Journal of Research in Horticultural Science | پژوهش در علوم باغبانی

Vol. 3, No.1 spring and summer 2024 (139-148) | جلد۳، شماره۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳ (ص۱۴۸-۱۳۹)

rhsj.2025.361098.1046/10.22092 | مقاله علمی پژوهشی | تارنمای مجله https://rhsj.areeo.ac.ir

بررسی کالوس‌زایی و ریزازدیادی زنجبیل(*Zingiber officinale* Rosc.) با استفاده از ریزوم

راضیه بیگلری فراش[1*]، محمدرضا صالحی سلمی[2]

۱ - کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۱۷

چکیده

زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosc) از مهم‌ترین گیاهان ادویه‌ای در جهان است که دارای ریزوم تند و معطری است. علاوه بر این ریزوم زنجبیل در صنعت دارویی نیز ارزشمند است و کاربرد فراوانی دارد. تکثیر این گیاه به‌طور معمول از طریق ریزوم بوده که معمولاً توسعه سطح زیر کشت آن با این روش بسیار کند بوده و با مشکلاتی همراه است. تقاضا و ارزش اقتصادی بالای زنجبیل، لزوم بکارگیری یک روش مناسب جهت تولید انبوه و عاری از بیماری این گیاه مانند تکنیک ریزازدیادی را ضروری می‌نماید. در مطالعه حاضر جهت بهینه‌سازی محیط کشت زنجبیل، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل نفتالین‌استیک‌اسید (NAA) و بنزیل‌آدنین (BA)، جهت کالوس‌زایی، جوانه‌زایی، ریشه‌زایی و سازگاری با استفاده از ریزنمونه‌های ریزوم مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان تشکیل کالوس از کشت ریزنمونه جوانه در تیمار تنظیم کننده رشد NAA با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر همراه با ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد. پرآوری بهینه شاخه از محیط موراشیگگ و اسکوگ (MS) حاوی ۰/۰۴ میلی گرم بر لیتر از هر دو تنظیم‌کننده‌ی‌رشد NAA و BA بدست آمد. بیشترین ریشه‌زایی در غلظت ۱ میکرومولار ایندول-۳-بوتیریک اسید (IBA) به دست آمد. در حدود ۷۵ درصد گیاهچه‌ها با محیط گلخانه سازگار شدند.

واژگان کلیدی: زنجبیل-تکثیر درون شیشه‌ای-تیمار تنظیم کننده رشد

Investigation on callus formation and micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) via rhizome

Razieh Bigleri Farash[1*], Mohamadreza Salehi Salmi[2]

1-M.Sc. , Department of Horticultural Science, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2-Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan

Received :January 2023 Accepted:October 2023

Abstract

Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) is considered as one of the most important spices in the world, which produces spicy and fragrant rhizomes. Ginger is papular all over the globe not only as a spice but also as an herbal medicine. Propagating this plant through rhizomes is time consuming and is associated with some problems. Due to high demand, economical and medicinal values of ginger, it seems necessary to provide a suitable protocol for mass production of ginger through tissue culture technique. Therefore, the present study investigated different hormonal compounds on rhizome buds for callus formation, induction of bud growth, rooting and adaptation for optimizing culture medium in Ginger. Four Benzyl Adenine (BA) concentrations (0, 0.04, 0.08, 0.16 mg / l) and three Naphthalene Acetic Acid (NAA) concentrations (0.02, 0.04 mg / l) were applied alone and in combination. The highest callus formation rate was obtained from bud samples treated with 0.04, 0.08 and 0.16 mg / l NAA in combination with 0.04 mg / l of BA hormone. Optimal branch propagation was obtained from MS medium containing 0.04 mg / l of both NAA and BA hormones. The maximum rooting (85%) was obtained in 1 μM (IBA indole-3-butyric acid).

