

# 植物生長調節劑與兩階段培養對薑組織培養苗增殖與生長之影響

陳威臣<sup>1</sup> 曹進義<sup>1</sup> 吳姿穎<sup>2</sup> 夏奇鈺<sup>3,\*</sup>

## 摘要

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈺。2018。植物生長調節劑與兩階段培養對薑組織培養苗增殖與生長之影響。台灣農業研究 67(4):401–413。

本研究利用「廣東薑」(*Zingiber officinale* 'Guang Dong') 與「竹薑」(*Z. officinale* 'Chu') 根莖之新生芽體為培植體，建立其組織培養苗大量繁殖方式。切取長約 1 cm 之新生根莖芽體 (rhizome bud) 為培植體，先利用 75% 酒精處理 30 s 後，再以 0.6% NaOCl 消毒 15 min，培養於含有 0.4 mg L<sup>-1</sup> 苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 之 B5 固態培養基中 12 wk 後，建立無菌培養瓶苗。將直徑約 5 mm 之「廣東薑」與「竹薑」組培根莖培養於含有 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> 萘乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid; NAA) 之 B5 固態培養基 8 wk 後，兩品種每個培植體平均可誘得高約 1.8–2.6 cm 之組培苗 4.8–6.0 株，且瓶苗具有良好之根系；提高 BA 濃度至 4 mg L<sup>-1</sup> 雖可增加苗數，但苗高顯著降低；反之，對照組之組培苗雖然較高，但其苗數顯著較少。利用直徑約 5 mm 之組培根莖以液態培養 8 wk 後比較 BA 濃度之影響，結果顯示在 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理條件下，「廣東薑」與「竹薑」之每個培植體分別誘得 7.6–7.8 芽與 7.1–7.3 芽，但苗高僅約 1.2–1.3 cm。將液態培養所得之叢生芽苗團塊，不經分割而直接繼代培養於含有 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基 8 wk 後，若培植體源自於 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之液態處理，「廣東薑」與「竹薑」每個培植體分別可獲得高約 2.8–3.1 cm 之組培苗 11.2–13.0 株，以及高約 4.6–5.2 cm 之組培苗 13.3–14.9 株，顯示液-固態兩階段培養可應用於薑組培苗之大量繁殖。

**關鍵詞：**薑、液-固態培養、苯甲基腺嘌呤、大量繁殖。

## 前言

薑 (*Zingiber officinale*) 源自東南亞與亞洲熱帶地區，為薑科 (Zingiberaceae) 多年生宿根草本植物，應用部位為根莖 (rhizome)，俗稱生薑或薑母。因其具有特殊辣味與香氣，自古即廣泛應用於世界各地，食用與藥用記錄可追溯 2,500 年的悠久歷史 (Mishra *et al.* 2012; Tsai *et al.* 2013; Singh *et al.* 2014; Agrahari *et al.* 2015)；美國藥物食品檢驗局 (Food and Drug Administration; FDA) 亦將薑列為一

般性安全的食品添加劑 (generally recognized as safe; GRAS) (Zadeh & Kor 2014)。在藥用方面，傳統上使用薑來治療關節炎、風濕、扭傷酸痛、喉嚨痛、噁心嘔吐、高血壓、腸胃不適及發燒頭痛等症狀 (Ali *et al.* 2008; Deng & Pan 2009; Rehman *et al.* 2011; Mishra *et al.* 2012; Agrahari *et al.* 2015)。現代藥理研究證實，生薑具有清熱活血、消腫止痛、利尿解毒、緩解痠痛、健胃止吐、降血脂與膽固醇等功能；同時具有改善血液循環、降血糖、延緩衰老、護肝保胃的效果，以及抗菌、抗發炎、抗

投稿日期：2017 年 9 月 29 日；接受日期：2018 年 6 月 21 日。

\* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

氧化及抗癌等作用 (Mishra *et al.* 2012; Singh *et al.* 2014; Zadeh & Kor 2014; Agrahari *et al.* 2015)。

近年來，產薑量最大的國家為印度，其次為中國 (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2017)。薑在台灣約有 1,000 ha 的栽培面積，年產量約 3 萬公噸，主要產區在南投、台東、宜蘭及苗栗；栽培品種多為俗稱大指薑之「廣東薑」(又名南洋薑，*Zingiber officinale* 'Guang Dong')，其次為俗稱小指薑的「竹薑」(又名本島薑，*Z. officinale* 'Chu')；依據薑不同生育階段採收之產品可分為嫩薑、粉薑、老薑(或稱薑母)及種薑 (Tsai *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014; Council of Agriculture, Executive Yuan 2017a, 2017b; Hsieh *et al.* 2017)。薑栽培以無性繁殖根莖種苗為主，除了可供選擇之品種極少外，且種薑品質難以維持，主因是受到軟腐病 (soft rot, 病原為 *Pythium myriotylum*) 與青枯病 (bacterial wilt, 病原為 *Ralstonia solanacearum*) 造成之根莖腐爛，此兩病原均可藉由種薑或田間留存傳播，因此連作薑田病害發生機率最高，嚴重影響產量與品質；次為根瘤線蟲 (root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*) 的危害，傳播途徑也是藉由種薑或土壤中蟲卵擴散，蟲體入侵根莖後所造成的傷口更有利其他病菌侵入 (Han 2000; Kambaska & Santilata 2009; Kavyashree 2009; Abbas *et al.* 2011; Sathyagowri & Seran 2011; Tsai *et al.* 2013)。此外，由於種薑儲存不易，因此栽種適期常面臨薑苗缺乏之困境。為解決上述問題，優質種薑量產技術之建立實屬必要。

組織培養技術常用於作物種苗繁殖，具有繁殖倍率大、繁殖週期短、可週年生產等優點，是快速量產品質均一種苗的有效方法。目前薑產業均利用塊狀根莖種植栽培，此種無性種苗之繁殖效率偏低，且易成為病害擴散之感染源，採用組織培養技術建立薑種苗繁殖體系不僅可排除田間病原汙染，更具有繁殖率高之優點，是目前無性繁殖根莖種薑所不能及 (Huang *et al.* 2004; Luo *et al.* 2006; Lincy & Sasikumar 2010; Seran 2013; David

*et al.* 2016; Li 2016)。薑之微體繁殖多利用生長點 (Han 2000; Huang *et al.* 2004) 或根莖芽體 (rhizome bud) (Kavyashree 2009; Abbas *et al.* 2011; Ayenew *et al.* 2012)，培養於含有苯甲基腺嘌呤 (6-benzylaminopurine; BA) 與奈乙酸 ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid; NAA) 組合之培養基中以建立其組織培養繁殖體系，惟芽體繁殖倍率僅在 2-5 之間。針對薑之組織培養程序而言，則各研究報告存有差異，部分學者指出其繁殖體系須經芽體伸長與發根階段 (Han 2000; Huang *et al.* 2004; Kambaska & Santilata 2009; Abbas *et al.* 2011; Sathyagowri & Seran 2011; Ayenew *et al.* 2012)，而有些報告則指出可同時進行芽體誘導、伸長及發根而成苗 (Kavyashree 2009)。此外，液態培養可促進組培芽體增殖率，而後將叢生芽體培養於固態培養基中，即可形成發根良好的組培苗 (Lincy & Sasikumar 2010)。

