



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.825:581.143.6

© 2019

КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ ІМБИРУ В УМОВАХ IN VITRO

М.В. Роїк¹, Н.С. Бех², М.О. Коцар³

¹доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

вул. Клінічна, 25, м. Київ, 03141, Україна

e-mail: sugarbeet@ukr.net

Надійшла 29.03.2019

Мета. Розробити метод клонального мікророзмноження імбиру для отримання якісного садивного матеріалу. **Методи.** Лабораторний, біотехнологічний, статистичний. **Результати.** Проростання бруньок на кореневищах в умовах термостата за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$ та вологості 90% спостерігали через 4 тижні культивування, вихід бруньок становив 161,8%. Застосування 0,1%-го розчину сулеми з експозицією 45–50 хв дало можливість отримати 50,0–63,9% асептичних бруньок імбиру в різних біотипів. Висота первинних пагонів через місяць культивування становила в середньому 2,2 см, кількість коренів — 4,5 шт. на 1 бруньку довжиною 1,9 см. Додавання БАП у живильне середовище збільшує пагоноутворення до 7,7 шт./пагін за 1 пасаж. Утворення коренів спостерігали на 10–14-ту добу культивування в усіх досліджуваних біотипів незалежно від наявності ауксинів у живильному середовищі. За умов вирощування мікророслин імбиру з *in vitro* на Веселоподільській ДСС та Ялтушківській ДСС приживлюваність розсади становила 72–98%. **Висновки.** Стимулювання брунькоутворення на кореневищах імбиру в термостаті за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$ та вологості 90% забезпечує вихід бруньок 161,8%. Для отримання 50,0–63,9% асептичної культури імбиру *in vitro* доцільно використовувати 0,1% розчин сулеми з експозицією 45–50 хв, що забезпечує 61,4–81,9% життєздатних бруньок. Використання БАП (3,0 мг/л) дає високий коефіцієнт розмноження імбиру — до 7,7 шт./пагін за 1 пасаж. Культуральні пагони імбиру *in vitro* не потребують додавання ауксинів у живильне середовище для стимулювання ризогенезу. Культуральна розсада імбиру з *in vitro* має високий рівень приживлюваності в умовах відкритого ґрунту — 72–98%, що дає змогу використовувати метод клонування *in vitro* для отримання якісного садивного матеріалу. Розроблений метод клонального мікророзмноження імбиру дає можливість отримати з 1-го введеного в умови *in vitro* експланта до 1000 укорінених рослин.

Ключові слова: імбир, бруньки, пагони, *in vitro*.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201906-06>

Імбир є однією з лікарських рослин, яка має попит у багатьох країнах світу і налічує близько 150-ти видів [1]. Імбир застосовують в усьому світі у виробництві екстракту олеозинів та ефірних масел, а також у кулінарних цілях. Імбир відомий як народний лікарський протизапальний препарат в єгипетських, індійських і китайських культурах, скажімо, для лікування інфекції *Echinococcus granulosus* [2, 3]. Основні країни вирощування імбиру Індія, Китай, Ямайка, Тайвань. Використання методів біотехнології може пришвидшити селекційний процес різних культур [4]. Також варто наголосити, що попит на чистий садивний матеріал імбиру важко задовольнити, застосовуючи звичайні (традиційні) методи розмноження, через неефективність виробництва та перенесення інфекції [5]. Оскільки садивного матеріалу має бути багато, приблизно 2,5 т/га, або 1000 кг/акр, розмноження імбиру здійснюють вегетативно — поділом кореневищ. Проте цей метод є трудомістким. У багатьох країнах немає можливості зберігати імбир упродовж тривалого періоду часу, тому його використовують для переробки та експорту [6]. Застосування методу клонального мікророзмноження є необхідним для створення великої кількості садивного матеріалу імбиру [7]. Дослідники з Індії застосовують БАП та НОК у різних концентраціях для стимулювання органогенезу та ризогенезу в імбиру [8]. Останні дослідження імбиру *in vitro* показали, що середня кількість пагонів за допомогою методу прямого органогенезу становить 6,6 пагона проти методу непрямого соматичного ембріогенезу — 3,8 пагона. Це дає змогу ефективно створювати садивний матеріал [9, 10]. Пришвидшення розмноження *Zingiber offic.* за допомогою методу культури тканин досягається за використання регуляторів росту, проте їх концентрацію потрібно добирати експериментальним способом.

Мета досліджень — розробити метод клонального мікророзмноження імбиру для отримання якісного садивного матеріалу.

Методи досліджень. Вихідним матеріалом для дослідження було використано кореневища, бруньки і пагони імбиру. Для стимулювання брунькоутворення на кореневищах імбиру

використовували умови термостату за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$ та вологості 90%.