Keywords: Auxin, *In vitro*, Medicinal plant, Proliferation

*نویسنده مسئول: Razibiglari65@gmail.com

۱- مقدمه

گیاه زنجبیل (*Zingiber officinale* Rosco) متعلق به خانواده Zingiberaceae، از مهمترین گیاهان ادویه‌ای در جهان است. ریزوم تند و معطر زنجبیل در سراسر جهان نه تنها به عنوان ادویه بلکه به عنوان داروی گیاهی نیز ارزشمند است و برای درمان سرطان (Zhang *et al*, 2021)، بیماری‌های قلبی عروقی (Ghafoor *et al*., 2020)، دیابت (Said *et al*., 2020)، سرماخوردگی، تهوع، آسم و سرفه (Choi *et al*., 2018) استفاده می‌گردد. در همه‌گیری جهانی COVID-19، تمایل به مصرف زنجبیل به‌واسطه اثرات ضد ویروسی و ضد التهابی آن در کاهش علائم شدید COVID-19 بیشتر شده (Rangnekar *et al*., 2021). پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها در برگ، ساقه و ریزوم زنجبیل عامل مهمی برای اثرات دارویی آن محسوب می‌شود (Ghasemzadeh *et al*, 2010).

زنجبیل گونه‌ای نابارور محسوب شده و به سختی بذر تولید می‌کند. علاوه بر این به دلیل اینکه ریزوم، بخش اقتصادی و مورد برداشت است در تکثیر رویشی با محدودیت ماده گیاهی مواجه است (Nair, 2019). از سوی دیگر بسیاری از عوامل بیماری‌زا مانند عامل پژمردگی باکتریایی (*Pseudomonas solanacearum*)، پوسیدگی نرم (*Pythium aphanidermatum*) و نماتدها (*Meloidogyne* spp.) که باعث کاهش عملکرد می‌شوند، به وسیله ریزوم آلوده منتقل می‌شوند (Kasilingam *et al.,* 2018). بنابراین، تکثیر درون شیشه‌ای جایگزین مناسبی برای غلبه بر این محدودیت‌ها است. گزارش‌های زیادی در مورد تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان دارویی ریزوم‌دار مانند هل (Parvin et al, 1999) و خولنجان (Amin *et al*., 2001) وجود دارد. ریزازدیادی زنجبیل نیز توسط تعداد کمی از محققان گزارش شده است (Bhojawani and Razdan, 1983; Malamug and Asahira, 1991; Razdan, 1993). تاکنون پژوهش زیادی در مورد ریزازدیادی درون شیشه‌ای زنجبیل در ایران گزارش نشده است.

با توجه به تقاضای بالا و ارزش اقتصادی و دارویی گیاه زنجبیل در ایران، تولید انبوه گیاهان عاری از بیماری از طریق کشت بافت ضروری است. بنابراین در مطالعه حاضر تلاش شد تا پروتکلی جهت افزایش انبوه گیاه زنجبیل در شرایط آزمایشگاهی از طریق ریزنمونه‌های ریزومی تهیه شود.

۲- مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: به منظور ریزازدیادی گیاه زنجبیل در آذر ماه سال ۱۳۹۹، ریزوم‌های تازه‌ی وارداتی از کشور چین که دارای جوانه‌های متورم بودند، از مرکز توزیع آن از بازار ساری خریداری شد.

محیط کشت پایه: در تمامی مراحل آزمایش از محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) همراه با آگار (۰/۸٪) و ساکارز (۱/۵٪) استفاده شد. همچنین از ذغال فعال (۰/۰۲٪) جهت جذب ترکیبات فنلی در محیط کشت استفاده شد. با کمک هیدروکسید پتاسیم (KOH) یا اسید کلریدریک (HCl) یک نرمال تنظیم pH محیط کشت در محدوده‌ی ۵/۷ –۵/۸ انجام شد.

گندزدایی محیط کشت و وسایل: به منظور گندزدایی محیط کشت و وسایل مورد نیاز از اتوکلاو تحت فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد.

