薑荷花與觀音薑芽體增殖與癒合組織再生之研究

黃柄龍、張本忞、陳富永、吳志文[1]

摘要

本研究目的為探討不同濃度 BA、2,4-D 對薑荷花及觀音薑去頂短縮莖側芽增殖、癒合組織誘導及植株再生之影響。結果顯示，薑荷花及觀音薑的側芽增殖以添加 5.0 mg l^{-1} BA 的 MS 培養基誘導產生的芽數最多，分別為 3.45 及 4.25 個；葉鞘培植體較容易誘導形成質地鬆軟的癒合組織，其誘導率分別為 65%及 85.3%，並且只有在含有 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.05 mg l^{-1} BA 的 VW 培養基誘導產生的淡土黃色葉鞘癒合組織具有較大的細胞團粒結構，能於不含植物生長調節劑的培養基中再生不定芽原體。增殖的芽體或癒合組織再生的不定芽，經 1-2 個月培養後可發育成組培苗，並可移植至試管外種植，存活率達 95%以上。

關鍵詞：薑荷花、觀音薑、側芽、植株再生

前言

薑荷花(*Curcuma alismatifolia* Gagnep)及觀音薑(*C. cordata* Wall.)均屬於單子葉薑科(Zingiberaceae)薑黃屬(*Curcuma*)的多年生草本熱帶球根花卉，原產於泰國清邁一帶。薑黃屬包含 60 個以上之原種[30]，其花序是薑科植物中最具觀賞價值的一群，其中，最醒目的部分為苞片，從白色、粉紅色、橙色、洋紅色到紫色，排列整齊、顏色豐富且花型多變化，苞片的觀賞期長，極適合作為切花或景觀用途。

薑科植物一般是利用球莖或根莖繁殖，但繁殖速度慢，且生育過程中的土壤病害、病原菌感染及昆蟲危害造成種薑嚴重腐爛，為經濟生產上經常遭遇的問題[18, 20, 34]。種球及種薑遭病蟲害感染後，易造成地上部植株萎凋及種球、種薑萎縮，致使隔年開花品質差，花瓣呈暗褐色、枯萎，花器提前凋謝等。因此，若能建立健康種苗的生產體系，不僅可以防止病原菌的傳播及病徵造成的嚴重損失，亦可避免因繁殖率低而造成遺傳形質的退化[34]，更可解決種球運輸過程中的清洗及防疫問題，對拓展熱帶球根花卉市場具有重要的影響。

[1]行政院農業委員會高雄區農業改良場副研究員、研究助理、助理研究員、副研究員兼課長

薑科花卉的組織培養研究以 *Zingiber* 屬植物最多[3, 8, 26, 27]，雖然亦有報告報導薑黃屬的組織培養繁殖如 *C. longa* [21, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 31]、*C. aromatica* [18]、*C. zedoaria* [14]及 *C. alismatifolia* [13, 16, 29]，但有關 *C. cordata* 的研究則付之闕如。國內則以薑花(*Hedychium coronarium*)研究較多，許等[1]以分蘗幼苗誘導薑花分蘗芽體的產生，黃和蔡[2]亦利用體胚形成模式進行薑花之微體繁殖，均可達到大量繁殖的目的，並可提供作為應用生物技術進行改良品種特性之材料使用。因此，本研究之目的為探討不同濃度植物生長調節劑對芽體增殖與癒合組織植株再生之影響，以建立一個有效率的薑荷花及觀音薑組織培養繁殖系統，並作為開發具高屏地方特色花卉之研究及推廣應用。

