Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

The effect of hormonal combinations on in vitro propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)

Mohammad Norozi

MSc Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: mnorozi75@gmail.com

Nasrin Moshtaghi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: moshtaghi@um.ac.ir

Hassan Marashi

Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: marashi@um.ac.ir

Fereshte Moshiri

Educational Expert, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail address: moshirife@um.ac.ir

Abstract

Objective

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) belongs to the *Zingiberaceae* family and it is one of the most important spices in the world which produces spicy and fragrant flavors and it has many healing properties. This plant does not have the ability to produce seeds due to sterility. The growth of the plant through the rhizome causes the cost of cultivation and the probability of pathogen attack. Therefore, propagation using in vitro tissue culture be effective method for increasing the rate of proliferation and infection control. For obtaining the better results in tissue culture, explants should be prepared from healthy, fresh and strong maternal sources. Somatic embryogenesis usually not used for propagation due to mutation, so it is better to use the rhizome buds as explant to preserve genetic characteristics.

Materials and methods

For micropropagation, explants including shoot, leaf, collar and buds of ginger in were used and cultured on MS basal medium supplemented with 9 different hormonal combinations (BAP alone or in combination with NAA) for shoot induction. Shoots were transferred to MS medium containing 1 mg/l NAA or IBA for rooting. Plantlets were transferred to pots and gradually adapted to the greenhouse condition.

Results

The best explant for fast and easy multiplication of ginger was the healthy rhizome. MS culture medium supplemented with 2 mg/l BAP and 1 mg/l NAA produced 7 shoots in each rhizome bud. The best treatment for rooting was MS medium containing 1 mg/l NAA which produced 7 roots per shoot. Then, the plantlets were successfully adopted in pots containing garden soil and cocopeat at greenhouse condition.

Conclusions

The results of this study showed that micropropagation of ginger plant is affected by the type of growth regulators and their concentration in MS medium and the rhizome buds were the best explants for direct in vitro propagation of ginger.

Keywords: Auxin, Bud, Rhizome, Ginger, Tissue culture

Paper Type: Research Paper.

Citation: Norozi M, Moshtaghi N, Marashi H, Moshiri F (2024) The effect of hormonal combinations on in vitro propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 91-108.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 91-108. DOI: 10.22103/jab.2024.22032.1505

Received: February 04, 2024. Received in revised form: March 28, 2024.

Accepted: March 29, 2024. Published online: May 31, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

تاثیر ترکیب‌هورمونی بر پرآوری درون‌شیشه‌ای گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale* Roscoe)

محمد نوروزی

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: mnorozi75@gmail.com

نسرین مشتاقی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: moshtaghi@um.ac.ir

سید حسن مرعشی

استاد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: marashi@um.ac.ir

فرشته مشیری

کارشناس آموزشی، دانشکده کشاورزی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: moshiri-fe@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۰

چکیده

هدف: گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale Roscoe*) یکی از گیاهان خانواده *Zingiberaceae* بوده و از مهم‌ترین ادویه‌های‌جهان است که ریزومی تند و معطر تولید می‌کند و خواص درمانی زیادی دارد. این گیاه توانایی تولید بذر را به‌دلیل عقیمی شدید ندارد. تکثیر گیاه از طریق ریزوم، هزینه‌های کشت و احتمال حمله عوامل بیماریزا را بالا می‌برد. بنابراین استفاده از روش‌های تکثیر کشت بافت می‌تواند کمک موثری در جهت افزایش نرخ تکثیر و کنترل آلودگی داشته باشد. برای حصول نتیجه بهتر برای کشت‌بافت، ریزنمونه باید از منابع مادری سالم، تازه و قوی

حاصل شود. به‌دلیل آن که در کالوس و جنین‌زایی سوماتیکی امکان ایجاد موتاسیون وجود دارد معمولا برای تکثیر از این روش‌ها استفاده نمی‌شود و بهتر است از ریزنمونه‌های نوک‌شاخه و یا جوانه‌ریزوم که امکان حفظ خصوصیات ژنتیکی را دارند استفاده شود.

مواد و روش‌ها: جهت تکثیر مستقیم، از ریزنمونه ساقه‌ی برش خورده گیاه بالغ زنجبیل، برگ‌ها، طوقه، قطعات برش خورده جوانه ریزوم زنجبیل و جوانه کامل ریزوم زنجبیل استفاده شد. از بهترین ریزنمونه در محیط‌کشت پایه‌ی MS با ۹ نوع ترکیب هورمونی مختلف استفاده شد که در آن‌ها از هورمون‌های BAP و NAA به تنهایی و یا در ترکیب با هم در غلظت‌های مختلف به‌منظور شاخه‌زایی استفاده گردید. ریزنمونه‌ها پس از شاخه‌زایی به محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و IBA جهت ریشه‌زایی منتقل شدند. گیاهچه‌های بدست آمده در گلدان کاشته شده و به تدریج در گلخانه سازگار شدند.

نتایج: بهترین ریزنمونه برای تکثیر سریع و آسان زنجبیل جوانه سالم ریزوم این گیاه بود. بهترین تیمار برای شاخه‌زایی، ۲ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA در محیط‌کشت MS بود که ۷ شاخه در ریزوم جوانه تولید نمود. بهترین تیمار برای ریشه‌زایی، در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA بود که ۷ عدد ریشه را در شاخه تولید نمود. در ادامه، گیاهچه‌های کشت‌بافتی در گلدان حاوی خاک‌باغچه و کوکوپیت به نسبت ۱:۱ با موفقیت با محیط گلخانه سازگاری یافتند.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش حاضر نشان داد، ریزازدیادی گیاه زنجبیل تحت تاثیر نوع تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت آن‌ها در محیط‌کشت MS قرار می‌گیرد و ریزنمونه جوانه ریزوم برای تکثیر مستقیم دارای نتایج مطلوبی می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: اکسین، جوانه، ریزوم، زنجبیل،کشت بافت.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: نوروزی محمد، مشتاقی نسرین، مرعشی سید حسن، مشیری فرشته (۱۴۰۳) تاثیر ترکیب‌هورمونی بر پرآوری درون‌شیشه‌ای گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale* Roscoe). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۹۱-۱۰۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

زنجبیل با نام علمی (*Zingiber officinale* Rosc.) یک گیاه علفی تک‌لپه چندساله از خانواده *Zingberaceae* و دارای ریزوم معطر می‌باشد که به صورت تجاری در مناطق گرمسیری در دنیا کشت می شود. دو کشور چین و هند از بزرگترین کشورهای تولیدکننده زنجبیل هستند (Ravindran et al. 2005). این گیاه دارویی به عنوان یک ادویه در سراسر جهان و در

طب سنتی که قدمت آن به بیش از ۲۰۰۰ سال می‌رسد شناخته می شود (Zhou et al. 2020). در سال ۲۰۱۹ تولید جهانی زنجبیل ۴ میلیون‌تن گزارش شد که نشان دهنده ارزش اقتصادی قابل توجه آن در تجارت جهانی است (Li et al. 2021). با توجه به آمار گمرک بیش از ۳هزارتن زنجبیل از کشورهایی نظیر چین، هند، آلمان و امارات به ایران واردات می شود که بر اساس آمار واردات این حجم زنجبیل به کشور، ۴ میلیون و ۷۳۲ هزار دلار ارز از کشور خارج می‌شود که معادل ریالی آن، بالغ بر ۱۹۸ میلیارد و ۳۷۱ میلیون ریال در آمار گمرک در سال ۱۳۹۷ به ثبت رسیده است. می‌توان با برنامه ریزی‌های درستی از خروج ارز جلوگیری کرده و همچنین بستر اشتغال‌زایی را برای کشاورزان و دانش‌آموختگان این رشته فراهم نمود.