گندزدایی ریزنمونه: جوانه های ریزوم به طول ۱ تا ۲ سانتی‌متر به عنوان ریزنمونه‌های اولیه انتخاب شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب روان قرار گرفتند. جوانه‌ها پیش از انتقال به زیر دستگاه هود لامینار ایر

فلو، به مدت ۶۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شدند. سپس ریزنمونه‌ها در کلریدجیوه (HgCl2) ۰/۱ درصد به‌مدت ۵ دقیقه گندزدایی شده و ۳ تا ۴ مرتبه با آب مقطر کاملاً شسته و با کاغذ بلات استریل در زیر جریان دستگاه هود لامینار ایر فلو خشک شدند.

کالوس‌زایی و شاخه‌زایی: ریزنمونه‌های تهیه شده در محیط کشت MS حاوی دو تنظیم کننده رشد بنزیل‌آدنین (BA) در چهار غلظت (۰، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر) و نفتالین‌استیک اسید (NAA) در سه غلظت (۰، ۰/۰۲ و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر) به تنهایی و در برهمکنش با هم بود. تنظیم‌کننده‌های رشد با فیلتر سر سرنگی به محیط کشت افزوده شد. داده‌برداری پس از ۶ هفته از زمان کشت ثبت شد. در این مرحله ۶ تکرار (هر تکرار حاوی ۳ ریزنمونه) در نظر گرفته شد.

ریشه‌زایی: ساقه‌های بدست آمده در مرحله شاخه‌زایی به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر به محیط کشت MS نیم‌غلظت حاوی ایندول‌بوتریک‌اسید (IBA) با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میکرومولار منتقل شدند. در این مرحله ۴ تکرار (هر تکرار حاوی ۲ ساقه) در نظر گرفته شد.

شرایط رشد محیطی: نمونه‌ها زیر نور فلورسنت سفید با شدت ۳۰۰۰ لوکس در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و با دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

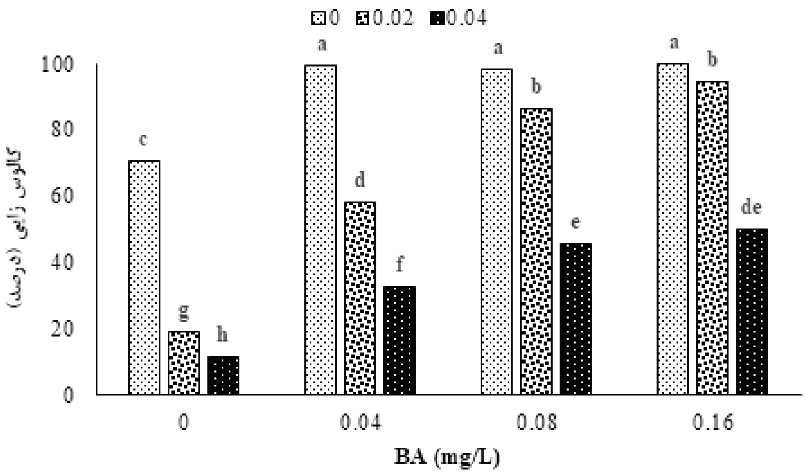
سازگاری: گیاهچه‌های ریشه‌دار شده از ظروف کشت خارج و به منظور حذف آگار و محیط کشت، ریشه‌ها زیر آب روان شسته شدند. سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های پلاستیکی کوچک با قطر ۸ سانتی‌متر حاوی خاک باغچه و کمپوست (۱:۱) استریل شده کشت شدند و گلدان‌ها در داخل محفظه پلاستیکی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد نگهداری شدند. پس از چهار هفته به گلخانه منتقل شدند.

واکاوی داده‌ها: آزمایشات در سه مرحله (کالوس زایی، شاخه زایی و ریشه زایی) و هرکدام به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. سپس داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت رسم نمودار از نرم افزار اکسل، ۲۰۱۶ استفاده گردید.

