬が 1、清十郎が 7 個体で、ログワ系の清十郎自然交雑胚軸が再分化個体の過半数を占めている。また培地別の不定芽形成数は、L. S+NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M が 7 と最も多く、L. S+NAA $5 \times 10^{-7}$ M+KIN $5 \times 10^{-6}$ M が 2、L. S+IBA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M が 1 個体と少ない。また、NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M の生長調節剤組合せが過半数を占めている。これらのことから培養カルスからの器官再分化に関しては、供試品種とエキスプラントの選択および培地の種類と添加物の濃度組合せが重要な条件であることが知られた。

Table 3 Numbers of adventitious roots and buds on callus of hypocotyl kept for 70 days in L.S medium.

Concentration	No. of explants	Mizusawa			Ichinose			Seijuro			
		No. of redifferentiation callus			No. of redifferentiation callus			No. of redifferentiation callus			
		Root	Bud	Total	Root	Bud	Total	Root	Bud	Total	
1	NAA $5 \times 10^{-6}$ M +KIN $10^{-6}$ M	30	15 (138)	0	15	11 (107)	1 (1)	11+1	6(24)	4 (4)	6+4
2	NAA $5 \times 10^{-7}$ M +KIN $5 \times 10^{-6}$ M	30	18 (150)	0	18	14 (123)	0	14	10 (31)	0	10
3	IBA $5 \times 10^{-6}$ M +KIN $10^{-6}$ M	30	20 (162)	0	20	18 (153)	0	18	17 (45)	0	17

The parenthesis indicated the number of rooting and bud formation.

つぎに継代2代目（置床70日目）における培養カルスからの不定根および不定芽形成の状態を Table 3 に示した。

この表から不定根の形成は培養全区にわたって認められた。品種別にみると、水沢では移植カルスの半数以上が発根し、その数は他に比べて著しく多い。これに対し清十郎は発根カルスにおいて3種類の培地全体の約 1/4、発根数も水沢の約 1/5 程度と少なく、一の瀬は両者の中間であった。培地別では  $IBA5 \times 10^{-6}M + KIN10^{-6}M$  が発根カルスおよび発根数ともに最多を示し、移植カルスの半数以上が発根している。これに反し、

