

マメガキ (*Diospyros lotus* L.) の胚培養について

北島 宣・梁 若英*・石田雅士・傍島善次

AKIRA KITAJIMA, RUOYING LIANG, MASASHI ISHIDA
and YOSHITSUGU SOBAJIMA

Embryo culture of dateplum (*Diospyros lotus* L.)

要旨：マメガキ (*Diospyros lotus* L.) の胚培養について、MS 培地を用いて初代培養、増殖及び発根段階での好適条件を検討した。その結果、初代培養では、標準 MS 培地の 1～3/2 倍の窒素濃度 (1～3/2N) とショ糖 2～5% がシュートの生育に効果が認められた。その中で、特にショ糖 5% は根の生育に対しても優れた効果を示した。6-ベンジルアデシン (BA) 及び α -ナフタレン酢酸 (NAA) は主に根の生育に作用し、BA 0.5mg/l は根長及び根数の増加に有効であり、NAA 0.5～1 mg/l は根数を著しく増加させた。増殖段階では、1/2N を用いた場合に、シュート長では BA 2～5 mg/l 及び 2-イソペンチルアデニン (2 iP) 5 mg/l の添加効果が認められたが、シュート数では BA の添加で効果が認められた。なお、NAA の添加効果は認められなかった。発根段階では、インドール酪酸 (IBA) 500～1000mg/l、ショ糖 3～7%、暗処理 6 日間で高い効果が認められたが、特に根数に関しては IBA1000mg/l が優れた。

緒 言

カキ (*Diospyros kaki* L.) は東アジア原産の果樹で、日本でも古くから栽培されており、その歴史は 1300 年以上とされている¹²⁾。しかし、中国では紀元前一世紀にはすでに栽培の記述があり¹³⁾、およそ 2000 年以上の歴史があるようである。これらカキ栽培種の起源の研究や、遺伝資源の収集・保存及び利用を行う上で、カキ属の他の野生種の研究が重要であると考えられる。カキ属植物は約 200 種あるといわれているが、そのうち温帯に分布するものは数種にすぎず、ほとんどは熱帯、亜熱帯に分布している⁵⁾。すなわち、日本では 3～4 種の分布しか認められていないが、中国では海南島や広東、広西、福建、雲南各省など、広大な

地域に 64 種が分布しており、その多くは熱帯、亜熱帯のものである¹⁴⁾。このような熱帯、亜熱帯産の野生種を研究する上で、研究に必要な均一な材料を常に手に入れるためには、組織培養系による保存が有効であると考えられる。特に近年、果樹において組織培養により器官を長期低温保存する研究が進められ、遺伝資源の保存にとって経済的で効果的な方法であることが認められている⁸⁾。

これまで、カキの組織培養は困難とされていたが、Sugiura et al. (1986)¹³⁾ が '平核無' 成木の茎頂組織を用いて培養に成功して以来、他の栽培品種についても研究が進められてきた^{11, 3), 10)}。一方、石田ら¹⁾ は、'平核無' 未熟胚の培養に成功しており、その後、'富有' の胚培養の報告²⁾ もある。一般に、胚培養は茎頂培養に比べ容易であり、未熟

京都府立大学農学部果樹園芸学研究室

Laboratory of Pomology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

*現在 中華人民共和国陝西省果樹研究所

昭和 63 年 8 月 15 日受理

胚から成熟胚まで幅広く外殖体として用いることができ、かつ、完熟種子は長期の輸送、貯蔵が可能である。しかし、胚の遺伝形質は母方のものと全く同一ではないため、品種の保存には適当ではないが、種の保存にはほとんど問題がないと考えられる。これらの点から、種の保存に関しては、胚培養が有効な一つの手法であると考えられる。

D. lotus (マメガキ) は温帯に属する数少ない種の一つであるが、西アジアから東アジアにかけて広範囲に分布しており¹¹⁾、日本や中国では古くから台木として利用されてきた^{6), 15)}。ところで、これら台木の利用に当たっては実生苗を用いるため、遺伝的な変異もあるが、その中で優良系統が選抜されれば、そのクローンの増殖には組織培養の手法を用いるのが有効と思われる。