زنجبیل زراعی به‌طور کلی نابارور بوده و توان تولید بذر ندارد، بنابراین تولیدمثل جنسی نداشته و از ریزوم‌های رویشی برای تکثیر آن استفاده می شود (Nair 2019). توسعه‌ی روش‌های مختلف باززایی در شرایط آزمایشگاهی برای تسریع در ریزازدیادی زنجبیل بسیار مهم است و امروزه اطلاعات جامعی در این خصوص وجود ندارد. لذا در این پژوهش و پژوهش‌های مشابه سعی شده تا تاثیر نوع هورمون‌های اکسین و سیتوکنین بر شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و افزایش نرخ سازگاری این گیاه با محیط بیرونی مورد آزمایش قرار بگیرد. بهینه سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای گیاه زنجبیل با استفاده از بخش‌های مختلف گیاه به نحوی که بتوان در زمان کوتاه‌تر به تعداد گیاهچه بیشتر، همراه با نرخ زنده‌مانی بالاتر دست یافت از ضروریات تکثیر آزمایشگاهی این گیاه و هدف پژوهش حاضر می‌باشد.

با توجه به اینکه ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشدی می‌تواند تاثیر متفاوتی روی ازدیاد گیاهان بر جای بگذارد، لذا در خصوص تکثیر زنجبیل نیز استفاده از ترکیب هورمونی متفاوت می‌تواند در تکثیر شاخه و افزایش تعداد گیاهچه‌های حاصل از کشت در شرایط درون شیشه‌ای موثر باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش حاضر، با هدف بهبود و معرفی محیط‌کشت مناسب جهت پرآوری و تکثیر گیاه زنجبیل در شرایط کشت‌درون‌شیشه‌ای طراحی و اجرا شد. به این منظور از ریزنمونه‌ها و ترکیبات مختلف هورمونی در محیط‌کشت استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه کشت‌بافت دانشگاه فردوسی مشهد، انجام گرفت. برای تهیه ریزنمونه جهت انجام آزمایش، از گیاهان زنجبیل رشد یافته در گلدان تحت شرایط کنترل شده و نیز جوانه‌های حاصل از ریزوم‌های نگهداری شده در شرایط دمایی و رطوبتی مناسب، استفاده گردید. تمامی ریزوم‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر از منطقه میدان‌بار شهرستان مشهد تهیه شدند.

تهیه ریزنمونه مناسب و ضدعفونی: با توجه به آلودگی‌های متعدد جوانه های‌ریزوم، ابتدا شرایط ضدعفونی مختلف مطابق جدول ۱ روی جوانه‌های برداشت شده از ریزوم اعمال شدند. هر یک از تیمارهای ضدعفونی در ۴ تکرار مورد برر سی قرار

گرفت تا در نهایت با تجزیه و تحلیل آماری این ۱۶ تیمار ضـدعفونی در قالب طرح کاملا تصـادفی، بهترین تیمار برای ضـدعفونی جوانه‌ریزوم که کمترین میزان آلودگی‌ثانویه را به همراه دارد، معرفی شود. در ادامه از ریزنمونه‌های جوانه ریزوم، ساقه، برگ، طوقه و برش جوانه ریزوم به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. شستشوی سطحی ریزنمونه‌های برگ و ساقه با آب و مایع ظرفشویی انجام شد. سپس از مواد ضدعفونی‌کننده شامل الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه برای حذف آلودگی‌های سطحی احتمالی ریزنمونه‌ها، استفاده شد. پس از آن، شستشوی ریزنمونه‌ها زیر هود استریل با استفاده از آب مقطر استریل سه بار جمعا به‌مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت.

ارزیابی تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد برشاخه‌زایی: پس از تعیین بهترین تیمارضدعفونی، جوانه‌های ریزوم برداشت و با اعمال شرایط بهینه ضدعفونی، در هر یک از ترکیب‌های مختلف محیط‌کشت که شامل مقادیر افزایش یافته هورمون BAP به تنهایی و یا همراه با اکسین بودند، بررسی شدند. به این منظور تیمارهای مختلف هورمونی مطابق جدول ۲ در محیط‌کشت پایه MS تهیه و جوانه های‌ریزوم در آنها کشت گردید. شیشه‌های‌کشت همگی در اتاقک رشد با شرایط نوری و دمایی بهینه به‌مدت ۸ هفته قرار داده شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و در ۳ تکرار انجام گرفت. شاخه های‌تولید شده، تعداد ریشه در هر شاخه، طول شاخه، طول ریشه‌ها، قطرریشه‌ها و تعداد برگ در هر یک تیمارهای فوق شمارش و ثبت گردید.

ارزیابی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی‌از شاخه ها: این آزمایش با هدف ریشه‌زایی از شاخه‌های به‌دست آمده در مرحله‌ی قبل، انجام شد. برای انجام این آزمایش، شاخه‌هایی که بوسیله جوانه ایجاد شده بودند بوسیله اسکالپل تیز و استریل شده از بخش انتهایی شاخه که به جوانه متصل بود، بریده شدند و به محیط‌کشت پایه MS به همراه تنظیم‌کننده‌های موثر بر ریشه‌زایی در محیط‌های‌کشت MS فاقد هورمون، محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شدند.

سازگاری گیاهچه‌ها: گیاهچه‌های‌ریشه دار شده به تدریج با شرایط گلخانه سازگار شدند. در این مرحله پس از قرار گرفتن در محیط‌کشت مناسب ریشه‌زایی، گیاهچه ها از درون شیشه، خارج شدند و پس از شستشوی ریشه‌ها از محیط‌کشت در گلدان‌های حاوی کوکوپیت و خاک باغچه به نسـبت ۱:۱ قرار گرفتند. گلدان‌های کوچک به مدت یک هفته در زیر پلاسـتیک به منظور حفظ رطوبت در اتاقک رشـد قرار گرفتند و پس از مدتی به درون گلخانه با رطوبت نسـبی ۹۰ درصـد و دمای ^{o}C ۲۵ منتقل شدند.

جدول۱. تیمارهای مختلف برای ضدعفونی جوانه‌های ریزوم زنجبیل.

Table 1. Different treatments for disinfection of ginger rhizome buds.

