

根莖直徑與兩階段連續培養方式對薑組培苗 增殖與生長之影響

陳威臣¹ 曹進義² 吳姿穎³ 夏奇鈺^{4,*}

摘要

陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鈺。2021。根莖直徑與兩階段連續培養方式對薑組培苗增殖與生長之影響。台灣農業研究 70(2):117–128。

本研究以「廣東薑」(*Zingiber officinale* 'Guang Dong') 與「竹薑」(*Z. officinale* 'Chu') 組織培養根莖進行試驗，探討根莖直徑與液、固態兩階段連續培養方式對組培苗增殖與生長之影響。將直徑分別約 2、4 及 6 mm 根莖接種於含有 1.0 mg L⁻¹ 苯甲基腺嘌呤 (benzylaminopurine; BA) 與 0.1 mg L⁻¹ 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 Murashige & Skoog (MS) 固態培養基培養 8 wk，結果顯示「廣東薑」每一根莖可得 6.2–6.7 芽，但 3 種根莖直徑之間並無顯著差異。「竹薑」4 mm 與 6 mm 之每一根莖可得約 6.8–6.9 芽，顯著高於 2 mm 根莖所得之芽體；同時考慮瓶苗之株高與鮮重表現，則「廣東薑」與「竹薑」瓶苗增殖皆以利用直徑達 4 mm 或以上之根莖較佳。液、固態兩階段連續培養，係先將直徑約 5 mm 之根莖培養於含有 0.1 mg L⁻¹ NAA，並分別添加 0、0.5、1.0、2.0 mg L⁻¹ BA 之 MS 液態培養基中，培養 2、4 或 6 wk 後，將所得之芽苗團塊直接接種於含有 0.5 mg L⁻¹ BA 與 0.1 mg L⁻¹ NAA 之 MS 固態培養基中再培養 8 wk。結果顯示，「廣東薑」以含有 2.0 mg L⁻¹ BA 經 6 wk 液態培養處理之 24.6 芽顯著最多；「竹薑」在 6 wk 液態培養之 0.5–2.0 mg L⁻¹ BA 處理皆具有最高總芽數。綜合上述結果，建議利用直徑 4 mm 以上之根莖作為培植體，可兼顧瓶苗之增殖效率與生長品質；液、固態兩階段連續培養試驗中，若依平均每週可生產之芽數來看，「廣東薑」以 2.0 mg L⁻¹ BA 處理與「竹薑」以 1.0–2.0 mg L⁻¹ BA 處理之根莖，於液態培養 4 wk 後再繼代培養於固態培養基繼續培養 8 wk，所得之總芽數為最高。

關鍵詞：薑、微體繁殖、組培根莖、液態培養、兩階段連續培養。

前言

薑 (*Zingiber officinale*) 為薑科 (Zingiberaceae) 多年生宿根草本根莖類植物，原生於東南亞熱帶地區，因其根莖 (rhizome) 兼具食用與藥用功能，自古應用於世界各地。薑除了應用在食物調理與藥膳食療外，傳統醫學常用於緩解或治療風濕關節炎、扭傷酸痛、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; Singh *et al.* 2014)。現代藥理學亦證實，薑具有清熱活血、延緩衰老、護肝保胃及改善血液循環等功能，同時具有降血糖、降血脂和降膽固醇的效果，以及抗菌、抗發炎、抗氧化及抗癌等效用 (Singh *et al.* 2014; Zadeh & Kor 2014; Agrahari *et al.* 2015)。

台灣生薑的主要產區在南投、台東及苗栗等地，種植之品種多為「廣東薑」(*Z. officinale*

收件日期：2020 年 12 月 2 日；接受日期：2021 年 2 月 17 日。

* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。

³ 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。

‘Guang Dong’), 少量為「竹薑」(*Z. officinale* ‘Chu’)。生薑依其生育期長短, 可分為嫩薑、粉薑、老薑 (或稱薑母) 等 3 種 (Agriculture and Food Agency 2017; Council of Agriculture 2017a, 2017b; Chen *et al.* 2018)。薑栽培以無性繁殖根莖為主, 但種薑因為常感染薑軟腐病菌 (*Pythium myriotylum*) 與薑青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 而品質下降。上述病菌係藉由土壤或種薑而擴大傳播, 因此連作薑田之病害發生率高, 嚴重影響生薑的產量與品質 (Kambaska & Santilata 2009; Kavyashree 2009; Sathyagowri & Seran 2011)。此外, 由於種薑不易長期貯存, 栽種適期常面臨種薑缺乏的困境。因此, 如何減少種薑帶菌, 以及提供足量優質之種薑作為栽培應用, 是目前亟需解決的問題。

組織培養技術具有繁殖倍率大、繁殖週期短、可週年生產等優點, 乃量產品質均一種苗的有效方法。組織培養種苗繁殖過程係為無菌培養, 可排除病原生物之污染, 此優勢是傳統無性繁殖種薑所不能及 (Huang *et al.* 2004; Ma & Gang 2006; Deng & Pan 2009; Lincy & Sasikumar 2010; Liu *et al.* 2010; Seran 2013; Li 2016; Kasilingam *et al.* 2018)。利用液態培養或是液、固態兩階段連續培養方式, 可提高組培薑苗增殖與生長效率 (Lincy & Sasikumar 2010; Hapsari *et al.* 2011)。本研究前期已建立「廣東薑」與「竹薑」微體繁殖流程, 並以液態培養方式進行大量繁殖, 獲得淡黃色叢生芽苗團塊。然而, 須將此芽苗團塊移至固態培養基接續培養後, 方能長成具有綠色且葉片展開之正常苗, 在增殖與養成效率方面仍有改善之空間 (Chen *et al.* 2018)。為提高繁殖效率與瓶苗品質, 本研究擬藉由篩選適當培植體根莖直徑與縮短液態培養時間, 提升組培苗之增殖與養成效率, 達到量產優質種苗之目標。

