試験管内挿木法を用いたチャの大量増殖 ——腋芽の生育に及ぼす各種ホルモンの効果——

静岡県茶業試験場[†]

中村 順行, 柴田真里子

(平成2年7月23日受理)

Micropropagation of Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) through *in vitro* Cuttings.

——(Effects of Various Hormones on the Growth of Shoots from Axillary Buds)——

Yoriyuki NAKAMURA and Mariko SHIBATA

Shizuoka Tea Experiment Station

1 はじめに

最近、組織培養を利用した大量増殖法の研究が種々の木本植物でも進められている。¹⁾

ツバキ属植物だけに限定しても、子葉やカルスなどから不定胚²⁻⁵⁾及び不定芽⁶⁻⁹⁾を誘導したり、あるいは茎頂¹⁰⁻¹⁴⁾や腋芽¹⁴⁻¹⁶⁾培養などから大量増殖を目的として種々の試みがなされている。

しかしながら、不定胚や不定芽分化に関する報告の大部分は外植片の影響、培養条件や品種間差異などの初代培養系の確立を目指したものである。また、茎頂¹⁰⁻¹⁶⁾や腋芽¹⁴⁻¹⁶⁾培養においても初代培養系の確立や多芽形成^{12, 13, 15, 16)}、その後の発根誘導などについての報告^{5, 10, 15-17)}が大部分であり、継代培養からの増殖を試みたものはツバキでの一報告にとどまる。⁴⁾

そこで、本報ではチャの大量増殖技術を確立するために、外植片として安定的で多量に得られやすい培養幼植物体の腋芽を供試し、増殖方法のひとつである試験管内挿木法により、腋芽の生育に及ぼすホルモンの種類及び濃度を検討し、その最適条件を明らかにしたので報告する。

2 材料及び方法

供試材料は‘やぶきた’子葉から不定胚³⁾を分化させ、その後生育したシュートを用いた。また、このシュートは多量無機成分を1/2に減じたMURASHIGE & SKOOG (1962) (以下1/2 MSとする)

を基本とし、それにインドール酪酸 (IBA) 0.1 mg/l とベンジルアデニン (BA) 1.0 mg/l を添加した寒天 0.75%、ショ糖 3.0% の培地で1年間以上にわたり継代培養を行ったものである。供試材料としての外植片は5 cm 程度に生育したシュートから、Fig. 1 に示すように腋芽のついた節ごとに節間で切り取った大きさ4~7 mm 程度のものとし、各処理区当たり20個程度を試験に供した。

試験に用いた培地はいずれも1/2 MSを基本とした。ホルモンの種類及び濃度として、オーキシンはインドール酪酸 (IAA), IBA, 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を各々0.01~10.0 mg/l の範囲で4段階の濃度、サイトカイニンにはBA, アデニン, カイネチン, イソペンテニルアデニン (2iP) を各々0.01~20.0 mg/l の範囲、7段階の濃度で使用した。また、2iP処理区では添加濃度を高めるにつれシュートの生育が促進されたため、再度0.01~50.0 mg/l の範囲、9段階の濃度で添加効果を確認した。さらに、ホルモン類の組合せとしてIBA (0.01, 0.1, 1.0 mg/l) + BA (0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/l) + ジベレリン ((GA₃) 5.0 mg/l), BA (1.0, 5.0, 10.0 mg/l) + カイネチン (1.0, 5.0, 10.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l) 及びBA (0.1, 1.0 mg/l) + 2iP (5.0, 10.0, 20.0 mg/l) + IBA (0.1 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l) の各組合せも検討した。

なお、いずれの場合も培地の寒天濃度は0.75%,

[†] 〒439 静岡県小笠郡菊川町倉沢1706-11

Fig. 1 The preparation of explants.
The explants were cut into 4-7mm long nodal segments with an axillary bud from the shoot that were grown 5cm long.

