

蜂巢薑組織培養繁殖之研究

黃柄龍、蔡奇助¹

摘要

蜂巢薑為極具發展潛力之新興熱帶花卉，可供切花及觀賞盆花之用。利用組織培養技術進行蜂巢薑繁殖之研究，除了能夠在短時間內達到大量繁殖的目的外，更可利用作為基因轉殖之材料使用。試驗結果顯示，分蘖芽體可以經由側芽培植體誘導產生，不過以 MS 基本鹽類配合 BA 2mg/l 及 NAA 或 IAA 0~0.5mg/l 均無法促使蜂巢薑分蘖芽體形成幼株，甚至還會造成芽體黃化死亡；添加 0.05~0.1ppm ABA 可促進正常器官的形成，增加分蘖幼株的生長。而葉鞘莖及根培植體在含 5mg/l 2,4-D、0.5mg/l BA、3% 蔗糖及 200ml/l 椰子水的 VW 固體培養基中，可誘導產生癒合組織，但僅有根段癒合組織能直接由表面分化產生體胚。

關鍵字：蜂巢薑、組織培養、大量繁殖

前言

蜂巢薑 (*Zingiber spectabile* Griff) 為薑科 (*Zingiberaceae*) 多年生宿根性植物，具長型囊狀花序，黃色苞片及深紫色花^(10,14)，可供觀姿、觀花等^(2,6)，通常作為切花用，為極具觀賞潛力之新興熱帶薑科植物之一。蜂巢薑繁殖方法可以肉質狀根莖 (rhizome) 或採分株方式，但繁殖速度較慢，且生育過程中往往因雨感染病害，造成種薑嚴重腐爛。若能使用組織培養技術繁殖，除可避免病蟲危害及環境因子的影響，達到短時間大量繁殖的目的外，更可比較組織培養苗與傳統種苗生產上種苗品質之優劣性，開發新的觀賞花卉種類。

薑科植物組織培養之研究報告極少。許等⁽⁴⁾以分蘖幼苗誘導薑花分蘖芽體產生的方式，可以組織培養技術達到繁殖的目的。黃和蔡⁽⁵⁾利用體胚形成模式進行薑花之微體繁殖，為應用生物技術進行品種改良，提供了一可行的路徑；而在食用生薑方面，利用莖頂培養，誘導大量芽梢產生，一個莖頂平均可產生 5.5 個芽梢，用以繁殖及克服軟腐病蔓延問題⁽⁷⁾。因此，本試驗之目的，乃期望建立一有效的蜂巢薑組織培養繁殖系統，提高其增殖倍率，作為新興薑科觀賞花卉繁殖推廣之應用。

¹行政院農業委員會高雄區農業改良場助理研究員、副研究員。

材料與方法

切取葉片尚未開展之分蘗幼苗約 5 cm，洗淨外部泥土，利用 1% 次氯酸鈉 (NaOCl) 溶液，加 2 滴/100ml 展著劑 Tween-20，激烈振盪進行表面消毒 20 分鐘，以無菌水沖洗數次後，逐層剝除包覆外部之葉片，切取側芽，於溫度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光強度 1,750 lux，16 小時之光照週期培養，作為以下試驗之材料。

一、不同濃度 NAA 或 IAA 對誘導分蘗芽體的影響

參考黃和蔡⁽⁵⁾之研究，將側芽培養於含有 Thiamine · HCl 0.4mg/l、Pyridoxine · HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Myo-Inositol 100mg/l、Glycine 1.0mg/l、Adenine sulfate 40 mg/l、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 170 mg/l、3% Sucrose 及 1% 洋菜(Merck)的 MS⁽¹¹⁾固體培養基 (pH=5.2)，添加 BA (6-benzyladenine) 2 mg/l，並配合 0, 0.05, 0.1, 0.5mg/l 不同濃度之 NAA (α -Naphthaleneacetic acid) 或 IAA (Indole-3-acetic acid)，探討分蘗芽體之誘導率。