材料與方法

一、試驗材料與滅菌處理

本研究所使用之材料係栽培於高雄區農業改良場(Kaohsiung District Agricultural Research and Extension Station)試驗田之薑荷花(*Curcuma alismatifolia* Gagnep)及觀音薑(*Curcuma cordata* Wall.)植株。首先，分離 2-5 cm 葉片尚未開展之分蘗新芽，以自來水洗淨後，逐層剝除其上緊密包裹的葉片，使莖節上的側芽裸露。切取側芽，利用 1%次氯酸鈉(NaOCl) (Clorox; Clorox Co, Oakland, CA)溶液，每 100 ml 並加入 2 滴展著劑 Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany)，以超音波振盪 10 分鐘進行表面消毒，再以無菌水沖洗 3 次，每次 3 分鐘。去除側芽周圍受滅菌劑傷害的組織後，作為初始培植體。

二、基礎培養基與培養條件

側芽增殖之基礎培養基組成以 MS (Murashige and Skoog, 1962) [17]培養基為主，其他添加有機物包括 0.4 mg l^{-1} thiamine·HCl、0.5 mg l^{-1} pyridoxine·HCl、0.5 mg l^{-1} nicotinic acid、100 mg l^{-1} myo-inositol 及 2.0 mg l^{-1} glycine，另添加 3% sucrose，並以 0.8% Merck agar 作為固體凝膠劑，滅菌前 pH 值調至 5.8；癒合組織誘導之基礎培養基組成則參考黃和蔡[2]的作法，以 VW (Vacin and Went, 1949) [32]培養基為主，添加相同之有機物及固體凝膠劑，另添加 200 ml l^{-1} coconut water 及 4% sucrose，滅菌前 pH 值調至 5.3。培養基並以 121℃，1.2 kg cm^{-2}，滅菌 20 分鐘。培養環境溫度 25 ± 2℃。側芽增殖採 16 小時光週明期(光強度 50 μmol $m^{-2}s^{-1}$，日光燈管 FL-30 D/29, 40W，東亞，中國電器股份有限公司)照光培養，暗期為 8 小時；而癒合組織誘導則行黑暗培養。每隔 8 週，繼代培養一次。

三、不同濃度 BA 對側芽增殖之影響

將薑荷花及觀音薑初始之側芽培植體培養於添加 1.0 mg l^{-1} BA(6-benzyladenine)及 0.1 mg l^{-1} NAA(α-naphthaleneacetic acid)之基礎培養基中，作為側芽增殖之初始培養。待發育成分蘗幼株後，去頂，將短縮莖培養於添加不同濃度 BA(0、1.0、3.0、5.0 及 7.0 mg l^{-1})與 0.1 mg l^{-1} NAA 組合之側芽增殖培養基，每單位容器內之培養基為 100 ml。每一處理 4 個重複，每重複分別培養 5 個短縮莖培植體。培養 8 週後，調查每一培植體之增殖芽數。

四、不同濃度 2,4-D 與 BA 組合對癒合組織誘導之影響

將薑荷花及觀音薑分蘗幼株之葉鞘、根及葉等，切成長度約 0.7 cm，培養於上述癒合組織誘導基礎培養基，並添加不同濃度 2,4-D 與 BA 組合 (0 + 0、0.5 + 0.05、1.0 + 0.1 及 5.0 + 0.5 mg l^{-1}) 之植物生長調節劑。每一處理 10 個重複，每重複分別培養 30 個培植體。連續黑暗培養 8 週後，調查癒合組織之誘導率。癒合組織誘導率為計算表面增生白色或淡黃色癒合組織團之培植體占所有培植體之比率。

癒合組織誘導率 ＝ (表面產生白色或淡黃色癒合組織之培植體個數) ÷ (培植體總數) × 100%

五、統計分析

各處理均經過 4 重複以上試驗，所得數據使用 SAS 軟體(SAS Institute, Cary, NC)進行 GLM 變異數分析(α= 0.05)，並以 LSD (Least significant difference)方法統計其差異性。