材料與方法

培植體來源、培養基配製及培養條件

本研究利用 Chen *et al.* (2018) 建立之「廣東薑」(‘Guang Dong’) 與「竹薑」(‘Chu’) 瓶苗為材料。於固態培養基加入 9 g L⁻¹ 洋菜

(Bacto Agar, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 前, 先以 0.1–1.0 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⁻² 滅菌 20 min 後冷卻備用。固態培養環境為 26°C ± 2°C、38 μmol m⁻² s⁻¹ 光強度照光 14 h, 液態培養條件相同, 但光強度為 10 μmol m⁻² s⁻¹, 置於水平迴轉式振盪器 (orbital shaker, SanKuan Co., Taichung, Taiwan) 以 80 rpm 速度進行振盪培養。

根莖直徑對薑組培苗增殖與生長之影響

選取根莖直徑分別約為 2、4 或 6 mm 之「廣東薑」與「竹薑」組培苗, 切除根系但保留 2.5 cm 長之假莖作為培植體, 接種於內含 100 mL 培養基之 500-mL 蘭花瓶 (orchid flask, Taiwan Glass Ind. Corp., Hsinchu, Taiwan) 中進行試驗。培養基為含有 1.0 mg L⁻¹ 苯甲基腺嘌呤 [benzylamino-purine (BA), Sigma, St Louis, MO, USA] 與 0.1 mg L⁻¹ 萘乙酸 [α -naphthalene acetic acid (NAA), Sigma, St Louis, MO, USA] 之 Murashige & Skoog (MS) 固態培養基 (Murashige & Skoog 1962)。培養 8 wk 後, 調查每一培植體所得之芽數、苗高及鮮重。本試驗每處理採 3 重複, 每重複 (瓶) 接種 3 個培植體。

液態培養時間與 BA 濃度對薑組培苗增殖與生長之影響

選取根莖直徑約為 5 mm 之「廣東薑」與「竹薑」組培苗為材料, 將切除假莖與根系後之根莖培養於內含 20 mL 培養基之 125-mL 三角瓶 (Erlenmeyer flask) 中進行試驗。根莖培養於含有 0.1 mg L⁻¹ NAA 並分別添加 0、0.5、1.0 或 2.0 mg L⁻¹ BA 之 MS 液態培養基, 於培養 2、4 或 6 wk 後, 調查每一培植體所得之芽數。並依芽體生長形態分為葉片未展開之黃色芽 (yellow shoot-bud; YS) 與綠色芽 (green shoot-bud; GS) 及葉片展開芽 (plantlet with unfolded leave; PL) (圖 1), 計算個別數量。將 3 種形態芽體之總和作為總芽數, 以各別形態芽體之芽數除以總芽數為其所占比率。本試驗每處理採 3 重複, 每重複 (瓶) 接種 3 個培植體。

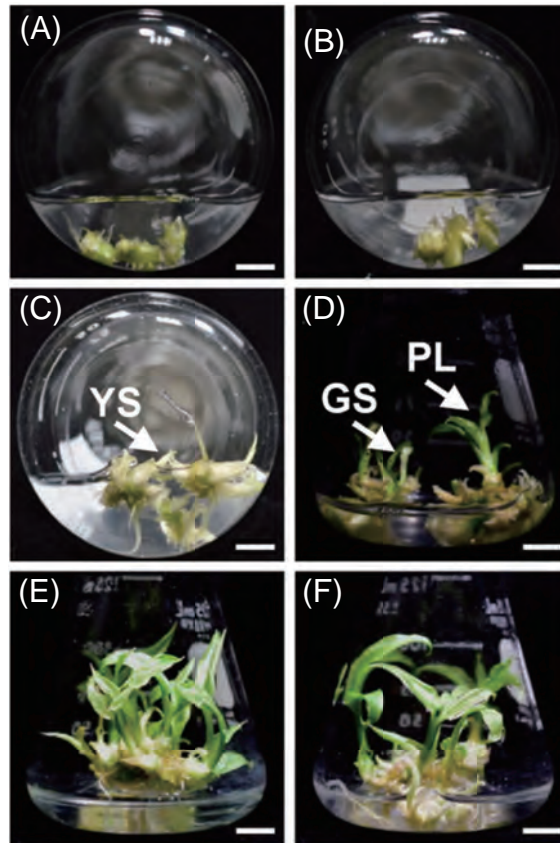


圖 1. 「竹薑」根莖於含有不同濃度 BA 之液態培養基中，培養不同時間後之叢生芽苗團塊或組培苗形成情形。以直徑約 5 mm 根莖培養於含有 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 Murashige & Skoog (MS) 液態培養基，並添加 (A) 0、(B) 1 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzyl-aminopurine; BA) 培養 2 wk，(C) 0.5、(D) 2 mg L^{-1} BA 培養 4 wk，以及 (E) 0.5、(F) 1 mg L^{-1} BA 培養 6 wk。YS：黃色芽、GS：綠色芽、PL：葉片展開芽。Bars = 1 cm。

Fig. 1. Shoot-bud clusters and plantlets of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Chu' derived from media with various benzylamino-purine (BA) concentrations and culture durations. *In vitro* rhizomes (about 5 mm in diameter) were cultured in a MS liquid medium supplemented with 0.1 mg L^{-1} NAA and in combined with (A) 0, (B) 1.0 mg L^{-1} BA for 2 wk; (C) 0.5, (D) 2.0 mg L^{-1} BA for 4 wk and (E) 0.5, (F) 1.0 mg L^{-1} BA for 6 wk of culture. YS: yellow shoot-bud; GS: green shoot-bud; and PL: plantlet with unfolded leave. Bars = 1 cm.