これらの点から、本研究は野生種として *D. lotus* (マメガキ) を用い、胚培養による培養系の確立を試みた。

材料および方法

京都府立大学農学部附属農場植栽のマメガキ (*D. lotus* L.) 成木を用い、発育中の果実より種子を採取し実験に供した。種子は0.1% Tween20加用次亜塩酸ナトリウム溶液により減圧及び常圧下でそれぞれ15分ずつ滅菌を行った後、滅菌水で十分に水洗した。無菌的に種子から胚を摘出し、初代培養を行った。培地はビタミンとアミノ酸を加えたMS培地⁹⁾ (ショ糖3%, 寒天1%, pH 5.7) を用い、各処理ともそれぞれ20個体を供試した。培養温度は25℃とし、白色蛍光灯により約1500lxの連続照明下で培養を行った。また、培養期間は各処理とも4週間とした。

初代培養では、窒素濃度、6-ベンジルアデニン (BA) 濃度、 α -ナフタレン酢酸 (NAA) 濃度及びショ糖濃度について検討を行った。窒素濃度はMS無機塩の $\text{NH}_4 + \text{NO}_3$ の量を1Nとし、0から3/2Nまで区を設けた。所定の期間培養した後、シュート長、根長、葉数及び根数の調査を行った。

初代培養で生育の良好な個体は根を切除し、初代培養における各処理の影響をできるだけ少なくするために、BA 5 mg/l, NAA 0.01 mg/l を含むMS培地で4週間培養した。生育したシュートは1 cm 長に調整し、増殖段階の実験材料とした。

増殖段階では1/2N MS培地を用い、サイトカイニンの種類と濃度及びNAAの濃度についてそ

れぞれ好適条件を検討した。サイトカイニンはBA及び2-イソペンチルアデニン (2iP) を用いた。培養後、シュート長、シュート長5 mm以上のシュート数、5 mm以下のシュート数及び新鮮重増加量を調査した。なお、新鮮重増加量は培養後の新鮮重と培養前の新鮮重の差として求めた。

発根段階では2iP 5 mg/l, NAA 0.01 mg/l を含むMS培地で4週間培養し、生育したシュートを1.5 cm 長に調整したものを実験材料として用いた。

発根培地はホルモンフリーのMS培地を用い、インドール酪酸 (IBA) 濃度、ショ糖濃度及び暗処理日数が発根に及ぼす影響を調べた。IBA処理は、IBAを含む50%エタノール溶液にシュート基部を30秒間浸漬することにより行った。培養開始後1週間ごとに発根個体数を調査し、発根率の経時変化を調べた。培養後、根長、根長2 mm以上の根数及び2 mm以下の根数を調査した。

一方、果実が熟期に近づくにつれて、胚乳組織が硬化し、無菌的に種子から胚を摘出するのが容易ではなくなった。そこで、先に胚を摘出し、滅菌処理を行う方法が能率的であるため、このときの滅菌処理条件についても検討を加えた。

なお、有意差検定はすべてダンカンの多重検定を5%水準で行った。

結 果

1. 初代培養

BA 2 mg/l, NAA 0.05 mg/l を含むMS培地を用い、窒素濃度0, 1/2, 3/4, 1, 3/2Nについて検討した結果、マメガキの胚は窒素を含む培地で良く生育し、窒素無添加に比べ、シュート長、根長はともに優れた。特に、1~3/2Nの高い濃度で顕著な効果を示し、生育抑制は認められなかった(第1図)。したがって、以下の初代培養では1Nを用いた。

次に、NAA 0.05 mg/l を含むMS培地を用い、BA 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/l について検討を行った。その結果、シュート長では差が認められなかったものの、0.5~2 mg/l のBAの添加により根の伸長が促進された。根数ではBA 0.5 mg/l で顕著な効果が認められたが、BA濃度が高まるにつれて抑制的に作用した(第2図)。一方、展開葉の大きさは、BA低濃度及び高濃度では比較的小さいため、総体的にみるとその生育はBA 1~2 mg/l が優れていた。これらの結果より、以下の初代培養におけるBA濃度は2 mg/l