۳- نتایج

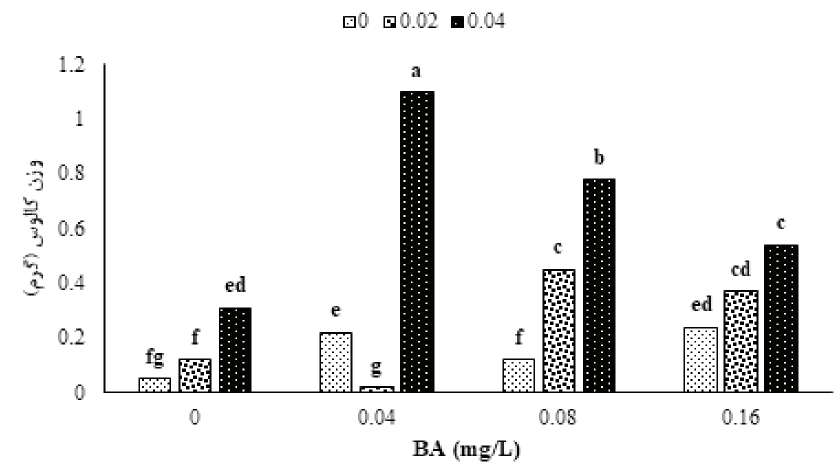
کالوس‌زایی: نتایج مقایسه میانگین شاخص درصد القای کالوس تحت تأثیر تنظیم کننده‌های رشد در گیاه زنجبیل نشان داد که NAA با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر همراه با ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر BA سبب بیشترین (۱۰۰٪) کالوس‌زایی گردید، با این وجود با تیمارهای NAA با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر همراه با ۰/۰۸ و یا ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر BA اختلاف معنی‌داری نشان نداد. همچنین کمترین میزان (۱۱/۳ ٪) القای کالوس در تیمار بدون تنظیم کننده رشد مشاهده شد که با تیمار ۰/۰۴ میلی‌گرم BA و بدون NAA اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱).

مقایسه میانگین وزن‌تر کالوس (شکل۲) تحت تأثیر NAA و BA نشان داد که ترکیب دو تنظیم‌کننده‌رشد هر کدام به میزان ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۱/۱ گرم برای هر ریزنمونه، دارای حداکثر وزن تر کالوس بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. کمترین میزان (۰/۰۲ گرم در هر ریزنمونه) این شاخص درترکیب تیمار NAA با غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر و BA با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد.



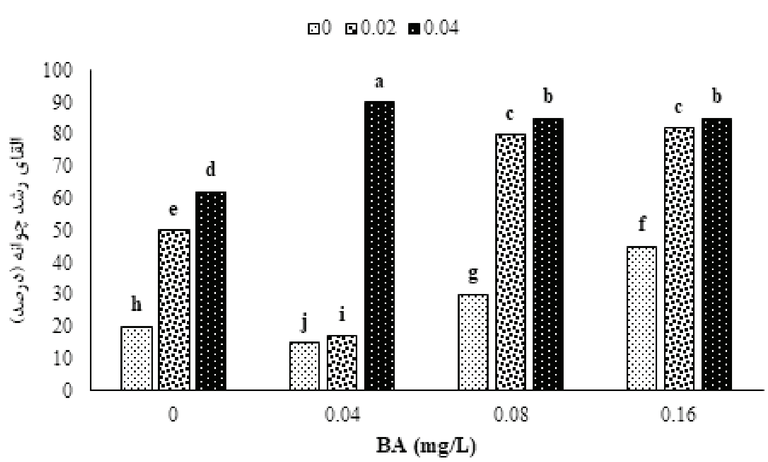
شکل ۱- برهمکنش NAA و BA بر درصد کالوس‌زایی زنجبیل در محیط کشت MS

ستون‌های با حروف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.