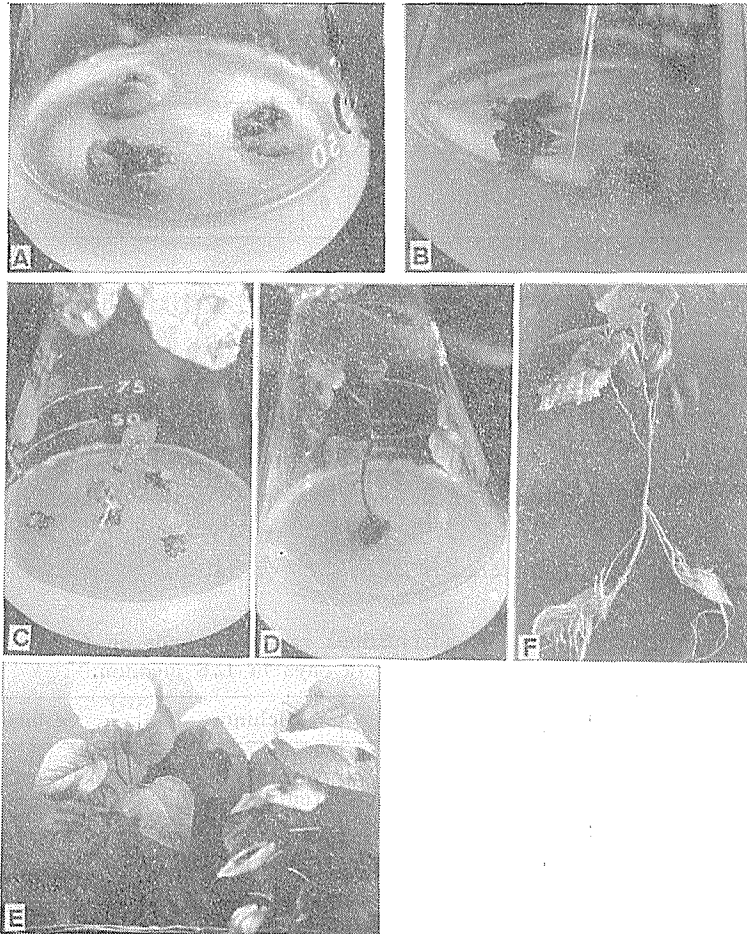


Fig. 1 Development of plantlet from adventitious bud formation on cultured callus of hypocotyl in mulberry.  
 A : Callusing from hypocotyl.  
 B : Formation of adventitious bud from cultured callus.  
 C : Formation of adventitious roots from basal adventitious bud.  
 D : Plantlet from adventitious bud formation.  
 E, F : Plantlet developing into water culture.

NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M 培地は水沢を除き発根カルスは移植カルスの約 1/3~1/5 程度であった。また、NAA $5 \times 10^{-7}$ M+KIN $5 \times 10^{-6}$ M はこの中間であった。

不定芽の形成は置床後70日目の段階では、NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M 培地の一の瀬と清十郎カルスからそれぞれ1または4個体が認められた。清十郎は一の瀬に比べて不定根の形成は少ないが、不定芽の形成数は多い。この現象は不定根と不定芽とが形成段階のある時点まではかなり独立的な関係にあることを示唆しているものと推定される。

不定芽が形成されたカルスは、淡褐色の色調を呈したCカルスであり、その増殖速度は低いものであった。クワと近縁種であるコウゾ (*Broussonetia kazinoki*) において観察された<sup>10)11)</sup>ように、不定芽の分化はCカルスであったこと、およびカルス増殖の緩慢なことが第一要件で、増殖度が高く、しかもFカルスとなったものからは再分化はみられなかった。

Table 4 Composition of medium with multiple solution.

Major elements	Salt	g/10 $\ell$
A solution	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	707.58
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	240.15
B solution	KNO <sub>3</sub>	202.15
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	272.18
C solution	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	493.00
D solution	FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·5H <sub>2</sub> O	153.00
Minor elements		mg/10 $\ell$
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1855.20
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.56
	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2050.70
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.67
MA solution	KI	33.20
	SnCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	33.84
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	28.12
	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	26.28
	KBr	23.80
	TiCl <sub>4</sub>	531.92
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O
MB solution	BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36.64
	CdCl <sub>2</sub> ·2.5H <sub>2</sub> O	9.14
	K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	29.14
	KF	5.82
	HgCl <sub>2</sub>	5.44
	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.94
	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	7.28

These media were maintained at a level of PH 6.2, respectively.

クワと近縁植物であるハリグワ (*Cudrania triloba* HANCE<sup>12)</sup>) の胚軸カルスから不定芽の形成をみているがそこでは同一カルスから約7芽の形成が認められている。クワ下胚軸カルスからの不定芽形成の状態は、同一カルスから1芽のみの発生 (Fig. 1, B) で、他の草本植物にみられる数芽あるいは簇生的に発生する様相は観察されなかった。

本実験においては、不定芽が約1.5cmに達したとき、再分化培地からカルスとともに L.S+NAA $5 \times 10^{-7}$ M (オーキシン単独) 培地に移し、16L8Dの光周条件で培養を続けた結果、やがて不定芽形成の基部から発根し (Fig. 1, C), 次第に細根を分岐しつつ完全な個体に生長することができた (Fig. 1, D)。

これらの個体が約15cmに生長したとき、大形フラスコよりとり出し、多量要素培養液 (Table 4) による水耕法でプラントルックス蛍光灯を用いて明条件のまま培養を続行した結果、良好な伸長がみられ (Fig. 1, E, F), 母樹清十郎 (種子発芽により育成したもの) と全く相似の個体が育成された (Fig. 1, E)。

### 3.2 培養カルスの組織観察

不定芽の分化がみられたL.Sの再分化培地における清十郎の培養カルスについて、16L8D, 24D区ごとにその内部組織を鏡検し、不定芽分化の状態を調べた。

その結果、生長調節剤の濃度とカルスの性状は16L8Dの場合、KIN, BA, Aの濃度別組合せによりカルスの色調、性質に差が認められた (Table 5)。

Table 5 Characteristic of callus by concentration of growth regulators in L.S medium maintained in 16L8D.