Культивування сегментів кореневищ проводили в пластикових кюветах упродовж 1–2 міс.

Отримані бруньки розміром 0,5–2,0 см зрізали скальпелем із частиною кореневища до 0,5 см та промивали в розчині мила господарського 72% (30 хв). Для звільнення від мильної плівки бруньки промивали дистильованою водою 3–4 рази. Підготовлені бруньки занурювали в колби з розчином етанолу ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) масовою часткою 76% на 5 хв. Для отримання асептичної культури імбиру *in vitro* використовували розчин сулеми 0,1% за різних експозицій дії з подальшим 3-разовим промиванням dH_2O з інтервалом 15–20 хв [13].

Частину зрізаного кореневища відсікали й асептичну бруньку імбиру висаджували на живильне середовище Мурасіге і Скуга (МС) без гормонів.

Для стимулювання пагоноутворення звільнені від інфекції життєздатні бруньки висаджували на модифіковане живильне середовище МС різного складу: МС I — МС без гормонів; МС II — МС + 1,0 мг/л 6-бензіламінопурин (БАП) + 30 г/л цукрози; МС III — МС + 3,0 мг/л БАП + 30 г/л цукрози.

Ця культура не потребує стимулювання ризогенезу екзогенними ауксинами й утворює потужну кореневу систему за рахунок ендогенних ауксинів.

Обліки проводили впродовж 6-ти пасажів (1 пасаж — 8–10 тижнів культивування).

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення Excel.

Результати досліджень. За умов культивування сегментів кореневищ імбиру (181 шт.) у термостаті з температурою $28 \pm 2^\circ\text{C}$ і вологістю 90% отримали 293 бруньки розміром у середньому за висотою 2 см та діаметром 1,4 см. Для введення в умови *in vitro* оптимальний розмір бруньок імбиру не має перевищувати 3 см у довжину для зручності проведення етапів звільнення від інфекції.

Як показали дослідження, найефективнішим стерилізувальним засобом для бруньок імбиру є 0,1%-й розчин сулеми з експозицією 45–50 хв, що забезпечив 61,4–81,9% життєздатних бруньок із показниками стерильності 50,0–63,9% у різних біотипів.



а



б

Рис. 1. Звільнена від інфекції культура (а) та органогенез (б) імбиру

Через місяць культивування 54,9% введених бруньок утворили пагони і корені на МС I без гормонів. Висота пагонів становила в середньому 2,2 см, кількість бічних коренів — 4,5 шт. на 1 бруньку довжиною 1,9 см (рис. 1). У частини бруньок спостерігали лише утворення бічних коренів у кількості 0,6 шт. на 1 бруньку.

Пророщені бруньки імбиру було використано як первинні експланти для розроблення методу клонування культури імбиру *in vitro*.

Життєздатні бруньки імбиру для подальшого клонування перенесено на живильне середовище Мурасіге і Скуга з додаванням цитокинінів і цукрози. За рік 6 пасажів клонування пагонів імбиру з експозицією культивування 8–10 тижнів.

Перший і другий пасажі культивування проводили на живильному середовищі МС I без гормонів, що дало змогу отримати з одного вихідного експланта 1,0–8,0 нових пагонів. Це в середньому становило 2,6 шт. на 1 вихідну бруньку (таблиця).

За додавання в живильне середовище БАП у концентрації 1,0 мг/л було відзначено збільшення коефіцієнта розмноження в середньому до 3,1 шт./пагін. Зі збільшенням концентрації БАП у живильному середовищі МС III до 3,0 мг/л коефіцієнт розмноження пагонів становив у середньому 5,3 шт./пагін, що перебуває в межах НІР₀₅. Окремі біотиipi імбиру підвищили кількість новоутворених бруньок з 1,0 шт./пагін у контрольному варіанті до 3,6–7,7 шт./пагін на МС III, що збігається з наведеними показниками пагоноутворення в іноземних літературних джерелах.

Розвинені пагони імбиру мали темно-зелене забарвлення, листки розгорнуті, ланцетоподібні з глянцем та характерним для цієї культури ароматом і смаком. Основа пагонів має глобулярну структуру світло-зеленого кольору, на якій спостерігали утворення додаткових пагонів і коренів (рис. 2).

