

На правах рукописи

КХУАТ ВАН КУЕТ

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ *AMOMUM ROXB.* И ИЗУЧЕНИЕ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИХ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ**

Специальность 1.5.6. - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Калашникова Елена Анатольевна**,
доктор биологических наук, профессор, профессор
кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский
государственный аграрный университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Бондарев Николай Ильич**,
доктор биологических наук, доцент, профессор
кафедры промышленной химии и биотехнологии
ФГБОУ ВО «Орловский государственный
университет имени И.С.Тургенева»

Муратова Светлана Александровна,
кандидат биологических наук, доцент, профессор
кафедры садоводства, биотехнологий и селекции
сельскохозяйственных культур ФГБОУ ВО
«Мичуринский государственный аграрный
университет»

Ведущая организация: ФГБУН «Главный ботанический сад им. Н.В.
Цицина Российской академии наук»

Защита состоится «27» июня 2023 года в 10:00 час. на заседании диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 35.2.030.09,
кандидат биологических наук, доцент

Р.Н. Киракосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Лекарственные растения используют в здравоохранении с незапамятных времен. Во всем мире постоянно проводят исследования по проверке их эффективности, на основании которых созданы лекарственные препараты на растительной основе. Стоимость мирового рынка лекарственных растительных продуктов превышает 100 миллиардов долларов США в год. По данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 80% населения земного шара зависит от традиционных систем здравоохранения в сочетании с натуральными продуктами.

В современном мире наметилась острая необходимость в поиске новых лекарственных препаратов, действие которых направлено на борьбу с трудно излечимыми болезнями. Перспективным направлением в этой области является изучение редких и эндемичных растений, используемых в народной медицине, природные ресурсы которых находятся на грани исчезновения.

В настоящее время большой интерес представляют растения рода *Atomum* Roxb. (Семейство Zingiberaceae Lindl.), насчитывающий от 150 до 188 видов растений (Mabberley, 2008; Lamxay, Newman, 2012), из которых 21 вид зарегистрирован во Вьетнаме (Gagnerpain, 1908; Pham, 2000; Nguyen, 2005, 2017). Родовое название впервые было предложено Линнеем в 1753 г., но, как объяснили Бертт и Смит (1968 г.), ни один из видов, выделенных Линнеем, в настоящее время не входит в состав рода *Atomum*. Сейчас используется название *Atomum* Roxb. В 1810 году именно Роксбург определил *Atomum* по его лабеллуму, пыльнику и плодам (Lamxay, Newman, 2012).

Особого внимания заслуживают черный кардамон (*Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié) и пурпурный кардамон (*Atomum longiligulare* T.L. Wu.) – входящие в состав 188 видов *Atomum*. Растения сегодня широко распространены в Китае, Лаосе и Вьетнаме (Lamxay, Newman, 2012). Например, во Вьетнаме *A. tsao-ko*, это растение известно как «Кардамон», или «Do-ho» и широко распространено в провинциях Ха Джианг, Лао Кай, и Лай Чау, а *A. longiligulare* – в провинциях Центрального нагорья (таких как провинции Дак лак, Джиа Лай, Бинь Динь, Фу Йен, и Куанг Нгай) (Pham, 2000; Wu, Larsen, 2000; Nguyen, 2005, 2017). *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* входят в класс однодольных и являются многолетними травянистыми растениями. Эти растения являются ценным недревесным продуктом леса, а также важным лекарственными растением с прекрасным экспортным потенциалом. В традиционной медицине семена этих видов используют как лекарство при респираторных заболеваниях, миалгии, неврозах, ревматизме и каменной болезнине в почках, а также применяют от болей и вздутия в

животе, икоты, рвоты, диареи, малярии, кариесе и др. (Jafri, Javed, Singh, 2001; Do, 2005; Verma et al., 2010). Кроме того, эфирное масло обладает противомикробным и противогрибковым действием, а экстракты сухофруктов *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* оказывают ингибирующее действие на рост клеток рака шейки матки Hela, опухолевых клеток печени HepG-2 и SMMC-7721 и клеток рака легкого A549 (Zhang, Lu, Jiang, 2015; Zhou et al., 2021; Zhu et al., 2021). Все эти исследования еще раз подтверждают ценность исследуемых растений.