本研究擬以薑根莖芽體建立微體繁殖，利用液態培養促進芽體增殖率，再將叢生芽體轉移至固態培養基之液-固態兩階段培養方式，生產不帶真菌或細菌病原之優質種苗作為生產種薑之用，提供農民更多元之選擇。

## 材料與方法

### 植物材料來源與消毒條件

本研究利用「廣東薑」與「竹薑」根莖芽體作為建立組織培養之材料。取自田間之根莖以清潔劑清洗去除表面殘土後，置於室溫約 26°C 環境下誘導芽體萌發。切取長約 1-2 cm 之「廣東薑」與「竹薑」根莖新生芽體，剝去 2-3 層鞘葉後作為培植體。先以 75% 酒精溶液 (ethanol) 浸泡手搖 30 s，而後浸入 0.6% 次氯酸鈉 (NaOCl, The Clorox Co., CA, USA) 溶液，置於水平迴轉振盪器 (orbital shaker, SK-302AB, SanKuan Co., Taichung, Taiwan)，利用 80 rpm 速度振搖 15 min 進行消毒。取出後以無菌水沖洗 3 次，而後接種於含有 0.4 mg L<sup>-1</sup> BA (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 之 B5 (Gamborg *et al.* 1968) 固態培養基，用以建立薑之組織培養瓶苗。

## 培養基配製與試驗培養條件

培植體係培養於含有 3% 蔗糖、0–4 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 之 B5 固態或液態培養基；固態培養基於加入 9 g L<sup>-1</sup> 洋菜 (Difco Bacto-agar, Carolina Co., Burlington, VT, USA) 前，先以 0.1–1 N NaOH 或 HCl 將 pH 值調為 5.7 ± 0.1，液態培養基則未添加洋菜，且 pH 值調為 5.2 ± 0.1。培養基以 121°C、1.05 kg cm<sup>-2</sup> 滅菌 20 min 後，冷卻備用。

固態與液態培養均是將培植體接種於內含 20 mL 培養基之 125-mL 三角瓶 (Erlenmeyer flask)；固態培養置於 26°C ± 2°C、光照 14 h、光強度 38 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 的環境；液態培養除使用 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 低光照外，其餘環境條件與固態培養相同，並置於水平迴轉式振盪器，以 80 rpm 速度進行振盪培養。試驗採 3 重複，每瓶接種 3 個培植體，共接種 9 個培植體。

## BA 濃度於固態或液態培養對薑組培苗增殖與生長之影響

將「廣東薑」與「竹薑」組培苗之假莖與根部切除後，取直徑約 5 mm 根莖作為培植體，培養於含不同 BA 濃度 (0、0.5、1、2、4 mg L<sup>-1</sup>) 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態或液態培養基。培養 8 wk 後，調查每個培植體誘導形成瓶苗數與芽數；調查時依瓶苗或芽體之生長形態分別記錄葉片展開苗 (plantlet with unfolded leaves; PL Fig. 3)、葉片未開之綠色芽 (green shoot-bud; GS) 於結果及淡黃色芽 (yellowish shoot-bud; YS) 標註的數量，三者總和為總芽數；瓶苗數或芽數除以總芽數，則表示不同形態芽苗的占比。苗高僅調查葉片展開苗，自假莖基部至頂葉之葉身基部的高度。

## 液-固態兩階段培養對薑組織培養苗增殖與生長之影響

利用源自上述不同 BA 濃度液態培養所得之叢生芽苗塊作為培植體，不經分割而直接繼代培養於內含 100 mL 固態培養基之 500-mL 蘭花瓶 (Orchid Flask, Taiwan Glass Ind. Corp., Taipei, Taiwan) 中。培養基為含有 0.5 mg L<sup>-1</sup>

BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基，培養 8 wk 後，調查每個培植體形成之瓶苗數與高度；以具有葉片展開苗之培植體數除以總培植體數代表其成苗率。

## 試驗設計和統計分析

本研究採用完全隨機設計 (completely randomized design; CRD) 進行試驗。試驗所得數據若為比例資料，須先經角度轉換後再進行分析。經 SAS Enterprise Guide 7.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 套裝統計分析軟體進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著 ( $P < 0.05$ )，則以最小顯著差異性測驗 (least significant difference test; LSD) 比較各處理平均值間之差異。

## 結果

### 薑組織培養無菌培植體之建立

本研究切取長約 1–2 cm 「廣東薑」新生根莖芽體 (圖 1A、1B) 為材料，剝除 2–3 層鞘葉後，以 75% 酒精與 0.6% 次氯酸鈉溶液進行兩階段消毒處理。之後接種於含有 0.4 mg L<sup>-1</sup> BA 之 B5 培養基，4 wk 後即可萌發成苗 (圖 1C)。而後將小苗接種於相同組成之新鮮培養基，經 8 wk 培養後可建立薑的無菌組培苗 (圖 1D)；「竹薑」之無菌組培苗，亦以上述方法建立 (資料未列)。

### 固態培養下 BA 濃度對薑組培苗增殖與生長之影響

將直徑約 5 mm 之「廣東薑」與「竹薑」組培根莖，培養於含有 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基培養 8 wk 後，兩品種在此條件下表現相類似，每個培植體平均可誘得 4.8–6.0 株組培苗，苗高約為 1.3–2.6 cm (表 1)。提高 BA 濃度至 4 mg L<sup>-1</sup> 雖可增加苗數，兩品種分別獲得 7.2 與 7.7 株組培苗，但其苗高卻明顯降低，分別僅約 1.3 與 1.8 cm。反之，對照組之苗高雖然較高，分別達 2.2 與 3.2 cm，其苗數與 0.5–1.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理組之結果相近，但明顯較 2–4 mg L<sup>-1</sup> BA 處理