二、不同濃度 ABA 對分蘗幼株形成的影響

將由側芽誘導所得的分蘗芽體，培養於含有 BA 2 mg/l、NAA 0.05 mg/l，及 0, 0.05, 0.1, 0.5mg/l 不同濃度 ABA (Abscisic acid) 的 MS 基本鹽類固體培養基中，每一處理 4 個重複，每個重複為 5 個分蘗芽體，調查分蘗幼株之形成率。

三、培養基中不同濃度 BA 對繁殖速率的影響

將切除頂芽的蜂巢薑分蘗幼株，培養於含有 NAA 0.05mg/l、ABA 0.05mg/l，並配合 0, 0.5, 2, 4, 6, 8mg/l 等六種不同濃度的 BA 處理，每處理 4 重複，每個重複 5 株幼株，每星期分別統計繁殖的分蘗芽數。

四、不同部位培植體對癒合組織之誘導率及體胚分化之影響

參考薑花誘導體胚形成之結果⁽⁵⁾，將分蘗幼株之根、葉鞘、葉等切成長度 0.5 cm 作為培植體，培養於含有 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 5mg/l 及 BA 0.5 mg/l，Thiamine · HCl 0.4mg/l、Pyridoxine · HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Myo-Inositol 100mg/l、Glycine 1.0mg/l、4% Sucrose、coconut water 200ml/l 及 0.8% 洋菜的 VW⁽¹⁵⁾基本鹽類固體培養基，每處理 4 個重複，每個重複培養 50 個培植體，調查癒合組織的誘導率。

將誘導產生的癒合組織切成長、寬各約 0.5 cm，培養於前述分蘗幼株養成培養基，作為癒合組織增殖及體胚形成之試驗培養基。形成的體胚並於原培養基中令其萌發。

結果

一、不同濃度 NAA 或 IAA 對誘導分蘗芽體的影響

將側芽培養在含 NAA 0, 0.05, 0.1, 0.5mg/l 等各種處理中，對分蘗芽體的誘導率，無顯著的差異，但其中以濃度 0.05mg/l 對保持誘導分蘗芽體存活的效果稍較佳，其次為 0.1、0.5mg/l，顯示適當地添加 NAA 對分蘗芽體的生長具有加乘作用。IAA，不論其濃度為何，均容易造成誘導的分蘗芽體白化，甚至死亡。然而，不管 auxin 的種類為何，僅能誘導芽體的增生，卻無法正常生長形成分蘗幼株。

二、不同濃度 ABA 對分蘗幼株形成的影響

由圖 1 結果顯示，以 MS 鹽類添加 Thiamine·HCl 0.4mg/l、Pyridoxine·HCl 0.5mg/l、Nicotinic acid 0.5mg/l、Myo-Inositol 100mg/l、Glycine 1.0mg/l、Adenine sulfate 40 mg/l、NaH₂PO₄·H₂O 170 mg/l、3% Sucrose 及 1% 洋菜、BA 2 mg/l、NAA 0.05 mg/l，作為分蘗芽體誘導的基本培養基，在無 ABA 存在時，均無法誘使分蘗芽體形成幼株；在 ABA 0.05mg/l，0.1mg/l 及 0.5mg/l 三個組合下，經三個月培養後分別可使 75%、55% 及 15% 的分蘗芽體形成幼株，且此分蘗幼株均能正常生長（圖 2）。