液、固態連續培養方式與 BA 濃度對薑組培苗增殖與生長之影響

將上述不同液態培養時間與 BA 濃度之組合試驗所得之芽苗團塊作為培植體，直接接種於內含 100 mL 固態培養基之 500-mL 蘭花瓶中。培養基為含有 0.5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基（簡稱為生長培養基），經 8 wk 培養後，調查每一培植體所得之芽數。本試驗每處理採 3 重複，每重複（瓶）接種 3 個培植體。

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。試驗所得若為百分率資料，則先經角度轉換後再進行分析，經 SAS Enterprise Guide 7.1 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 test) 比較各處理平均值間之差異。

結果

根莖直徑對薑組培苗增殖與生長之影響

將直徑約為 2、4 或 6 mm 之「廣東薑」與

「竹薑」根莖，接種於含有 1.0 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基中，培養 8 wk 後之結果如表 1 與圖 2。「廣東薑」每一根莖所得芽數在 6.2–6.7 之間，3 種根莖直徑間並

表 1. 「廣東薑」與「竹薑」根莖直徑對組培苗增殖與生長之影響。

Table 1. Effect of rhizome diameter on proliferation rate and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* ‘Guang Dong’ and ‘Chu’ plantlets².

Cultivar	Rhizome diameter (mm)	Total plantlets/explant (number)	Plantlet height (cm)	Fresh weight/plantlet (g)
‘Guang Dong’	2	$6.2 \pm 0.3 \text{ a}^{\text{y}}$	$2.6 \pm 0.2 \text{ b}$	$3.1 \pm 0.2 \text{ b}$
	4	$6.6 \pm 0.1 \text{ a}$	$3.0 \pm 0.2 \text{ ab}$	$4.9 \pm 0.3 \text{ a}$
	6	$6.7 \pm 0.0 \text{ a}$	$3.5 \pm 0.1 \text{ a}$	$5.3 \pm 0.1 \text{ a}$
‘Chu’	2	$4.9 \pm 0.2 \text{ b}$	$2.5 \pm 0.1 \text{ b}$	$2.5 \pm 0.2 \text{ b}$
	4	$6.8 \pm 0.3 \text{ a}$	$3.2 \pm 0.2 \text{ a}$	$4.4 \pm 0.2 \text{ a}$
	6	$6.9 \pm 0.1 \text{ a}$	$3.1 \pm 0.3 \text{ ab}$	$4.6 \pm 0.5 \text{ a}$

² *In vitro* rhizome explants (about 2, 4 or 6 mm in diameter) were cultured on Murashige & Skoog (MS) medium containing 1.0 mg L^{-1} benzyl-aminopurine (BA) and 0.1 mg L^{-1} α -naphthalene acetic acid (NAA) for 8 wk of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication. Plantlets higher than 1 cm were recorded.

³ Means in the same column in each cultivar followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test.

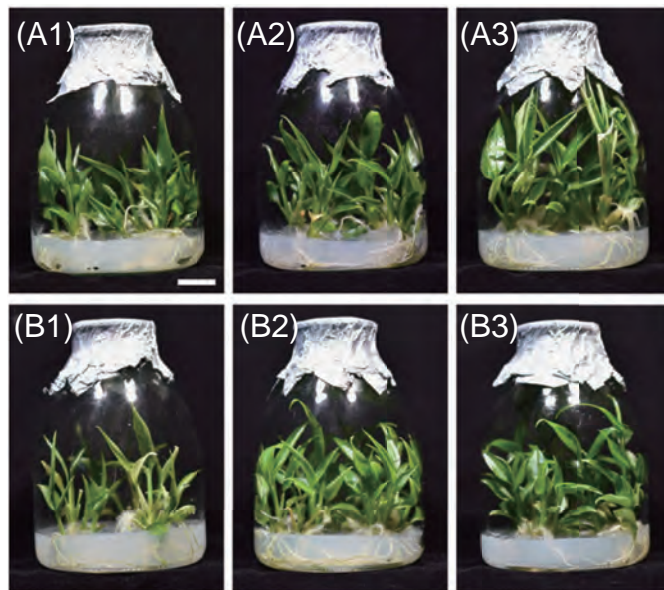


圖 2. 利用不同直徑薑根莖培養所得之組培苗增殖與生長情形。利用根莖直徑約為 (A1、B1) 2 mm、(A2、B2) 4 mm 及 (A3、B3) 6 mm 之 (A1–A3)「廣東薑」與 (B1–B3)「竹薑」根莖培植體，培養於含有 1.0 mg L^{-1} 苯甲基腺嘌呤 (benzyl-aminopurine; BA) 與 0.1 mg L^{-1} 萘乙酸 (α -naphthalene acetic acid; NAA) 之 Murashige & Skoog (MS) 固態培養基中，培養 8 wk 後之組培苗增殖與生長情形。Bar = 2 cm。

Fig. 2. Proliferation and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* plantlets were obtained by using rhizome in different diameters. *In vitro* plantlets of (A1–A3) *Z. officinale* ‘Guang Dong’ and (B1–B3) ‘Chu’ derived from rhizomes with about (A1, B1) 2, (A2, B2) 4, and (A3, B3) 6 mm in diameter were cultured on a MS medium supplemented 1.0 mg L^{-1} BA and 0.1 mg L^{-1} NAA for 8 wk of culture. Bar = 2 cm.