Medium No.	Concentration				Feature		Feature of callus cells*		Note
	NAA	KIN	BA	A			No. of cells	No. of -shape like tracheid	
1	0 <sup>M</sup>	10 <sup>-6</sup> <sup>M</sup>	<sup>M</sup>	<sup>M</sup>	G>W	C>F	81	120	
2	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>			G>W. Y	C>	97	90	Root formation
3	2 × 10 <sup>-6</sup>	2 × 10 <sup>-6</sup>			Y. W>G	C. F	75	36	
4	5 × 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>			Y. W>G	F. C	89	76	
5	0	10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-5</sup>	G. B	C>F	117	55	
7	5 × 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>		10 <sup>-5</sup>	Y. W>G	F	51	18	
8	10 <sup>-7</sup>	3 × 10 <sup>-7</sup>			G	C	98	69	
9	5 × 10 <sup>-7</sup>	5 × 10 <sup>-7</sup>			G>W	C>F	92	78	
B <sub>1</sub>	0		10 <sup>-6</sup>		G	C	90	115	
B <sub>2</sub>	0		10 <sup>-7</sup>		G>W. B	C>F	88	113	

Callus feature. G : Green W : White Y : Yellow B : Brown  
C : Compact callus F : Friable callus \* : No./0.0134mm<sup>2</sup>

すなわち、NAA については無添加もしくは比較的低濃度 ( $10^{-7}M$ ,  $5 \times 10^{-7}M$ ) で KIN が  $10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}M$ , また BA が  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}M$  程度の組合せにおいては、緑化(G)した外見上固いCカルスとなる傾向を示した(培地 No. 1, 5, 8, 9, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>)。また NAA, KIN とともに高濃度(前者  $2 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}M$ , 後者  $10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-6}M$ )の組合せ培地 (No. 3, 4, 7) に A の  $10^{-5}M$  を添加した培地 (No. 7) は、カルスの色調が黄白色化し、また柔いFカルスとなる傾向がみられた。

Cカルスになるとカルス細胞の配列が密になるため (Fig. 2, A), 単位面積内(一視中)の細胞数は多くなった。また、細胞数の増加に伴いカルス細胞中に形成された仮導管様細胞数も増加する傾向が観察された (Fig. 2, C)。とくに NAA 無添加の KIN  $10^{-6}M$ , BA  $10^{-6}M$ , BA  $10^{-7}M$  の単独培地 (No. 1, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) の場合にその傾向は顕著であった (Table 5)。

Fカルスでは、カルス細胞の配列が粗く (Fig. 2, B), 一視野中の細胞数は少なく、仮導管様細胞数もまた少なかった。ことにA添加の No. 7 培地 (NAA  $5 \times 10^{-6}M$  + KIN  $10^{-6}M$  + A  $10^{-5}M$ ) の場合は少なく、代表的な特性を示した (Table 5)。

全暗条件 (24D) の場合 (Table 6), カルスの性質は L.S + NAA  $5 \times 10^{-7}M$  + KIN  $10^{-6}M$  培地 (No. 4') を除きCカルスを生じる傾向が強く、不定根および不定芽を形成させた。

Table 6 Characteristic of callus by concentration of growth regulators in L.S medium maintained in 24D.

Medium No.	Concentration			Characteristic	Feature of callus cells*		Note
	NAA	KIN	A		No. of cells	No. of shape like tracheid	
1	0 <sup>M</sup>	$10^{-6}$ <sup>M</sup>	<sup>M</sup>	C > F	60	22	
3	$2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$	$10^{-5}$	C · F	155	153	Root formation
4	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$		C > F	89	93	Root and Bud formation
4'	$5 \times 10^{-7}$	$10^{-6}$		F · C	47	30	
9'	$5 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-6}$		C > F	93	101	Root and Bud formation
11	$10^{-7}$	$10^{-7}$		C > F	188	309	Root formation

\* : No. / 0.0134mm<sup>2</sup>

不定根分化の多い NAA  $2 \times 10^{-6}M$  + KIN  $2 \times 10^{-6}M$  + A  $10^{-5}M$  および NAA  $10^{-7}M$  + KIN  $10^{-7}M$  培地 (No. 3, 11) では、単位面積あたりの細胞数ならびに仮導管様細胞数は極めて多かったが、不定芽の分化は認められなかった。