ショ糖 3.0%とし、pH 5.8 に調整したのち 121℃、20 分間の高圧滅菌後使用した。培養は全て 26~28℃、3000~5000 lx、16 hr 照明とし、培養約 2 ヶ月後に挿木した腋芽の中で伸長したものの率、伸長したシュートの大きさ、1 個の外植片から分化したシュートの本数及び根の分化状況等を調査した。

3 結 果

3.1 オーキシンの添加効果

オーキシンの種類と濃度が挿木した腋芽の中で伸長したものの率、伸長したシュートの大きさ、根の分化率に及ぼす影響は Fig. 2 の通りである。挿木した腋芽の中で伸長したものの率はいずれのオーキシンでもその濃度が高まるにつれ低下した。特に、2,4-D では 0.01 mg/l 添加区で腋芽の伸長した率が 55.0% だったものが、1.0 mg/l 以上添加したときには腋芽の生育が認められなかった。伸長したシュートの本数はいずれの場合も 1 本だったが、その大きさは IBA、IAA、2,4-D とともに 0.1 mg/l 添加区で大きく、またいずれの濃度区においても IBA > IAA > 2,4-D 添加の順でシュートは大きかった。オーキシン添加区で生育したシュートはいずれも葉が小さく、やや黄色味を帯びていた。

また、根の分化は IBA (10.0 mg/l) 添加区で 80

Fig. 2 Effects of auxins on the growth of axillary buds and rooting.

(About 2 months after culture²⁾)

- 1) ● — ● : IAA, ○ — ○ : IBA, ▲ ▲ : 2,4-D
2) The medium consists of 1/2 MS, 3% of sucrose and 0.75% of agar.

Fig. 3 Effects of cytokinins on the growth of axillary buds.

(About 2 months after culture²⁾)

- 1) ●—● : BA, ○—○ : Adenine, ▲—▲ : Kinetin, △····△ : 2iP
 2) The medium consists of 1/2 MS, 3% of sucrose and 0.75% of agar.
 3) No. of shoots elongated from an axillary bud.

%程度と高い分化率だったのは、20 %程度であり、2,4-D (0.01, 10.0 mg/l) 区では根の分化が認められなかった。

カルスは IAA 添加区ではほとんど認められなかったが、IBA 及び 2,4-D では添加濃度を高めるにつれカルス率は高まり、IBA (10.0 mg/l) 区で 95.0 %, 2,4-D 区では 0.1 mg/l で 85.0 %, 1.0 mg/l 以上の添加では 100 % となった。また、カルスの大きさも添加濃度を高めるにつれ大きくなった。

3.2 サイトカイニンの添加効果

サイトカイニンの添加では、その種類や濃度にかかわらず全ての処理区で 85 % 以上の外植片から腋芽の生育が認められたが、その反応は各々のサイトカイニンの濃度により異なった。腋芽の生育に対して、Fig. 3 に示すように、アデニンでは効果が認められなかったが、カイネチンでは 1.0 mg/l 以上の添加で、BA では 1.0 mg/l 添加で、また 2 i P は Fig. 4 に見られるように 3.0 ~ 30.0 mg/l の高濃度添加区でシュートの伸長が促進された。BA (1.0 mg/l) や 2 i P (3.0 ~ 30.0 mg/l) 添加区で伸長したシュートの大きさは 20 ~ 25 mm 程度、葉数は 5 ~ 6 枚程度であった。

Fig. 4 Effects of 2iP on the growth of axillary buds.

(About 2 months after culture¹⁾)

- 1) The medium consists of 1/2 MS, 3% of sucrose and 0.75% of agar.
 2) No. of shoots elongated from an axillary bud.

Fig. 5 Effects of combination of IBA and BA on the growth of axillary buds.

(About 2 months after culture¹⁾)

- 1) The medium consists of 1/2 MS, sucrose (3%) and agar (0.75%) that added with GA₃ (5.0 mg/l).
- 2) No. of shoots elongated from an axillary bud.

Fig. 6 Effects of combination of BA and kinetin on the growth of axillary buds.

(About 2 months after culture¹⁾)

- 1) The medium consists of 1/2 MS, sucrose (3%) and agar (0.75%) that added with IBA (0.1 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l).
- 2) No. of shoots elongated from an axillary bud.

Table 1 Effects of combination of BA and 2iP on the growth of axillary buds.