無顯著差異。苗高以 6 mm 根莖所得芽體之 3.5 cm 最高，顯著高於 2 mm 根莖所得芽體，但與 4 mm 根莖所得芽體並無顯著差異。鮮重以 4 mm 與 6 mm 根莖所得芽體分別為 4.9 g 與 5.3 g 較重，顯著多於 2 mm 根莖所得芽體。「竹薑」以 4 mm 與 6 mm 之根莖可得約 6.8–6.9 芽，顯著高於 2 mm 根莖所得芽數。苗高以 4 mm 根莖所得芽體之 3.2 cm 最高，顯著高於 2 mm 根莖所得芽體，但與 6 mm 根莖所得芽體無顯著差異。鮮重亦以 4 mm 與 6 mm 根莖所得芽體分別為 4.4 g 與 4.6 g 較重，顯著高於 2 mm 根莖所得芽體。

液、固態兩階段連續培養方式與 BA 濃度對「廣東薑」組培苗增殖與生長之影響

「廣東薑」培植體於不同 BA 濃度之液態培養基中培養不同時間後之變方分析 (ANOVA) 結果顯示，對總芽數而言，液態培養時間呈現非常顯著 ($P < 0.001$) 影響，而 BA 濃度的影響及參試兩因子間之交互效應並不顯著。液態培養時間對 3 種形態芽體之比率，均呈現非常顯著影響；BA 濃度僅對黃色芽 (YS) 比率呈現非常顯著影響，對綠色芽 (GS) 與葉片展開芽 (PL) 比率則具有顯著影響 ($P < 0.05$)。液態培養時間與 BA 濃度之交互效應對葉片展開芽與綠色芽比率，均呈現極顯著 ($P < 0.01$) 差異，但對黃色芽比率則是呈現顯著交互效應 ($P < 0.05$) (表 2)。

「廣東薑」培植體所得總芽數會隨液態培養時間延長而增加，液態培養 2、4 及 6 wk 後之每一培植體分別可得約 3.8–4.6 芽、5.0–5.3 芽及 5.7–6.1 芽。液態培養 2 wk 後，以 2 mg L⁻¹ BA 處理之總芽數顯著高於對照組，但與 0.5 或 1.0 mg L⁻¹ BA 處理之間並無顯著差異。而液態培養達 4 wk 與 6 wk 後，所有 BA 處理組與對照組間均無顯著差異。對芽體生長狀況而言，在液態培養不同週數後之黃色芽、綠色芽及葉片展開芽 (圖 1) 所占比率均有所差異；當培植體經液態培養 2 wk 後，所得芽體全部為黃色芽；培養 4 wk 後開始產生綠色芽；而葉片展開芽則須在培養達 6 wk 後才會形成，此時對照組之葉片展開芽比率顯著高於 BA 處理組，而 BA 處理組中的 0.5 mg L⁻¹ BA 處理顯

著高於 2.0 mg L⁻¹ BA 處理，但與 1.0 mg L⁻¹ BA 處理之間並無顯著差異 (表 2)。

將經由不同液態培養時間與 BA 濃度處理所得之「廣東薑」芽苗團塊，直接接種於固態生長培養基中，經 8 wk 培養後之結果如表 2 顯示。對總芽數而言，液態培養時間與 BA 濃度均呈現非常顯著影響，且參試兩因子間之交互效應也具有顯著差異；液態培養時間對綠色芽與葉片展開芽比率均呈現非常顯著影響，而 BA 濃度對綠色芽與葉片展開芽比率則均無顯著影響；參試兩因子之交互效應對綠色芽與葉片展開芽比率均呈現顯著差異 (表 2)。液態培養 2-wk 處理所得總芽數顯著低於 4-wk 與 6-wk 處理；液態培養 4-wk 之 BA 處理組所得總芽數達 20.0–20.5 芽，顯著高於對照組，其中仍有 10.0–11.7% 為綠色芽；而液態培養 6-wk 之 BA 處理組總芽數亦顯著高於對照組，其中以 2.0 mg L⁻¹ BA 處理達 24.6 芽為最高，但其中仍有 13.1% 為綠色芽 (表 2)。

液、固態兩階段連續培養方式與 BA 濃度對「竹薑」組培苗增殖與生長之影響

「竹薑」培植體於不同 BA 濃度之液態培養基中，培養不同時間後之變方分析結果顯示，對總芽數而言，液態培養時間具有非常顯著影響，而 BA 濃度則無顯著影響，且參試兩因子間之交互效應也無顯著差異。液態培養時間在 3 種形態芽體比率上，均呈現非常顯著影響；BA 濃度對黃色芽與綠色芽比率並無顯著影響，但對葉片展開芽比率則具有極顯著影響；液態培養時間與 BA 濃度之交互效應在黃色芽比率上呈現顯著差異，但對於綠色芽比率則無交互效應，而對於葉片展開芽比率則呈現非常顯著交互效應 (表 3)。

「竹薑」培植體所得總芽數亦隨著液態培養時間延長而增加，液態培養 2、4 及 6 wk 後之每一培植體分別可得約 4.0–4.3 芽、5.3–5.9 芽及 5.4–7.0 芽。在液態培養 2 wk 與 4 wk 後，BA 處理組與對照組之間並無顯著差異，而培養達 6 wk 後，則 2.0 mg L⁻¹ BA 處理組顯著高於 0.5 mg L⁻¹ BA 處理組與對照組，但與 1.0 mg L⁻¹ BA 處理組之間並無顯著差異。對組培苗生長狀況而言，在培養 2 wk 後所有芽體仍

表 2. 液、固態兩階段連續培養與 BA 濃度對「廣東薑」組織培養苗增殖與生長之影響。
Table 2. Effects of two-stage continuous culture and BA concentration on proliferation rate and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Guang Dong' plantlets.