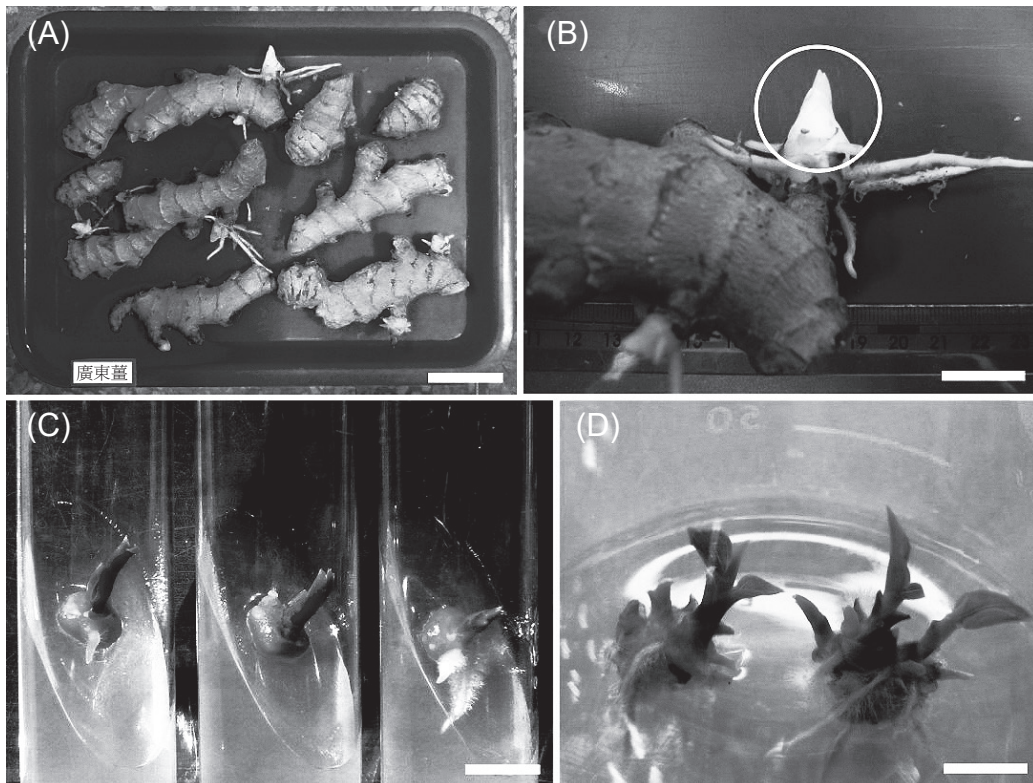


圖 1. 建立「廣東薑」組織培養初代培養。新生根莖芽體萌發於採自田間之根莖 (A, Bar = 5 cm; B, Bar = 2 cm); 根莖芽體培養於含有  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  BA 之 B5 固態培養基 4 wk 後, 芽體生長之情形 (C, Bar = 1 cm); 將此無菌芽體繼代培養於相同組成之固態培養基達 8 wk 後, 組培苗增殖與生長之情形 (D, Bar = 1 cm)。

**Fig. 1.** Establishment of *in vitro* culture of *Zingiber officinale* 'Guang Dong'. New rhizome bud germinated on rhizome derived from field (A, Bar = 5 cm; B, Bar = 2 cm), *in vitro* shoot grew while rhizome bud cultured on B5 medium supplemented with  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  6-benzylaminopurine (BA) for 4 wk (C, Bar = 1 cm), and multiple shoots were induced after *in vitro* shoot cultured on the same fresh medium for another 8 wk of culture (D, Bar = 1 cm).

組少, 每個培植體僅獲得約 4.4 與 4.1 株組培苗 (表 1)。此外, 對照組與各 BA 濃度處理之瓶苗均可發根良好 (圖 2)。

就組培苗高度而言, 「廣東薑」除 8.1% 對照組組培苗高於 4 cm 外, 於  $0.5\text{--}2.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA 處理條件下之苗高占比均類似, 苗高小於 2 cm 的比率約為 32.6–43.5%, 而苗高介於 2–4 cm 者約為 56.5–67.4%;  $4 \text{ mg L}^{-1}$  BA 處理之組培苗以低於 2 cm 的比率最高, 達 71.2% (表 1)。「竹薑」結果顯示, BA 處理組之組培苗大多介於 2–4 cm, 比率約為 67.9–80.1%; 對照組之組培苗則以大於 4 cm 苗高比率最高, 達 50.0% (表 1)。

### 液態培養下 BA 濃度對薑組培苗增殖與生長之影響

將直徑約 5 mm 「廣東薑」與「竹薑」組培根莖培養於含  $0.0\text{--}4.0 \text{ mg L}^{-1}$  BA 與  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  NAA 之 B5 液態培養基中, 經培養 8 wk 後所得瓶苗或芽體呈現 3 種形態, 分別為葉片展開苗 (PL, 圖 3A2)、葉片未開之綠色芽 (GS, 圖 3B3) 及淡黃色芽 (YS, 圖 3A4), 其中若綠色芽與淡黃色芽高度小於 1 cm 則不予記錄。「廣東薑」與「竹薑」每個培植體分別獲得 7.6–7.8 芽與 7.1–7.3 芽, 苗高僅 1.2–1.3 cm (表 2、圖 3)。將 BA 濃度提高至  $4 \text{ mg L}^{-1}$  時, 則「廣東薑」所得均為葉片未展開之綠色芽與淡黃色芽。兩

表 1. BA 濃度於固態培養下對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之影響。

Table 1. Effect of BA in the solid medium on plantlet proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Guang Dong' and 'Chu'.

Plant growth regulator BA (mg L <sup>-1</sup> )	No. of plantlets	Plantlet height (cm)	Percent of plantlet height (%)		
			< 2 cm	2–4 cm	> 4 cm
‘Guang Dong’					
0.0	4.4 ± 0.4 c <sup>1</sup>	2.2 ± 0.1 a	34.2 ± 11.2 b	57.6 ± 17.5 a	8.1 ± 2.1 a
0.5	5.6 ± 0.7 bc	1.8 ± 0.2 b	32.6 ± 12.6 b	67.4 ± 12.6 a	0.0 b
1.0	5.4 ± 1.1 bc	1.8 ± 0.2 b	43.5 ± 18.8 b	56.5 ± 18.8 a	0.0 b
2.0	6.0 ± 0.5 ab	1.8 ± 0.1 b	33.8 ± 11.7 b	66.2 ± 11.7 a	0.0 b
4.0	7.2 ± 0.5 a	1.3 ± 0.2 c	71.2 ± 10.6 a	28.8 ± 10.6 b	0.0 b
‘Chu’					
0.0	4.1 ± 0.4 c	3.2 ± 0.3 a	19.6 ± 8.2 ab	30.4 ± 9.3 b	50.0 ± 1.1 a
0.5	4.8 ± 0.4 bc	2.6 ± 0.3 b	13.3 ± 3.1 b	80.1 ± 6.8 a	6.7 ± 1.7 b
1.0	4.9 ± 0.2 bc	2.2 ± 0.2 bc	22.8 ± 5.0 ab	77.2 ± 6.4 a	0.0 c
2.0	6.0 ± 0.6 b	2.1 ± 0.1 cd	27.0 ± 8.4 ab	73.0 ± 8.4 a	0.0 c
4.0	7.7 ± 1.8 a	1.8 ± 0.1 d	32.1 ± 8.1 a	67.9 ± 8.1 a	0.0 c

<sup>2</sup> Explants were cultured on B5 medium containing various concentrations of 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk. Nine explants were used in each treatment.

<sup>1</sup> For each variety, means in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

品種在葉片展開苗數與綠色芽數上皆隨著 BA 濃度提高而減少，但是淡黃色芽數則隨之增加；BA 濃度對於芽體型態之影響以「廣東薑」較「竹薑」明顯，前者在 BA ≥ 1 mg L<sup>-1</sup> 處理下，淡黃色芽之比率皆超過 80% (表 2)。

### 液-固態兩階段培養對薑組培苗增殖與生長之影響

將上述「廣東薑」與「竹薑」於液態培養所得含葉片展開苗、綠色芽或淡黃色芽之叢生芽苗團塊，不經分割直接繼代培養於含 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基 8 wk 後，多數芽體均可發育成為葉片展開苗 (圖 4)；成苗率則以「竹薑」較「廣東薑」高，前者在對照組與處理組均可達 100.0%，而後者以 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理僅 55.6% 為最低，其餘 BA 處理組與對照組之成苗率則介於 66.7–88.9% 之間 (表 3)。表 3 結果顯示，源自 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理之「廣東薑」可得 11.2–13.0 苗，與對照組所得 10.2 苗之間無顯著差異，苗高約為 2.8–3.1 cm，較對照組之 4.1 cm 低，而源