(About 2 months after culture¹⁾)

BA	2iP	Shoot length	No. of leaves	No. of ²⁾ shoots	% of callus ³⁾ formation
mg/l	mg/l	mm			%
0.1	5.0	36.7	5.9	1.25	95
0.1	10.0	29.4	5.2	1.00	100
0.1	20.0	25.5	5.3	1.05	100
1.0	5.0	19.0	4.9	1.20	85
1.0	10.0	13.3	4.5	1.47	95
1.0	20.0	13.0	4.1	1.25	90

1) The medium consists of 1/2 MS that added with IBA (0.1 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l).

2) No. of shoots elongated from an axillary bud.

3) Callus formation occurred from the cutting surface of the basal part of explant.

1個の外植片から分化するシュートの本数を顕著に増加させることの出来るサイトカイニンはBAであり、20.0 mg/l添加区では3.2本となった。その他カイネチンや2 i Pも添加濃度を高くすることにより分化本数が増加する傾向にあったが3本以下と少なかった。

サイトカイニンを添加した区で生育したシュートはいずれも葉が大きく、緑の鮮やかな葉色で柔らかかった。

根の分化はアデニン添加区で5~15%程度、カイネチン (0.01~3.0 mg/l) 添加区で5~10%程度認められたが、BAや2 i P添加区ではいずれの濃度区においても全く認められなかった。

カルス形成はアデニン添加区で25%以下と低率であったが、カイネチン、2 i Pではその濃度が高まるにつれ高率化し、BAでは0.1~10.0 mg/l添加区で80%以上に認められた。カルスの大きさもカルス化率とはほぼ同様の傾向を示し、カルス化率の高い区ではカルスが大きく、低い区のものでは小さかった。

3.3 ホルモンの組合せ効果

まず、オーキシンとサイトカイニンの組合せとして、シュートの生育に効果的であったIBAとBAを用いた結果をFig. 5に示した。なお、ホルモンの組合せ効果の検討には全ての処理区にGA₃ (5.0 mg/l)を添加した。シュートの大きさはBA濃度に依存し1.0 mg/l添加区で大きく、なかでもIBA (0.1 mg/l) + BA (1.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l) 区でシュートの生育は促進され、大きさ32 mm、葉数7.4枚となった。1個の外植片から分化するシュートの本数はBA濃度に影響され、その濃度が高

くなるにつれ本数が増加した。

カルス化はIBA (0.01 mg/l) + BA (0.01 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l) 以外の全ての区で認められ、IBA濃度を高めるにつれカルス化率は高まる傾向にあったが、BA (10.0 mg/l) 添加区ではその率がやや低下した。カルスの大きさもカルス化率の高い区では大きく、低い区では小さかった。根の分化はBA濃度よりむしろIBA濃度に依存し、IBA (1.0 mg/l) 添加区で5~20%の分化率であった。

次に、サイトカイニンの中でBAとカイネチン、BAと2 i Pを組合せた。その結果、Fig. 6及びTable 1に示すように、BA濃度が高まるにつれ、シュートは小さくなるが、その本数は増加する傾向にあった。なかでも、BA (10.0 mg/l) + カイネチン (5.0, 10.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l) 区ではBA (20.0 mg/l) 単独区と同程度の分化本数となった。また、BAと2 i Pを組合せたときには両者の濃度が低い区ほどシュートは大きくなったが、その本数はBA濃度の高い区で多かった。しかし、カルス化率及びカルスの大きさはBA濃度が1.0 mg/l区に比べ0.1 mg/l添加区で大きかった。

4 考 察

最近では、草本植物のみならずリンゴ、ブドウやブルーベリーなど、一部の木本植物においても茎頂培養系を用いた大量増殖が可能となり、実用化段階に入っている。

しかし、ツバキ属植物では継代培養過程での増殖を試みた報告は少なく、培養苗の大量生産技術も普及しているとは言い難い。

Photo. 1 The growth of a shoot from an axillary bud.

(About 2 months after culture)

The medium consists of 1/2 MS, sucrose (3%) and agar (0.75%)
that added with IBA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l).