Liquid culture period (wk)	BA (mg L ⁻¹)	Liquid culture ^z				Solid culture (8 wk) ^y			
		Total plantlets/ explant	Plantlets with yellowish buds (%)	Plantlets with green shoots (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)	Total plantlets/ expla	Plantlets with green shoots (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)
2	0.0	3.8 ± 0.2 g ^x	100.0 a	0.0 c	0.0 d	8.9 ± 1.8 e	21.8 ± 6.9 a	78.2 ± 6.9 c	
	0.5	4.2 ± 0.3 fg	100.0 a	0.0 c	0.0 d	9.8 ± 1.3 de	19.9 ± 4.6 ab	80.1 ± 4.6 c	
	1.0	4.2 ± 0.4 fg	100.0 a	0.0 c	0.0 d	9.8 ± 2.0 de	13.5 ± 2.6 ab	86.5 ± 2.6 bc	
	2.0	4.6 ± 0.3 ef	100.0 a	0.0 c	0.0 d	9.7 ± 0.6 de	14.6 ± 5.1 ab	85.4 ± 5.1 bc	
4	0.0	5.1 ± 0.2 cde	47.2 ± 16.0 b	52.8 ± 16.0 a	0.0 d	13.0 ± 1.5 c	9.1 ± 4.7 b	90.9 ± 4.7 b	
	0.5	5.3 ± 0.1 bcd	65.5 ± 18.6 b	34.5 ± 18.6 ab	0.0 d	20.5 ± 1.3 b	10.1 ± 5.1 ab	89.9 ± 5.1 bc	
	1.0	5.2 ± 0.1 bcde	100.0 a	0.0 c	0.0 d	20.1 ± 1.6 b	11.7 ± 2.1 ab	88.3 ± 2.1 bc	
	2.0	5.0 ± 0.2 de	100.0 a	0.0 c	0.0 d	20.0 ± 2.8 b	10.0 ± 2.4 ab	90.0 ± 2.4 bc	
6	0.0	5.7 ± 0.1 abc	11.8 ± 11.8 c	37.9 ± 4.7 ab	50.3 ± 7.7 a	12.4 ± 1.8 cd	0.0 c	100.0 a	
	0.5	6.1 ± 0.4 a	50.2 ± 10.7 b	27.4 ± 10.5 b	22.4 ± 0.4 b	19.6 ± 2.4 b	0.0 c	100.0 a	
	1.0	5.8 ± 0.1 ab	50.3 ± 9.2 b	28.9 ± 10.2 ab	20.8 ± 11.3 bc	21.1 ± 1.3 b	12.8 ± 1.6 ab	87.2 ± 1.6 bc	
	2.0	5.8 ± 0.2 ab	54.6 ± 19.0 b	38.0 ± 14.4 ab	7.4 ± 4.9 c	24.6 ± 1.7 a	13.1 ± 4.6 ab	86.9 ± 4.6 bc	
Source		<i>F</i> -test ^w							
Wk		***	***	***	***	***	***	***	
BA		ns	***	*	*	***	ns	ns	
Wk × BA		ns	*	**	**	***	*	*	

^z *In vitro* rhizome explants (about 5 mm in diameter) were cultured on Murashige & Skoog (MS) liquid medium containing 0.0–2.0 mg L⁻¹ benzyl-aminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) for 2, 4 and 6 wk of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

^y Uncultured shoot-bud derived from various treatments in liquid medium were subcultured in the MS solid medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA for extending 8 wk of culture.

^x Means in each same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

^w *F*-test of analysis of variance (ANOVA). ns: non-significant; *, **, *** are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

表 3. 液、固態兩階段連續培養與 BA 濃度對「竹薑」組織培養苗增殖與生長之影響。
Table 3. Effects of two-stage continuous culture and BA concentration on proliferation rate and growth of *in vitro* *Zingiber officinale* 'Chu' plantlets.

Liquid culture period (wk)	BA (mg L ⁻¹)	Liquid culture ^z					Solid culture (8 wk) ^y				
		Total plantlets/ explant	Plantlets with yellowish buds (%)	Plantlets with green shoots (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)	Total plantlets/ explant	Plantlets with green shoots (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)	Total plantlets/ explant	Plantlets with green shoots (%)	Plantlets with unfolded leaves (%)
2	0.0	4.0 ± 0.2 e ^s	100.0 a	0.0 c	0.0 c	4.6 ± 0.1 d	0.0 e	100.0 a			
	0.5	4.3 ± 0.0 de	100.0 a	0.0 c	0.0 c	5.4 ± 0.2 cd	9.4 ± 2.3 ab	90.6 ± 2.3 de			
	1.0	4.3 ± 0.3 de	100.0 a	0.0 c	0.0 c	6.2 ± 0.6 cd	7.7 ± 2.4 ab	92.3 ± 2.4 de			
	2.0	4.2 ± 0.5 e	100.0 a	0.0 c	0.0 c	6.1 ± 1.1 cd	12.9 ± 1.4 a	87.1 ± 1.4 e			
4	0.0	5.3 ± 0.2 cd	100.0 a	0.0 c	0.0 c	5.9 ± 0.5 cd	3.2 ± 3.2 cde	96.8 ± 3.2 abc			
	0.5	5.8 ± 0.3 bc	92.6 ± 7.4 ab	7.4 ± 7.4 bc	0.0 ± 0.1 c	8.0 ± 1.7 bc	4.7 ± 2.5 bcd	95.3 ± 2.5 bcd			
	1.0	5.9 ± 0.1 bc	88.5 ± 8.4 b	11.5 ± 8.4 b	0.0 ± 0.1 c	10.3 ± 1.0 ab	3.2 ± 3.2 cde	96.8 ± 3.2 abc			
	2.0	5.9 ± 0.1 bc	87.3 ± 2.3 b	12.7 ± 2.3 ab	0.0 c	11.1 ± 1.2 a	5.4 ± 4.1 abc	94.6 ± 4.1 cde			
6	0.0	5.4 ± 0.1 bc	5.9 ± 0.4 d	23.7 ± 5.8 a	70.4 ± 5.8 a	7.2 ± 0.3 cd	0.0 e	100.0 a			
	0.5	5.9 ± 0.1 bc	32.2 ± 4.9 c	26.9 ± 3.3 a	40.9 ± 4.2 b	10.4 ± 0.6 ab	1.5 ± 1.1 cde	98.5 ± 1.1 abc			
	1.0	6.4 ± 0.2 ab	30.4 ± 8.6 c	25.8 ± 6.4 a	43.8 ± 5.6 b	10.3 ± 0.8 ab	0.0 e	100.0 a			
	2.0	7.0 ± 0.6 a	32.0 ± 7.3 c	28.7 ± 2.9 a	39.4 ± 6.8 b	10.7 ± 0.2 ab	0.9 ± 0.9 de	99.1 ± 0.9 ab			
Source	<i>F</i> -test ^w										
Wk	***	***	***	***	***	***	***	***			
BA	ns	ns	ns	**	***	***	**	**			
Wk × BA	ns	*	ns	***	ns	ns	ns	ns			

^z *In vitro* rhizome explants (about 5 mm in diameter) were cultured on Murashige & Skoog (MS) liquid medium containing 0–2.0 mg L⁻¹ benzyl-aminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) for 2, 4 and 6 wk of culture. Each treatment had 3 replications, and 3 explants were used in each replication.