自 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理之苗數明顯低於其他 BA 處理組。「竹薑」結果顯示，源自 0.0–4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理之苗數間並無顯著差異，約在 11.2–14.9 苗之間，而源自 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 處理之苗高雖顯著低於其他 BA 處理組，但仍可達約 4.2 cm (表 3)。

## 討論

薑組織培養所用之材料為根莖，因其位於地下而易附著塵土，並含有較多的細菌與真菌，導致初代培養的消毒成功率不佳。酒精、次氯酸鈉及氯化汞 (mercuric chloride; HgCl<sub>2</sub>) 是較常用的消毒藥劑，部分學者也利用殺菌劑 (fungicide) 或抗生素 (antibiotic) 克服真菌或細菌污染，但須搭配多種藥劑方能達成消毒效果 (Deng & Pan 2009; Kambaska & Santilata 2009; Kavyashree 2009; Abbas *et al.* 2011; Sathyagowri & Seran 2011; Seran 2013; David *et al.* 2016; Li 2016)。對於初代培養之效率而言，除上述消毒藥劑外，薑培植體大小亦為影響無菌培養成功與否的因子之一。雖然使用較

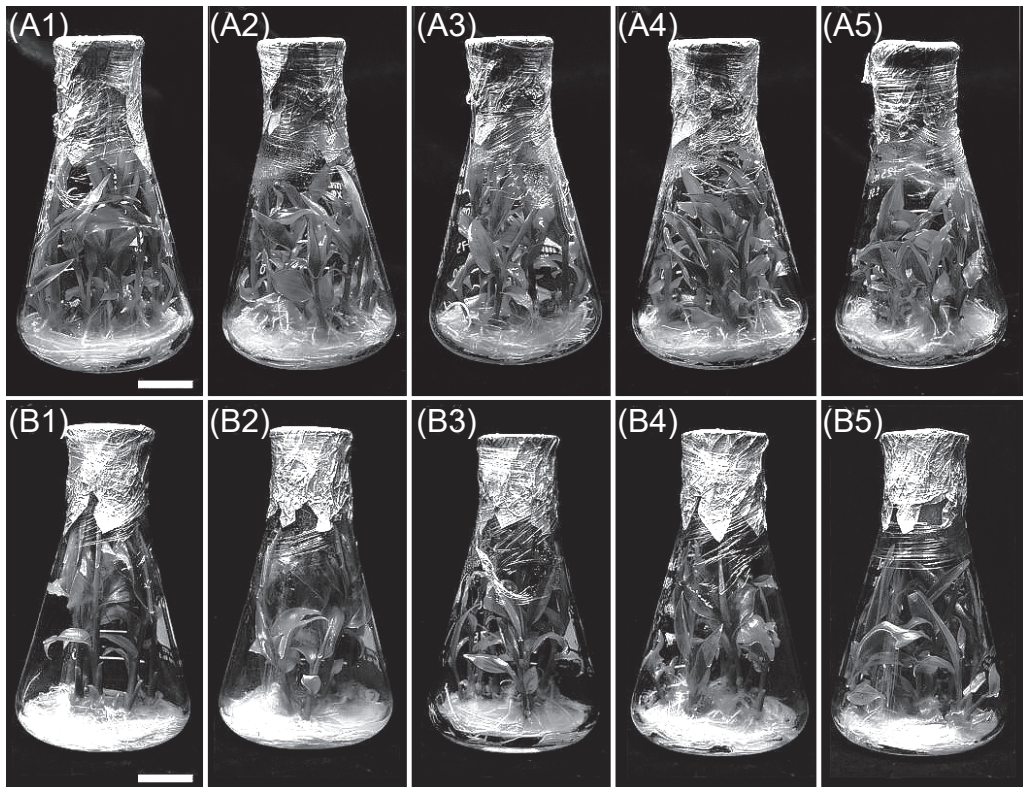


圖 2. BA 濃度於固態培養下對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之情形。「廣東薑」(A)與「竹薑」(B)之組培根莖分別培養於含有 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (依序為 A 與 B 圖中之 1、2、3、4、5) 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) 之 B5 固態培養基 8 wk 後之瓶苗；Bar = 2 cm。

**Fig. 2.** Effect of 6-benzylaminopurine (BA) concentration in the solid medium on plantlet proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Guang Dong' (A) and 'Chu' (B). Explants cultured on B5 solid medium supplemented with 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (1, 2, 3, 4, and 5 in A and B, respectively) and 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk of culture. Bar = 2 cm.

大培植體具有較佳之芽體誘導效果，但同時伴隨著污染率提高的問題 (Seran 2013)；一般而言，薑多以 5–10 mm 根莖芽體作為培植體 (Kavyashree 2009; Seran 2013)；而利用較小培植體 (0.3–0.5 mm)，則有避免病毒污染的優點 (Han 2000)。本研究以取自田間之「廣東薑」(圖 1) 與「竹薑」根莖經清潔後，誘導萌發新生根莖芽體為培植體，以酒精與次氯酸鈉溶液進行兩段式消毒的成功率約 70% (資料未列)，顯示在清潔環境下萌發之新生芽體不僅再生能力佳，且能提高後續之消毒成功率。

培養基中所含之植物生長調節劑對芽體的誘導與生長有直接影響，是影響薑組培苗繁殖效率的重要因子 (Seran 2013)。薑之莖頂與

根莖芽體於不含 BA 之培養基時，並無法誘得芽體，但是在添加 BA 後即可促使芽體萌發，顯示 BA 為芽體誘導之必要條件 (Deng & Pan 2009; Kambaska & Santilata 2009; Kavyashree 2009)。Han (2000) 利用 0.3–0.5 mm 「廣東薑」莖頂，培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 培養基 90 d (約 3 mo) 後，每個莖頂可得約 5.5 個芽體。Huang *et al.* (2004) 將 0.4–0.5 mm 「竹薑」生長點，培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS (Murashige & Skoog 1962) 培養基，增殖倍率為每月 3.5 芽。Ayenew *et al.* (2012) 以 15 mm 衣索比亞薑 (Ethiopian) 根莖芽體，培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> BA 與 1 mg L<sup>-1</sup> kinetin 之 MS 培養基 6 wk 後，