これまで組織培養を用いたツバキ属植物の増殖法として、子葉やカルス培養系から不定芽²⁻⁵⁾⁶⁻⁹⁾あるいは苗条原基を誘導し増殖する方法や、また茎頂¹⁸⁾や腋芽を培養し高サイトカイニン条件下で多数の苗条¹⁰⁻¹⁶⁾を得る方法あるいは継代的な試験管内挿木により¹⁴⁾幼植物体を増殖する方法などが試みられている。

しかしながら、これらの報告の大部分は初代培養系の確立を目指したものにすぎず、継代培養過程における増殖を目的としたものは‘Alba Plena’の培養幼植物体から継代培養を行う上での外植片の採取部位、基本培地の違いが増殖に及ぼす影響について¹⁴⁾検討を加えたものにとどまる。

そこで、今回は大量増殖方法のひとつである継代的な試験管内挿木法を確立するため、チャの腋芽を用い、継代培養過程におけるホルモンの種類及び濃度が腋芽の生育に及ぼす影響を検討した。

ツバキ属植物の培養系ではオーキシンを単独添加したときにはその濃度が高まるにつれ、茎頂や腋芽の生育は劣る傾向にあったが^{10, 11, 15)}、本試験ではオーキシンの0.1 mg/l添加でシュートの生育が促進された。このことは、初代培養系では認められなかったこと

であるが、他の多くの植物で認められているように¹⁹⁾継代培養を続けたことにより培地に順化したため、オーキシン単独添加においても生育を示すようになったものと考えられる。

これまでにも、腋芽や茎頂培養系には種々のサイトカイニンが供試され、シュートの生育に対し作用活性の高いものとしてBAが報告され^{5, 10, 13, 15, 16)}、その最適濃度は0.5~3.0 mg/l程度と考えられている。本試験においてもBAは作用活性が高く、その濃度は1.0 mg/l添加区で生育の優れたことから、継代培養過程においてもシュートの生育促進に対する最適濃度は初代培養系とほぼ同程度でよいと思われた。また、本試験では高濃度の2 i P添加でシュートの生育が促進されたが、これまでツバキ属植物では2 i Pの供試事例が少ないため、今後は初代培養系においても検討を加える必要があろう。

初代培養系においてシュートの分化本数を顕著に増加させるホルモンはBAであり、その濃度はツバキでは1.0 mg/l以上¹⁶⁾、チャでは5.0 mg/l以上^{12, 15)}と報告されているが、今回の試験でもほぼ同様の結果であった。

これらのことから、茎頂や腋芽を用いた初代、継代培養系ともシュートの生育に対してBAは作用活性が高く、低濃度で伸長促進作用が、高濃度で多芽形成作用が認められることはツバキ属植物では共通であることが示唆された。しかしながら、多芽形成が認められてもその数は2～3本と少なく、また1本1本のシュートも小さいことから試験管内挿木による増殖に対しては、現段階では増殖効率が低く不適当と考えられる。

オーキシンあるいはサイトカイニンの単独添加でも茎頂や腋芽からシュートを伸長させることは可能であるが、さらに両者や同種類間あるいはGA₃などのホルモンを組合せることによりシュートの生育促進が図られている。¹⁰⁻¹⁶⁾本試験においても単独添加でシュートの生育促進が図られたIBA, BA, 2 i Pを用い、¹⁰⁾それらの組合せにさらにシュートの節間伸長を図るためGA₃を添加した結果、Photo. 1に見られるようにIBA (0.1 mg/l) + BA (1.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l), IBA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l) + 2 i P (5.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)の組合せでシュートの生育が促進された。これまで、初代培養系におけるシュートの生育促進を図るためにNAAとBA,¹⁰⁻¹²⁾ IBAとBA¹³⁾などの組合せが用いられ、いずれの場合でも茎頂や腋芽の生育は低濃度のオーキシンに0.1～3.0 mg/l程度のサイトカイニンを添加するのが効果的とされているが、本試験の継代培養過程でもほぼ同程度の結果であった。

またこれまで、同種類のホルモンを組合わせた事例¹⁶⁾は少なく、ツバキでのBAとカイネチンの組合せを見るにとどまるが、シュートの生育はBA濃度に依存し、伸長した本数は両者の添加濃度が高まるにつれ増加するなど、今回のチャでの結果と同様であった。