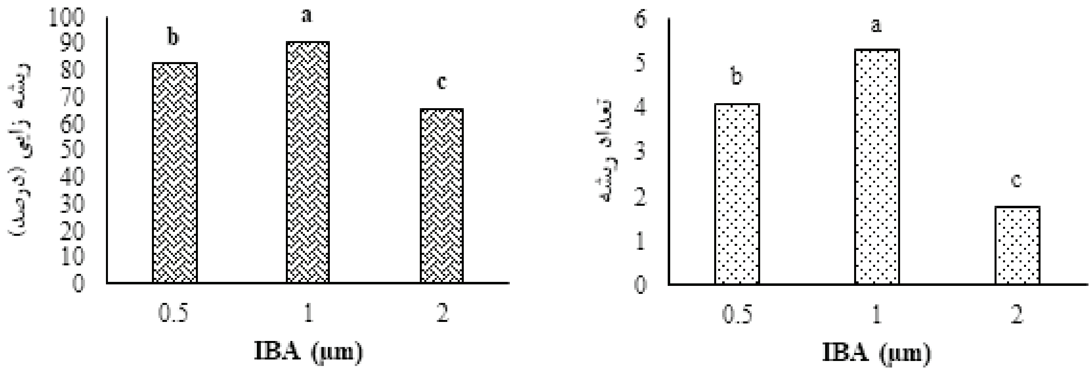
شکل۲- برهمکنش NAA و BA بر میزان کالوس (گرم) زنجبیل در محیط کشت MS

ستون‌های با حروف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۳- برهمکنش NAA و BA بر القای جوانه (درصد) زنجبیل در محیط کشت MS

ستون‌های با حروف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ٤- مقایسه میانگین درصد ریشه‌زایی (چپ) و تعداد ریشه (راست) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف IBA

در هر نمودار ستون‌های با حروف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.

شاخه‌زایی: مقایسه میانگین القای رشدجوانه تحت تأثیر NAA و BA نشان داد که ترکیب دو تنظیم‌کننده‌رشد هر کدام به میزان ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر سبب القای بیشترین (۸۵ ٪) نوساقه شد که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین کمترین (۱۵ ٪) میزان شاخه‌زایی در تیمار BA با غلظت ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر بدون حضور NAA مشاهده شد (شکل ۳).

ریشه‌زایی: ریزنمونه‌های شاخه‌ها در محیط کشت MS با سطوح مختلف ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌دار شدند. از بین سه غلظت مورد استفاده، غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر بیشترین ریشه‌زایی را نشان داد (شکل ۴). درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌های تولید شده در این تیمار به ترتیب ۹۱ ٪ و ۵/۳ عدد بود. غلظت بالاتر IBA از ۱ میکرومولار میزان پایین القای ریشه را نشان داد.

٤- بحث

استقرار اولیه‌ی کشت‌ها در شرایط آزمایشگاهی نیاز به گندزدایی سطحی ریزنمونه‌ها دارد. از بین چندین ماده شیمیایی، کلریدجیوه به‌عنوان ماده ضدعفونی کننده سطحی موثر شناخته می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد حدود ۹۰ ٪ کشت‌های بدون آلودگی از ریزنمونه‌هایی به‌دست آمد که به مدت ۵ دقیقه با کلریدجیوه ۰/۱ ٪ گندزدایی شدند. این ریزنمونه‌ها سبز باقی مانده و رشد و تکثیر شاخه از جوانه ریزوم را نشان دادند. با این حال، اثر بازدارندگی رشدی توسط این ماده نیز بیشتر از سایر مواد ضدعفونی کننده‌ای است که معمولاً در کشت بافت گیاهی استفاده می‌شود (Roy and Datta, 1988). ازآنجا که سطح ریزوم زنجبیل ناهموار و پوشیده از بقایای برگی است، بنابراین استفاده از یک ماده ضدعفونی کننده قوی مانند کلریدجیوه ضروری است. گزارش‌های متعددی در مورد استفاده از کلریدجیوه جهت گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های گیاهی وجود دارد که با مطالعه حاضر همسویی دارد (Kirtikar and Basu, 1996).

