

クワの芽の分離培養に関する研究 III

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
著者	岡, 成美 大山, 勝夫
巻/号	47巻1号
掲載ページ	p. 15-20
発行年月	1978年2月

クワの芽の分離培養に関する研究

Ⅲ. 冬芽からの茎葉展開におよぼす寒天濃度, pHおよび糖の影響

岡 成 美・大 山 勝 夫

杉並区和田・農林省蚕糸試験場(〒166)

(1977年4月27日受理)

岡・大山(1974)は、クワ冬芽の分離培養における冬芽からの茎葉展開におよぼす生長物質の効果を調べ、MURASHIGE・SKOOGの基本培地にサイトカイニンとしてベンジルアデニンを加えた培地を用いると茎葉展開がみられることを明らかにした。また、冬芽の培養における品種間差異についても同時に検討し、品種によって茎葉の展開程度が異なることを示した。

冬芽の培養法を種々の目的に応用するためには、広範囲な品種について培養可能な条件を確立する必要があるが、そのためには上記の培養条件ではなお不十分であると考えられたので、前報以後培地条件を種々検討してきたが、寒天濃度、培地のpH、糖の種類が冬芽の生長に影響すること、およびこれらの条件を適当なものとすることによって、広範囲の品種において冬芽から茎葉を展開させうるようになったので報告する。

材 料 と 方 法

培養に用いた材料は剣持、一ノ瀬ほか数品種で、1~3月には場から採取した枝条を2.5℃に冷蔵し、随時取出して実験に用いた。冬芽の培地への植付けは前報(岡・大山, 1974)と同様の方法で行った。

培養液はMURASHIGE・SKOOG(MS)の基本培地を用い、サイトカイニンとしてベンジルアデニン(BA) 1.0mg/lを加えた。炭素源として通常3%の濃度で各種の糖を加え、さらに種々の濃度の寒天(和光純薬製)を加えたが、詳細は結果の項で述べ

ることとする。培養容器には100mlの3角フラスコを用い、30mlの培養液を入れ、120℃で15分間高圧滅菌を行った。

冬芽は1フラスコあたり2個ずつ置床し、各試験区とも5フラスコ、合計10個体の冬芽を供試した。

培養は28℃、1日12時間蛍光灯による人工照明(4,000ルクス)下で、4~6週間にわたって行い、そののち培養期間中に展開した茎、葉の生重量および茎長を測定した。

結 果 と 考 察

1. 培地の寒天濃度およびpHが茎葉展開におよぼす影響

大山・岡(1976)はクワの伸長中の茎頂組織の培養において、寒天濃度が茎葉展開に著しい影響をおよぼし、寒天濃度が低いほど茎葉の生長が良好なことを報告した。そこで、冬芽の培養においても茎頂組織の場合と同様に寒天濃度が茎葉展開に影響するかどうかを検討した。

シュクロース3%を加え、pHを5.6に調整したうえ、0.2、0.4、0.6、0.8および1.0%の濃度で寒天を加えた培地を作成した。pH 5.6とした場合の寒天濃度と培地の固さの関係をみると、寒天濃度0.6%以上では培地はフラスコ壁に固着するのに対し、0.2%では培地がゾル状を呈し、0.4%ではその中間でフラスコを傾斜させると培地はフラスコ壁から分離した。

上記の培地を用いて剣持および一ノ瀬の2品種を

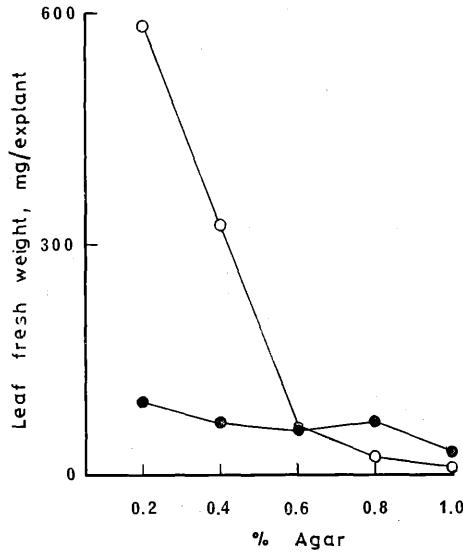


Fig. 1. Effect of agar concentration on leaf development from mulberry winter bud of two varieties. Medium; MS+1.0mg/l BA, pH=6.0, 3% Sucrose. culture period; 40 days.
 ○—Kenmochi
 ●—Ichinose