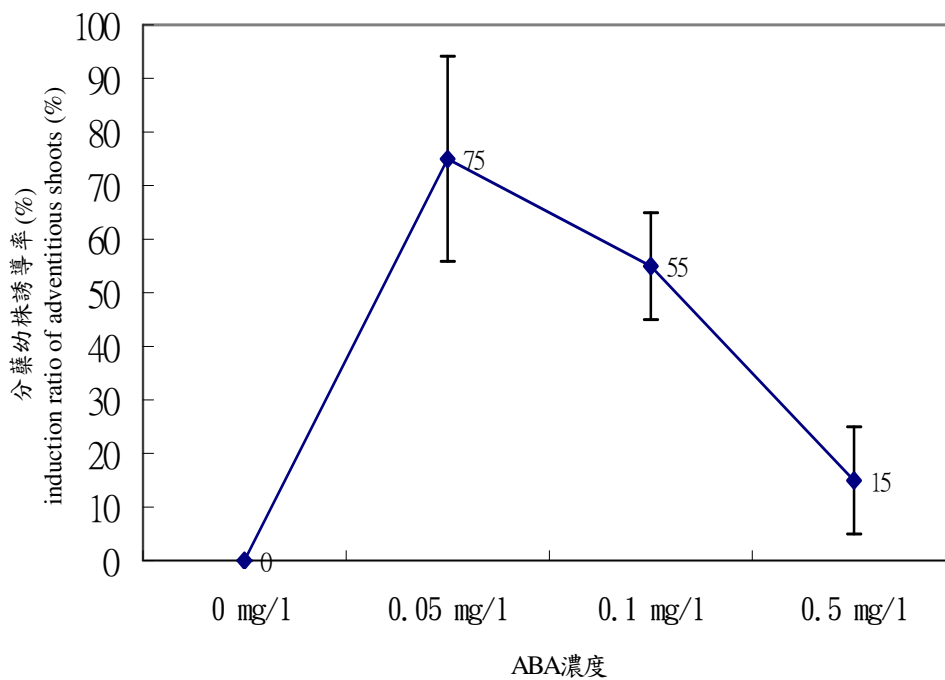


圖 1. 不同濃度 ABA 對蜂巢薑分蘗幼株誘導率的影響

Fig 1. Effect MS basal medium supplemented with different concentrations of ABA on shoot induction of *Zingiber spectabile*

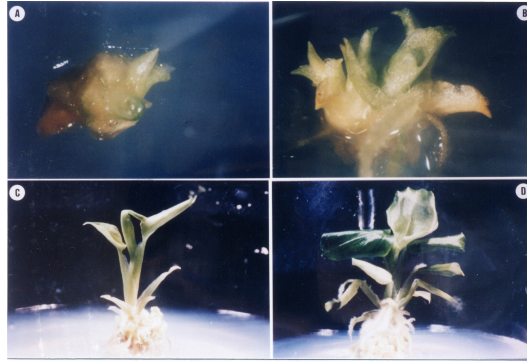


圖 2. 蜂巢薑利用側芽培養誘導形成分蘖幼株之過程 (A)分蘖芽體誘導產生 (B)分蘖芽體萌發、增殖 (C)分蘖幼株 (D)分蘖成株形成

Fig 2. The adventitious shoots of *Zingiber spectabile* produced from Adventitious buds (A)Adventitious buds (B) Germination of immature shoots (C) The plantlet (D) The intact plant

三、培養基中不同濃度 BA 對繁殖速率的影響

圖 3 顯示，不含生長調節劑 BA 的處理在培養六個星期後，繁殖的分蘖芽數平均為 1.75 個，而其他五個 BA 濃度處理的分蘖芽數，分別為 2.75，4.25，5，3.25，5 個。BA 處理濃度在 0~4mg/l 範圍時，分蘖芽數隨著 BA 濃度的增高而增加，4mg/l 時為最高，隨後隨著 BA 濃度的提高反而有不良的結果。BA 8mg/l 時，雖然誘得的平均分蘖芽數多，但芽體小、畸形，無法於原培養基中正常發育形成植株。因此，誘導蜂巢薑分蘖芽體的繁殖，以 BA 4mg/l 濃度的效果為最佳。