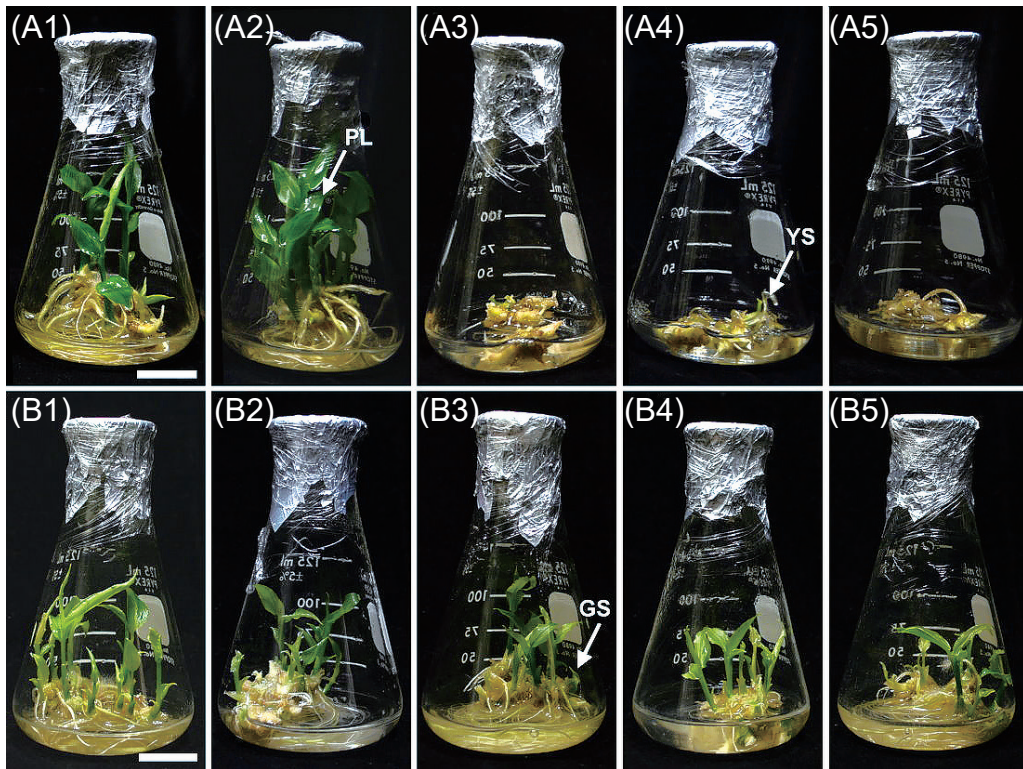


圖 3. BA 濃度於液態培養下對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之情形。「廣東薑」(A) 與「竹薑」(B) 之組培根莖分別培養於含有 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (依序為 A 與 B 圖中之 1、2、3、4、5) 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) 之 B5 液態培養基 8 wk 後所形成之葉片展開苗 (PL, A2), 以及葉片未開之綠色芽 (GS, B3) 與淡黃色芽 (YS, A4); Bar = 2 cm。

**Fig. 3.** Effect of 6-benzylaminopurine (BA) concentration in the liquid medium on plantlet proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Guang Dong' (A) and 'Chu' (B). Plantlets with unfolded leaves (PL, A2), green shoot-bud (GS, B3), and yellowish shoot-bud (YS, A4) were obtained from the *in vitro* rhizome explant cultured on B5 liquid medium supplemented with 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (1, 2, 3, 4, and 5 in A and B, respectively) and 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk. Bar = 2 cm.

可形成約 7 株組培苗，且參試兩品種 ('Yali' 與 'Boziab') 有相類似的結果。埃及薑 (Egypt) 根莖芽體培養於含有 4.5 mg L<sup>-1</sup> BA 之 MS 培養基 12 wk 後 (4 wk time<sup>-1</sup>, 3 times)，可形成約 8 株組培苗 (Abbas *et al.* 2011)。Kavyashree (2009) 利用 5–10 mm 印度薑 ('Varada') 根莖芽體，培養於含有 17.76  $\mu$ M (約 4 mg L<sup>-1</sup>) BA 之 LS (Linsmaier & Skoog 1965) 培養基 4 wk 後，芽體增殖率達 4 倍。綜合上述研究結果顯示，生長點或根莖芽體培養於 2–4 mg L<sup>-1</sup> BA 處理下，每 4 wk 之芽體增殖率分別為 1.8–3.5 芽與 2.7–4.7 芽，似乎培植體種類與大小對芽體增殖率並無明顯影響。Han (2000) 與 Huang

*et al.* (2004) 分別以「廣東薑」或「竹薑」莖頂進行培養，每月芽體增殖率分別達 1.8 芽與 3.5 芽。本研究以「廣東薑」根莖芽體培養結果顯示，根莖芽體於含有 0.4 mg L<sup>-1</sup> BA 之 B5 固態培養基 4 wk 後即可誘使生長。而後將此芽體繼代培養於相同組成之新鮮培養基 8 wk 後，僅獲得約 3–4 芽，亦即每 4 wk 之增殖率僅 1.0–1.1 芽 (資料未列，參考圖 1)，推測 BA 濃度對於薑芽體增殖率之高低具有明顯影響。此外，由於考量「廣東薑」與「竹薑」根莖芽體初代培養之高污染率問題，因此先以較低 BA 濃度誘使根莖芽體生長後，再以較高 BA 濃度進行芽體增殖的培養策略。

表 2. BA 濃度於液態培養下對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖與生長之影響。

Table 2. Effect of BA in the liquid medium on plantlet proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Guang Dong' and 'Chu'.

BA (mg L <sup>-1</sup> )	No. of plantlets	Plantlet height (cm)	Plantlet with unfolded leaves (%)	Percent of shoot-bud (%)	
				Green shoot-bud	Yellowish shoot-bud
'Guang Dong'					
0.0	6.1 ± 0.2 b <sup>y</sup>	1.4 ± 0.1 a	29.0 ± 11.3 a	32.8 ± 10.1 a	38.1 ± 4.4 c
0.5	7.8 ± 0.2 a	1.3 ± 0.2 a	25.4 ± 18.8 a	22.9 ± 6.8 a	51.7 ± 20.6 c
1.0	7.6 ± 0.5 a	1.3 ± 0.3 a	6.2 ± 4.7 ab	13.6 ± 9.8 a	80.3 ± 17.1 bc
2.0	7.6 ± 0.4 a	1.2 ± 0.0 a	5.9 ± 2.1 bc	7.4 ± 9.5 a	86.6 ± 12.2 ab
4.0	6.3 ± 0.9 b	- <sup>x</sup>	0.0 ± 9.5 c	4.9 ± 4.6 a	95.1 ± 4.6 a
'Chu'					
0.0	6.7 ± 1.0 a	1.6 ± 0.4 a	54.2 ± 7.7 a	23.7 ± 11.7 a	22.1 ± 4.3 c
0.5	7.1 ± 0.2 a	1.3 ± 0.1 a	48.8 ± 18.8 a	29.7 ± 1.9 a	21.6 ± 16.9 c
1.0	7.2 ± 0.6 a	1.3 ± 0.2 a	43.9 ± 4.7 ab	22.9 ± 6.5 a	33.2 ± 11.3 bc
2.0	7.3 ± 0.6 a	1.2 ± 0.1 a	27.4 ± 2.1 bc	24.7 ± 9.1 a	47.9 ± 8.0 ab
4.0	7.8 ± 1.3 a	1.3 ± 0.3 a	9.9 ± 9.5 c	24.6 ± 9.6 a	65.5 ± 14.0 a

<sup>z</sup> Explants were cultured on B5 medium containing various concentration of 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk. Nine explants were used in each treatment.

<sup>y</sup> For each variety, means in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

<sup>x</sup> No buds with unfolded leaves.