材料とし冬芽培養を行った。その結果は Fig. 1 に示すとおりで両品種で異なる結果がみとめられた。すなわち、剣持では寒天濃度が茎葉展開に大きな影響をおよぼし、0.6% 以上では茎葉の展開速度がゆるやかで展開量も少なく、特に1%では小型の葉が

わずかに展開したのみで茎の伸長はみられずに全体がまもなく黄変した。一方、0.2~0.4% の低濃度では、冬芽からの茎葉展開が良好で、多くの個体では1個の冬芽から数本のシュートが伸長した (Fig. 2)。これに対し、一ノ瀬ではいずれの寒天濃度においても葉の展開は少量で茎の伸長は全くみられなかった。

前報 (岡・大山, 1974) において、剣持は茎葉をよく展開するのに対し、一ノ瀬では茎葉展開がみられないことを報告したが、その際に用いた寒天濃度は0.8% であった。剣持についてみると、今回の実験では寒天0.8% では前報の場合にくらべて茎葉展開量が、かなり少ないが、これは主に調査方法の相違によっている。すなわち、前報では茎と葉を合わせて秤量したため、肥厚した茎の基部の重量が含まれているのに対し、今回は葉のみの重量でしかも展開後褐変枯死した葉の重量は除かれている。一方、一ノ瀬については前報と同様に茎葉の展開がきわめて悪く、しかも寒天濃度を低めても生長促進がみられなかった点で、やはり剣持とは異なるタイプの品種であると考えられた。

剣持についてみられた寒天濃度と茎葉展開との関係は、茎頂培養 (大山・岡, 1976) の場合の結果と一致しており、このことから一般に芽の培養には低濃度の寒天を加えた柔い培地が適しているといえる。

培地の固さは寒天濃度のみでなく培養液の pH に

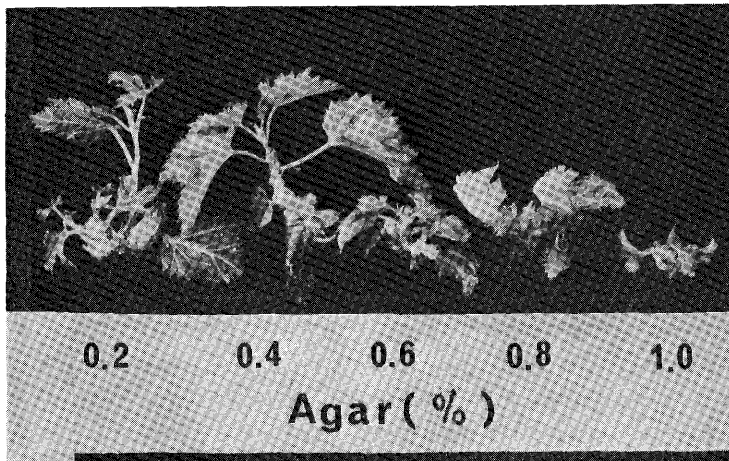


Fig. 2. Agar concentration and shoot development from cultured winter bud (Var. Kenmochi), culture period; 40 days.

よっても変化する。すなわち、pH が低いほど培地がかたまりにくい。そこで、1N の HCl と 1N の NaOH を用いて、培養液の pH を 3.4, 4.0, 5.0, 6.0 および 7.0 (高圧滅菌前) に調整し、これに 0.4% と 0.8% の寒天を加えて種々の固さの培地を作成した。滅菌後の培地の性状は次のとおりである。pH 3.4 では寒天がすべて沈んで培地は全く固まらなかった。寒天 0.4% の場合、pH 4.0~6.0 では培地は粘度の高い液状となりフラスコ壁に固着せずいわゆるゾル状を呈した。pH 7.0 で培地はゲル化し、ゼリーを形成してフラスコ壁に固着した。寒天 0.8% の場合、pH 4.0 ではゾル状であり、pH 6.0 以上でゲル化し、pH 5.0 ではその中間の性状を示した。

これら 10 種類の培地に剣持の冬芽を植付け、4 週間後に各区における茎葉の展開程度をみたのが Fig. 3 である。まず、pH 3.4 では冬芽が完全に液体中に沈みこんでしまい、そのままの状態全く生長しなかった。つぎに、pH 4.0~7.0 ではいずれの pH においても、寒天 0.4% 区の方が 0.8% 区よりも茎葉展開量が多かった。一方、同じ寒天濃度では、pH 6.0~7.0 区よりも pH 4.0~5.0 区の方が茎葉展開量が多かった。