Утворення коренів спостерігали на 10–14-ту добу культивування в усіх досліджуваних біотипів. Пагони імбиру формували потужну кореневу систему — від 3–4-х до 25–30-ти коренів на 1 пагін довжиною 1,5–8,0 см білого та світло-зеленого

Клональне мікророзмноження імбиру *in vitro*

Номер біотипу	Коефіцієнт розмноження, шт./пагін		
	МС I	МС II	МС III
1	3,0	4,4	5,4
2	8,0	3,5	6,3
3	2,0	1,5	5,5
4	2,0	3,0	5,6
5	2,0	3,0	4,8
6	2,0	3,5	3,9
7	1,0	3,0	4,7
8	2,0	1,0	5,7
9	2,0	1,5	3,6
10	6,0	1,2	5,1
11	2,0	3,0	4,6
12	1,0	3,0	3,6
13	2,0	7,5	7,7
14	2,0	4,0	6,4
15	2,0	3,0	7,0
Середнє	2,6	3,1	5,3
НІР ₀₅	0,5	0,4	0,3



Рис. 2. Клональне мікророзмноження імбиру на МС III

кольорів із додатковими корінцями (рис. 3). Через 5 пасажів культивування з однієї введеної в умови *in vitro* бруньки імбиру було отримано 1000 укорінених рослин із потужною кореневою системою.

Клоновану розсаду в кількості 4000 шт. було передано для вивчення умов адаптації і вирощування на Веселоподільську



Рис. 3. Зовнішній вигляд укорінених пагонів імбиру

дослідно-селекційну та Ялтушківську дослідно-селекційну станції. Приживлюваність культуральної розсади становила 72–98%. Наприкінці вегетаційного періоду рослини імбиру формували 3–7 нових пагонів.

Висновки

Стимулювання брунькоутворення на кореневих бруньках імбиру в термостаті за температури $28 \pm 2^\circ\text{C}$ та вологості 90% забезпечує вихід бруньок — 161,8%. Для отримання 50,0–63,9% асептичної культури імбиру *in vitro* доцільно застосовувати 0,1%-й розчин сулеми з експозицією 45–50 хв, що забезпечує 61,4–81,9% життєздатних бруньок. Використання БАП (3 мг/л) забезпечує високий коефіцієнт розмноження імбиру — до 7,7 шт./пагін за 1 пасаж. Культуральні пагони імбиру *in vitro* не

потребують додавання ауксинів у живильне середовище для стимулювання ризогенезу. Культуральна розсада імбиру з *in vitro* має високий рівень приживлюваності в умовах відкритого ґрунту — 72–98%, що дає змогу використовувати метод клонування *in vitro* для отримання якісного садивного матеріалу. Розроблений метод клонального мікророзмноження імбиру дає можливість отримати з 1-го введеного в умови *in vitro* експланта до 1000 укорінених рослин.

Роик Н.В., Бех Н.С., Коцар М.А.

Институт биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН, ул. Клиническая, 25, г. Киев, 03141, Украина; e-mail: sugarbeet@ukr.net

Клональное микроразмножение имбиря в условиях *in vitro*

Цель. Разработать метод клонального микроразмножения имбиря для получения качественного посадочного материала. **Методы.** Лабораторный, биотехнологический, статистический. **Результаты.** Прорастание почек на корневых бруньках в условиях термостата при температуре $28 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности 90% наблюдали через 4 недели культивирования, выход почек составил 161,8%. Применение 0,1% раствора

сулемы с экспозицией 45–50 мин обеспечивает 50,0–63,9% асептических почек имбиря у различных биотипов. Высота первичных побегов через месяц культивирования составляла в среднем 2,2 см, количество корней — 4,5 шт. на 1 почку длиной 1,9 см. Добавление БАП в питательную среду увеличивает побегообразование до 7,7 шт./побег за 1 пассаж. Образование корней наблюдали на 10–14-е сутки культивирования во всех исследуемых биотипов независимо от наличия ауксинов в питательной среде. В условиях выращивания микрорастений имбиря с *in vitro* на Веселоподольской ИСС и Ялтушковской ИСС приживаемость рассады составляла 72–98%. **Выводы.** При стимулировании побегообразования

на кореневих імбиру в термостаті при температурі $28 \pm 2^\circ\text{C}$ і вологості 90% вихід почек становив 161,8%. Застосування 0,1% розчину сулемы з експозицією 45–50 мин дає можливість отримати 50,0–63,9% асептичних почек імбиру у різних біотипів. Вихід життєздатних почек становить 61,4–81,9%. Використання БАП (3 мг/л) забезпечує високий коефіцієнт розмноження імбиру — до 7,7 шт./побег за 1 пасаж. Культуральні побегі імбиру *in vitro* не потребують додавання ауксинів в поживну середу для стимулювання ризогенезу. Культуральна раса імбиру з *in vitro* має високий рівень приживаемості в умовах відкритого ґрунту — 72–98%, що дає можливість використовувати метод клонування *in vitro* для отримання якісного посадочного матеріалу. Розроблений метод клонального мікророзмноження імбиру дає можливість отримати з 1-го введення в умовах *in vitro* експланта до 1000 укорених рослин.