不定芽の分化が観察された L.S + NAA  $5 \times 10^{-6}M$  + KIN  $10^{-6}M$  および NAA  $5 \times 10^{-7}M$  + KIN  $5 \times 10^{-7}M$  培地 (No. 4, 9') におけるカルスの性質は、黄淡褐色の色調を呈し、

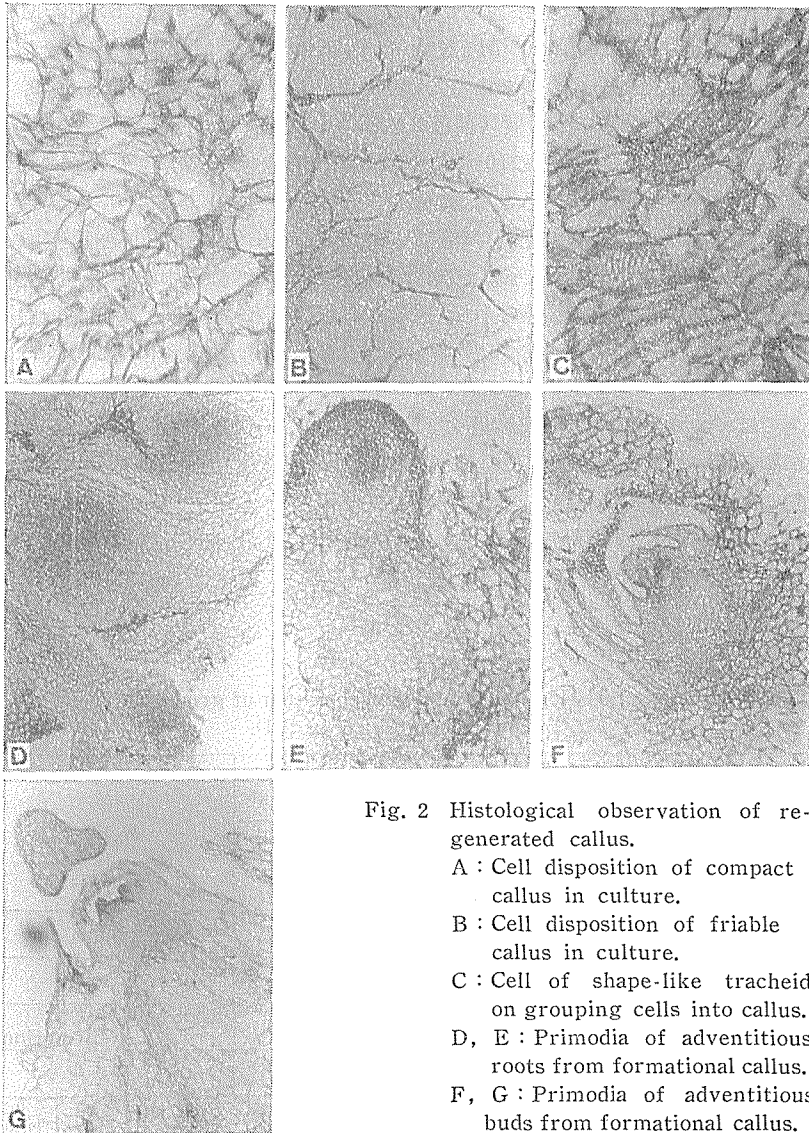


Fig. 2 Histological observation of re-generated callus.

- A : Cell disposition of compact callus in culture.  
 B : Cell disposition of friable callus in culture.  
 C : Cell of shape-like tracheid on grouping cells into callus.  
 D, E : Primordia of adventitious roots from formational callus.  
 F, G : Primordia of adventitious buds from formational callus.