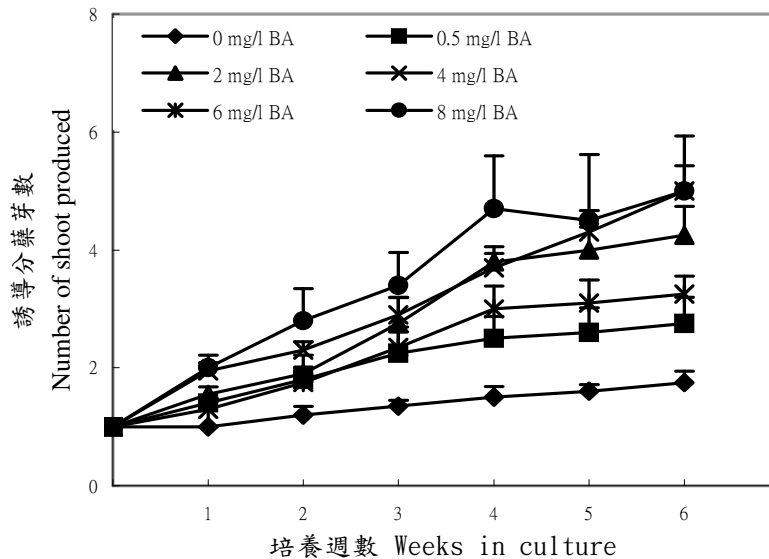


圖 3. 不同濃度的 BA 對蜂巢薑繁殖速率的影響

Fig 3. Effect of 6-benzyladenine concentration supplemented on shoot formation from *Zingiber spectabile*

四、不同部位培植體對癒合組織之誘導率及體胚分化之影響

大部分的葉培植體於培養二週後即開始褐化，僅 0.5% 的葉片產生少量、水浸狀之癒合組織；而葉鞘莖及根培植體，其癒合組織誘導率分別為 24.5% 及 45%（圖 4）。葉鞘莖誘導的癒合組織由切口處長出，呈淡土黃色，質鬆軟，外觀正常；但根段培植體極易由根毛處形成癒合組織，不過此癒合組織量少，含水量多，呈糜爛狀。

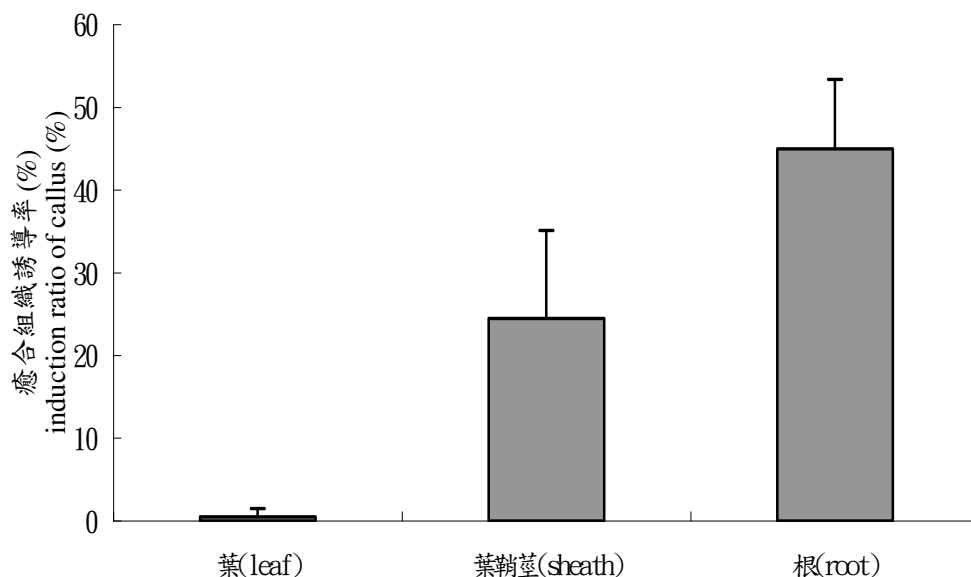


圖 4. 蜂巢薑不同部位培植體之癒合組織誘導率

Fig 4. Effect of different explants on callus induction from *Zingiber spectabile*

將葉鞘莖及根培植體上誘導產生的癒合組織挑出，分切後培養於分蘖幼株養成培養基中，在每二個月更換一次新培養基的情形下，可造成癒合組織無限量增殖。培養一個月後，由根段癒合組織的表面會直接產生體胚分化 (embryogenesis) (圖 5)，分化的體胚並直接萌發。不過，葉鞘莖癒合組織只會持續增殖，無法分化產生體胚。