Ключові слова: імбир, почки, побегі, *in vitro*.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201906-6>

Roik M., Bekh N., Kotsar M.

Institute of biopower crops and sugar beet of NAAS, Clinichna Str., 25, Kyiv, 03141, Ukraine; e-mail: sugarbeet@ukr.net

***In vitro* clonal microreproduction of ginger**

The purpose. To develop a method of clonal microreproduction of ginger for deriving quality planting stock. **Methods.** Laboratory, biotechnological, statistical. **Results.** Germination of gemmas on roots in conditions of thermostat at temperature $28 \pm 2^\circ\text{C}$

and moisture content of 90% has been observed for 4 weeks of cultivation. Yield of gemmas has made 161,8%. Application of 0,1% of solution of sublimate with exposure of 45–50 min ensures 50,0–63,9% of aseptic gemmas of ginger at different biotypes. Altitude of primary shoots in a month of cultivation averaged 2,2 cm, amount of roots — 4,5 pieces for 1,9-cm gemma. Addition into nutrient medium of BAP raises sprout-formation up to 7,7 pieces/shoot for 1 passage. Formation of roots was observed on 10–14 day of cultivation in all probed biotypes irrespective of presence of auxins in nutrient medium. In conditions of growing of microplants of ginger *in vitro* survival of seedling made 72–98%. **Conclusions.** At stimulation of sprout-formation on ginger hands in thermostat at temperature $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and moisture content of 90% the yield of gemmas has made 161,8%. Application of 0,1% of solution of sublimate with exposure of 45–50 min enables to gain 50,0–63,9% of aseptic gemmas of ginger at different biotypes. The yield of viable gemmas makes 61,4–81,9%. Application of BAP (3 mg/l) ensures high multiplication ratio of ginger — up to 7,7 pieces/shoot for 1 passage. Culture shoots of ginger *in vitro* do not demand add-on of auxins into nutrient medium for stimulation rhizogenesis. Culture seedling of ginger *in vitro* has high level of survival in conditions of open ground — 72–98%. That enables to use a method of cloning *in vitro* for deriving quality planting stock. The developed method of clonal microreproductions of ginger enables to obtain from one *in vitro* explant up to a thousand rooted plants.

Key words: ginger, gemmas, shoots, *in vitro*.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201906-6>

Бібліографія

1. Ravindran I., Nirmal Badu K. Ginger: the genus. *Zingiber*. 2005. P. 15–87.
2. Shahira M.E., Marwa I.E., Mona M.O. et al. The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) potent *in vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity. *J. of Ethnopharmacology*. 2018. V. 214. P. 113–123.
3. Manel A., Chafia T. *In vitro* anti-hydatic and immunomodulatory effects of ginger and [6]-gingerol. *Asian Pacific J. of Tropical Medicine*. 2016. V. 9, Is. 8. P. 749–756.
4. Singh G., Satty S. Impact of tissue culture on agriculture in India. *Biotechnol Bioinf. Bioeng*. 2011. V. 1 (3). P. 279–288.
5. Ayenew B., Tefera W., Kassahum B. *In vitro* propagation of Ethiopian ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cultivars: Evaluation of explant types and hormone combinations. *African J. of Biotechnology*. 2012. V. 11 (16). P. 3911–3918.
6. Policegondra R.S., Aradhya S.M. Biochemical Changes and antioxidant activity of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizomes during postharvest storage at different temperatures. *Postharvest Biology and Technology*. 2007. V. 46. Is. 2. P. 189–194.
7. Brian K.W., Chang and Richard A. Criley Clonal propagation of pink ginger *in vitro*. *Hortscience*. 1993. № 28 (12). P. 1203.
8. Sidhid D.F., Yunus A., Pujiasmanto B. Multiplication of red ginger *in vitro* using BAP and NAA. Proceedings. *The 6th Indonesian Biotechnology Conference Surakarta*, 6–7 September 2016. P. 315–322.
9. Azra S., Lutful H., Syed D. et al. *In vitro* regeneration of ginger using leaf shoot tip and root explants. *Pak. J. Bot.*, 2009. № 41 (4). P. 1667–1676.
10. Villamor C. Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc. *E-internat. Scientific Res. J.* 2010. № 2. P. 1–6.
11. Бех Н.С., Коцар М.О., Поїк М.В. Спосіб отримання асептичної культури імбиру *in vitro*. *Вісник аграрної науки*. 2017. № 9. С. 40–43.