寒天濃度と茎葉展開の関係について、大山・岡 (1976) は ROMBERGER・TABOR (1971), STOLTZ

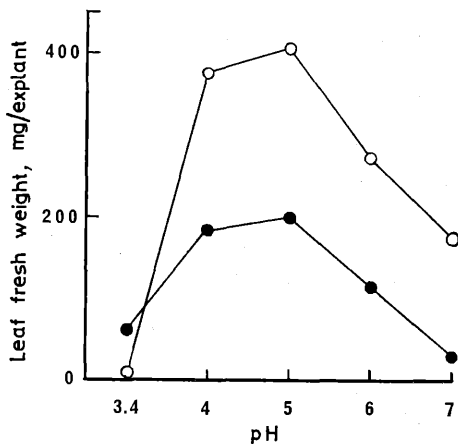


Fig. 3. Effect of medium pH on the leaf development from cultured winter bud with two agar concentrations.

Medium; MS+1.0mg/l BA, 3% Sucrose.
Variety; Kenmochi, Culture period; 30 days.
—○— 0.4% Agar
—●— 0.8% Agar

(1971) の報告を引用して、低濃度の寒天培地上で茎頂組織の生長が良好であるのは、物質の移動性や水分の利用のされかたが原因として考えられることを述べている。培養冬芽からの茎葉展開過程を観察すると、ゾル状の培地では、最初に展開した葉が培地中に部分的に沈みこんで生長し、その結果葉面積の拡大が早く進行する場合がしばしばみられ、このように葉面をとおしての養分吸収が容易になることも 1 つの理由として考えられる。

培地の pH が培養物の生長におよぼす影響には、pH そのもののいわば化学的な効果と培地の固さの変化をつうじてのいわば物理的な効果とがある。上記の実験は後者に着目して行ったものであるが、pH そのものの直接的な影響については培地の粘度を一定にしながら pH を変化させる実験区を設ける必要があり、これは今後に残された課題である。しかし、少なくとも冬芽培養の場合、寒天濃度が 0.4~0.8% の場合、組織培養における培地の pH として通常用いられる 5.0~6.0 よりも低い値でも十分な茎葉展開がみられることは明らかである。

2. 糖の種類が茎葉展開におよぼす影響

MS+BA 1.0mg/l 培地に 6 種類の糖(シュクロース、グルコース、フラクトース、ラクトース、マルトース、ガラクトース)をそれぞれ 3% の濃度で加えた培地を作成した。なお、培地の pH は 5.6、寒天濃度は 0.4% とした。これらの培地に一ノ瀬冬芽を植え付け、30 日間培養した。その結果は Figs. 4, 5 に示すとおりである。ガラクトースは全く利用されず冬芽は植付け後まもなく枯死した。シュクロースおよびラクトースでは、培養期間をつうじて、冬芽は緑色を保っていたが、わずかの葉が展開したのみで茎の伸長はみられなかった。一方、グルコースとマルトースでは、若干の個体で茎葉が展開した。茎葉展開に最も効果的であったのはフラクトースで、葉の展開、茎の伸長ともに他の糖にくらべて最も良好であった。つぎに、フラクトースとシュクロースの濃度を 1.3, 5% とした区を設けて一ノ瀬冬芽の培養を行った結果、シュクロースではいずれの濃度でも茎葉の生長がみられず、フラクトースでは 3% 区において最も旺盛な茎葉展開がみられた。

前報において、糖としてシュクロースを用いた場合に茎葉の展開程度によって 3 つのタイプの品種があり、茎葉をよく展開する品種 (A 型: 剣持など)、

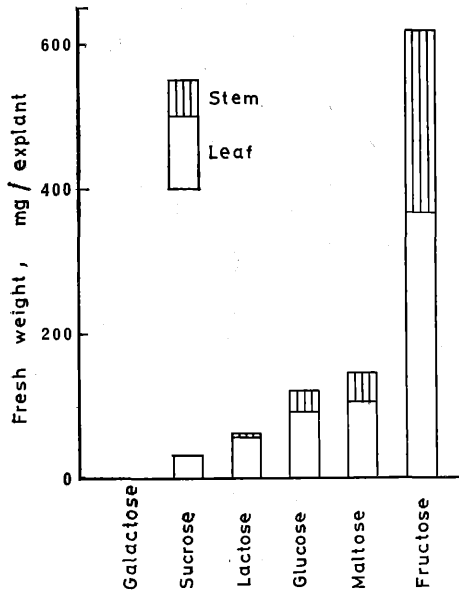


Fig. 4. Effect of sugars on shoot development in cultured winter bud of 'Ichinose'.
The concentration of each sugar is 3%.
Medium; MS+1.0mg/l BA, 0.4% agar.
Culture period; 35 days.