شماره تیمار Treatment number	تیمارها Treatments
1	الکل (۷۰ درصد) ۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم (۰/۲درصد) ۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + sodium hypochlorite (0.2 %) 5 min
2	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) ۱۰ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + sodium hypochlorite (1 %) 10 min
3	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + هیپوکلریت سدیم (۱/۵ درصد) ۱۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + sodium hypochlorite (1.5 %) 15 min
4	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۱ درصد) ۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.1 %) 5 min
5	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۱ درصد) ۱۰دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.1 %) 10 min
6	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۱ درصد) ۱۲دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.1 %) 12 min
7	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۱ درصد) ۱۵دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.1 %) 15 min
8	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.5 %) 5 min
9	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۱۰ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.5 %) 10 min
10	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۱۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0.5 %) 15 min
11	الکل (۷۰ درصد) ۱ دقیقه + کلرید جیوه (۱ درصد) ۵ دقیقه Alcohol (70 %) 1 min + Mercury (II) chloride (1 %) 5 min
12	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + هیدروژن پراکسید(۳۰ درصد) ۱۰ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Hydrogen peroxide (30 %) 10 min
13	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) ۵ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec + Mercury (II) chloride (0/5 %) 5 min + sodium hypochlorite (1 %) 5 min
14	الکل (۷۰ درصد)۳۰ ثانیه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) ۱۰ دقیقه Alcohol (70 %) 30 sec+ Mercury (II) chloride (0/5 %) 5 min+ sodium hypochlorite (1 %) 10 min
15	قارچکش کاربندازیم و ایپرودیون (۲ در ۱۰۰۰) ۱۰ دقیقه + الکل (۷۰ درصد) ۱ دقیقه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) ۵ دقیقه Iprodione and Carbendazim fungicide (2kg in 1lit) 10 min+ Alcohol (70 %) 1 min+ Mercury (II) chloride (0/5 %) 5 min+ sodium hypochlorite (1 %) 5 min
16	قارچکش کاربندازیم و ایپرودیون (۲ در ۱۰۰۰) ۱۰ دقیقه + الکل (۷۰ درصد) ۱ دقیقه + کلرید جیوه (۰/۵ درصد) ۵ دقیقه + هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) ۱۰ دقیقه Iprodione and Carbendazim fungicide (2kg in 1lit) 10 min+ Alcohol (70 %) 1 min+ Mercury (II) chloride (0/5 %) 5 min+ sodium hypochlorite (1 %) 10 min

جدول۲. تنظیم کننده‌های رشد با هدف شاخه‌زایی از جوانه ریزوم زنجبیل.

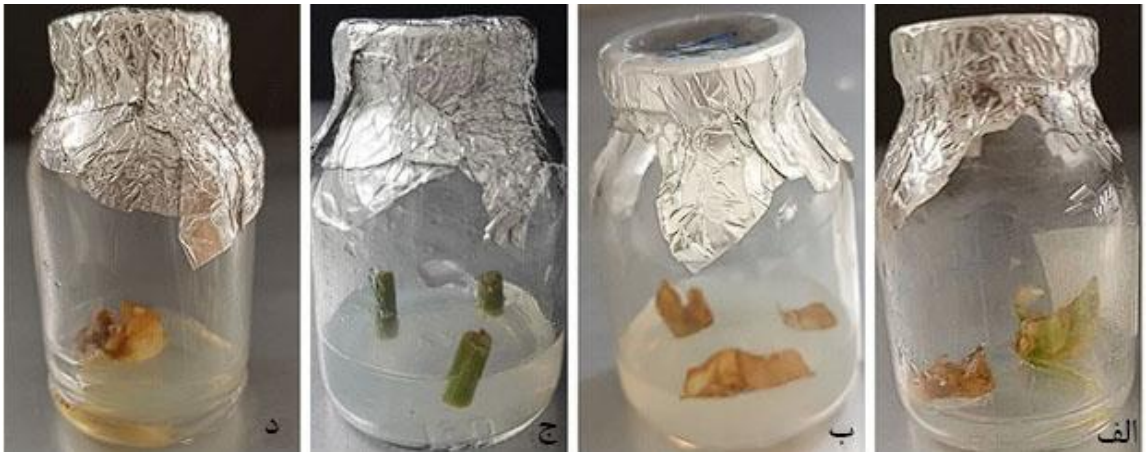
Table 2. Growth regulators for shoot production of ginger rhizome bud.

شماره تیمار Treatment number	تیمارها Treatments
1	MS
2	MS + BAP ۱ میلی‌گرم بر لیتر 1 mg/L BAP + MS
3	MS + BAP ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2 mg/L BAP +MS
4	MS + BAP ۳ میلی‌گرم بر لیتر 3 mg/L BAP+ MS
5	MS + BAP ۴ میلی‌گرم بر لیتر 4 mg/L BAP + MS
6	MS + BAP ۵ میلی‌گرم بر لیتر 5 mg/L BAP + MS
7	MS + NAA ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 1 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + MS
8	MS+ NAA ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2 mg/L BAP + 1 mg/L NAA + MS
9	MS + NAA ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم بر لیتر 3 mg/L BAP+ 1 mg/L NAA + MS

تجزیه آماری: آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شده بود. تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 8.2.1 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ در صد با ۳ تکرار تکنیکال، انجام شد.

نتایج و بحث

در طی آزمایشات انجام‌شده از ریزنمونه‌های برش جوانه‌ی ریزوم، برگ، ساقه و طوقه‌ی‌گیاه در تیمارهای مختلف مشخص شد که هیچکدام از آن‌ها برای تکثیر گیاه مناسب نیستند. جوانه‌های ریزوم به‌منظور تکثیر گیاه در محیط‌کشت به‌وسیله اسکالپل تیز و استریل شده پس از ضدعفونی شدن به قطعات کوچکتری برش خوردند که نتیجه‌ای در پی نداشت (شکل۱–الف). ریزنمونه‌های تهیه شده از سایر بخش‌ها نیز هیچ واکنشی نسبت به محیط‌کشت نداشته و همه‌ی آن‌ها از بین رفتند (شکل۱–ب، ج، د). نتایج آزمایشات نشان داد که استفاده از ریزنمونه‌ی کامل و سالم جوانه‌ریزوم، برای تکثیر مستقیم گیاه زنجبیل در محیط‌کشت MS مناسب است (شکل۳). در پژوهش Balachandran et al (1990) .از ریزنمونه جوانه به طول یک سانتی‌متر برای تکثیر گیاه زنجبیل استفاده کردند. در بسیاری از آزمایشاتی که روی تکثیر زنجبیل انجام داده‌اند، از بخش جوانه ریزوم استفاده شده بود (Babu et al. 1997).