Cカルスが大半を占め、部分的にFカルスが混在し、細胞の配列が密で一定面積当りのカルス細胞数も多く、仮導管様細胞の形成数もまた多かった。

光条件が16L8Dにおける  $NAA5 \times 10^{-6}M + KIN10^{-6}M$  の場合（培地 No. 4）は、カルスの性質はやや緑化しF, Cカルスの占有割合は約半数ずつで、多少はFカルス化し易い傾向にあり、不定根および不定芽の分化は全くみられない状態であった。不定芽がみられた24Dの培地 No. 4, 9' は、培地組成は同一であるが、光条件を異にしている。このように光条件の変化により不定根、不定芽形成にかなりの差を生じる点は注目に値する。



したがって、クワの培養カルスからの再分化（根、芽）には全暗条件（24D）が決定的条件とはいえないまでも極めて重要な因子であると考えられる。

また、Fig. 2, Dにみられるように、カルス細胞群中に染色度の高い仁を伴った不定根形成の原基である分裂組織の像（Fig. 2, E）、および茎頂の分裂組織である不定芽の原基像（Fig. 2, F, G）が観察され、再分化の様相が鮮明であった。これら不定芽の原基は、カルス表面における周辺分裂組織<sup>13)</sup>にドーム状の1対の葉原基から形成されたものであることが認められた。

以上、培養カルスからの再分化に関し、カルス細胞の状態、とくに単位面積内における細胞数と仮導管様細胞の形成数とは何等かの平行的關係があることが示唆された。Fig. 3に示されているように再分化に影響を与える24D（全暗条件）における不定根分化の多い培地（No. 3, 11）のカルスでは細胞数、仮導管様細胞数ともに最大値をとり、ことに No. 11 (L.S+NAA $10^{-7}$ M+KIN $10^{-7}$ M) の場合、仮導管様細胞の発達が顕著である

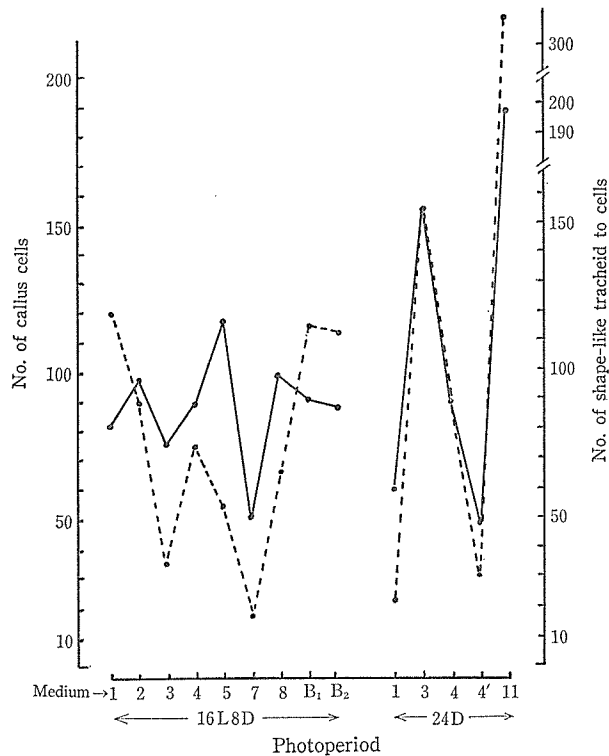


Fig. 3 Effect of different media on numbers of cell and shape-like tracheid cell in regenerated callus (for limited measure).  
 — : No. of callus cells.  
 - - - : No. of shape-like tracheid to cells.

ことが明白である。これに反し分化のみられなかった No. 1 (L.S+NAA free+KIN  $10^{-6}$ M), No. 4' (L.S+NAA  $5 \times 10^{-7}$ M+KIN  $10^{-6}$ M) 培地は細胞数, 仮導管様細胞数ともに少なく, とくに細胞数に比べ仮導管様細胞数が極めて少ないことが注目される。

不定芽が形成された No. 4, No. 9' 培地においては, 細胞数と仮導管様細胞数とも両者間の差が少ない傾向にある。また再分化の余りみられなかった16L8D区では, 概して細胞数は多いが, 細胞数と仮導管様細胞数間の差には一定の傾向がみられなかった。

### 3.3 育成クワ個体の染色体数

不定芽形成から馴化育成したクワ個体について, 根端における体細胞染色体を, ホイクルゲン核染色および酢酸オルセイン法により観察した。

その結果, 培養カルスにみられる倍数性および異数性細胞より再分化された染色体数の変異は観察されず, いずれの細胞においてもその体細胞染色体は  $2n=28$  を算えることができ, かつ分裂も正常であり, 2倍体であることが確認された (Fig 4)。