در این پژوهش اثر BA و NAA بر کالوس‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های ریزوم کشت شده در محیط MS مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل شاخه‌های متعدد در اکثر تیمارها طی سه هفته پس از کشت مشاهده شد. از ۱۲ تیمار اعمال شده بهترین نتیجه در تیمار حاوی ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۴ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد و تقریباً ۹۰٪ از ریزنمونه‌ها، شاخساره تولید کردند. این نتایج با یافته‌های پژوهش ایندن و همکاران (Inden *et al.*, 1998) مطابقت دارد که بیان کردند بیشترین پرآوری شاخساره زنجبیل در محیط MS در ترکیب با BA و NAA به‌دست آمد. همچنین

این تیمار سبب تولید بیشترین شاخه (۴/۵ شاخه از هر ریزنمونه) با طول متوسط ۶/۲ سانتی‌متر شد. نتایج به‌دست آمده با گزارش‌های بالاچاندران و همکاران (Balachandran *et al*., 1990)، هوگو و همکاران (Hoque *et al*., 1999) همسویی داشت. برای تشکیل کالوس نسبت بهینه از دو تنظیم کننده رشد اکسین و سیتوکینین ضروری است. در ریزنمونه‌های مورد بررسی، کالوس‌هایی با رنگ‌ها و بافت‌های مختلف تشکیل شد، همچنین شروع کالوس‌زایی و رشد بعدی آن از سرعت بالایی برخوردار بود. از آنجا که کیفیت کالوس به نوع و میزان عناصر موجود در محیط کشت وابسته است، تنظیم کننده‌های مختلف رشد می‌توانند روی این ویژگی اثر گذار باشند.

ریشه‌زایی درون شیشه‌ای نیز توسط عوامل مختلفی مانند تنظیم کننده‌های رشد، ترکیب نمک‌های پایه، ژنوتیپ و شرایط کشت کنترل می‌شود. در بیشتر گونه‌ها وجود اکسین برای ریشه‌زایی لازم است. همچنین نسبت اکسین به سیتوکینین برای القا و رشد اولیه ریشه فاکتور مهمی محسوب می‌شود و با افزایش اکسین و کاهش سیتوکینین، ریشه‌ها تشکیل می‌شوند (Tripathi and Tripathi. 2003). تنظیم‌کننده‌ی‌رشد IBA به‌عنوان مناسب‌ترین اکسین جهت ریشه‌زایی در گیاهان همیشه بهار (طاهری و همکاران، ۱۳۹۹) و نخود شیرین (بذرافکن و همکاران، ۱۳۹۸) گزارش شده است. غلظت ۱ میکرومولار IBA سبب ۹۱ ٪ ریشه‌زایی شد که با یافته‌های گزارش شده در سایر گونه‌های گیاهان ریزوم‌دار مطابقت داشت (Kackar *et al*, 1993).

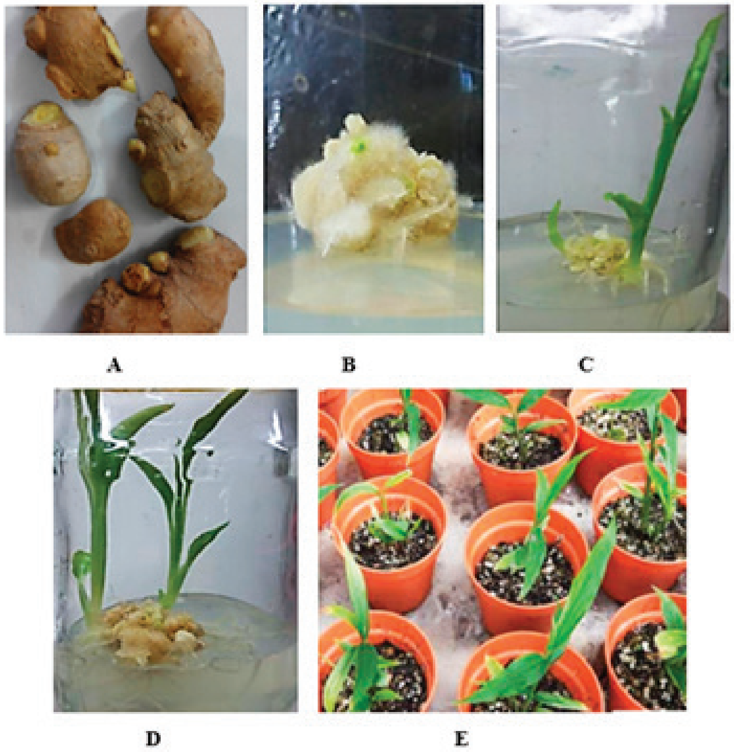
در حدود ۷۵ ٪ از گیاهچه‌های باززایی شده در شرایط آزمایشگاهی که به بستر خاک باغچه و کمپوست منتقل شدند توانستند شوک ناشی از تغییرات را تحمل کنند و در محیط آزمایشگاه زنده بمانند و سرانجام در مزرعه کشت شدند (شکل ۵).