結果與討論

一、初始培養之建立

薑科植物一般是利用地下部的球莖或根莖繁殖，新芽受環境污染嚴重，甚至高達 40%以上的培植體遭受細菌及真菌感染[27]，因此，欲獲得無菌的培植體以建構初始培養階段並不容易[9, 25, 28]。雖然 Islam 等人[9]認為，經 0.1% $HgCl_2$ 及 Tween 20 表面消毒，能獲得 70%無感染的初始培養材料，但其大部分培植體，卻只能在當次培養條件下維持無病原菌污染狀態，無法移植至新鮮的繼代培養基，乃因維管束組織可能遭內生菌污染。本研究先切取莖節上的側芽，再以 1% NaOCl 及 Tween 20 進行表面消毒。由於受污染的組織減少，因此，較一般先滅菌再取培植體的方法更容易操作，約可獲得 70%無污染的培養材料，並且容易於新鮮培養基中維持無病原菌感染狀態。

二、不同濃度 BA 對側芽增殖之影響

Cytokinin 在組織培養過程中，扮演著誘導不定芽分化及產生枝條的主要角色，當培養基內的 cytokinin 及 auxin 間的含量比值高時，可促進芽的分化與側芽增殖[6, 33]。圖 1 結果顯示，薑荷花及觀音薑分蘗幼株之去頂短縮莖，培養在有無 BA 的側芽增殖培養基，均可誘導芽體增殖(圖 2A,C)，其中，又以 5.0 mg l^{-1} BA 誘導產生的芽數最多，培養 8 週後，每個培植體之芽體增殖數分別為 3.45 及 4.25 個。增殖率約隨 BA 濃度的增加而有上升的趨勢，但 BA 濃度提高至 7.0 mg l^{-1} 時，增殖率卻下降，每個培植體分別只增殖 2.85 及 4 個芽體。此種高濃度 cytokinin 誘導芽體增殖率反較低濃度差的現象與前人研究相似[5]，也發生在 *Zingiber officinale* 中[27]。Shirgurkar 等人[28]也認為高濃度 BA (8 mg l^{-1})會完全限制薑黃屬植物的生長，甚至抑制根莖的產生。摘除頂芽或利用 cytokinin 處理，可以增加側芽內 cytokinin 的含量，促使營養物質向側芽部位流動，而促進側芽的生長[12]。雖然 0.1-2.0 mg l^{-1} TDZ (thidiazuron) 即能誘導鬱金(*C. longa*)未縱切頂芽產生類似的增殖效果[21]，但 TDZ 容易誘