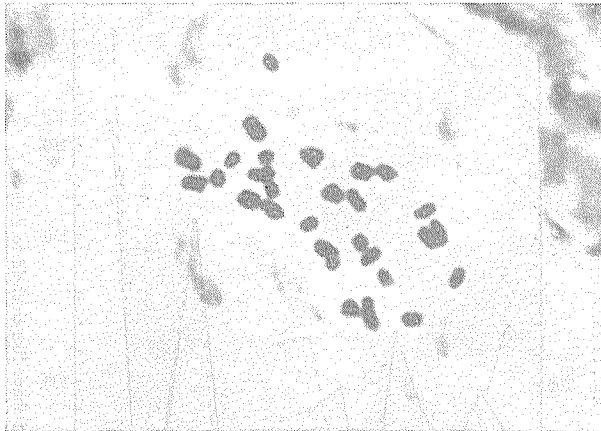


Fig. 4 Chromosome numbers ( $2n=28; 2x$ ) of developmental plantlets from regenerated callus in culture (Seijuro).

## 4. 考 察

クワの培養カルスから不定芽の形成をみるまでの実験に供試されたエキsprantは, 多くの場合, 主として新梢や枝条に由来したものであった。すなわち, クワカルス培養においては従来, 主として枝条および新梢, 葉柄, 葉身および古条の木部よりのエキsprant<sup>2)3)4)5)6)</sup>, をそれぞれ供試した。しかしながら, いずれも誘導されたカルスから再分化されたものは不定根のみで, 不定芽の分化はみられなかった。

クワ培養カルスからの発根は, 一般的にヤマグワ系品種に多く, ログワ系品種に少なく, カラヤマグワ系品種はその中間的傾向を有している。事実, 前報<sup>1)</sup>のヤマグワ系の島の内, 剣持などのカルスからの発根数は他品種に比較して著しく多い。さらに桑樹萎縮

病抵抗性品種とカルス発根性との関係を調査した場合<sup>14)</sup>においても、カルスの形成量と発根数との関係は平行的で、第2次カルス形成の多い水沢、水内桑（ヤマグワ系品種）は発根数多く、カルス形成量の少ない魯八、赤芽魯桑、収穫一（ログワ系品種）は発根数が極めて少なかった。またカラヤマグワ系品種の鼠返はその中間であった。このことから、発根性の難易が品種的特性として考えられた。

培養カルスにおけるオーキシンとサイトカイニン濃度のバランスにより分化型（根、芽）に差異の生ずることは、タバコ髓カルスにおける実験<sup>15)</sup>から明らかにされているが、クワ胚軸カルスにおける不定根分化のためのオーキシン濃度は  $5 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$ 、サイトカイニン濃度は  $5 \times 10^{-7} \text{M} \sim 10^{-6} \text{M}$  程度であると考えられた。これに関し、桑条カルス培養において M. S+IAA(NAA)0.2ppm ( $\equiv 1.1 \times 10^{-6} \text{M}$ )+KIN 0.02ppm ( $\equiv 10^{-7} \text{M}$ ) が適当である<sup>5)</sup> 場合、または M. S+IAA 2.0ppm ( $\equiv 1.1 \times 10^{-5} \text{M}$ )+KIN 0.1ppm ( $\equiv 5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 培地において新梢、葉柄、古条からのカルスでは殆んど発根せず、葉身、子葉、胚軸などのカルスでは著しい発根が認められている。いずれにせよ、上記オーキシンならびにサイトカイニンの濃度別組合せの範囲内では、エキスプラントの如何にかかわらず不定根分化に限定するならば、オーキシンは  $5 \times 10^{-7} \text{M} \sim 3 \times 10^{-6} \text{M}$  サイトカイニンは  $5 \times 10^{-7} \text{M} \sim 10^{-6} \text{M}$  程度として差し支えないと考える。