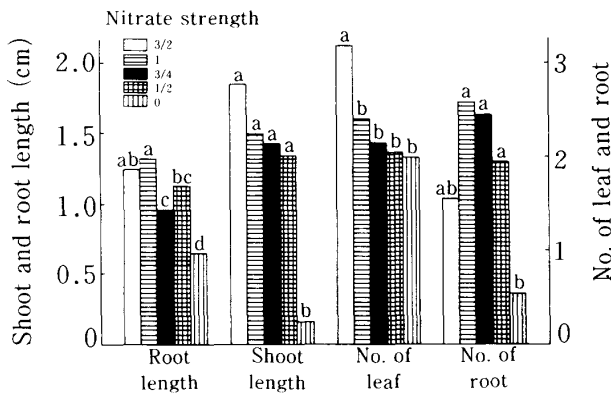


Fig. 1. Effect of different nitrate strength on shoot and root growth of *D. lotus* embryo cultured in vitro on the initial stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

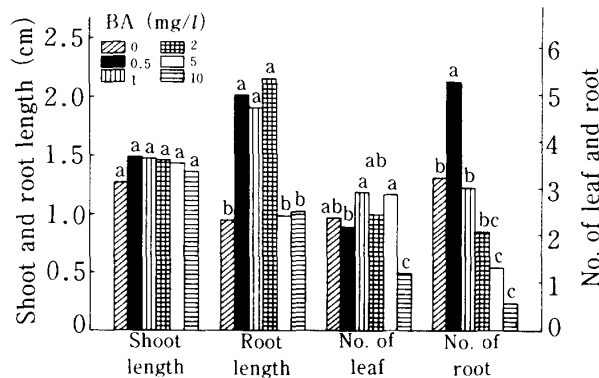


Fig. 2. Effect of BA concentrations on shoot and root growth of *D. lotus* embryo cultured in vitro on the initial stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

を用いて実験を行った。

また、NAA 濃度は、0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5mg/l について検討を行った。その結果、NAA 0~0.05mg/l では生育の程度にあまり変化はみられなかったが、NAA 濃度がさらに高まると、シュート長、根長ともに生育が抑制された。根数では NAA 0.5~1.0mg/l で著しく高い効果が認められたが、基部のカルス化がおう盛で、シュート長、根長及び葉数は極めて劣った (第 3 図)。低濃度の NAA においても添加効果は認められなかったが、生育の様相が総体的に良好であった NAA 0.01mg/l を用いて次の実験を行った。

ショ糖濃度は 1, 2, 3, 5, 10% について検討を行った。その結果シュート、根の生育ともにショ糖 2~5% が優れていた。特に、根長及び根数ではショ糖 5% が極めて高い効果を示した。しかし、ショ糖 10% と高濃度になると、シュート、

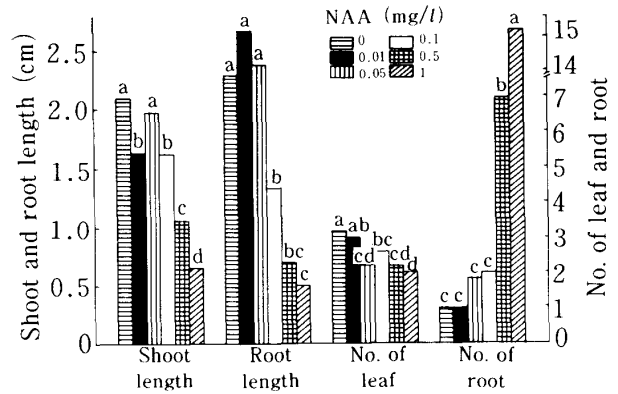


Fig. 3. Effect of NAA concentrations on shoot and root growth of *D. lotus* embryo cultured in vitro on the initial stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