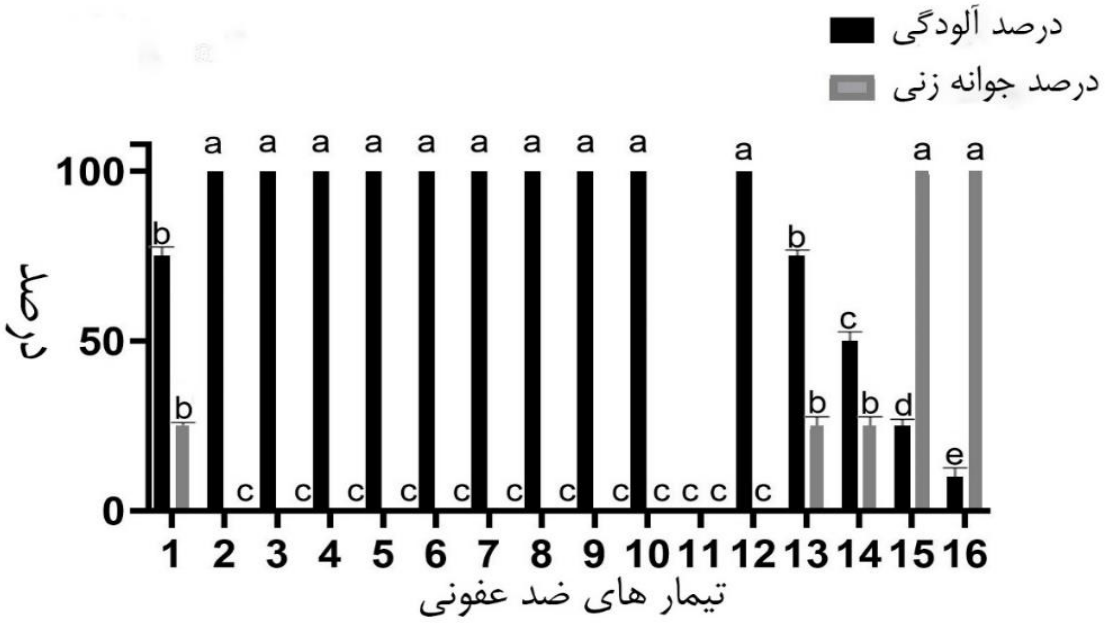
شکل۱. ریزنمونه‌های کشت شده از برش‌جوانه (الف)، برگ (ب)، ساقه (ج) و طوقه (د) در محیط‌کشت MS

Figure 1. Cultured explants from cuttings of bud (a), leaf (b), stem (c) and collar (d) in MS culture medium

تاثیر تیمار ضـــدعفونی جوانه ریزوم: با توجه به آزمایشـــات انجام شـــده برای انتخاب بهترین غلظت و مواد ضدعفونی‌کننده برای ازبین بردن عوامل قارچی و باکتریایی از ریزنمونه جوانه‌ی گیاه زنجبیل (شکل ۲) در نهایت مشخص شد که بکار بردن قارچکش کاربندازیم و ایپرودیون (۲در۱۰۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه، الکل (۷۰ درصـــد) بمدت یک دقیقه، کلرید جیوه (۰/۵ درصد) بمدت ۵ دقیقه و هیپوکلریت سدیم (یک درصد) به مدت ۱۰ دقیقه بیشترین میزان زنده‌مانی ریزنمونه، جوانه‌زنی با نرخ ۱۰۰ درصد و همچنین نرخ ۱۰ درصد آلودگی را در پی داشت. برای ضدعفونی نمودن جوانه‌های ریزوم Singh and Bhagyalshmi (1988) از کلرید جیوه به غلظت ۰/۲ درصد استفاده کرده بودند که این روش برای ضدعفونی نمودن ریزنمونه‌ها و زنده مانی آنها در این پژوهش مناسب نبود. در پژوهش دیگری که توسط .Pandey et al (1997) انجام شد، جوانه‌های سالم و تازه‌ی ریزوم را ابتدا در هیپوکلریت سـدیم ۱۰ درصـد بمدت ۱۵ دقیقه و هیپوکلریت سـدیم ۵ درصـد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار دادند. در مرحله بعد، جوانه‌های ریزوم را در مایع حاوی ۰/۲ درصـد تتراسـایکلین و ۰/۲ درصـد متالاکسـی برای ۱/۵ سـاعت قرار دادند. جوانه‌ریزوم در پژوهش انجام شده توسط .Balachandaran et al (1990) با کلرید جیوه ۰/۱ درصد، به مدت ۱۵ دقیقه استریل سطحی شده و سپس ۵ الی ۶ مرتبه با آب استریل آنها را شستند که استفاده از این روش ضدعفونی برای ازبین بردن آلودگی‌ها در این پژوهش مناسب نبود. ریزوم‌ها در پژوهش Malabadi (2002) توسط توین ۲۰[5] به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و به مدت ۲ ساعت زیر آب‌جاری قرار گرفتند. کل ریزوم با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه، کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شد و

5.Tween 20

در ادامه ۴ الی ۵ مرتبه با آب استریل شستشو شد. لذا مشاهده می‌شود که کنترل‌آلودگی سطحی در ریزوم زنجبیل به دلیل محیط رشد خاکی و فرایند واردات آن، بالاست و ترکیبی از مواد ضدعفونی‌کننده مختلف کارایی دارد.



شکل۲. تاثیر تیمارهای مختلف ضدعفونی بر درصد آلودگی و جوانه‌زنی جوانه‌های ریزوم

Figure 2. The effect of different disinfection treatments on the percentage of contamination and germination of rhizome buds

تاثیر تنظیم کننده‌های ر شد بر شاخه‌زایی و تعداد برگ: شاخه‌زایی از ریزنمونه‌ی جوانه‌ریزوم در محیط‌ک شت MS با هورمون‌ها و غلظت‌های مختلف م شاهده شد. در میان تیمارهای مختلفی که برای این آزمایش طراحی شد، محیط‌ک شت MS همراه با ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک‌میلی‌گرم بر لیتر NAA بیشترین تعداد شاخه را با میانگین ۷ شاخه به‌وجود آورده بود. کمترین میزان شاخه‌زایی نیز مربوط به تیمار شاهد فاقد هورمون و همچنین تیمار هورمونی BAP به غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر به تعداد ۲ عدد شاخه مشاهده شد (شکل۴-الف). تعداد برگ‌های بوجود آمده هر شاخه در تیمارهای مختلف هورمونی بررسی شد. نتایج نشان داد، ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین تعداد برگ را به میانگین ۱۲ برگ به همراه داشت (شکل۴-ه). بیشترین تعداد برگ در پژوهش .Abbas et al (2011) از ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP در محیط‌کشت MS به تعداد ۱۵ عدد گزارش شد و کمترین تعداد برگ نیز در تیمار شاهد فاقد هورمون به تعداد ۳ عدد گزارش شد اما کمترین میزان برگ‌دهی پژوهش حاضر، در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP به میزان ۲ عدد بود. بیشترین تعداد برگ به میزان ۴ عدد و بیشترین تعداد ریشه با میانگین ۵ عدد ریشه در