このような試料採取の条件、品種的特異性による制約、培地の組成、濃度などの相異が結果的に不定芽形成を成功に導かなかつたのではないかと考えられる。

この困難視されたクワ培養カルスよりの不定芽形成の追究に当ってクワ近縁種であるコウゾにおける不定芽形成の結果<sup>11)</sup>およびクワにおける予備実験の結果にもとづき、つぎの方法をとった。

- (1) 材料として新梢または枝条のカルスを用いる代りにクワ下胚軸カルスを用いる。
- (2) 供試品種は採種母樹にヤマグワ系として水沢、カラヤマグワ系として一の瀬、ログワ系として清十郎を選び、その交雑種子を用いる。
- (3) 基本培地は従来用いてきた Murashige & Skoog に代えて Linsmaier & Skoog 培地を用い、それに添加する生長調節剤のオーキシン・カイネチンバランスは  $\text{NAA} 5 \times 10^{-7} \text{M} \sim 5 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $\text{KIN} 5 \times 10^{-7} \text{M} \sim 10^{-6} \text{M}$  の範囲とする。
- (4) 光条件は全期暗状態とする。

これら設定した4項の条件のもとに反復実験の結果、継代2代目の清十郎、継代3代目の一の瀬そして継代5代目の水沢において困難視されていた不定芽の形成にはじめて成功した。

なお、本不定芽形成実験に関連して山本・中西<sup>16)</sup>は子葉または胚軸を用い、筆者の用いた再分化培地 (L. S+NAA $5 \times 10^{-6} \text{M}$ +KIN $10^{-6} \text{M}$ ) と山本・中西のD培地 (L. S+2.4-D 10ppm ( $\equiv 4.5 \times 10^{-5} \text{M}$ )+KIN 0.1ppm ( $\equiv 5 \times 10^{-7} \text{M}$ )) を用いて不定芽形成の比較実験を行なった結果、種子から誘導した清十郎、剣持において、筆者の場合と同一培地で継代3代目カルスにおいて不定芽の形成を認めた。また、魯桑および剣持の子葉から誘導したカルスを筆者の場合と同一の培地に移植し培養したところ、前者で40日目、後者で80日目に不定芽の形成が認められたことから、山本はこの L. S+NAA $5 \times 10^{-6} \text{M}$

+KIN $10^{-6}$ M 培地は不定芽形成を起し易い条件を具えていると報告している。培養カルスから不定胚、不定芽および不定根を分化させるための条件として<sup>17)</sup>、(a) オーキシンの濃度を下げるか、培地からオーキンを除く。(b) 2,4-Dを NAA または IAA に代える。(c) サイトカイニン類を加える。(d) ジベレリンを加えない。(e) チッソその他の塩濃度を高くする。(f) 長く継代培養したカルスを使用しない。などが有効であるとのべている。筆者の用いた NAA および KIN 濃度を  $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6}$ M 並びに  $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}$ M においたこと、L. S 培地はチッソ量が高い点など、再分化培地として使用した一連の組成は、たまたまこれらの条件に適していたといえるかもしれない。

不定芽形成数は、清十郎が一の瀬、水沢より断然多いが、不定根発生数は逆に水沢が断然多く、清十郎は少ない。このことは品種という遺伝的な差異に支配された反応であり、クワの生長速度とも関連していることは察するに難くない。

一面においてクワが生育するにつれて全能性 (totipotency) が変化しつつあることもうかがえる。すなわち、枝条、新梢といっても桑樹の1個体としてみれば、細胞の増殖能、分化能は極めて明確な方向に向っているが、それだけにかなり小さく、逆に下胚軸は未分化であり、細胞の増殖能も極めて大きいことを明解に表わしていると考えられる。

木本植物であるクワの培養カルスから不定芽の分化に成功したということは、草本植物でのカルス培養と同様、ひとり細胞分化の研究面にとどまらず、クワの生理学、さらには育種的应用面などに寄与することが考えられる。

## 5. 摘 要

従来、クワ培養カルスからの器官再分化は極めて困難視されていたが、本実験は下胚軸の培養カルスから不定芽を形成させ、再分化によるクワ個体を育成することができた。

その結果はつぎのように要約される。

(1) 不定芽が形成された再分化培地は、従来の M. S 培地から L. S 培地に代えたもので、その生長調節剤濃度は、a. NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M, b. NAA $5 \times 10^{-7}$ M+KIN $5 \times 10^{-6}$ M, c. IBA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M の3種である。このうち NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M が最も良好であった。