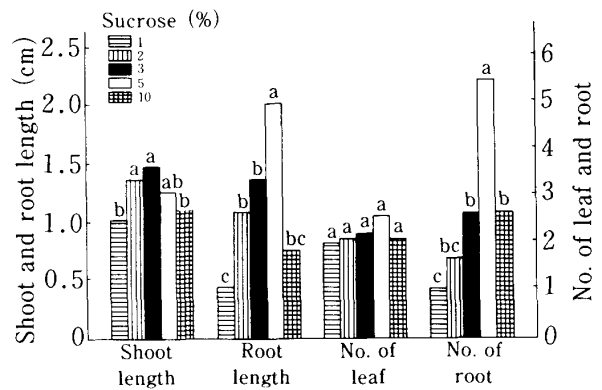


Fig. 4. Effect of sucrose concentrations on shoot and root growth of *D. lotus* embryo cultured in vitro on the initial stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

根ともに生育が抑制された (第 4 図)。

2. 増殖段階

NAA 0.01mg/l を含む MS (1/2N) 培地を用い、BA 及び 2 iP のそれぞれ 0, 2, 5, 10mg/l について検討を行った。その結果は第 1 表に示すとおり、シュート長では BA 2~5 mg/l 及び 2 iP 5 mg/l で効果が認められた。5 mm 以上のシュート数では、BA 2~10mg/l が優れ、2 iP は効果が認められなかった。5 mm 以下のシュート数でも同様な結果であったが、特に BA 10mg/l が極めて高い値を示した。新鮮重増加量では 2 iP 5~10mg/l で優れたが、これは基部のカルス化によるものであった。

次に、BA 2 mg/l を含む MS (1/2N) 培地で NAA 濃度 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5mg/l についての検討を行った結果、NAA 0~0.05mg/l ではいずれも有意な差は認められず、NAA 濃度が

Table 1. Effect of different concentrations of BA and 2iP on shoot growth of *D. lotus* cultured in vitro on the propagation stage.

	BA (mg/l)				2iP (mg/l)		
	0	2	5	10	2	5	10
Shoot length (cm)	1.20b ^z	1.96a	1.91a	1.60ab	1.64ab	2.10a	1.69ab
No. of shoot (>5mm)	1.05c	2.05a	1.85ab	1.78ab	1.20c	1.55abc	1.45bc
No. of shoot (<5mm)	0 c	1.65b	1.95b	3.17a	0 c	0.25c	0.65c
Fresh weight (g)	0.10b	0.14b	0.17b	0.16b	0.14b	0.28a	0.28a

^z Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

0.01mg/l より高くなるにつれて、シュート長やシュート数が抑制される傾向がみとめられた。なお、NAA0.5mg/lでは基部のカルス化がおう盛であり、新鮮重増加量が極めて高い値を示した。このように、NAA添加による生育の促進効果は認められなかった(第5図)。

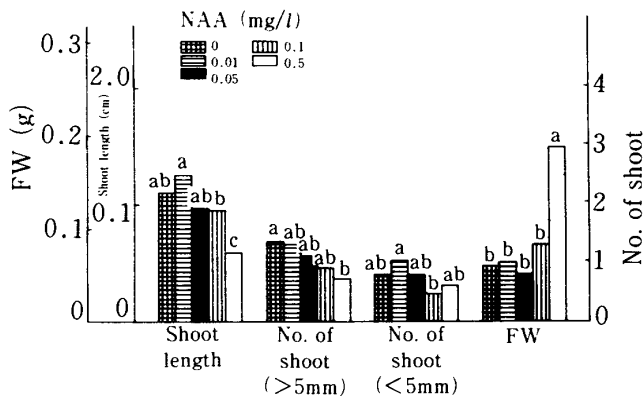


Fig. 5. Effect of NAA concentrations on shoot growth of *D. lotus* cultured in vitro on the propagation stage.