Основной способ размножения черного кардамона и пурпурного кардамона – семенной и вегетативный (корневищами) (Nguyen, 1999; Loi, 2001; Moi, 2002; Hoat, Thuan, 2005; Thom, Lai, To, 2006; Hai, 2013; Lim, 2013). Однако эти способы имеют как преимущества, так и недостатки. Например, при размножении семенами, взрослые растения дают более высокий и качественный урожай, но из-за твердой оболочки всхожесть семян очень низкая. Это приводит к получению ограниченного количества посадочного материала. При использовании корневищ, возникает вероятность получения посадочного материала восприимчивого к заболеваниям, вызываемым вирусами, грибами или бактериями, что способствует снижению урожая и получению плодов низкого качества. Таким образом, классические методы размножения имеют ограничения и не всегда отвечают потребностям производства. Развитие методов клеточной биотехнологии позволяет решить данную проблему путем получения высококачественного посадочного материала *in vitro*.

В мире проводят исследования по размножению *in vitro* некоторых видов рода *Amomum*, таких как *A. longiligulare* (Rao et al., 2003), *A. krekevanh* (Rao et al., 2004; Tefera, Wannakrairoj, 2004), *A. villosum* (Ping, 2004; Hong, 2005), *A. subulatum* (Sajina, et al., 1997; Pradhan et al., 2014; Purohit et al., 2017; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018) и *Amomum* sp. (Truong et al., 2017). Что касается Вьетнама, то исследования такого плана малочисленны. Как правило, исследования проводят на растениях *A. longiligulare* (Dang et al., 2011) и совсем не изучен в культуре *in vitro* *A. tsao-ko*.

Цель работы – изучить морфогенетический потенциал *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* в культуре *in vitro* и установить биологическую и фунгицидную активность экстрактов, полученных из разных органов изучаемых видов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- получить хорошо растущую стерильную культуру из различных первичных эксплантов *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu;

- установить оптимальные условия предобработки семян *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu, обеспечивающие их прорастание *in vitro*;

- изучить влияние условий культивирования (минеральный и гормональный состав питательной среды) на морфогенетический потенциал культивируемых первичных эксплантов на разных этапах клонального микроразмножения;

- разработать технологию адаптации микроклонов *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu к условиям *ex vitro*;

- получить растительные экстракты из различных органов интактных растений *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu, и изучить их биологическую и фунгицидную активность;

- провести анализ растительных экстрактов, полученных из различных органов интактных растений, на суммарное содержание фенольных соединений и флаваноидов.

Научная новизна. Впервые изучены в культуре *in vitro* эндемичные виды *Amomum* (*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu.), произрастающие во Вьетнаме, установлены биологические особенности их размножения *in vitro* и разработана технология клонального микроразмножения.

Впервые проведены исследования морфологических и анатомических характеристик семян *A. tsao-ko* и *A. longiligulare*, а также определены их посевных качеств. Установлено, что для повышения всхожести и получения равномерного прорастания семян целесообразно применять для черного кардамона – механическую скарификацию (надрезы скальпелем), а для пурпурного кардамона – химическую скарификацию (замачивание в 50%-ной HNO₃ в течение 15 мин).

Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан протокол получения асептической культуры из семян, а также из подземных частей растения (корневища), содержащих спящие почки. Предлагаемая схема стерилизации (обработка эксплантов 0,1% раствором HgCl₂ в течение 4-10 мин) позволяет получать 51,39-80,0% асептических семян и 18,29–35,6% - асептических корневищ, сохраняя жизнеспособность спящих почек и обеспечивая прорастание семян *in vitro*.

Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан эффективный протокол микроразмножения с использованием в качестве экспланта верхушек побегов, которые культивируют на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, дополненной 4,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л НУК (для черного кардамона) и 1,5 мг/л БАП в сочетании с 0,25 мг/л

НУК (для пурпурного кардамона). В этих условиях коэффициент размножения составляет 5-6.

Установлено, что при укоренении микрочеренков целесообразно применять ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л. В этих условиях формировались микроклоны высотой в среднем 5-8 см и средним количеством корней на одно растение 14-16 шт.