(2) 不定芽形成をみた培養カルスは、暗条件の培養による C カルスで、不定根を分化したものは不定芽の分化が少なく、両者の関係は反対象的であった。

(3) 不定芽の形成は、カルス表面の周辺分裂組織の葉原基から分化したものと組織観察から推定された。

(4) 育成されたクワ個体の体細胞染色体数は  $2n=28$  で、2倍体であることが確認された。

## 謝 辞

本研究を行うに当たり、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) 押金健吾 : Jou. Fac. Text. Sci & Tech., Shinshu Univ., No. 107, Ser. E, Agri. and Seric., No. 11, pp. 13-39, 1989
- 2) 岡 成美・大山勝夫 : 日蚕雑, 42, 4, 317-324, 1973
- 3) 岡 成美・大山勝夫 : 日蚕雑, 45, 5, 385-391, 1976
- 4) 南沢吉三郎・平野 久 : 日蚕雑, 43, 1, 94-97, 1974
- 5) 関 博夫・武田正男・堤 和敏・宇敷義道 : 日蚕雑, 40, 2, 81-85, 1971
- 6) 山本有彦・蒲田昌治 : 京都工芸織大繊維学部研究報告, 6, 2, 108-121, 1971
- 7) 押金健吾 : 日蚕学会, 43回講要, 87, 1973
- 8) 押金健吾 : 日蚕学会, 44回講要, 108, 1974
- 9) Linsmaier, E.M. & Skoog, F. : *physiol. plant.*, 18, 100-127, 1965
- 10) 岡 成美・大山勝夫 : 育種学雑, 23, 別冊, 2, 10, 1973
- 11) 押金健吾 : 日蚕学会中部講要, XXIX, 22, 1973
- 12) 関 博夫・武田正男 : 日蚕学中部, XXXI, 17, 1975
- 13) 中野 寛・前田英三 : 日作紀, 43, 151-160, 1974
- 14) 関 博夫・押金健吾 : 日蚕雑, 38, 3, 249-259, 1969
- 15) Skoog, F. and Miller, C.O. : *Symp. soc. Expt. I. Biol.*, 11, 118-131, 1957
- 16) 山本有彦・中西節子 : 京都工芸織大繊維学部研究報告, 8, 2, 1-6, 1977
- 17) 前田英三 : 日作紀, 41, 2, 269-283, 1972

## Summary

Studies on Formation of Adventitious Bud and Growth of Plantlet in the Hypocotyl Callus of Mulberry.

Kengo OSHIGANE

Attached Facility in Experimental Farm, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda 368, Japan.

In this experiment, an account is given by results on the effect of adventitious bud in cultured callus of hypocotyl. And thenceforth the plantlets by the redifferentiation were developed into the adventitious bud.

The results obtained are summerized as follows.

1. Linsmaier and Skoog medium (L.S medium) to develop into adventitious bud from the callus of hypocotyle was more succesful for this experiment than M.S medium. In the case of callus culture each compound of plant growth regulator added to L.S medium was

NAA $5 \times 10^{-5}$ M+KIN $10^{-6}$ M, NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $5 \times 10^{-7}$ M and IBA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M, in which the medium with NAA $5 \times 10^{-6}$ M+KIN $10^{-6}$ M had made remarkably to develop adventitious bud.

2. The cultured callus with a capacity of developing adventitious bud was C-callus that had been propagated under dark condition. C-callus displayed, however, that the more the adventitious root became, the smaller the adventitious bud did, and *vice versa*.

3. It would be suggested that the occurrence of adventitious bud was differentiated from a leaf primordia in the peripheral meristem on the exodermis of callus.

4. In this experiment, the chromosome numbers in each of somatic cells in plantlet were *in vitro* constituted  $2n=28$ . These cells, therefore, were the diploid chromosome number.

正 誤 表

誤

正

13p	上から11行目	である。コウゾ	であるコウゾ
47p	上から17行め	〇カルス	Cカルス
52p	下から11行目	C.	c.