^y Uncultured shoot-bud derived from various treatments in liquid medium were subcultured in the MS solid medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA for extending 8 wk of culture.

^x Means in each same column followed by different letters are significantly different at the 5% level by least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.

^w *F*-test of analysis of variance (ANOVA). ns: non-significant; *, **, and *** are significant at 5%, 1% and 0.1% level, respectively.

為黃色芽；而培養達 4 wk 後，BA 處理組約有 7.4–12.7% 綠色芽形成。當培養達 6 wk 後，對照組之黃色芽約為 5.9%，顯著低於 BA 處理組。而在 BA 處理組間並無顯著差異，綠色芽約占 23.7–28.7%，BA 處理組與對照組之間並無顯著差異，此時之對照組已有 70.4% 葉片展開芽，顯著高於 BA 處理組 (表 3)。

將經由不同液態培養時間與 BA 濃度處理所得之「竹薑」芽苗團塊，直接接種於固態生長培養基中，經 8 wk 培養後之結果如表 3 顯示。對總芽數而言，液態培養時間與 BA 濃度均呈現極顯著影響，但兩因子間並無顯著交互效應。液態培養時間對綠色芽與葉片展開芽比率均為極顯著影響；BA 濃度對綠色芽與葉片展開芽比率均為非常顯著影響。參試兩因子間之交互效應，對綠色芽與葉片展開芽比率而言，均無顯著差異 (表 3)。液態培養 2-wk 處理之總芽數，在對照組與 BA 處理組之間並無顯著差異。液態培養 4-wk 處理之 2.0 mg L⁻¹ BA 處理組，所得總芽數顯著高於對照組與 0.5 mg L⁻¹ BA 處理組，但與 1.0 mg L⁻¹ BA 處理組並無顯著差異。液態培養 6-wk 處理之 BA 處理組，所得總芽數約 10.3–10.7 芽，顯著高於對照組，但 BA 處理組之間並無顯著差異，此時所有處理之葉片展開芽比率均已達 98.5–100% (表 3)。

討論

Seran (2013) 評論報告指出，薑根莖培植體大小對組織培養芽體形成與形態發生有顯著影響，較小之培植體因所含養分較少，導致芽體生長較為緩慢。一般而言，薑組培苗之初代培養之適當培植體長度約為 0.5 cm，增殖培養則約在 0.5–2.0 cm 之間。Zuraida *et al.* (2016) 利用 0.5–1.0 cm、2.0–4.0 cm 及大於 4.0 cm 之薑新生芽體進行初代培養試驗，結果以 2.0–4.0 cm 新生芽體培植體所得組培苗數最多。雖然上述兩篇文獻中均未提到新生芽體直徑大小，但是相較而言，較長的新生芽體應當具有較大的根莖直徑。Dal Vesco *et al.* (2001) 於鳳梨 (*Ananas comosus*) 研究結果指出，高度約 3–4 mm 新生芽體培植體相較於 1–2 mm 與 2–3

mm 培植體，對組培苗之生長較為有利。然而，萱草 (*Heimerocallis* spp.) (Chen *et al.* 2005)、海棗 (*Phoenix dactylifera*) (Mazri 2013) 及朝鮮薊 (*Cynara cardunculus*) (El Boullani *et al.* 2017) 研究則指出，組織培養各階段均有其適用培植體大小，過大或太小培植體均不利於組培苗生長。然而，Chen *et al.* (2019) 於孤挺花 (*Hippeastrum hybridum*) 研究結果顯示，培植體來源之鱗莖大小對組培苗增殖並無顯著影響，但對誘導鱗莖之生長具顯著影響，較大培植體能在較短時間內獲得具有較大鱗莖之組培苗。本研究結果顯示，「廣東薑」與「竹薑」組培苗在增殖培養時，其根莖直徑達 4 mm 以上，對芽體之增殖與生長較有利 (表 1)。此結果與 Sathyagowri & Seran (2011) 在薑的研究相符，即較長的新生芽體培植體 (2.0 cm)，應當具有相對較大直徑之根莖，因其內生荷爾蒙或其蓄積之養分充足，相較於較短的根莖培植體 (0.5 cm) 可縮短芽體形成時間，並且促進後續芽體之增殖與生長。本研究與上述研究相較，使用更小之根莖作為繁殖材料，亦能成功快速大量繁殖，此點在繁殖材料短缺時更能發揮其繁殖之效能 (表 1)。

商業化組培苗大量繁殖系統中已有許多重要作物利用液態培養，或是更進一步以反應器進行大規模生產，顯示液態培養方式具有量化繁殖與降低成本的優勢 (Mehrotra *et al.* 2007)。Seran (2013) 評論報告指出，液態培養是促進薑組培苗增殖的有效方法。Mbiyu *et al.* (2012) 於肯亞馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 研究結果顯示，液態培養所得瓶苗較固態培養者具有較多的莖節與葉片，顯示液態培養對量產組培苗而言，是種高效率的增殖方式。Mehta *et al.* (2014) 於蘋果砧木 (MM106 與 B9) 組培苗研究結果顯示，適當體積 (20 mL) 與短時間 (30 d) 的液態培養相對固態培養之結果，除可增加組培苗之芽數、芽長、葉數、葉面積、根數、根長及出瓶成活率外，培養基成本更可降低 8 倍。