3. 発根段階

IBA 0, 100, 250, 500, 1000mg/l について検討を行った結果、発根は培養1週間後ですでに認められ、発根率は培養2週間後でIBA500及び1000mg/lが60%に達し、培養4週間後ではそれぞれ85%及び70%と高い値を示した(第9図A)。総根長ではIBA500~1000mg/lが、根数では1000mg/lが顕著な効果を示した(第6図)。

次に、発根率が最も高かったIBA500mg/l処理を行い、ショ糖濃度0, 1, 3, 5, 7%について検討を行った。その結果、培養2週間後で発根が認められたのはショ糖5%と7%のみで、培養4週間後における発根率は、ショ糖7%が最も高く75%に達し、次いでショ糖5%が高かった。一方、ショ糖0及び1%では、培養4週間後においても発根は全く認められなかった(第9図B)。根長及び根数に及ぼす影響は、ショ糖3~7%の

間では差がみられなかった(第7図)。

さらに、IBA500mg/l処理、ショ糖5%添加MS培地を用いて、暗処理日数0, 3, 6, 9, 12日間について検討を行った。その結果、6日間処理が培養2週間後より高い発根率を示し、4週間後では85%に達した。12日間処理も培養4週間後に85%の発根率を示しており、無処理の発根率が最も低かった。また、暗処理日数の短いものは培養3週間までに発根がほぼ終了するのに比べ、

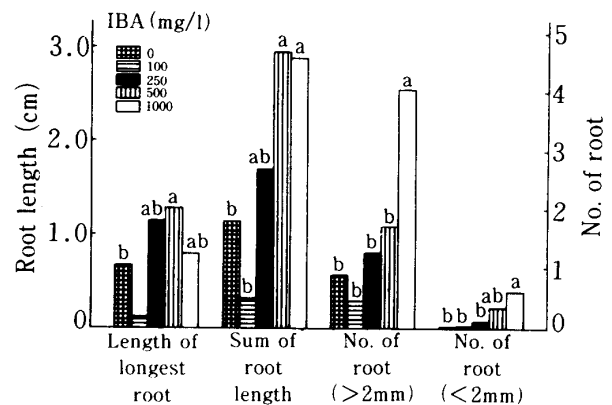


Fig. 6. Effect of IBA concentrations on root growth of *D. lotus* cultured in vitro on the rooting stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

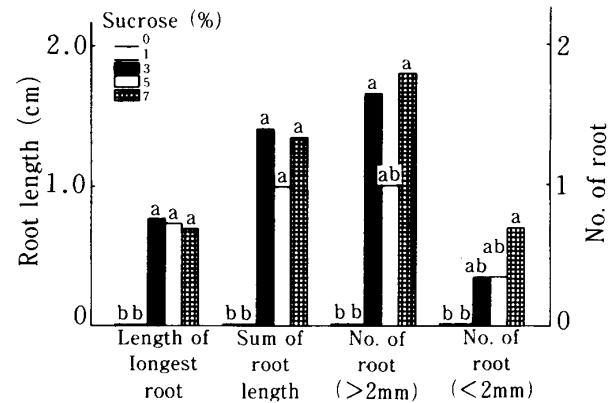


Fig. 7. Effect of sucrose concentrations on root growth of *D. lotus* cultured in vitro on rooting stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

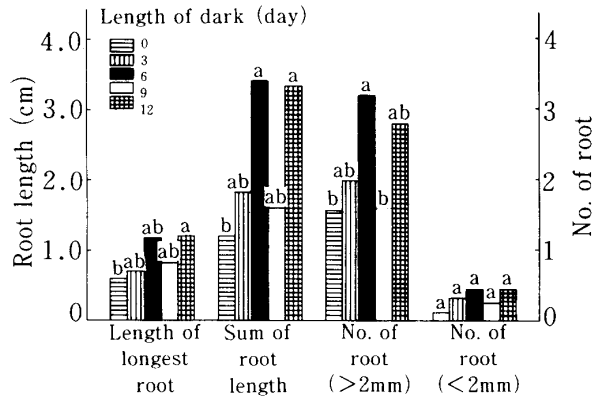


Fig. 8. Effect of length of dark treatment on root growth of *D. lotus* cultured in vitro on the rooting stage. Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