薑組培苗繁殖常利用 1–5 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.1–2 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基，此組成可誘導芽體形成而達到增殖效果，且 BA 配合 NAA 處理對芽體增殖效率顯著優於單獨使用 BA (Deng & Pan 2009; Kambaska & Santilata 2009; Seran 2013)。Li (2016) 將山東薑根莖芽體培養於含有 1.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基 30 d 後，芽體增殖率達 3.5 倍。印度薑 'Suprava' 與 'Suruchi' 的研究結果顯示，長約 1 cm 根莖芽體培養於含有 2 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基 6 wk 後，誘得株高約 6.2 cm 之組培苗達 7.5 苗；若將 BA 濃度提高至 2.5–3 mg L<sup>-1</sup>，則會形成癒傷組織且降低芽體數量 (Kambaska & Santilata 2009)。本研究結果顯示，提高 BA 濃度至 4.0 mg L<sup>-1</sup> 雖可促進苗數增加，但苗高顯著降低；此外，本研究中使用 2.0–4.0 mg L<sup>-1</sup> BA 濃度處理「廣東薑」與「竹薑」並未形成癒傷組織，亦未見芽數減少之現象。上述兩研究顯示不同的結果，推測其原因可能是品種間差異所造成。

Seran (2013) 之評論報告指出，薑組培芽體若培養於含有較高 BA 濃度之培養基中，則其伸長與發根均會受抑制，因此在芽體量繁殖後，培養基需要調降 BA 濃度，誘使芽體伸長與發根後才能成為組培苗。Han (2000) 於「廣東薑」莖頂培養研究指出，其誘導所得之芽體並無法同時發根成苗，必須將芽體繼代培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基中誘導發根。「竹薑」(Huang *et al.* 2004) 與衣索比亞薑 (Ayenew *et al.* 2012) 利用生長點為培植體之研究結果亦顯示，芽體須經過伸長與發根階段才能成為組培苗。Sathyagowri & Seran (2011) 利用斯里蘭卡薑 'Local'、'Chinese' 及 'Ragoon' 的研究結果也顯示，組培苗的養成需要經過兩個階段，先將 5 mm 根莖芽體培養於含有 5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基 6 wk 後，誘導芽體成為叢生芽，而後再將叢生芽分切後，繼代培養於含有 3 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基中，促進芽體伸長與發根而成為組培苗。印度薑 (Kambaska & Santilata 2009)、埃及薑 (Abbas *et al.*

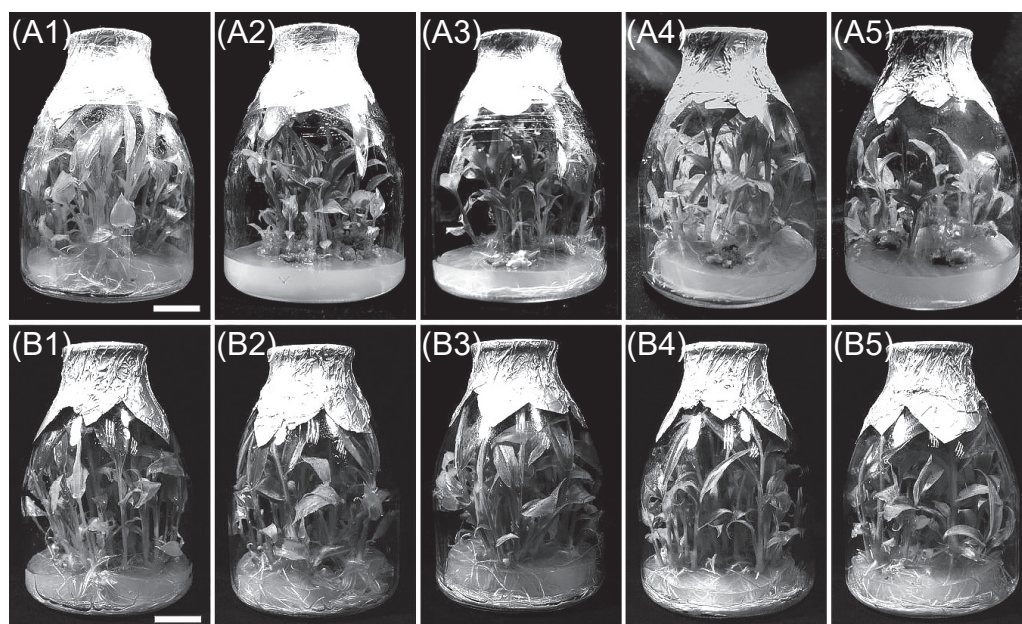


圖 4. 源自不同 BA 濃度液態培養之「廣東薑」與「竹薑」於液-固兩階段培養後組培苗增殖與生長之情形。「廣東薑」(A)與「竹薑」(B)之組培根莖先於含有 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (依序為 A 與 B 圖中之 1、2、3、4、5) 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 液態培養基中培養 8 wk 後，將未經切割之葉片展開苗、綠色芽及淡黃色芽直接繼代培養於含有 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基 8 wk 後之瓶苗生長情形；Bar = 1 cm。

**Fig. 4.** Effect of 6-benzylaminopurine (BA) and liquid-solid two-stage culture on plantlet proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* ‘Guang Dong’ (A) and ‘Chu’ (B). Uncut explants were derived from B5 liquid medium containing 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA (1, 2, 3, 4, and 5 in A and B, respectively) and 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk of culture before subculturing on the B5 solid medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA for another 8 wk of culture. Bar = 1 cm.

2011) 及山東薑 (Li 2016) 均利用類似之組培苗量化繁殖策略，亦即先以較高 BA 濃度誘導大量芽體形成，而後再將其繼代培養於調降 BA 濃度之培養基中，則可促進芽體伸長與發根而成為正常瓶苗。

然而 Kavyashree (2009) 於印度薑 ‘Varada’ 的研究指出，根莖芽體培養於含有 17.76  $\mu$ M (4 mg L<sup>-1</sup>) BA 之 LS 培養基 4 wk 後，可誘導芽體形成，再經過 2–3 次繼代於相同組成培養基，只須一種培養基組成即可發根成苗。本研究結果顯示，將根莖芽體培養於含有 0.4 mg L<sup>-1</sup> BA 之 B5 培養基 2 次，共 12 wk 之培養後，即形成每苗含 3–4 芽且發根之組培苗 (圖 1C、1D)。由上述研究來看，不同之培植體與 BA 濃度會影響薑組培苗繁殖之效率；以生長點為培植體，須經芽體增殖與伸長發根兩個階段才能成為組培苗，而利用根莖芽體作為培植體，

則其芽體較易發根而成苗，然而提高 BA 濃度則會抑制芽體伸長發根，必須將芽體繼代培養於調降 BA 濃度之培養基中，藉以促使芽體伸長與發根。推測根莖芽體基部可能是已分化之根莖組織，因此根系發育極為容易；然而，莖頂係尚未分化之地上部組織，因此根系發育則相對困難；而其他需要兩個階段才能成苗的相關研究，則可能是品種差異或 BA 濃度過高所導致的結果，抑或是組培苗量化繁殖的策略應用。

Seran (2013) 的評論指出，薑的芽體若培養於含有 1–5 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.0–0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基，可同時增殖芽體與發根而成苗。David *et al.* (2016) 將 5–10 mm 馬來西亞薑 ‘Tambunan’ 根莖芽體，培養於含有 3 mg L<sup>-1</sup> BA 與 1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 培養基中 10 wk 後，可獲得 6.14 株發根組培苗。Lincy

表 3. 源自不同 BA 濃度液態培養基之「廣東薑」與「竹薑」培植體於固態培養基中對組培苗增殖與生長之影響。

**Table 3.** Effect of explants derived from various BA concentrations in the liquid medium on plantlet proliferation and growth after subculturing in the solid medium of *Zingiber officinale* 'Guang Dong' and 'Chu'<sup>z</sup>.