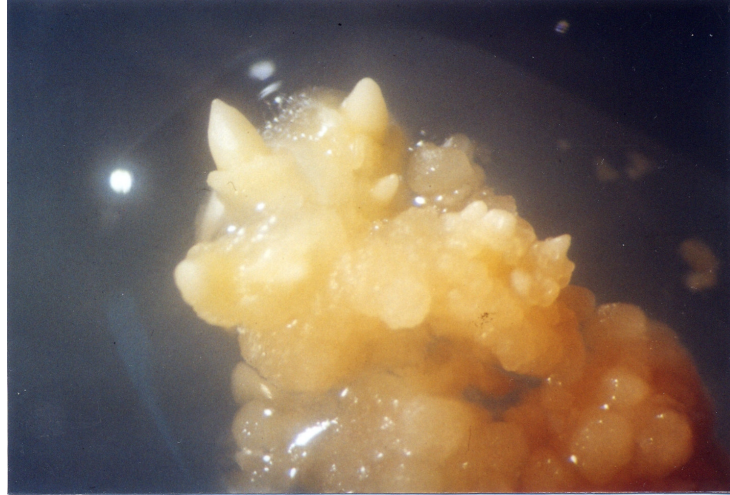


圖 5. 蜂巢薑根段癒合組織表層直接產生體胚分化之情形

Fig 5. Somatic embryos were directly produced from the surface of callus derived from roots of *Zingiber spectabile*

討 論

蜂巢薑與薑花雖然同屬薑科植物，然二者在分蘖幼株誘導上仍存在部分的差異。許等⁽⁴⁾利用 MS 基本鹽類配合植物生長調節劑 BA 2mg/l 及 NAA 0.05mg/l 培養薑花分蘖幼株，本試驗結果雖然同樣可以誘導蜂巢薑分蘖芽體產生，不過繼續發育成植株則需 ABA 0.05~0.1mg/l 才能達成，這或許如高⁽³⁾所推論的，ABA 與 cytokinins 的交感作用可解除芽之休眠，增加正常器官之形成有關，低濃度的 ABA 可促進分蘖幼株的生長。

許多文獻指出，cytokinin 可誘導產生不定芽，且 BA 對腋芽與不定芽的促進效果往往比 kinetin 或 2ip 的效果好^(8,13)，TDZ (Thidiazuron) 雖然同樣具有誘導器官形成的功效⁽¹⁾，不過，其容易導致形態上畸形的現象⁽⁹⁾，卻也成為 TDZ 使用上的限制。適當的 BA 可誘導芽體的增殖，但 BA 濃度過高，反而會導致幼芽發育不正常，植株矮小、腫脹⁽¹²⁾，及降低增殖速率等⁽⁹⁾，本試驗中 BA 8mg/l 時，雖然誘得的平均分蘖芽數多，但芽體小、畸形，無法於原培養基中正常發育形成植株，反倒是 BA 4mg/l 較低濃度時，對繁殖速率的影響有最佳效果，此結果與前面之論述互相吻合。

癒合組織是一群未組織化、未分化的薄壁細胞團 (cell cluster)，可藉由繼代培養大量增生，也可再分化為各種組織、器官或植株，形成一高效率的無性繁殖體系⁽¹⁶⁾。以含有 2,4-D 5mg/l 及 BA 0.5 mg/l 的相同培養基可誘導蜂巢薑葉鞘培植體產生癒合組織，這與黃和蔡⁽⁵⁾經三個月培養後誘得薑花之鵝黃色、質鬆軟的癒合組織有相同的結果，同時，癒合組織也都具有強大的增殖

能力；相反地，蜂巢薑葉片幾乎無法誘得癒合組織，而根培植體癒合組織雖然外形糜爛、含水量多，卻獨具體胚分化之能力，此結果又與薑花僅葉鞘、葉培植體誘得的癒合組織可直接於表面產生體胚分化有所不同。