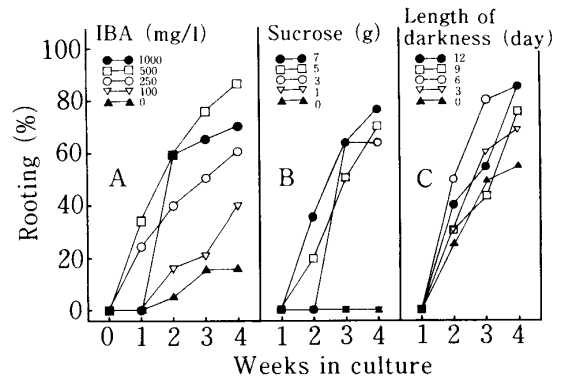


Fig. 9. Effect of IBA (A) and sucrose (B) concentrations and length of dark treatment (C) on rooting of *D. lotus* cultured in vitro during rooting stage.

Table 2. Effect of active chlorine concentrations in sodium hypochlorite solution and length of the sterilization treatment on shoot and root growth inhibition of *D. lotus* embryo cultured in vitro, and contamination.

Active Cl conc. (%)	Time of sterilization (min)	Growth index ^z		% of contamination
		Shoot	Root	
0.1	5	3.00a ¹	1.875a	20
0.3	1	2.20b	1.850ab	0
0.3	3	2.10b	1.750b	0

^z Growth index was scored as follows: Shoot; dead=1~very good=4, Root; non rooting=1~rooting=2.

¹ Mean separation by Duncan's multiple range test, 5% level.

暗処理日数の長いものでは培養3~4週間後の発根率の上昇が大きい傾向もみられた(第9図C)。根長及び根数では、発根率の高かった6及び12日間処理で優れた。これらのことから、発根の誘導に対して明らかに暗処理の効果が認められた(第8図)。

4. 胚の滅菌条件

予備的実験において、有効塩素0.6%次亜塩素酸ナトリウム溶液で3分間滅菌を行ったところ、培養後の胚の生育に障害が認められたので、有効塩素0.3%3分、1分及び0.1%5分の次亜塩素酸ナトリウム溶液での滅菌処理を行い、培養3週間後に生育調査を行った。いずれの処理も界面活性剤としてTwee20を0.1%加用した。生育調査は、地上部を枯死=1から生育が極めて良好=4の4段階に、地下部を発根なし=1、発根あり=2の2段階に分けて段階評価を行った。その結果、有効塩素0.1%では生育の程度は良好であったが、

雑菌の混入が20%認められた。一方、有効塩素0.3%ではいずれも雑菌の混入は認められなかったが、地上部の生育はやや抑制された(第2表)。

考 察

カキ (*D. kaki* L.) の茎頂培養において、Sugiura et. al.¹³⁾ は、初代培養で標準 MS 培地を用いると外植体の定着が十分でないのは、培地に含まれる窒素などの濃度が高すぎるためであろうとしており、1/2NO₃ の MS 培地で良好な結果を得ている。しかし、マメガキ (*D. lotus* L.) の胚培養においては、標準 MS 培地の3/2倍の窒素濃度でも生育抑制はみられず、逆に窒素濃度が低下すると、シュートの生長などが抑制された。このことは、胚は茎頂に比べ硝酸態窒素の悪影響を受けにくく、窒素濃度が低いと生育に必要な窒素養分が不足することを示しているように思われる。特に、初代

培養においては初期の生育をいかに早めるかが重要であり、初期の生育が劣ると、次の継代培養にもその影響が残り、健全な生育に至るためにはより多くの時間が必要になる。したがって、マメガキの胚培養においては、本実験の結果から1~3/2倍の窒素濃度が最適であるものと考えられた。