محیط‌کشت MS حاوی یک ppm[۲] TDZ[۳] توسط Sukarnih et al. (2021) گزارش شد و کمترین میزان برگ در تیمار هورمونی 2ip[۴] و Kin[۵] به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت MS به تعداد ۲ برگ بود. ریزنمونه‌های جوانه در پژوهش Balachandran et al. (1990) به طول یک سانتی‌متر برش خورده و آن‌ها را درون محیط‌کشت MS حاوی سایتوکینین BAP با غلظت‌های مختلف ۰، ۰/۲، ۱، ۳ یا ۵ میلی‌گرم بر لیتر یا در ترکیب با یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر Kin کشت نمودند. پس از ۴ هفته ۴ ساقه در هر جوانه مشاهده شد که در غلظت ۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP بهترین نتیجه را در پی‌داشت که نتایج این پژوهش با نتایج تحقیقات ما هم‌خوانی نداشتند. در دیگر پژوهش انجام شده توسط Pandey et al. (1997) ریزنمونه‌جوانه در محیط‌کشت MS حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر BA[۶] در ترکیب با ۰/۵ میلی‌گرم NAA بالاترین تعداد شاخه با میانگین ۵شاخه در هر گیاه و طویل ترین شاخه‌ها پس از ۵ هفته را بدست آوردند. در پژوهش دیگری جوانه‌های استریل ریزوم در محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر Kin، ۲۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۲ میلی گرم بر لیتر NAA بین ۷ تا ۸ شاخه ایجاد نمود (Singh and Sharma 1997). طول شاخه‌های ایجاد شده در تیمارهای متفاوت هورمونی مورد سنجش و بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد رشد شاخه‌ها در تیمارهای متفاوت اختلاف دارند. در این میان، تیمارهای شاهد، BAP در غلظت‌های ۲، ۳ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر و ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با ۱، ۲ و۳ میلی‌گرم بر لیتر BAP بیشترین طول شاخه را به ترتیب به طول ۴/۵، ۵، ۴، ۵/۵، ۴، ۵ و ۵ سانتی‌متر داشتند و کمترین طول شاخه مربوط به محیط‌کشت حاوی ۱ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP به ترتیب با طول میانگین ۲ و ۳ سانتی‌متر بود (شکل۴-ب). در پژوهشی Biglari Farash and Nikfekr (2021) برای القای ساقه‌زایی استفاده از ترکیب هورمون‌های NAA و BA هر دو با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر را مناسب گزارش کردند. بیشترین طول‌شاخه در پژوهش Santilata and Kambaska (2009) از ترکیب ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک میلی‌گرم بر لیتر NAA به طول ۶ سانتی‌متر گزارش کردند، این ترکیب هورمونی در پژوهش حاضر نیز با ۵ سانتی‌متر بیشترین طول شاخه را داشت. در پژوهشی، بیشترین طول شاخه را Kavyashree (2009) در محیط‌کشت MS حاوی ۱۷/۷۶ میکرومولار BAP به طول ۱۲ سانتی‌متر مشاهده کردند. بیشترین طول شاخه در تحقیق دیگری از ترکیب‌هورمونی ۳ میلی‌گرم بر لیتر Kin و یک میلی‌گرم بر لیتر NAA به طول ۲ سانتی‌متر گزارش شد و کمترین طول شاخه در محیط‌کشت MS حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA به میزان ۲ سانتی‌متر مشاهده شد (Abbas et al. 2011). بیشترین طول‌شاخه در پژوهش Cher et al. (2016) در محیط‌کشت کنترل بدون هورمون به طول ۶ الی۷ سانتی‌متر مشاهده کردند که در پژوهش حاضر نیز در همین ترکیب، شاخه‌ها به طول ۵ سانتی‌متر

6. Part Per Million
7. Thidiazuron
8. 6- (γ, γ-Dimethylallylamino) Purine
9. Kinetin
10. Benzyl Adenine

بیشترین طول را داشتند. بیشترین طول شاخه گزارش شده در پژوهش Alqadesi et al. (2022) از هورمون Kin به غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر در محیط‌کشت MS به میزان ۷ سانتی‌متر گزارش کردند. در پژوهشی درباره تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر ریزازدیادی زنجبیل تحقیق شد. برای این منظور آن‌ها از جوانه‌های به دست آمده از ریزوم‌تازه و قرار دادن آن در محیط‌کشت پایه MS استفاده کردند. ریزنمونه‌های کشت شده در محیط‌کشت MS حاوی ۲میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین نرخ شاخه‌زایی را نشان دادند. در مرحله بعد ریزنمونه‌های شاخه به محیط‌کشت MS½ با ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA برده شدند که رشد ریشه‌ای خوبی داشتند. در مرحله آخر گیاهچه‌ها را به گلخانه برده و در گلخانه سازگار نمودند (Kambaska and Santalia 2009).

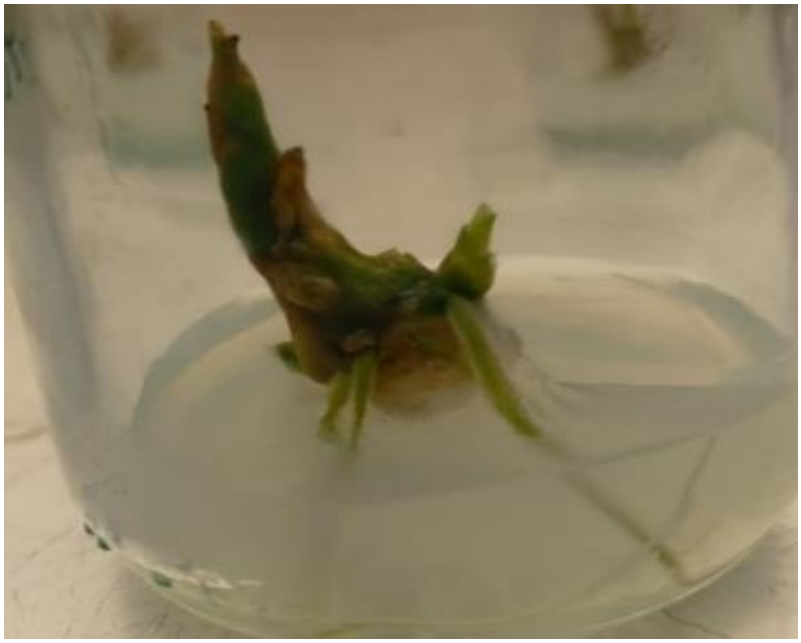
در تحقیقات Mbanso and Nkere (2010) برای ریزازدیادی زنجبیل با استفاده از ریزنمونه نوک‌شاخه و با تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف انجام شد. بهینه‌سازی غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد برای ریزازدیادی زنجبیل انجام پذیرفت. بالاترین شاخه‌زایی در محیط‌کشت حاوی ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA در ترکیب با هورمون BAP با غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۴ عدد مشاهده شد. در پژوهش Abbas et al. (2011) بر روی ازدیاد درون‌شیشه‌ای زنجبیل پژوهش انجام شد، نتایج گواه آن بود که استفاده از ۴/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هورمون BAP در محیط‌کشت MS بیشترین تعداد شاخه را تولید کرده بود. برای ریشه‌زایی نیز استفاده از محیط‌کشت B5[11] ½ همراه با یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA بیشترین در صد ریشه‌زایی را به وجود آورده بود. در نهایت گیاهان با محیط گلخانه و مزرعه سازگاری یافتند.