Впервые для *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu проведены исследования по определению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов растений. Показана их аллелопатическая активность по отношению к проросткам, полученных из семян 5 видов растений (капуста белокочанная, рыжик посевной, томат, киноа, лук), а также 2 видов фитопатогенных грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*). Установлено, что наибольшей биологической и фунгицидной активностью обладают экстракты, полученные из семян.

Экспериментально установлено, что суммарное содержание фенольных соединений в изучаемых экстрактах *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* различно. Показано, что в экстрактах, полученных из семян, суммарное содержание фенольных соединений было наибольшим и составило $4,30 \pm 0,03$ мкг GAE/мг, за которым следовали экстракты листьев ($2,43 \pm 0,02$ мкг GAE/мг), псевдостебля ($1,80 \pm 0,01$ мкг GAE/мг), корневища и корня $1,63 \pm 0,01$ мкг GAE/мг.

Практическая значимость. Предложенная технология культивирования *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu в условиях *in vitro* может быть применена и для размножения других видов семейства Zingiberaceae Lindl., а также для растений других таксономических групп. Технология предусматривает получение в большом количестве генетически стабильного посадочного материала, так как не предусматривает размножение растений через каллусную ткань. Полученные результаты можно использовать в учебном процессе при проведении лекционных и лабораторно-практических работ по дисциплинам: «Физиология растений», «Сельскохозяйственная биотехнология», «Прикладная биотехнология», «Культура клеток и тканей растений» для студентов, обучающихся по направлениям «Биотехнология» и «Агрономия».

Методология и методы исследования. Основой методологии данного исследования являются методы культуры клеток и тканей растений, а также методы биохимического анализа определения суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов, анализ биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из различных органов интактных растений *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu. Объектом исследования является черный кардамон

(*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié) и пурпурный кардамон (*Amomum longiligulare* T.L. Wu.), предметом исследования – получение хорошо растущей стерильной культуры, режимы культивирования изолированных первичных эксплантов *in vitro* в зависимости от гормонального минерального состава питательной среды, условия адаптации микроклонов *ex vitro*, биологическая активность экстрактов, полученных из различных органов интактных растений.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований были представлены на научных конференциях и симпозиумах: XX Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2020); Всероссийская научная конференция с международным участием «Растениеводство и Луговое хозяйство» (Москва, 2020); XI Международный симпозиум и школа молодых ученых «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», (Москва, 2022); Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (Москва, 2022)

Публикации. По материалам диссертации опубликована 14 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 7 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ (из них 5 в международных базах данных (Web of Science, Scopus)), 7 – в других изданиях.

Личный вклад соискателя. Результаты исследований, представленные в диссертации, получены соискателем лично на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВО Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. Диссертантом совместно с научным руководителем разработана тема исследования, лично получены основополагающие результаты, подготовлены и опубликованы научные статьи по теме диссертации в соавторстве.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 181 страницах компьютерного текста; состоит из введения, 5 глав (обзор литературы, материалы и методы исследований и 3-х глав экспериментальной части), выводов и списка литературы. Работа содержит 37 таблиц, 66 рисунков. Библиографический список включает 205 источников, в том числе 201 – на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служили семена и корневища кардамона двух видов – черный кардамон (*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié) и пурпурный кардамон (*Amomum longiligulare* T.L. Wu.)

Зрелые растения и коробочки с семенами черного кардамона были собраны в конце декабря 2020 года в кардамоновом лесу района Там Дуонг, провинция Лай Чау, Вьетнам, около 22° 23' 04,5" северной широты и 103°32'44,0" восточной долготы. Растительный материал пурпурного кардамона был собран в лесу на скалистой горе (22° 46' 08,9" северной широты и 104° 59' 18,4" восточной долготы) в деревне Ланг Кунг, коммуна Дао Дык, район Ви Суйен, провинция Ха Гианг, Вьетнам, в августе 2020 года. После сбора материала, они были сохранены с помощью вакуумной упаковки и переданы в Российскую Федерацию на кафедру биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева. Ботаническая идентификация видов *Атомит* была проведена доктором Там Н. М. Одна часть образцов была перевезена в Россию, другая – была депонирована в Гербарий образцов, факультет ботаники, Ханойского педагогического университета №2 (Вьетнам).