以上のように、継代培養過程に試験管内挿木法を用いた場合、シュートの生育に最適なホルモンの組合せはIBA (0.1 mg/l) + BA (1.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)、あるいはIBA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l) + 2 i P (5.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)程度であり、前者では2ヵ月間でシュートは32 mmに伸長し、葉数は7.4枚、後者では37 mm、5.8枚となった。この幼植物体を用いて継代培養を行う場合には5個程度の腋芽と1本の頂芽を含んだ芽が外植片として利用できるため、1年間に6回の継代培養が可能とし、1回に6本(利用可能な外植片)ずつ殖やせるとすれば、1本のシュート

から1年後には47000本(6本)程度の増殖が可能である。また、増殖後の発根・順化については、^{10, 15-17)}これまでの報告のとおり容易に行い得るものと考えられる。

5 摘 要

組織培養法を用いたチャの急速大量増殖技術を確立するために、試験管内挿木法を用い、腋芽の生育に及ぼすホルモンの種類及び濃度の影響を検討し、その最適条件を明らかにした。

1) オーキシンの添加では、挿木した腋芽の中でシュートの伸長したものの率はIAA, IBA, 2,4-Dとも添加濃度を高めるにつれ低下したが、シュートの生育はIBA > IAA > 2,4-Dの順に優れ、最適濃度はいずれの種類でも0.1 mg/lであった。

2) サイトカイニンの添加では、各々の種類や濃度により腋芽の生育に対する反応が異なった。シュートの伸長に対して、アデニンは効果が認められなかったが、カイネチンでは1.0 mg/l以上で、BAでは1.0 mg/lで、2 i Pでは3.0～30.0 mg/l程度の添加で生育が優れた。また、伸長するシュートの本数を顕著に増加させることのできるホルモンはBAであった。

3) 各種のホルモンを組合わせた結果、シュートはIBA (0.1 mg/l) + BA (1.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)あるいはIBA (0.1 mg/l) + BA (0.1 mg/l) + 2 i P (5.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)の組合せで伸長が促進された。この時、2ヵ月間でシュートは大きさ32 mm、葉数7.4枚程度に生育した。また、いずれの組合せでも腋芽の生育はBA濃度に影響を受け、高濃度添加区ではシュートの生育は抑制されるがその本数は増加する傾向にあった。

4) 以上のことから、IBA (0.1 mg/l) + BA (1.0 mg/l) + GA₃ (5.0 mg/l)のようなホルモン条件で継代培養を繰り返すことにより、1本の外植片から1年間で47000本程度の増殖が可能と考えられた。