Hapsari *et al.* (2011) 研究結果顯示，以不含生長調節劑且添加食用糖 (table sugar) 之 MS 液態培養基培養 8 wk 後，不僅無損印尼茂物地區 (Bogor area, Indonesia) 紅薑組培苗的生長發育與移植存活率，更有益於降低成

本。然而，Swarnathilaka *et al.* (2016) 以斯里蘭卡薑 (*Z. officinale*, Sri Lanka) 進行微型根莖 (microrhizone) 的研究指出，培植體經 10 wk 液態培養後，微型根莖數量、微型根莖鮮重、組培苗鮮重及根系鮮重均顯著低於固態培養，而在組培苗之數量與株高上則無明顯差異。由此顯示，液態培養並非全然有利於薑組培苗的增殖與生長。Lincy & Sasikumar (2010) 以印度薑 (‘Jamaica’ 與 ‘Varada’) 於 3,000 lux ($69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 條件下進行組培苗研究結果指出，在 1.0 mg L^{-1} thidiazuron (TDZ) 搭配 0.5 mg L^{-1} 或 1.0 mg L^{-1} indolebutyric acid (IBA) 液態培養處理下，雖可提高芽體增殖率，卻形成白色叢生苗，後續將其切割成為含有 4–5 芽之芽苗團塊培植體。培養於固態培養基中 12 d 後，則白色叢生苗開始轉成綠色，培養 45 d 後可形成發根良好的組培苗。顯示利用液、固態兩階段培養方式，具有促進組培苗增殖與生長的效果。Chen *et al.* (2018) 研究結果顯示，「廣東薑」與「竹薑」根莖於液態培養 8 wk 後，將所得之綠色芽或黃色芽繼代培養於含有 0.5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基中，經 8 wk 培養後成為葉片展開之正常苗。本研究中液、固態兩階段連續培養試驗結果顯示，液態培養時間與 BA 處理對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖均具有極顯著影響，而兩因子間交感效應在「廣東薑」為極顯著影響，但在「竹薑」則無顯著影響，顯示兩因子對「廣東薑」與「竹薑」組培苗增殖之影響並不一致 (表 2、表 3)。「廣東薑」總芽數以 2.0 mg L^{-1} BA 處理組在液態培養 6-wk 後再經 8 wk 固態培養處理，顯著高於對照組與其餘 BA 處理組；然而若是以兩階段連續培養之總培養週數作為計算母數，則上述 2.0 mg L^{-1} BA 處理組每週約形成 1.78 芽，明顯高於 2-wk 處理，但與 4-wk 處理結果相近。「竹薑」在上述相同處理條件下，BA 處理組所得總芽數雖然顯著高於對照組，但 BA 處理組之間並無顯著差異。然而，若以每週產芽數作比較，則 2.0 mg L^{-1} BA 處理組每週約形成 0.76 芽，雖明顯高於 2-wk 處理，但卻低於液態培養 4-wk 處理下之 1.0 mg L^{-1} 與 2.0 mg L^{-1} BA 處理組 (表 2、表 3)。因此，若以每週產芽數為準進行比較，則液態

培養 4 wk 後再接續於固態培養 8 wk，應為較適當的處理組合。

綜合本研究結果，建議「廣東薑」與「竹薑」組培苗於增殖培養時，根莖直徑至少需達 4 mm 以上；「廣東薑」根莖培養於 2.0 mg L^{-1} BA 處理與「竹薑」根莖培養於 1.0 mg L^{-1} 或 2.0 mg L^{-1} 處理，液態振盪培養達 4 wk 後，將所得芽苗團塊直接繼代培養於含有 0.5 mg L^{-1} BA 與 0.1 mg L^{-1} NAA 之 MS 固態培養基。再經 8 wk 培養後，可得較佳之組培苗增殖與生長效率。上述結果可供薑產業於組培苗量化生產之參考應用。

誌謝

本文稿承行政院農委會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

- 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(28):20–27.
- Agriculture and Food Agency. 2017. 2016 Yearly Report of Taiwan's Agriculture. Agriculture and Food Agency, Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan. <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx> (in Chinese) (visit on 2017/6/6)
- 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. Toxic.* 46:409–420. doi:10.1016/j.fct.2007.09.085
- Chen, J., D. E. Hall, and V. De Luca. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large-scale micropropagation of daylily (*Emerocallis* spp.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41:58–62. doi:10.1079/IVP2004595
- 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.* 67:401–413. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201812_67(4).0008
- Chen, U. C., J. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2019. Effect of explant size, sucrose and activated charcoal on *in vitro* plantlet proliferation and growth in amaryllis. *J. Taiwan Agric. Res.* 68:137–147.