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی: تعداد ریشه‌های تشکیل شده از ریزنمونه‌ی جوانه ریزوم در این آزمایش مورد سنجش قرار گرفت. استفاده از ریزنمونه‌ی‌جوانه ریزوم در محیط کشت MS فاقد هورمون و نیز همراه با هورمون (فارغ از متناسب بودن یا نبودن نوع هورمون برای ریشه‌زایی) ریشه زایی‌را به‌دنبال داشت (شکل ۳). نتایج نشان داد ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر NAA به همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP تعداد ریشه‌ها را به شکل قابل توجهی افزایش داد و تعداد ریشه‌های تشکیل شده برای این تیمار ۲۰ عدد بود (شکل۴–ج). طول ریشه در تیمارهای مختلف هورمونی و همچنین ترکیبات هورمونی مورد آزمایش و سنجش قرار گرفت. آزمایش و سنجش قرار گرفت. بیشترین طول ریشه در تیمارهای محیط‌کشت فاقد هورمون و همچنین محیط‌کشت‌های حاوی ۵،۴،۳،۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP به ترتیب با میانگین ۴، ۴/۵، ۴، ۵ و ۴ سانتی‌متر و ترکیب یک میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۳، ۲، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP با میانگین ۴ سانتی‌متر بیشترین طول ریشه و کمترین طول ریشه درتیمار هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به میزان ۲ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل۴–د). قطر ریشه‌های تشکیل شده در تیمارهای مختلف هورمونی در محیط کشت MS نیز مورد بررسی و سنجش قرار گرفت. نتایج این سنجش نشان داد، در میان تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معناداری وجود نداشت. تیمارهایی که دارای هورمون NAA بودند، ریشه‌های مویین بیشتری

11. Gamborg B5

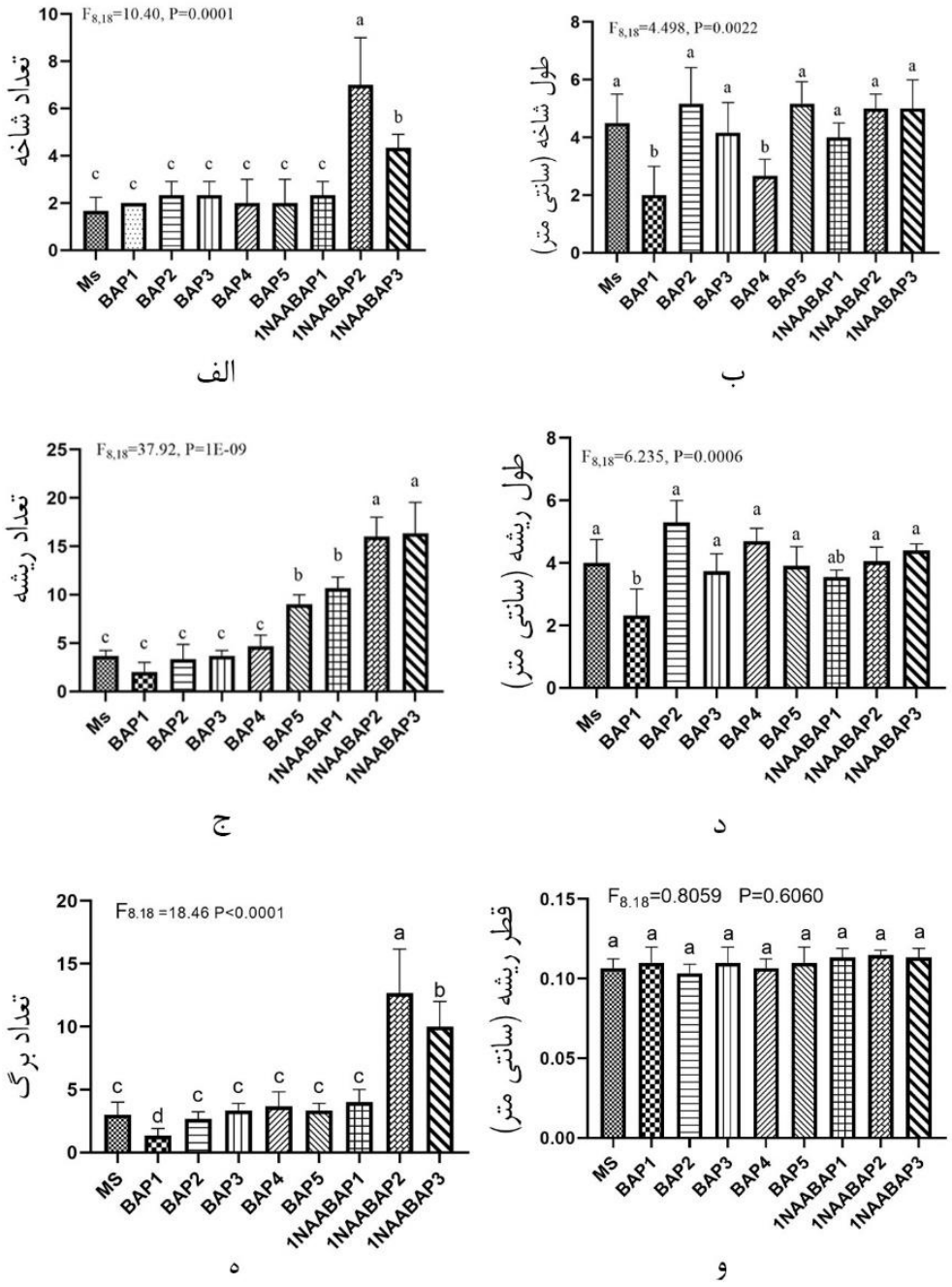
داشتند (شکل۴–و). برای مرحله ریشه‌زایی در پژوهش .Arimura et al (2000) از هورمون NAA استفاده کردند که استفاده از این هورمون در پژوهش حاضر نیز توانسته بود ریشه‌زایی مناسبی را از شاخه‌ها به همراه داشته باشد. در دیگر پژوهش انجام شده توسط Palai et al (2000). استفاده از IBA بهترین نتیجه را برای ریشه‌زایی داشت. از ریزنمونه‌های شاخه در پژوهش and Kambaska Santilata (2009) در محیط‌کشت MS ۱/۲ با ۲ میلی‌گرم بر لیتر NAA رشد ریشه‌ای خوبی گزارش شد. تعداد ریشه‌ها و طول آن‌ها در تیمارهای متوالی در محیط‌کشت مایع بهبود پیدا کرده بود. بیشترین تعداد ریشه‌زایی را Kavyashree (2009)در محیط کشت MS حاوی ۱۸/۵۶ میکرومولار Kin به میزان ۱۱ عدد گزارش کردند و کمترین تعدادریشه‌دهی نیز در محیط‌کشت MS حاوی ترکیب BAP و NAA به غلظت ۴۴/۴ و ۵/۳۶ میکرومولار به تعداد ۴ عدد بود در حالی‌که پژوهش حاضر نشان داد استفاده از این ترکیب هورمونی می‌تواند ریشه‌زایی را به میزان قابل ملاحظه‌ای در ریزنمونه جوانه بالا ببرد (شکل۴–ج).

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی ریزنمونه نوک شاخه: در این ارزیابی تعداد ریشه‌های ایجاد شده در تیمار شاهد و هورمون‌دار مورد سنجش قرار گرفت که بهترین تیمار استفاده از هورمون NAA به غلظت یک‌میلی‌گرم بر لیتر بود که ۷ عدد ریشه را ایجاد کرده‌بود (شکل۵–الف). طول ریشه‌های ایجاد شده در تیمار شاهد و تیمار های‌هورمونی مورد سنجش و اندازه گیری قرار گرفت (شکل۶). نتایج نشان داد هورمون IBA به غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر بیشترین طول ریشه را با میانگین ۵ سانتی‌متر ایجاد کرده بود (شکل۵–ب).