BA (mg L <sup>-1</sup> )	No. of plantlets	Plantlet height (cm)	Plantlet formation (%)
'Guang Dong'			
0.0	10.2 ± 1.4 ab <sup>y</sup>	4.1 ± 0.6 a	88.9 ± 19.2 a
0.5	12.5 ± 2.9 a	2.8 ± 0.3 b	88.9 ± 19.2 a
1.0	13.0 ± 4.5 a	3.1 ± 0.3 b	66.7 ± 0.0 ab
2.0	11.2 ± 1.5 a	2.8 ± 0.4 b	88.9 ± 19.2 a
4.0	3.9 ± 5.3 b	2.4 ± 0.8 b	55.6 ± 19.2 b
'Chu'			
0.0	11.2 ± 1.2 a	6.1 ± 0.6 a	100.0 a
0.5	14.9 ± 3.3 a	5.2 ± 0.9 ab	100.0 a
1.0	13.5 ± 1.3 a	5.0 ± 0.3 bc	100.0 a
2.0	13.3 ± 2.5 a	4.6 ± 0.2 bc	100.0 a
4.0	14.9 ± 2.0 a	4.2 ± 0.3 c	100.0 a

<sup>z</sup> Explants derived from B5 liquid medium containing 0–4 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> α-naphthaleneacetic acid (NAA) for 8 wk of culture, and the explants without cutting were subcultured on the B5 solid medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA for another 8 wk of culture. Nine explants were used in each treatment.

<sup>y</sup> For each variety, means in the same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

& Sasikumar (2010) 將 1.0–1.5 cm 印度薑根莖芽體，培養於含有 1.0 mg L<sup>-1</sup> 賽本隆 (thidiazuron, TDZ) 配合 0.5 與 1.0 mg L<sup>-1</sup> 吡啶丁酸 (indole butyric acid; IBA) 之 MS 培養基中 2 mo 後，兩品種 'Jamaica' 與 'Varada' 分別達 8.8–12.9 個芽與 6.8–8.1 條根。本研究結果顯示，0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 處理之每個培植體可誘得約 5–6 苗，苗高約 1.8–2.6 cm (表 1)；提高 BA 濃度至 4.0 mg L<sup>-1</sup> 雖可增加苗數，但苗高顯著較低；反之，對照組之苗高雖然較高，但苗數卻顯著較少 (表 1)；此外，在此增殖階段之組培芽體均可同時發根良好而成苗 (圖 2)，因此本研究並未調查各 BA 處理所得組培苗之根數與根長。綜合上述研究結果指出，薑根莖培植體培養於含有適當細胞分裂素 (BA 與 TDZ) 與生長素 (NAA 與 IBA) 濃度組合之處理，則可具有促進芽體增殖、伸長及發根的效果。本研究於「廣東薑」與「竹薑」組培苗數量與高度之結果顯示，雖然對照組之組培苗顯著較高，且芽數上與 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 處理組並無顯著差異，但是 BA 處理具有較多芽數，考量為維持後續培養時之增

殖、伸長及發根效率，建議可利用 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 配合 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 培養基，作為薑組培苗之繼代培養基。

Luo *et al.* (2006) 利用 30 mL 固態培養基或於固態培養基上添加少量 10 mL 液態培養基的淺層液態培養方式，進行「廣東薑」組培苗繁殖研究，結果顯示固態與淺層液態培養方式在培養 1 mo 後之發根率均可達 100%，但是淺層液態處理之組培苗葉片較大且植株較為健壯。Lincy & Sasikumar (2010) 利用 1.0–1.5 cm 印度薑 'Jamaica' 與 'Varada' 地上部芽體，培養於只含有 TDZ 的固態培養基，所誘得的芽體數較少且大多發育異常，若以液態培養則可顯著提高芽體增殖率；而後將叢生芽體培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ 配合 0.5 或 1.0 mg L<sup>-1</sup> IBA 之 MS 液態培養基中 3 wk 後，芽體伸長且發根成為白色叢生苗；而後再將每叢含有 4–5 芽之叢生苗作為培植體，培養於含有 1 mg L<sup>-1</sup> BA 與 1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 MS 固態培養基中約 45 d 後，即可形成發根良好的綠色叢生組培苗。雖然報告中並未提及芽體增殖率，但可知液-固兩階段培養方式具有促進組培苗增殖與

生長效果。本研究於「廣東薑」與「竹薑」也顯示相類似結果，雖然液態培養下每個培植體獲得約 6.1–7.8 芽，但卻存在大量小於 1 cm 的淡黃色芽 (表 2、圖 3)。因此，後續再將叢生芽繼代培養於固態培養基中，以促使大量芽體伸長且發根成為正常苗。表 3 與圖 4 之結果顯示，「廣東薑」與「竹薑」於液態培養下所得叢生芽團塊，不經切割而直接繼代培養於固態培養基中，可使「廣東薑」芽苗團塊中部分芽體長成正常苗，其成苗率約 55.6–88.9%，而「竹薑」之成苗率更可達到 100%；就瓶苗增殖率而言，兩品種均以源自 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA 液態處理之結果較佳，顯示液-固態兩階段培養可利用於薑組培苗之大量繁殖。此外，「廣東薑」與「竹薑」經液態與固態兩階段共 16 wk 培養後，每 8 wk 的平均增殖率分別為 6.50 (13 苗/2 次) 與 7.45 (14.9 苗/2 次) (表 3)；相較於固態培養 8 wk 後所得 7.2 與 7.7 之增殖率的差異不大，但兩階段培養方式之優點在於所得瓶苗較高 (表 1、表 3)，且在液態培養後繼代培養時，無須切割直接轉入固態培養基中。而固態培養則因根系已發育完成，繼代培養時必須切除部分假莖與根系，兩培養方式在操作程序比較下，液-固態兩階段培養方式顯然較為省工，但是卻也存在液態培養所需振盪培養設備需求的問題。

本研究利用「廣東薑」與「竹薑」之根莖芽體，已建立其微體繁殖方式，可將組培芽體培養於含有 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA 與 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA 之 B5 固態培養基，可達瓶苗增殖、伸長及發根成苗之目的。此外，本研究同時建立液-固態兩階段培養方式，不僅有效促進組培苗之增殖率，且可縮短組培操作之時間；後續將針對苗數與苗高對於薑苗生長的重要性，並探討組培苗之適當馴化條件，完成量產優質薑種苗之生產鏈，提供薑種苗產業之應用。