- (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR.201906_68(2).0004
- Council of Agriculture. 2017a. A survey of vegetable production in Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuen, Taiwan. <https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx> (in Chinese) (visit on 2017/6/6)
- Council of Agriculture. 2017b. Production forecast for May 2017, Agricultural Intelligence. Vol. 299. Agriculture Policy & Review, Agricultural Publications, Statistics and Publications. Council of Agriculture, Executive Yuen, Taiwan. <https://www.coa.gov.tw/ws.php?id=2506392> (in Chinese) (visit on 2017/6/6)
- Dal Vesco, L. L., A. de Almeida Pinto, G. R. Zaffari, R. O. Nodari, M. S. dos Reis, and M. P. Guerra. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits* 56:143–154. doi:10.1051/fruits:2001100
- Deng, N. and B. Pan. 2009. Research progress on tissue culture of ginger. *J. Anhui Agric. Sci.* 37:12406–12407, 12410. (in Chinese with English abstract)
- El Boullani, R., K. Lagram, A. El Mousadik, and M. A. Serghini. 2017. Effect of explants density and size on the *in vitro* proliferation and growth of separated shoots of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *J. Mater. Environ. Sci.* 8:2469–2473.
- Hapsari, B. W., T. M. Ermayanti, D. E. Rantau, and D. Rudiyanto. 2011. Comparison of the reduction effect of sucrose and table sugar concentration on growth characteristics of red ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultured in liquid medium. *Ann. Bogorienses* 15:15–20. doi:10.14203/ann.bogor.2011.v15.n1.15-20
- Huang, Y. X., J. C. Wang, F. F. He, 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.
- Kasilingam, T., G. Raman, N. D. Sundramoorthy, G. Supramaniam, S. H. Mohtar, and F. A. Avin. 2018. A review on *in vitro* regeneration of ginger: Tips and highlights. *Euro. J. Med. Plants* 23:1–8. doi:10.9734/EJMP/2018/40181
- 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. doi:10.3906/bot-0805-6
- Liu, Z. W., Q. Z. Li, and X. J. Shi. 2010. Research progress on tissue culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *China Veg.* 10:9–15. (in Chinese with English abstract)
- Ma, X. and D. R. Gang. 2006. Metabolic profiling of *in vitro* micropropagated and conventionally greenhouse grown ginger (*Zingiber officinale*). *Phytochemistry* 67:2239–2255. doi:10.1016/j.phytochem.2006.07.012
- Mazri, M. A. 2013. Effect of basal medium, explants size and density on the *in vitro* proliferation and growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar '16-bis'. *Not. Sci. Biol.* 5:332–337. doi:10.15835/nsb539089
- Mbiyu, M., J. Muthoni, J. Kabira, C. Muchira, P. Pwaipwai, J. Ngaruiya, J. Onditi, and S. Otieno. 2012. Comparing liquid and solid media on the growth of plantlets from three Kenyan potato cultivars. *Amer. J. Exp. Agric.* 2:81–89. doi:10.9734/AJEA/2012/715
- Mehrotra, S., M. K. Goel, A. K. Kukreja, and B. N. Mishra. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African J. Biotechnol.* 6:1484–1492.
- Mehta, M., R. Ram, and A. Bhattacharya. 2014. A simple and cost effective liquid culture system for the micropropagation of two commercially important apple rootstocks. *Indian J. Exp. Biol.* 52:748–754.
- 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. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- 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.) *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. doi:10.3923/

- pjbs.2013.1826.1835
- 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.
- Swarnathilaka, D. B. R., N. S. Kottearachchi, and W. J. S. K. Weerakkody. 2016. Factors affecting on induction of microrhizomes in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), cultivar local from Sri Lanka. Br. Biotechnol. J. 12:1–7. doi:10.9734/BBJ/2016/23903
- 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.
- Zuraida, A. R., M. A. Mohd Shukri, M. N. Erny Sabrina, O. Ayu Nazreena, C. Z. Che Radziah, G. Pavallekoodi, and S. Sreeramanan. 2016. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* var. Rubrum) using buds from microshoots. Pak. J. Bot. 48:1153–1158.

Effects of Rhizome Diameter and Two-Stage Continuous Culture on Proliferation Rate and Growth of *In Vitro Zingiber officinale* Plantlets

Uei-Chern Chen¹, Chin-Yi Tsao², Tzu-Ying Wu³, and Chi-Ni Hsia^{4,*}

Abstract

Chen, U. C., C. Y. Tsao, T. Y. Wu, and C. N. Hsia. 2021. Effects of rhizome diameter and two-stage continuous culture on proliferation rate and growth of *in vitro Zingiber officinale* plantlets. *J. Taiwan Agric. Res.* 70(2):117–128.

The influence of rhizome diameter and liquid-solid two-stage continuous culture on proliferation rate and growth of *in vitro Zingiber officinale* ‘Guang Dong’ and ‘Chu’ plantlets were investigated in this study. The rhizomes of *in vitro* plantlets with about 2, 4 and 6 mm rhizome diameter were cultured on a Murashige & Skoog (MS) solid medium supplemented with 1 mg L⁻¹ benzylaminopurine (BA) and 0.1 mg L⁻¹ α -naphthalene acetic acid (NAA) for 8 wk of culture. There were 6.2–6.7 plantlets were induced from per explant of ‘Guang Dong’ rhizome, and no significant difference among three size of rhizomes. There were 6.8–6.9 plantlets were obtained from per 4 mm and 6 mm explants which were significantly higher than that of from 2 mm rhizome of ‘Chu’. Moreover, the rhizome diameter larger than 4 mm was considered better explants for growth of the plant height and fresh weight. In the two-stage continuous culture, *in vitro* rhizomes with 5 mm diameter were first culture in a liquid medium containing 0.5 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA for 2, 4 or 6 wk of culture before subculturing on a solid medium containing 0.5 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA for 8 wk of culture. The highest number of proliferated plantlets were obtained from the liquid medium containing 2.0 mg L⁻¹ BA or 0.5–2.0 mg L⁻¹ BA for 6-wk treatment in ‘Guang Dong’ and ‘Chu’, respectively. In short conclusion, the diameter of rhizome larger than 4 mm as explants would be beneficial on plantlet proliferation and growth. In according to proliferation efficiency, explants first cultured in a liquid medium containing with 2.0 mg L⁻¹ BA in ‘Guang Dong’ and with 1.0–2.0 mg L⁻¹ BA in ‘Chu’ for 4 wk of culture before subculturing on the solid medium for 8 wk of culture had the highest plantlet yield on a weekly basis of production.

Key word: *Zingiber officinale*, Micropropagation, *In vitro* rhizome, Liquid culture, Two-stage continuous culture.

Received: December 2, 2020; Accepted: February 17, 2021.

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

¹ Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

³ Project Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.