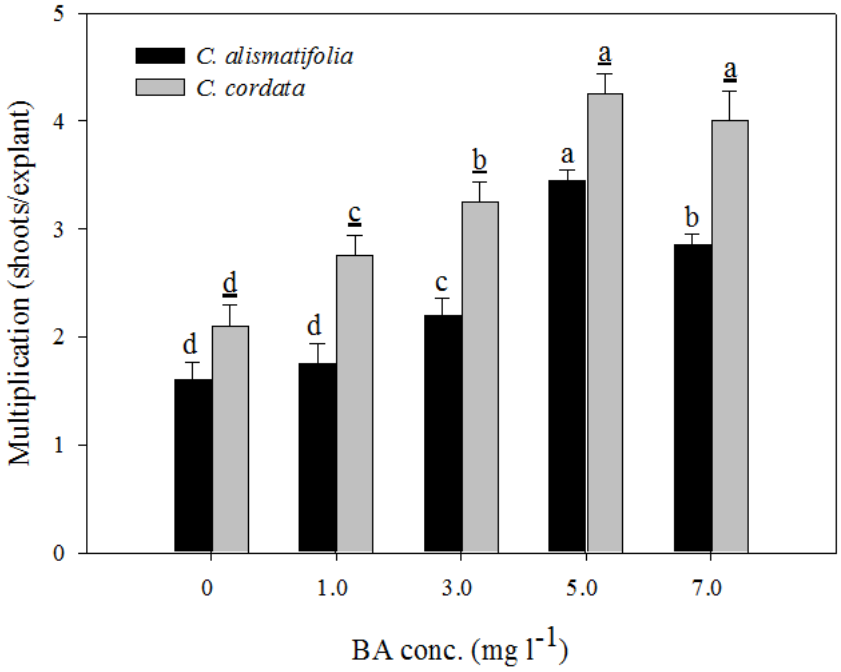

圖 1. 不同濃度 BA 對薑荷花及觀音薑去頂短縮莖側芽增殖之影響

Fig. 1. Effect of different concentrations of BA supplemented to MS basal medium on the multiplication of adventitious lateral shoots from decapitated stem of *Curcuma alismatifolia* and *C. cordata*.

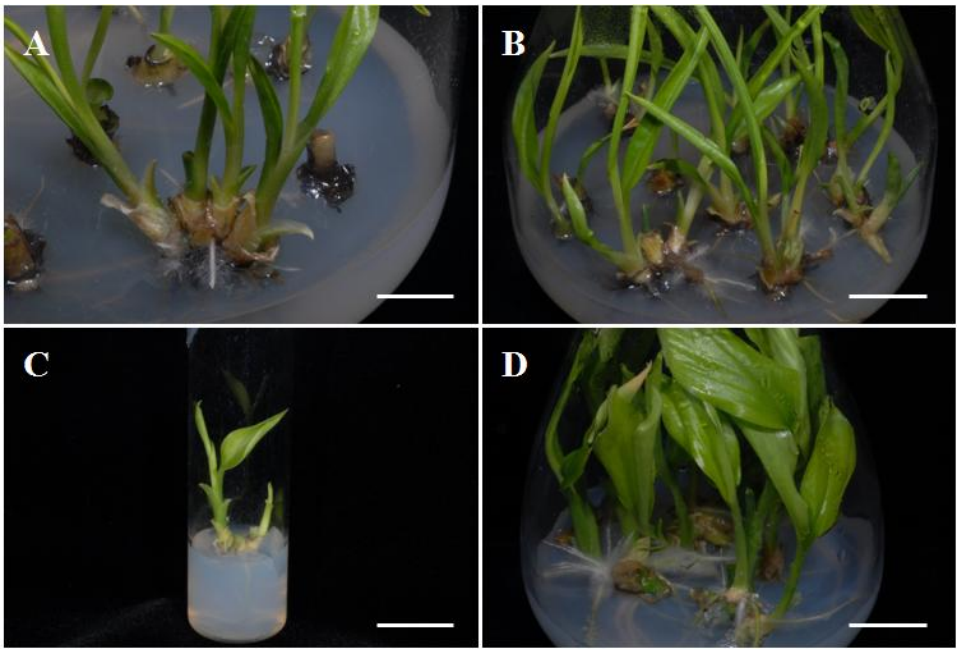

圖 2. 薑荷花與觀音薑側芽增殖及大量繁殖之情形 (A,B)薑荷花(A, bar = 15 mm; B, bar = 20 mm). (C,D)觀音薑(C, bar = 20 mm; D, bar = 25 mm)

Fig. 2. Lateral shoot induction and mass propagation of *C. alismatifolia* and *C. cordata*. (A,B) *C. alismatifolia* (A, bar = 15 mm; B, bar = 20 mm). (C,D) *C. cordata* (C, bar = 20 mm; D, bar = 25 mm).