۵- نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر نفتالین‌استیک‌اسید و بنزیل‌آدنین در باززایی گیاه زنجبیل بررسی شد و بهترین ترکیب تنظیم-کننده‌های رشدی معرفی شد. همچنین با بهینه‌سازی تولید کالوس از ریزنمونه‌های زنجبیل، می‌توان از آن در برنامه‌هایی مانند انتقال ژن، کشت پروتوپلاست و تولید متابولیت ثانویه درون شیشه‌ای استفاده کرد. از این رو استفاده از تکنیک‌های مختلف کشت بافت در جهت تکثیر می‌تواند گامی مؤثر برای تولید گیاهان عاری از بیماری و حفاظت از ژرم پلاسم زنجبیل باشد.

٦- پیشنهادات

علی‌رغم سودمندی بسیار گیاهان کشت بافتی، از مهمترین معضلات در کشت بافت گیاه زنجبیل دو ساله شدن پروسه کشت و کار گیاهان کشت بافتی است، به‌صورتی‌که در مطالعات میدانی دیده شده است که گیاهان کشت بافتی زنجبیل در سال اول بعد از کاشت، ریزوم بسیار کوچکی تولید می‌کنند و این ریزوم‌ها در سال آینده بایستی مجدداً کشت شوند و در نهایت پس از دو سال کشت محصول به‌دست خواهد آمد. این در حالی است که در کاشت ریزوم‌های غیرکشت بافتی با چنین مشکلی مواجه نیستیم. یقیناً دو ساله شدن کشت گیاهان زنجبیل، کشاورزان را متحمل هزینه‌های بیشتر و توجیه پذیری کمتر استفاده از گیاهان کشت بافتی زنجبیل خواهد کرد. لذا جهت کاربردی شدن مطالعات آینده و بهبود صنعت باغبانی کشور، پیشنهاد می‌شود کلیه گیاهان سازگار شده از تیمارهای مورد مطالعه (چه تیمارهای مطالعه حاضر و چه سایر تیمارهای مورد استفاده در مطالعات آینده) به مزرعه منتقل شوند و در دو سال آینده مورد کشت و بررسی قرار گیرند و بهترین تیمارها در تناسب با عملکرد ریزوم گیاهان جهت کشت بافت زنجبیل انتخاب و معرفی گردد.



شکل ۵- مراحل بهینه‌سازی کالوس‌زایی و ریز ازدیادی در زنجبیل
تهیه ریزوم دارای جوانه (A)، کالوس زایی (B)، شاخه‌زایی (C)، ریشه‌زایی (D) و سازگاری (F).

تضاد و تعارض منافع- نویسندگان هر گونه تعارض و تضاد منافع اعم از تجاری و غیر تجاری و شخصی را که در ارتباط مستقیم یا غیرمستقیم با اثر منتشرشده است رد می‌نمایند.

منابع

بذرافکن، م.، دانشور، م.ح. و م.ر. صالحی سلمی. (۱۳۹۸). اثر نوع ریزنمونه، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشدگیاهی بر کالوس‌زایی و باززایی غیرمستقیم نخودشیرین (*Lathyrus odoratus* L.). نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۷، ۹۸-۱۰۷.

طاهری، ص.، دانشور، م.ح. و م.ر. صالحی سلمی. (۱۳۹۹). اثر تحریکی تیدیازورون (TDZ) و پوترسین (PUT) و نوع ریزنمونه بر اندام‌زایی غیرمستقیم گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.). نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۸، ۳۱۲-۳۲۴.