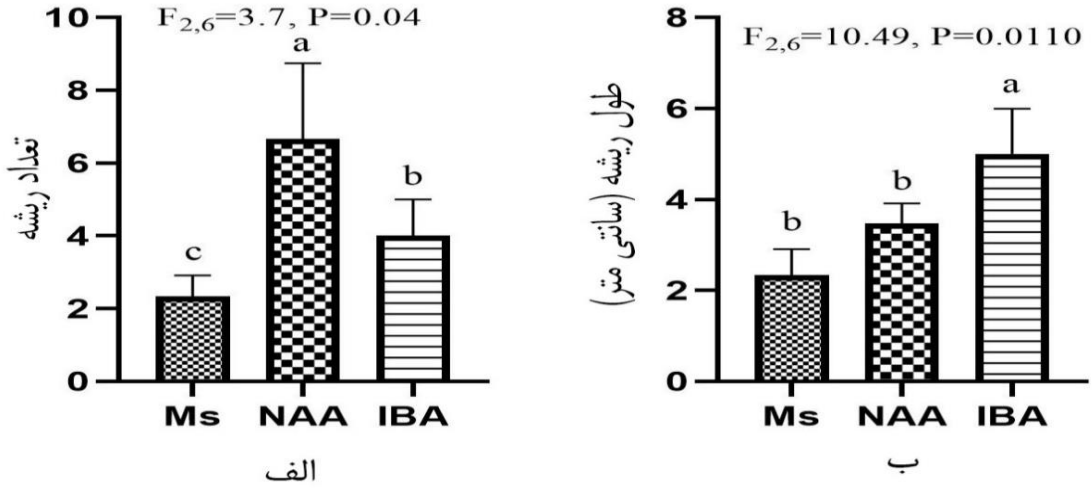
شکل۳. ریشه‌زایی و مراحل آغازین شاخه‌زایی جوانه‌ریزوم

Figure ۳/ Rooting and shootemergence of rhizome bud



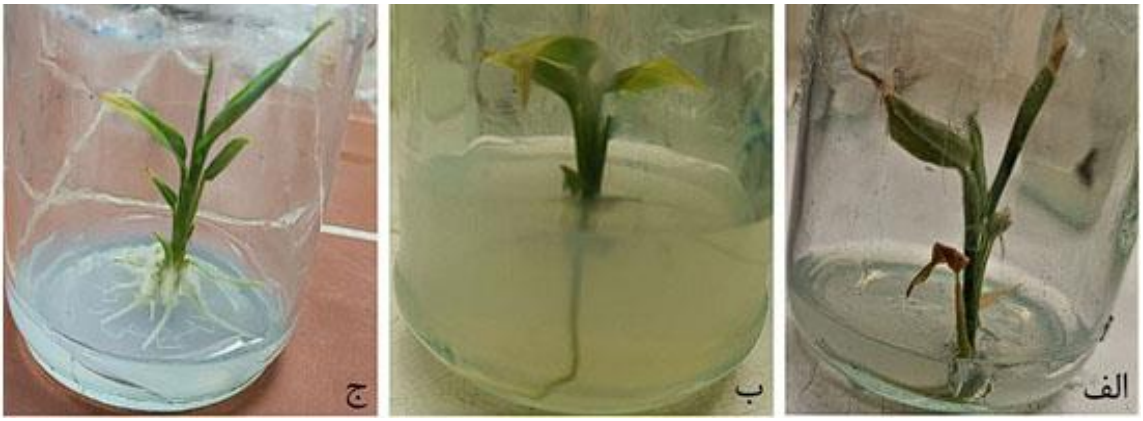
شکل٤. تاثیر ترکیبات هورمونی بر (الف) تعداد شاخه، (ب) طول شاخه، (ج) تعداد ریشه، (د) طول ریشه، (ه) تعداد برگ، (و) قطر ریشه. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت‌های آماری معنی‌دار و حروف‌مشترک بیانگر عدم معنی‌داری است (Tukeytest, $p \leq 0.05$). نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف‌معیار می‌باشد

Figure 4. The effect of hormonal compounds on the number of shoots (a), the length of shoots (b), the number of roots (c), the length of roots (d) the number of leaves (e), and root diameter (f). Different letters indicate the statistically significant differences (Tukey test, $p \leq 0.05$). Error bars represent the standard deviation of each mean



شکل۵. تاثیر یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون‌های IBA و NAA بر تعداد ریشه (الف) و طول ریشه (ب) در شاخه‌ها. نوارهای خطا نشان‌دهنده انحراف معیار می‌باشد (Tukeytest, $p \leq 0.05$)

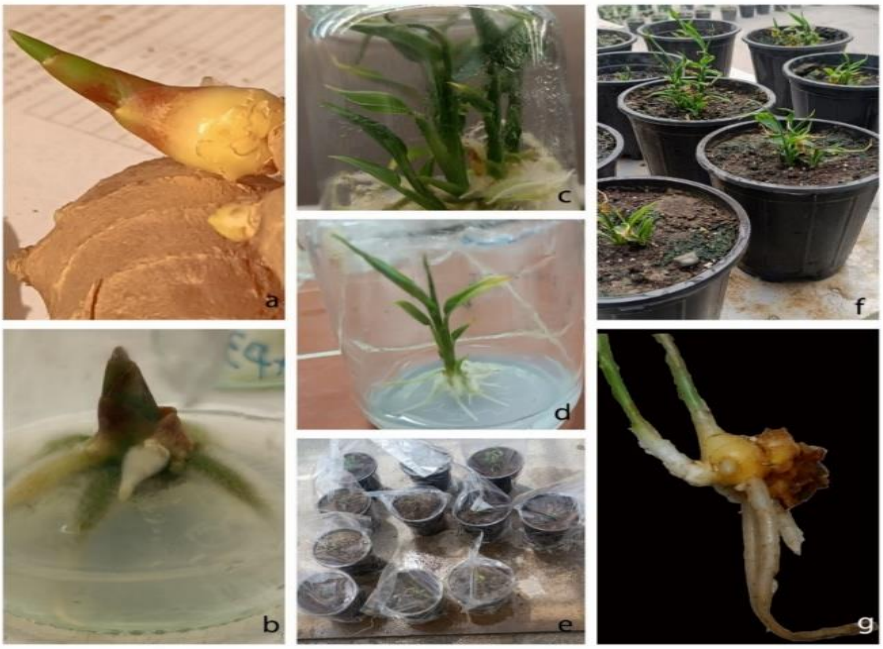
Figure 5. The effect of 1 mg/L of IBA and NAA on the number of roots (a) and the root length (b) in the shoots. Error bars represent the standard deviation of each mean (Tukeytest, $p \leq 0.05$)



شکل٦. تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر ریشه‌زایی از شاخه‌های زنجبیل. ریشه‌های تشکیل شده از ریزنمونه شاخه در محیط‌کشت MS فاقد هورمون (الف). محیط‌کشت MS حاوی IBA (ب)، محیط‌کشت MS حاوی NAA (ج)

Figure 6. The effect of growth regulators on rooting from ginger shoots. Roots of shoots in MS culture medium without hormone (a), MS culture medium containing 1 mg/L IBA, (b) and MS culture medium containing 1 mg/L NAA (c)

سازگاری: برای حفظ رطوبت و دمای‌منا سب در گلدان‌ها از نایلون در هر گلدان بمدت یک هفته ا ستفاده شد (شکل۷-e). سازگاری گیاهچه‌های کشت‌بافتی به محیط گلخانه و غیر استریل با زنده‌مانی و موفقیت (۹۰ درصد) انجام گرفت. هر هفته دو مرتبه گلدان‌ها آبیاری شده و یک‌مرتبه در هفته نیز به کمک کود سه بیست به صورت محلول‌پاشی تغذیه شدند (شکل۷-f).