ある程度の葉が展開するが茎の伸長しない品種（B型：市平など）および葉の展開がほとんどみられない品種（C型：一ノ瀬など）がみとめられることを報告した。上述の実験から、代表的なC型品種である一ノ瀬についても糖としてフラクトースを用いることにより、A型品種と同様に茎葉を展開させることが可能になったわけである。そこで一ノ瀬以外の品種についてフラクトースの効果を明らかにするため Fig. 6 に示す品種を用いて冬芽培養を行った。その結果、フラクトースはいずれの品種についても茎葉展開をきわめて促進した。すなわち、A型品種（剣持、島ノ内）ではシュクロース培地でも茎葉展開がみられたが、フラクトース培地ではいっそう生長が促進され、一方B、C型品種（市平、ふかゆき、魯八）においてもフラクトース培地で培養することにより茎葉が展開した。

フラクトースの冬芽からの茎葉展開に対する効果は、培養のかなり初期の段階に顕著であると考えられる。それは、フラクトース培地で展開した一ノ瀬の茎頂部を切取ってシュクロースまたはフラクトースを加えた培地に再度移植すると、その後の茎葉の生長はいずれの糖を加えた培地でもほぼ同程度であったことからもうかがえる。このことは、一たん茎葉が展開した後には、その後の茎葉展開に対してフ

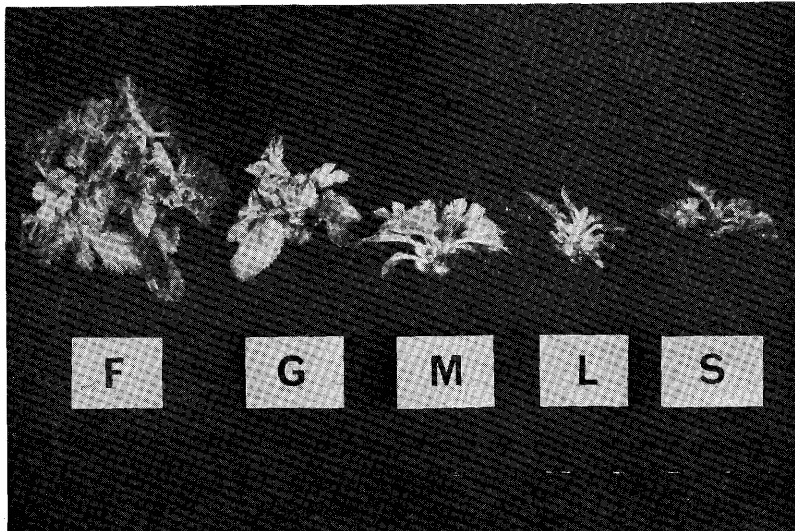


Fig. 5. Shoot development from cultured winter bud (var. Ichinose) on media containing various kinds of sugar (3%).
F; Fructose, G; Glucose, M; Maltose, L; Lactose, S; Sucrose.
Culture period; 35 days.

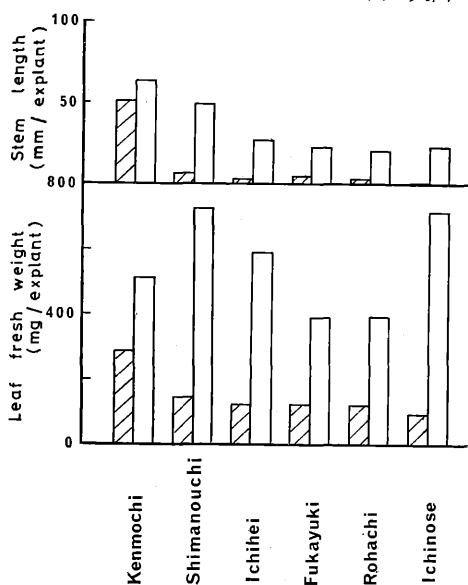


Fig. 6. Effect of sucrose and fructose on the shoot development from cultured winter bud in several mulberry varieties.