一方、初代培養における植物ホルモンの影響についてみると、シュートの生育に対しては、BA、NAAのいずれも促進的な作用は認められず、NAAでは高濃度になるにつれて抑制的に作用した。根の生育に関しては、BA0.5~2 mg/lで促進効果が認められたが、NAAでは0.1mg/l以上で抑制的に作用した。また、根数の増加に及ぼす効果をみると、BAでは0.5mg/lの低濃度で、NAAでは0.5mg/l以上の高濃度で促進された。このことについて、福井ら²⁾は‘富有’の胚培養において、BAは根の伸長にほとんど作用を持たなかったと報告しており、また、カンキツではアデニン硫酸塩が、胚の根源基の分化や発根に効果があるという報告⁷⁾があるが、本実験の結果からみると、サイトカイニンマメガキの胚の根の生長や根数に促進的に作用するように考えられた。これらのことから、初代培養におけるBA及びNAAの添加効果は、主に根の生長及び根数の増加に対して作用することが明らかとなった。

ショ糖は組織培養における植物体の主要な炭素源であるため、その濃度は植物体の生育を左右する要因の一つであると考えられる。マメガキの初代培養においても、その添加効果はシュート、根ともに明らかに認められ、シュートの生育に対しては2~5%のショ糖濃度が最適であった。根の生育に対してはショ糖濃度が高まるにつれて促進効果も優れ、ショ糖5%では顕著な効果が認められた。しかし、ショ糖10%ではシュート及び根の生育が抑制され、逆に悪影響を及ぼすことが認められた。カンキツにおいても、胚からの根の生育に対するショ糖濃度は5~6%が最適であるとされており⁷⁾、マメガキの初代培養におけるショ糖の最適濃度は5%であることが明らかとなったことから、カンキツとほぼ類似する点がみられ注目された。

増殖段階では、シュートの生育に対しBAは2~5 mg/l、2 iPは5 mg/lが優れ、シュート数に関してはBAの効果は2 iPに比べて高く、2 iP5~10mg/lではカルスの形成が盛んであった。これらの事実は、‘平核無’の茎頂培養におけるシ

ュート増殖段階の結果¹³⁾とほぼ一致しており、種の違いや外植体の違いによる作用性の相違がほとんどないことを示唆しているものと思われる。また、増殖段階におけるNAAは、濃度が高まるにつれてシュートの生育を抑制し、促進的な添加効果は認められなかった。一方、NAA0.5mg/lではカルスの形成が盛んとなり、シュートの生育は著しく抑制された。しかし、2 iP5 mg/lではカルスの形成が促進されたにもかかわらず、シュートの生育は最も優れており、これら両者のカルス形成の様相は明らかに異なっていた。

発根段階では、IBA500、1000mg/lが発根処理の濃度として最適であり、特に、発根率ではIBA500mg/lが、発根数ではIBA1000mg/lが優れた。文室ら³⁾の‘西村早生’わい性系統と強勢系統を用いた報告によると、発根率はわい性系統がIBA500mg/l、強勢系統がIBA1000mg/lで最も優れ、発根量は2系統ともIBA500mg/lで最も優れるが、濃度が高い程発根は抑制されることを認めている。これらの結果は、マメガキの本実験結果ともほぼ一致しているが、発根数に関しては異なる結果が得られた。このことは、同一品種でも系統の違いにより発根率に対するIBA濃度の反応が異なるように、種の違いによっても反応が異なることを示しているのかも知れない。

また、発根段階におけるショ糖濃度では、根の生長や根数に対しては3~7%が良好であった。しかし、ショ糖5~7%は発根開始時期が他に比べて早く、かつ発根率も高かった。これまでのカキの組織培養においては、発根培地に添加するショ糖濃度は3%が用いられており、その最適濃度に関する検討はなされていなかったが、今回の発根段階における結果と初代培養における結果を考え合わせると、カキの根の誘導、発育に関しては、従来の3%よりもやや高濃度の5~7%の方が有効であると考えられた。いうまでもなく、根の生育は順化段階へ移行するための重要な条件であり、カキの順化段階の確立が未だ十分になされていない現在、順化可能と考えられる多くの個体を育成する上で、今後、更に発根に対するショ糖濃度の影響について検討を加える必要がある。