本報告の作成に当たり、ご校閲をいただいた農林水産省野菜・茶業試験場 高柳謙治 博士に深く感謝申し上げます。

6 引用文献

- 1) 小崎 格 (1988) : 永年性作物の栄養繁殖による種苗の増殖. 農及園, 63 (1), 79-82.
- 2) KATO, M. (1986) : Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* and *C. sinensis*. *Japan. J. Breed.*, 36, 31-38.
- 3) 中村順行 (1988) : チャ等のツバキ属植物の子葉培養における不定胚分化率の向上. 茶研報, No. 67, 1-12.
- 4) 顔 暮勤, 陈 平, 韦 民, 王 以紅 (1984) : 油茶的组织培养与大田栽培. 林业科学, 20 (4), 341-350.
- 5) NAKAMURA, Y. (1988) : Effective methods of *in vitro* propagation of tea plant. Proceeding of the international symposium on recent development in tea production. Taiwan. 63-75.
- 6) KATO, M. (1985) : Regeneration of plantlets from tea stem callus. *Japan. J. Breed.*, 35, 317-322.
- 7) PHUKAN, M. K. and MITRA, G. C. (1984) : Regeneration of tea shoots from nodal explants in tissue culture. *Current Science*, Vol. 53 (16), 874-876.
- 8) 中村順行 (1989) : チャの茎切片培養における不定芽分化とその品種間差異, 茶研報, No. 70, 41-49.
- 9) 中村順行 (1990) : チャの組織培養における不定芽形成と腋芽の生育に及ぼす糖の影響, 静岡茶試研報, No. 15, 1-5.
- 10) 中村順行 (1987) : チャ ‘やぶきた’ の茎頂培養. 茶研報, No. 65, 1-7.
- 11) JACQUELINE A. CARLISU and KENNETH C. TORRES (1986) : *In vitro* shoot proliferation of *Camellia* ‘Purple Dawn’. *HortScience*, 21 (2), 314.
- 12) 陳 際松・陳 惠藏・葵 新聲・林 品才 (1983) : 茶茎頂培養之誘発多芽體的形成. 台湾茶研彙報, 2, 1-9.
- 13) P. V. ARULPRAGASAM and R. LATIFF (1986) : Studies on the tissue culture of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). 1. Development of a culture method for the multiplication of shoots. *S. L. J. Tea Sci*, 55 (1), 44-47.
- 14) ANA M. VIEITEZ, J. BARCIELA and A. BALLESTER (1989) : Propagation of *Camellia japonica* cv. Alba Plena by tissue culture. *J. Hortic. Sci.*, 64 (2), 177-182.
- 15) 中村順行 (1987) : チャの腋芽培養による幼植物体の早期育成法. 静岡茶試研報, No. 13, 23-27.
- 16) SAMARTIN A., VIEITEZ, A. and VIEITEZ, A. M. (1984) : *In vitro* propagation of *Camellia japonica* seedlings. *HortSci.*, 19, 225-226.
- 17) SAMARTIN A., VIEITEZ, A. and VIEITEZ, A. M. (1986) : Rooting of tissue cultured *Camellias*. *J. Hortic. Sci.*, 61, 113-120.
- 18) NADAMITU, S., M. SEGAWA and K. KONDO (1987) : Callus and shoot primordium induction and plant regeneration in shoot apex and cotyledon cultures in *Camellia japonica*. *Mem. Fac. Integrated Arts and Sci., Hiroshima Univ.*, Ser. N, Vol. 13, 69-75.
- 19) 竹内正幸・中島哲夫・古谷 力 (1979) : 新植物組織培養, 初版. 朝倉書店, pp. 76-78.

Summary

For *in vitro* propagation of tea plants through stem cuttings, the effects of various hormones on the growth of shoot from the axillary buds were investigated. Aseptically elongated shoot with 5-6 leaves and a bud was cut into 5-6 pieces of stem segment with node and planted on the agar medium containing the 1/2 MS salts and minerals, 3.0 % of sucrose, 0.75% of agar and supplemented hormones.

1) In the three kinds of auxins tested on the bud-sprouting rate became lower and lower percentage as the concentration of auxin became higher.

The shoot elongation was also affected by the kind and the concentration of auxins, in order of IBA > IAA > 2,4-D, and the optimum concentration was 0.1 mg/l of each auxins.

2) The effect of cytokinins — BA, kinetin, adenine and 2iP — for the growth of axillary bud was different among the kind and the concentration of cytokinin in the medium mentioned above.

Shoot elongation from an axillary bud was stimulated by concentrations, 1.0 mg/l of BA, 3.0-30.0 mg/l of 2iP and 1.0-20.0 mg/l of kinetin,

but not by adenine. Higher concentration of BA induced multiple shoot development from an axillary bud.

3) For better growth and development of shoot from an axillary bud, various combination of hormones was investigated.

The following combinations,

- ① 0.1 mg/l IBA + 1.0 mg/l BA + 5.0 mg/l GA₃
and
- ② 0.1 mg/l IBA + 0.1 mg/l BA + 5.0 mg/l 2iP
+ 5.0 mg/l GA₃

were effective for the shoot elongation. The shoot-grew on these medium was 32mm length of shoot and 7.4 leaves in average.

4) From these results, six cycles of nodal segment cutting culture in every 2 months in the medium of 1/2 MS supplemented with 3.0% of sucrose, 0.75% of agar, 0.1 mg/l of IBA, 1.0 mg/l of BA, and 5.0 mg/l of GA₃ could produce ca. 47,000 (6⁶) plantlets from an original shoot within a year.