使培植體產生畸變或毒害，需較 BA 謹慎使用[4]。Salvi 等人[23]也認為，*C. longa* 未成熟花序培養於添加 5-10 mg l^{-1} BA 和 0.1 mg l^{-1} NAA 的培養基，最能促進芽體直接產生。

三、不同濃度 2,4-D 與 BA 組合對癒合組織誘導之影響

圖 3 結果顯示，將薑荷花及觀音薑之葉鞘、根及葉培植體分別培養於 VW 添加不同濃度 2,4-D 及 BA 之誘導培養基，癒合組織誘導率、癒合組織大小及顏色等差異極大。其中，薑荷花的葉鞘和根段較容易於添加 2,4-D 及 BA 的培養基中誘導產生癒合組織，但葉片則不易誘導產生癒合組織，Prakash 等人[20]也認為葉鞘培植體較易誘導形成癒合組織。葉鞘及根培植體的癒合組織誘導率均以添加 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.05 mg l^{-1} BA 之組合為最高，分別達 65.0%及 77.3% (圖 3A)，只是根癒合組織易呈糜爛狀，團粒結構較小，不能增殖且會逐漸萎凋。未添加 2,4-D 及 BA 的對照培養基雖然可以誘導部分癒合組織，但與添加 1.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.1 mg l^{-1} BA 及 5.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} BA 的培養基一樣，衍生的癒合組織褐化率極高，無法進一步利用，只有

於添加 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.05 mg l^{-1} BA 誘導產生的淡土黃色葉鞘癒合組織之細胞團較大(圖 4A)，部分癒合組織並可分化產生不定根，顯示高濃度 2,4-D 可能減少癒合組織的形成及生長[19]。