□ Sucrose, □ Fructose

ラクトースとシュクロースのいずれもが利用されることを示している。

カルス培養においてはフラクトースがシュクロースと同程度の効果を示す例がいくつか知られている(庄野, 1972)が, 器官培養においてフラクトースが顕著な生長促進を示す例はないようである。冬芽培養におけるフラクトースの効果は, おそらくフラクトースと他の糖の間に培地から冬芽への取りこみまたは糖代謝における利用のされやすさに差があることによるものと考えられる。フラクトースの利用のされやすさという点に関して, 柏田(1955)は興味ある報告をしている。すなわち, 彼はクワの条に含まれる遊離糖の時期的変化を調べ, クワの生育期間中および春の萌芽期にはフラクトースが条中にあまり存在しないのに対し, 秋末から冬期にかけては増加することから, フラクトースが最も良好な呼吸源であると述べている。培養液中に炭素源として加えられたフラクトースと上記の結果には関連があると考えられるが, フラクトースの効果についての詳

細な検討は今後に残されている。

以上の実験結果から, 培地の寒天濃度を下げることおよび糖としてフラクトースを用いることによって, より多くの品種について安定的にしかも早い速度で培養冬芽から茎葉を展開させうることが明らかになった。

摘 要

クワ冬芽の分離培養における培地の寒天濃度, pH および糖の茎葉展開におよぼす影響を調べた。MURASHIGE・SKOOGの基本培地に BA 1.0mg/l を加えたものに, 剣持, 一ノ瀬ほか数品種の冬芽を無菌的に植付け, 4~6週間, 28℃, 12時間蛍光灯による人工照明下で培養を行った。

剣持では培地の寒天濃度が低いほど茎葉生長が良好で, この結果は新梢先端の茎頂培養の場合と同じであった。一方, 一ノ瀬では茎頂では寒天濃度を低めても茎葉展開がみられなかった。

培地の pH は寒天濃度とともに培地の固さに影響し, 低い pH ほど培地が柔らかくなるが, 茎葉展開の良好な pH は 4.0~5.0 であった。

糖の種類は冬芽からの茎葉展開に大きな影響をおよぼし, シュクロース培地では茎葉が展開しない一ノ瀬でもフラクトース培地では茎葉展開がみられた。さらに, 他のいずれの品種においてもフラクトースはシュクロースよりも好結果をもたらした。冬芽からの茎葉展開に対するフラクトースの最適濃度は3%であった。

文 献

- 柏田豊(1955): 日蚕雑, 24, 76-79.
- 岡成美・大山勝夫(1974): 日蚕雑, 43, 230-235.
- 大山勝夫・岡成美(1976): 日蚕雑, 45, 115-120.
- ROMBERGER, J. A. and C. A. TABOR (1971): Amer. J. Bot., 58, 131-140
- 庄野邦彦(1972): 植物組織培養(竹内正幸他編) pp. 468, 朝倉書店, 東京.
- STOLTZ, L. P. (1971): J. Amer. Soc. Hort. Sci., 96, 681-684.

Summary**Studies on *in vitro* culture of excised buds
in mulberry tree****III. Effects of agar concentration, pH and sugars of medium
on the development of shoots from winter buds**

By

Seibi OKA and Katsuo OHYAMA

Winter buds were obtained from field tree branches that had been cut off during January-March and stocked in a cool temperature room (2.5°C) until used for experiments. The buds were surface sterilized, removed of scale, and cultured on the Murashige and Skoog's medium containing benzyl adenine at 1mg/l. Cultures were maintained for 4-6 weeks at 28°C under 12hr daily illumination.

In variety 'Kenmochi', agar concentration of the medium greatly influenced upon shoot development from the bud: the quantity of expanded leaves and stems increased as agar concentration decreased. This result was the same as that of shoot tip culture of mulberry. In 'Ichinose', in contrast, shoots failed to develop even if agar concentration was lowered.

Initial pH (4~8) of the medium also affected the grade of solidity of the medium. The best shoot development was brought about at the lower pH range 4-5, where the medium was loose and soft just as the medium with low concentration of agar.

The development of the shoots from the buds depended on the kind of sugars used as carbon sources. Fructose was much more effective for the development than sucrose which had been most popularly used in tissue cultures. The shoot growth in 'Ichinose' was thus achieved only when fructose was used as a carbon source. In 'Kenmochi', on the other hand, shoots were able to develop on the medium with sucrose. But when fructose was supplied they developed more rapidly and vigorously than when sucrose was used.

(*Sericultural Experiment Station, Suginami-ku, Tokyo* 〒166)