شکل۷. تکثیر بوسیله ریشه‌دار نمودن شاخه‌ها: ریزوم سالم گیاه زنجبیل در مکان مناسب برای جوانه‌زنی قرار می‌گیرد (a). جوانه‌ریزوم پس از ضدعفونی در محیط مناسب جوانه‌زنی کشت می‌شود (b). شاخه‌زایی پس از ۸هفته (c). شاخه از جوانه‌ریزوم جدا و در محیط‌کشت مناسب برای ریشه‌زایی قرار می‌گیرد (d).گیاهچه‌ها پس از دو هفته از محیط‌کشت خارج شده و در گلدان حاوی کوکوپیت در اتاقک سازگاری قرار می‌گیرند با قراردادن نایلون بروی گلدان‌ها، رطوبت برای گیاه در گلخانه حفظ می‌شود (e). گیاهان زنجبیل پس از ۳هفته در گلخانه در خاک باغچه و کوکوپیت به نسبت ۱:۱ (f). زنجبیل تشکیل شده پس از ۳ ماه در انتهای‌گیاه همراه با ریشه گوشتی (g)

Figure 7. Propagation by rooting the shoots: the healthy rhizome of the ginger plant is placed in a suitable place for germination (a), The rhizome bud is cultivated after disinfection on a suitable environment for germination (b), shoot production after 8 weeks (c), The shoot is separated from the rhizome bud and placed in a suitable culture medium for rooting (d), After two weeks, plantlets transferred from the culture medium to pots containing cocopeat in an acclimatization chamber, humidity was kept by placing nylon on the pots greenhouse (e), Ginger plants after 3 weeks in the pots containing garden soil and cocopeat in a ratio of 1:1 (f), Rhizome was formed at the end of plantlets after 3 months (g)

نتیجه گیری: کشت بافت یکی از بهترین ابزارها برای کاهش هزینه‌ها و افزایش سرعت تکثیر گیاهان با ارزش می‌باشد. از میان ریزنمونه‌های مختلفی که مورد آزمایش قرار گرفت، ریزنمونه‌جوانه‌ریزوم (شکل۷-a) برای تکثیر مستقیم گیاه زنجبیل مناسب شناخته شد (شکل۷-b). بیشترین میزان شاخه‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP و یک‌میلی‌گرم بر لیتر NAA حاصل شد (شکل۷-c). نتایج بیانگر آن بود که افزودن هورمون NAA در کنار هورمون BAP می‌تواند شاخه‌زایی را به صورت قابل‌توجهی افزایش دهد. نتایج پژوهش نشان داد که می‌توان نوک‌شاخه‌های ایجاد شده در مرحله شاخه‌زایی را برش داده و پس از انتقال به محیط‌کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر از هورمون NAA به خوبی پس از ۷ روز ریشه‌دار کرد (شکل۷-d). شاخه‌های ریشه‌دار شده به کمک پوشش پلاستیکی به خوبی با محیط گلخانه سازگار شدند (شکل۷-e و شکل۷-f) و در نهایت محصول نهایی پس از سه ماه نگهداری در گلخانه حاصل شد (شکل۷-g).

سپاسگزاری: از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

بیگلری فراش راضیه، نیک فکر روح الله (۱۴۰۰) ریزازدیادی و تکثیر درون شیشه ای گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc). اولین همایش ملی پژوهش های جامعه محور در کشاورزی، منابع طبیعی و محیط زیست، همدان، ایران.

References

Abbas MS, Taha HS, Aly UI, et al. (2011) In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J Genet Eng Biotechnol 9(2), 165-172.

Alqadasi AS, Al-madhagi I, Al-kershy, et al. (2022) Effect of Cytokinin Type and pH Level on Regeneration of Ginger in vitro. J Hortic Sci 9(3), 265-274.

Arimura C, Finger F, Casali V (2000) Effect of ANA and BAP on ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) sprouting in solid and liquid medium. Rev Bras de Plantas Medicinais 2(2), 23-26.

Balachandran S, Bhat S, Chandel K (1990) In vitro clonal multiplication of turmeric (*Curcuma spp*.) and ginger (*Zingiber officinale Rosc*.). Plant Cell Rep 8, 521-524.

Babu K, Ravindran P, Peter K (1997) Protocols for micropropagation in spices and aromatic crops. (p. 35). (IISR).

Bhagyalakshmi B, Singh NS (1988) Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale Rosc*.) with a high yield of oleoresin. J Hortic Sci 63(2), 321-327.

Biglari Farash R, Nikfekr R (2021) Micropropagation and in vitro propagation of ginger plant (*Zingiber officinale* Rosc.). The first national conference of community-oriented

researches in agriculture, natural resources and environment, Hamedan, Iran (In Persian).

Cher CZ, Pavallekoodi G, Sreeramanan S (2016) Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale var. rubrum*) using buds from microshoots. Pak J Bot 48(3), 1153-1158.

Kavyashree R (2009) An efficient in vitro protocol for clonal multiplication of Ginger–var. Varada. Indian J Agric Sci 8, 328-331.

Kambaska K, Santilata S (2009) Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv-Suprava and Suruchi. J Agric 5(2), 271-280.

Li C, Li J, Jiang F, et al. (2021) Vasculoprotective effects of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and underlying molecular mechanisms. Food Funct 12(5), 1897-1913.

Malabadi RB (2002) In vitro propagation of spiral ginger [*Costus speciosus (Koen.) Sm*.]. Indian J Genet Plant Breed 62(03), 277-278.

Nair KP (2019) *Turmeric (Curcuma Longa L.)* and Ginger *(Zingiber Officinale Rosc.)*-World's Invaluable Medicinal Spices: The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger. Springer.

Nkere C, Mbanaso E (2010) Optimizing concentrations of growth regulators for in-vitro ginger propagation. J Agrobiol 27(2), 61.

Pandey YR, Sagwansupyakorn C, Sahavacharin O, et al. (1997) In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). Agric Nat Resour 31(1), 81-86.

Palai S, Rout G, Samantaray S, et al. (2000) Biochemical changes during in vitro organogenesis in *Zingiber officinale* Rosc. J Plant Biol 27(2), 153-160.

Ravindran P, Shiva K, Babu KN, et al. (2005) Ginger. Advances in Spices Research: History and Achievements of Spices Research in India Since Independence, Ravindran PN Babu KN Shiva and JA Kallupurackal (Eds.). J Agron Jodhpur India 367-368.

Sukarnih T, Rudiyana Y, Hanifah N, et al. (2021) Micropropagation of red ginger (*Zingiber officinale* Rosc. *Var. Rubrum*) using several types of cytokinins. J Phys Conf

Sharma T, Singh B (1997) High-frequency in vitro multiplication of disease-free *Zingiber officinale Rosc*. Plant Cell Rep 17(1), 68-72.

Zhou J, Guo F, Fu J, et al. (2020) In vitro polyploid induction using colchicine for *Zingiber officinale Roscoe* cv. '*Fengto*u'ginger. Plant Cell Tissue Organ Cult 142, 87-94.