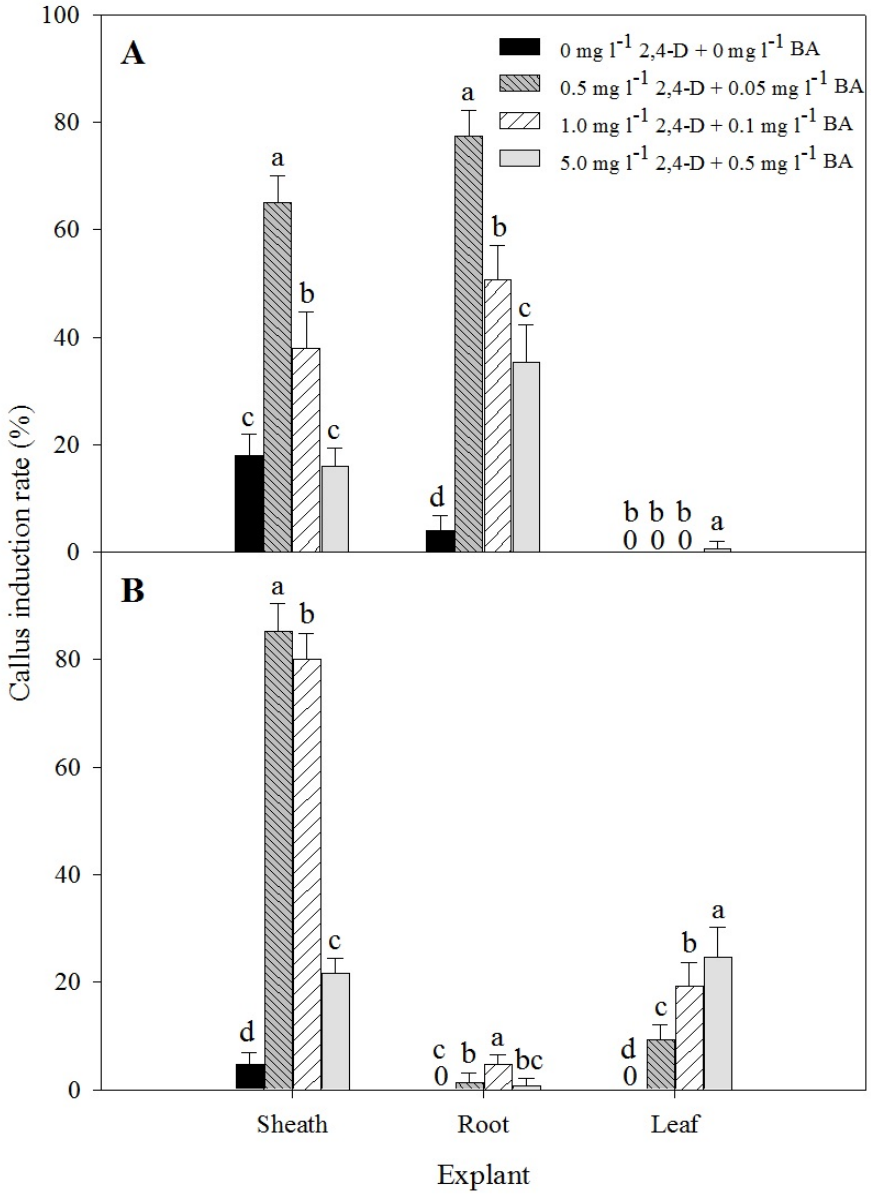

圖 3. 不同濃度 2,4-D 與 BA 組合對薑荷花及觀音薑癒合組織誘導之影響 (A)薑荷花. (B)觀音薑

Fig. 3. Effect of different combinations of 2,4-D and BA supplemented to VW basal medium on callus induction of *C. alismatifolia* and *C. cordata*. (A) *C. alismatifolia*. (B) *C. cordata*.

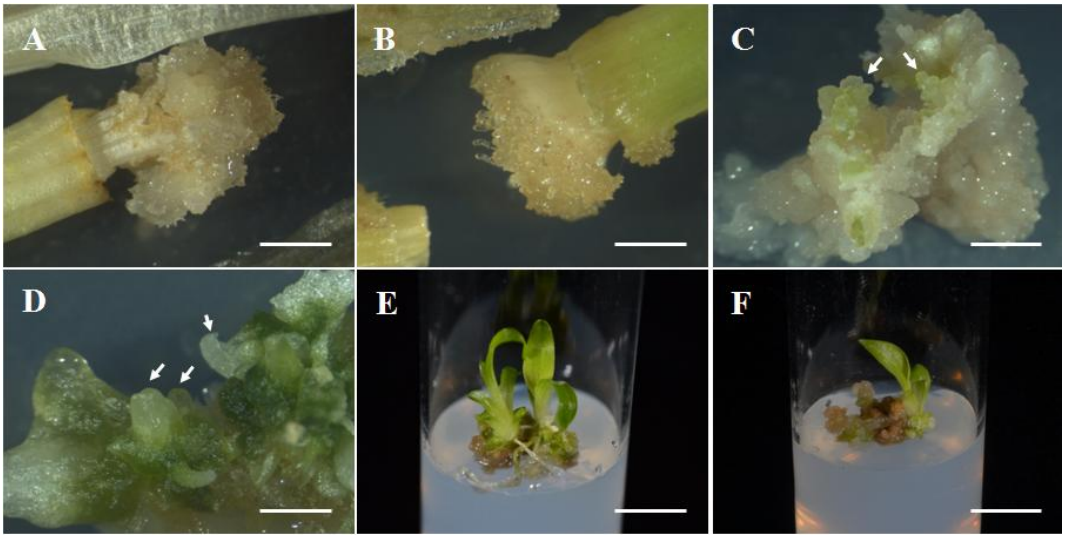

圖 4. 薑荷花與觀音薑葉鞘癒合組織誘導與植株再生之情形 (A)薑荷花葉鞘癒合組織(bar = 30 mm). (B)觀音薑葉鞘癒合組織(bar = 30 mm). (C)薑荷花癒合組織分化形成綠色結構(bar = 20 mm). (D)薑荷花不定芽原體分化(bar = 10 mm). (E)薑荷花植株再生(bar = 80 mm). (F)觀音薑植株再生(bar = 80 mm).