## 誌謝

本文稿承農業試驗所花卉研究中心蔡嫻婷博士協助審閱，特此申謝。

## 引用文獻

- Abbas, M. S., H. S. Taha, U. I. Aly, H. M. El-Shabrawi, and E. I. Gaber. 2011. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). J. Gene. Engine. Biotech. 9:165–172.
- Agrahari, P., P. Panda, N. K. Verma, W. U. Khan, and S. Darbari. 2015. A brief study on *Zingiber officinale*-A review. J. Drug Dis. Therap. 3:20–27.
- Ali, B. H., G. Blunden, M. O. Tanira, and A. Nemmar. 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. Food Chem. Toxicol. 46:409–420.
- Ayenew, B., W. Tefera, and B. Kassahun. 2012. *In vitro* propagation of Ethiopian ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars: Evaluation of explant types and hormone combinations. Afr. J. Biotechnol. 11:3911–3918.
- Chen, W. L., R. S. Li, Z. H. Tsai, and C. H. Hsiao. 2014. Study on improving sprout forcing methods for early ginger (*Zingiber officinale*) production. J. Taiwan Soc. Hort. Sci. 60:253–264. (in Chinese with English abstract)
- Council of Agriculture, Executive Yuan. 2017a. A survey of vegetable production in Taiwan. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx> (visit on 2017/6/6) (in Chinese)
- Council of Agriculture, Executive Yuan. 2017b. Yearly report of Taiwan's agriculture. <http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx> (visit on 2017/6/6) (in Chinese)
- David, D., T. Y. Ji, and J. A. Gansau. 2016. *In vitro* propagation of *Zingiber officinale* Rosc. 'Tambunan'. Trans. Sci. Technol. 3:162–167.
- Deng, N. F. and B. L. Pan. 2009. Research progress on tissue culture of ginger. J. Anhui Agric. Sci. 37:12406–12407, 12410. (in Chinese with English abstract)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Ginger visualize data in Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (visit on 2017/6/6)
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and O. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151–158.
- Han, C. M. 2000. Study on the shoot tip culture of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Res. Bull. KDARES 11:37–46. (in Chinese with English abstract)
- Hsieh, L. Y., C. J. Tsai, C. Y. Huang, and H. I. Chen. 2017. Production forecast for May 2017. <http://>

- www.coa.gov.tw/ws.php?id=2506392 (visit on 2017/6/6) (in Chinese)
- Huang, Y. X., J. C. Wang, F. F. Hem. D. B. Tang, C. Cui, C. H. Li, and Z. W. Liu. 2004. Studies of technology systems for meristem culture and rapid propagation of ginger (*Zingiber officinals*). J. Southwest Agric. Univ. (Nat. Sci.) 26:556–559. (in Chinese with English abstract)
- Kambaska, K. B. and S. Santilata. 2009. Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv- Suprava and Suruchi. J. Agric. Technol. 5:271–280.
- Kavyashree, R. 2009. An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of Ginger-var. Varada. Indian J. Biotechnol. 8:328–331.
- Li, F. 2016. Study on tissue culture and transplanting techniques of ginger. J. Liaoning Agric. Tech. College 18:13–14, 20. (in Chinese with English abstract)
- Lincy, A. and B. Sasikumar. 2010. Enhanced adventitious shoot regeneration from aerial stem explants of ginger using TDZ and its histological studies. Turk. J. Bot. 34:21–29.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18:100–127.
- Luo, T. K., X. L. Zhang, Z. Chen, Z. Tang, Q. Liu, and S. J. Zhu. 2006. Application of shallow liquid culture system for the rapid propagation technology of virus-free ginger. Chinese Agric. Sci. Bull. 22:75–77. (in Chinese with English abstract)
- Mishra, R. K., A. Kumar, and A. Kumar. 2012. Pharmacological activity of *Zingiber officinale*. Intl. J. Pharm. Chem. Sci. 1:1073–1078.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.
- Rehman, R., M. Akram, N. Akhtar, Q. Jabeen, T. Saeed, S. M. Ali Shah, K. Ahmed, G. Shaheen, and H. M. Asif. 2011. *Zingiber officinale* Roscoe (pharmacological activity). J. Med. Plants Res. 5:344–348.
- Sathyagowri, S. and T. H. Seran. 2011. *In vitro* plant regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with emphasis on initial culture establishment. Intl. J. Med. Arom. Plants 1:195–202.
- Seran, T. H. 2013. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through direct organogenesis: A review. Pak. J. Biol. Sci. 16:1826–1835.
- Singh, S. K., J. R. Patel, and D. Bachle. 2014. A review on *Zingiber officinale*: A natural gift. Intl. J. Pharm. Bio. Sci. 5:508–525.
- Tsai, J. H., H. L. Liu, C. W. Chen, Y. F. Tsai, and C. S. Chang. 2013. Studies on continuous cropping disease of ginger and its shoot promoting technology. Seed Nursery (Taiwan) 15:57–67. (in Chinese with English abstract)
- Zadeh, J. B. and N. M. Kor. 2014. Physiological and pharmaceutical effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) as a valuable medicinal plant. Euro. J. Exp. Bio. 4:87–90.

# Effect of Plant Growth Regulator and Two-Stage Culture on Proliferation and Growth of *In Vitro* Ginger Plantlets

Uei-Chern Chen<sup>1</sup>, Chin-Yi Tsao<sup>1</sup>, Tzu-Ying Wu<sup>2</sup>, and Chi-Ni Hsia<sup>3,\*</sup>

## Abstract

Chen, U. C., C. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2018. Effect of plant growth regulator and two-stage culture on proliferation and growth of *in vitro* ginger plantlets. *J. Taiwan Agric. Res.* 67(4):401–413.

Efficient protocols for *in vitro* multiplication of *Zingiber officinale* ‘Guang Dong’ and ‘Chu’ were established in this study. Newly germinated rhizome buds (about 1 cm) were treated with 75% alcohol for 30 s, followed by 0.6% NaOCl for 15 min, before cultured on a B5 basal medium containing 0.4 mg L<sup>-1</sup> 6-benzyladeninepurine (BA) for 12 wk to establish *in vitro* culture. Proliferation of 4.8–6.0 plantlets per explant with 1.8–2.6 cm in height were obtained by using 5 mm rhizome explants culturing on a B5 solid medium containing 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup>  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) for ‘Guang Dong’ and ‘Chu’. Good rooting was found for all plantlets derived from all treatments. Although more plantlets were obtained in the 4.0 mg L<sup>-1</sup> BA treatment, shorter plantlets were observed. On the contrary, higher plantlets with less numbers were found from the control. Proliferation of 7.6–7.8 and 7.1–7.3 plantlets per explant were obtained for ‘Guang Dong’ and ‘Chu’, respectively, by using 5 mm rhizome explants culturing on the liquid medium containing 0.5–2.0 mg L<sup>-1</sup> BA for 8 wk. However, plantlets with unfolded leaves of 1.2–1.3 cm in height were observed for both varieties. Uncut explants of plantlets with unfolded leaves, green shoot-buds, and yellowish shoot-buds derived from the liquid culture were subcultured onto the fresh solid B5 medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA for another 8 wk. Proliferation of 11.2–13.0 plantlets per explant with 2.8–3.1 cm in height and 13.3–14.9 plantlets per explant with 4.6–5.2 cm in height were obtained for ‘Guang Dong’ and ‘Chu’, respectively. This result indicated that using liquid-solid two-stage culture could be beneficial on *in vitro* multiplication of *Z. officinale*.

**Key words:** *Zingiber officinale*, Liquid-solid culture, 6-benzylaminopurine, Mass propagation.

---

Received: September 29, 2017; Accepted: June 21, 2018.

\* Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.