Amin, M.N., Islam M.A., & Azad, M.A.K. (2001). Micropropagation and conservation of a threatened aromatic medicinal plant- *Alphinia calcarata* Rosc. Proceedings of the 4th International Plant Tissue Culture Conference, Nov. 1-3, Dhaka, 55-57.

Balachandran, S.M., Bhat, S.R., & Chandel, K.P.S. (1990). *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rose.). *Plant Cell Report*, 8, 521-524.

Bennett, I.J., & Comb, M. (1982). Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. *Australian Forestry*, 12, 121-127.

Bhojawani, S.S., & Razdan, M.K. (1983). Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publication, Amsterdam, The Netherlands. 510 p.

Ghafoor, B., Ali, M.N., & Riaz, Z. (2020). Synthesis and appraisal of natural drug-polymer-based matrices relevant to the application of drug-eluting coronary stent coatings. *Cardiology Research and Practice*, 17, 1-11.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecules, 15, 4324-4333.

Haque, M.I., Perveen, S., & Sarker, R.H. (1999). In vitro propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Tissue Culture*, 9, 44-51.

Inden, H., Hirano, A., & Asahira, T. (1998). Micropropagation of ginger. Acta Horticulture, 230, 177-184.

Inden, H., Asahira, T., & Hirano, A. (1988). Micropropagation of ginger. Acta Horticulture, 230, 177-184.

Kackar, A., Bhat, S.R., Chandel, K.P.S., & Malik, S.K. (1993). Plant regeneration via somaic embryogenesis in ginger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 32, 289-292.

Kasilingam, T., Raman, G., Sundramoorthy, N.D., Supramaniam, G., Mohtar, S.H., & Avin, F.A. (2018). A review on in vitro regeneration of ginger: Tips and highlights. *European Journal of Medicinal Plants*, 23, 1-8.

Kirtikar, K.R., & Basu, B.D. (1996). *Curcuma* L. pp: 2417-2426, In: E. Blatter, J.P. Caius and K.S. Mhaskar (eds.). Indian medicinal plants, Lalit Mohan Basu, Allahabad, India.

Malamug, J.J.F., Inden, H., & Asahira, T. (1991). Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. *Scientia Horticulture*, 48, 89-97.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*, 15, 473-497.

Nair, K.P. (2019). Turmeric (*Curcuma longa* L.) and Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)-World's invaluable medicinal spices: The agronomy and economy of Turmeric and Ginger; Springer Nature, Basel, Switzerland, 216 p.

Parvin, S., Hossain, M., Bari, M.A. Huda, S., & Islam, M.S. (1999). *In vitro* plant regeneration in cardamom (*Elettaria cardimomum* M.). Proceedings of the 3rd International Plant Tissue Culture Conference, Mar. 8-10, Dhaka, 47-47.

Razdan, M.K. (1993). An introduction to plant tissue culture. Oxford and IBH Publ. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, 398 p.

Rangnekar, H., Patankar, S., Suryawanshi, K., & Soni, P. (2020). Safety and efficacy of herbal extracts to restore respiratory health and improve innate immunity in COVID-19 positive patients with mild to moderate severity: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials Journal*, 21, 943.

Roy, S.K., Rahman, L., & Datta, P.C. (1988). *In vitro* propagation of *Mitragyna parvifolia* Korth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 12, 75-80.

Said, H., Abdelaziz, H., Abd Elhaliem, N., & Elsherif, S. (2020). A comparative study between ginger and *Echinacea* possible effect on themalbino rat spleen of experimentally induced diabetes. Egyptian *Journal of Histology*, 43, 763-776.

Choi, J.G., Kim, S.Y., Jeong, M., & Oh, M.S. (2018). Pharmacotherapeutic potential of ginger and its compounds in age-related neurological disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 182, 56-69.

Tripathi, L., & Tripathi. J.N. (2003). Role of biotechnologe in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 243-253.

Zhang, M.M., Wang, D., Lu, F., Zhao, R., Ye, X., He, L., Ai, L., & Wu, C.J. (2021). Identification of the active substances and mechanisms of ginger for the treatment of colon cancer based on network pharmacology and molecular docking. *Biodata Mining*, 14, 1-16.