Fig. 4. *In vitro* propagation of *C. alismatifolia* and *C. cordata* via sheath segments culture. (A) Callus dervied from sheath tissue of *C. alismatifolia* (bar = 30 mm). (B) Callus dervied from sheath tissue of *C. cordata* (bar = 30 mm). (C) *C. alismatifolia* callus differentiation by the appearance of green structures (bar = 20 mm). (D) Adventitious shoot primordia occurred on the surface of callus of *C. alismatifolia* after being cultured on growth regulator-free medium (bar = 10 mm). (E) Plant regeneration from organogenic callus of *C. alismatifolia* (bar = 80 mm). (F) Plant regeneration from callus of *C. cordata* (bar = 80 mm).

而觀音薑的葉鞘、根及葉培植體培養於添加相同 2,4-D 及 BA 濃度組合之誘導培養基，培植體及癒合組織的褐化率均較薑荷花為低。圖 3B 顯示，觀音薑的葉鞘培植體也是以含 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.05 mg l^{-1} BA 的培養基，可獲得最大的癒合組織形成率(85.3%)(圖 4B)，但與添加 1.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.1 mg l^{-1} BA 的處理並無顯著差異，同時，高濃度的 2,4-D 亦不利癒合組織的形成。而與薑荷花不同的是，觀音薑根培植體的癒合組織誘導率極低，僅部分鬚根尖端繼續生長而已，並不適合作為癒合組織的誘導材料，但葉培植體於其他添加 2,4-D 及 BA 的培養基卻有 9.3-24.7%的誘導率，如 Salvi 等人[24]即是以 *C. longa* 葉基組織為培植體，添加 dicamba 誘導薑科植物(*Zingiber officinale*)嫩葉形成癒合組織[11]。

四、植株形成

薑荷花及觀音薑經 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.05 mg l^{-1} BA 誘導產生的葉鞘癒合組織，照光培養於不含任何植物生長調節物質的 MS 培養基，可使癒合組織表面產生綠色構造(圖 4C)，並由其表面分化多數個數目不等的不定芽原體(圖 4D)。Kackar 等人[11]也認為不含植物生長調節劑的培養基可促進薑科癒合組織再生，並有助於莖 和根系的發育，不過，*C. kwangsiensis* 以 TDZ、BA 及 2,4-D 誘導產生的莖基癒合組織在含 TDZ、BA 和 NAA 組成的再生培養基中，才能形成最大的芽原體再生頻率[34]，再次顯示器官或體胚再生除了和植物材料有關外[15]，也受使用的生長調節劑種類和處理時間影響[7, 10, 31]。經由側芽增殖而來的芽體或癒合組織再生而得的不定芽原體，分離後培養於相同不含生長調節物質的培養基，約 1-2 個月後可發育並形成組培苗(圖 2B,D; 圖 4E,F)。組培苗經適當的馴化，即可移植至遮陰的溫室種植。與其它薑科植物品種一樣[25, 31, 34]，組培苗的存活率高，可達 95%以上，並可正常發育形成成熟的植株。

參考文獻

1. 許家言、葉常青、蔡新聲. 1991. 薑花組織培養之大量繁殖. 中華農業研究 40:171-177.
2. 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 48:239-246.
3. Balachandran, S.M., S.R. Bhat, and K.P.S. Chandel. 1990. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell Rep. 8:521-524.
4. Chand, H., M.N. Pearson, and P.H. Lovell. 1999. Rapid vegetative multiplication in *Colocasia esculenta* (L) Schott (taro). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 55:223-226.
5. 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.
6. Chawla, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology, 2nd edn. Science Publishers, Enfield, pp. 3-56.
7. Das, A., V. Kesari, and L. Rangan. 2010. Plant regeneration in *Curcuma* species and assessment of genetic stability of regenerated plants. Biol. Plant. 54:423–429.