さらに、マメガキの発根段階における暗処理は、発根の誘導に効果のあることが認められた。この結果は、従来暗処理の期間が発根率¹⁰⁾や根長³⁾に影響を及ぼすという、これまでの栽培種の報告とほぼ一致し、異なる種においても、発根に対する

暗処理の反応には大きな違いのないことが明らかとなった。

以上のように、マメガキの胚培養において、各段階での培養の諸条件を明らかにすることができた。しかし、熱帯、亜熱帯産の他の野生種については、これらの条件が異なる可能性もあるので、本実験の結果を基にして、それぞれの種ごとに検討を加える必要があろうと思われる。さらにまた、カキ属の遺伝資源の収集保存、並びにその利用を効率的に行う手段としての長期保存培養などについても、今後併せて検討する予定である。

引用文献

- 1) 福井博一・杉山峰雄・中村三大 (1986) : 組織細胞培養によるカキの育種に関する研究 (第1報) 茎頂培養による培養系の確立, 園学要旨, 昭61春, 159-159.
- 2) ————・中村三大 (1987) : 組織細胞培養によるカキの育種に関する研究 (第3報) 実生植物の in vitro への導入, 園学要旨, 昭62春: 114-115.
- 3) 文室政彦・村田隆一・村山秀樹・田尾龍太郎・杉浦 明 (1987) : カキのわい性台木の育成に関する研究 (第1報) in vitro による“西村早生”わい性系統の繁殖, 園学要旨, 昭62春: 116-117
- 4) 石田雅士・稲葉昭次・傍島善次 (1980) : カキ平核無未熟胚の組織培養, 京都府立大学報・農, 32: 20-24.
- 5) 菊地秋雄 (1948) : 果樹園芸学. 上巻, 養賢堂, 347.
- 6) ———— (1953) : 果樹園芸学. 下巻, 養賢堂, 94-96.
- 7) Kochba, J. and P.Spiegel-Roy (1977) : Cell and tissue culture for breeding and developmental studies of citrus. HortScience, 12: 110-114.
- 8) Monette, P.L. (1987) : Organogenesis and plantlet regeneration following in vitro cold storage of kiwifruit shoot tip cultures. Scientia Hort., 31: 101-106.
- 9) Murashige, T. and F.Skoog. (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 10) 村山秀樹・田尾龍太郎・田中辰美・杉浦 明 (1986) : カキの in vitro 繁殖に関する研究 (第2報). 園学要旨, 昭61秋: 160-161.
- 11) Ng, F.S.P. (1979) : The origin of *Diospyros lotus* and other notes on the genus *Diospyros* (Ebenaceae). Malay. Forester, 42: 165-170.
- 12) 傍島善次 (1980) : 柿と人生. 明玄書房, 12.
- 13) Sugiura, A., R.Tao, H.Murayama and T.Tomana (1986) : In vitro propagation of Japanese persimmon. HortScience, 21: 1205-1207.
- 14) 王仁梓・梁若英・王愛琴 (1984) : 柿種質資源考察報告. 陝西省果樹研究所.
- 15) 陝西省果樹研究所・山東農学院・河南省博愛県農林局編著 (1982) : 柿. 中国林業出版社, 4.

Summary

Dateplum (*Diospyros lotus* L.) was carried out to determine the appropriate medium condition on mature embryo culture.

On the initial stage, 1~3/2 nitrate strength of Murashige and Skoog's medium enhanced shoot growth. Sucrose concentration of 2~5% promoted shoot growth and sucrose 5%, furthermore, stimulated root growth. 6-Benzylaminopurine (BA) and α -naphthalene acetic acid (NAA) mainly influenced root growth. BA 0.5mg/l stimulated both root emergence and root elongation. NAA 0.5~1mg/l promoted to increase number of root markedly.

On the propagation stage, BA 2~5mg/l or 2-isopentyladenine (2iP) 5mg/l enhanced shoot elongation and BA was more effective to increase number of shoot, but NAA had no effect.

On the rooting stage, rooting and root growth were stimulated by IBA 500~1000mg/l, sucrose 3~7% and 6 days dark treatment. IBA 1000mg/l was more effective at root emergency.