利用組織培養技術進行蜂巢薑繁殖之研究，不僅可以在短時間內達到大量增殖的目的，癒合組織誘導及體胚形成系統的建立，更可應用為利用生物技術改造品種特性的另一可行方法，作為發展基因轉殖與誘變育種之材料使用，達成發展具地域特色的熱帶花卉，開發更多新的觀賞花卉種類的目標。

誌 謝

本研究承本場生物技術研究室鍾素銘、顏屏合等多位同仁協助試驗，謹致謝忱。

參考文獻

- 1.王瑞章、謝桑煙、葉茂生. 2003. 黑豆及毛豆花藥培養之研究. 台南區農業改良場研究彙報 41: 35-43.
- 2.侯寬昭. 1991. 中國種子植物科屬詞典. pp.224. 南天書局發行. 台北.
- 3.高景輝. 1989. 植物荷爾蒙. pp.232-280. 華香園出版社. 台北.
- 4.許家言、葉長青、蔡新聲. 1991. 薑花組織培養之大量繁殖. 中華農業研究 40(2): 171-177.
- 5.黃柄龍、蔡奇助. 2002. 利用體胚形成進行薑花之微體繁殖. 中國園藝 48(3): 239-246.
- 6.楊恭毅. 1984. 楊氏園藝植物大名典. pp.7168. 中國花卉雜誌社. 台北.
- 7.韓青梅. 2000. 薑之莖頂培養. 高雄區農業改良場研究彙報 11(2): 37-46.
- 8.Bennett, L. K. and F. T. Davies. 1986. In vitro propagation of *Quercus shumardii* seedlings. HortScience 21(4): 1045-1047.
- 9.Chang, H. S., D. Chakrabarty, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: 129-134.
- 10.Larsen, K., H. Ibrahim, S. H. Khaw and L. G. Saw. 1999. GINGERS of Peninsular Malaysia and Singapore. Natural History Publications (Borneo) .
- 11.Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 12.Nieuwkerk, J. P., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. HortScience 21(3): 516-518.

13. Stafer, R. E. and C. W. Heuser. 1986. Rapid multiplication of *Heuchera sanguinea* Engelm. "Rosamundi" propagated in vitro. *HortScience* 21(4): 1043-1044.
14. Timothy Sean Chapman. 1995. *Ornamental Gingers*. pp.45. Louisiana, U.S.A.
15. Vacin, E. F. and F. W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605-613.
16. Walden, R. and W. Ruth. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *TIBTECH.* 13: 324-331.

In Vitro Propagation of *Zingiber spectabile*

Ping-Lung Huang and Chi-Chu Tsai¹

Abstract

Zingiber spectabile is a high potential, new and developing tropical ornamental flower. The economical value of *Zingiber spectabile* is on cut flower and potted flower. The purpose of this experiment was not only to develop an effective *in vitro* method to mass-propagate *Zingiber spectabile* in a short period of time, but expected to be used for the materials of future transgenic plant. Now, it could be achieved for adventitious bud regeneration via lateral bud cultured. But plantlet couldn't be induced from the regenerative adventitious bud on the MS medium supplemented with BA 2mg/l with NAA or IAA. The other study show that appropriate addition of 0.05~0.1mg/l ABA promotes normal organogenesis and shoot growth. Now, we can compare the effects between several kinds of plant growth regulator for adventitious buds induction to obtain the best combination, and that adventitious shoots regeneration system in *Zingiber spectabile* could be established. Sheath and root explants, cultured in VW medium containing 5mg/l 2,4-D、0.5mg/l BA、3% sucrose and 200ml/l coconut water, could be induced to form callus. However, only root-derived callus could produce lots of somatic embryos from the surface of calli.

Key words: *Zingiber spectabile*, tissue culture, mass propagation

¹ Assistant Researcher and Associate Researcher, Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Pingtung, Taiwan, R.O.C