8. Faria, R.T. and R.D. Illg. 1995. Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. Sci. Hortic. 62:135-137.
9. Islam, M.A., K. Kloppstech, and H.-J. Jacobsen. 2004. Efficient Procedure for *In vitro* Microrhizome Induction in *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) – A Medicinal Plant of Tropical Asia. Plant Tissue Cult. 14:123-134.
10. Jiang, B., Y.G. Yang, Y.M. Guo, Z.C. Guo, and Y.Z. Chen. 2005. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot organogenesis of the medicinal plant *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:677-681.
11. Kackar, A., S.R. Bhat, K.P.S. Chandel, and S.K. Malik. 1993. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 32:289–292.
12. Kieber, J. 2006. Ethylene, In: Taiz, L. and E. Zeiger (Eds.), Plant physiology, 4th edn. Sinauer, Sunderland, pp. 543-591.
13. Kuehny, J.S., M.J. Sarmiento, and P.C. Branch. 2002. Cultural studies in ornamental ginger. Trends in New Crops and New Uses, J. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 477-482.
14. Loc, N.H., D.T. Duc, T.H. Kwon, and M.S. Yang. 2005. Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe)–a valuable medicinal plant. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81:119–122.
15. Loh, C.S. and A.N. Rao. 1989. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formation *in vitro*. Sci. Hortic. 39:31-39.
16. Mahadtanapuk, S., N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermsri, and S. Anuntalabhochai. 2006. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots. Plant Biotechnol. 23:233–237.
17. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
18. Nayak, S. 2000. *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb. Plant Growth Regul. 32:41-47.
19. Obukosia, S.D., E. Kimani, K. Waithaka, E. Mutitu, and P.M. Kimani. 2005. Effects of growth regulators and genotypes on pyrethrum *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:162-166.
20. Prakash, S., R.E. Elangomathavan, S. Seshadri, K. Kathiravan, and S. Ignacimuthu. 2004. Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. plantlets

21. Prathanturarug, S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee, and P. Saralamp. 2003. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. Plant Cell Rep. 21:1054-1059.
22. Prathanturarug, S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee, and P. Saralamp. 2005. Rapid micropropagation of *Curcuma longa* using bud explants pre-cultured in thidiazuron-supplemented liquid medium. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 80:347–351.
23. Salvi, N.D., L. George, and S. Eapen. 2000. Direct regeneration of shoots from immature inflorescence cultures of turmeric Plant Cell Tiss. Organ Cult. 62:235–238.
24. Salvi, N.D., L. George, and S. Eapen. 2001. Plant regeneration from leaf base callus of turmeric and random amplified polymorphic DNA analysis of regenerated plants. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 66:113–119.
25. Salvi, N.D., L**.** George, and S. Eapen. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 68:113-119.
26. Sharma, T.R. and B.M. Singh. 1995. *In vitro* microrhizome production in *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Rep. 15:274-277.
27. Sharma, T.R. and B.M. Singh. 1997. High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Rep. 17:68-72.
28. Shirgurkar, M.V., C.K. John, and R.S. Nadgauda. 2001. Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 64:5-11.
29. Toppoonyanont, N., S. Chongsang, S. Chujan, S. Somsueb, and P. Nuamjaroen. 2005. Micropropagation Scheme of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. Acta Hort. (ISHS) 673:705-712.
30. Tyagi, R.K., A. Agrawal, C. Mahalakshmi, Z. Hussain, and H. Tyagi. 2007. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 43:51–58.
31. Tyagi, R.K., A. Yusuf, P. Dua, and A. Agrawal. 2004. *In vitro* plant regeneration and enotype conservation of eight wild species of *Curcuma*. Biol.

Plant. 48:129–132.
32. Vacin, E.F. and F.W. Went. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Bot. Gaz. 110:605-613.
33. Van Staden, J., E. Zazimalova, and E.F. George. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.F., M.A. Hall, and G.J. De Klerk (Eds.), Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Volume 1. The background. Springer, New York, pp. 205-226.
34. Zhang, S., N. Liu, A. Sheng, G. Ma, and G. Wu. 2011. *In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl. (Zingiberaceae). Plant Growth Regul. 64:141-145.