Введение в культуру *in vitro* семян. Семена исследуемых видов замачивали в теплой воде в течение 8 часов, после этого выдерживали под проточной водой комнатной температуры в течение 1 часа, затем их погружали в жидкое мыло на 10 минут, после чего вновь промывали под проточной водой. На следующем этапе семена поверхностно стерилизовали 70%-ным этанолом в течение 30 секунд с последующим погружением в 0,1%-ный раствор HgCl₂ или 5%-ный и 10%-ный, раствор гипохлорита кальция на 5, 10 или 15 минут. После этого семена промывали стерильной дистиллированной водой 4-5 раз и высевали на агаризованную питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга (МС).

Изучали влияния различных разбавленных концентраций базальной среды МС (1, 1/2, 1/4 и 1/16 концентрации МС) на параметры прорастания - процент всхожести (GP), среднее время прорастания (MGT) и индекс скорости прорастания (GRI) семян черного кардамона и пурпурного кардамона. В качестве контроля использовали дистиллированную воду

Для того, чтобы увеличить скорость прорастания *in vitro* семян черного кардамона и пурпурного кардамона, было проведено десять предпосевных обработок, включая механическую скарификацию (ME), погружение в горячую (HW2m и HW4m) или холодную воду (CW), химическую скарификацию (HCl 10 мин, HCl 15 мин, HNO₃10 мин и HNO₃15 мин) и погружение в регуляторы роста растений (ГК в течение 24 ч и НУК в течение 24ч).

Введение в культуру *in vitro* корневищ. Перед введением в культуру *in vitro* сегменты корневища разрезали на отдельные узловые сегменты длиной 3,0-5,0 см. Затем их промывали проточной водопроводной водой в течение 15-20 минут, после чего острым лезвием удаляли внешние чешуи и

очищенные сегменты погружали в 1%-ный мыльный раствор на 10 минут, промывали под проточной водой, после чего стерилизовали 70%-ным этанолом в течение 30 секунд с последующим погружением в 0,05%-ный или 0,1%-ный раствор HgCl_2 или 5%-ный и 10%-ный раствор гипохлорита кальция на 4, 8 или 12 минут, промывали стерильной дистиллированной водой 4-5 раз и помещали на питательную среду МС, в которую для инициации культивирования добавляли индивидуально БАП или кинетин в концентрации 0,5-3,0 мг/л. В качестве контроля служила среда без регуляторов роста.

Влияние питательной среды на микроразмножение. С проростков высотой около 2-3 см, полученных из семян, удаляли листья, корни и изолировали верхушки побегов, которые культивировали на твердой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, а также различные гормоны - НУК в концентрации 0,5, 1,0 и 4,0 мг/л или 2,4-Д в концентрации 1,0 и 2,0 мг/л, БАП в концентрации 1,0 - 4,0 мг/л. Каждый эксперимент по вариантам проводили в 2 аналитических и 12 биологических повторностях.

Микропобеги, полученные из корневищ, длиной 1,5–2,0 см с 3–4 листьями культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС и дополненную различными концентрациями БАП (0,5-3,0 мг/л), кинетином (0,5-3,0 мг/л) в сочетании с НУК 0,25 и 0,5 мг/л. В качестве контроля использовали безгормональную питательную среду. Визуальные наблюдения проводили один раз в неделю, оценивая при этом высоту побегов (см), коэффициент размножения, количество адвентивных побегов (шт).

Укоренение и адаптация микроклонов. Для укоренения микропобегов использовали удлиненные, здоровые побеги длиной 4-4,5 см, имеющие 4-6 листьев, полученные в предыдущих экспериментах. Микропобеги культивировали на питательной среде МС с добавлением ИМК или НУК в концентрациях 0; 0,25; 0,50; 0,75; и 1,00 мг/л. В качестве контроля служила среда без регуляторов роста. Учет результатов проводили через 8 недель с начала культивирования в изучаемых условиях выращивания. При этом учитывали: число укоренившихся микропобегов (%), количество корней на одном растении (шт) и длина корней (мм). Сформировавшиеся микроклоны, имеющие высоту 4,0-5,0 см и 3-4 листа, переносили в почвенный субстрат (грунт универсальный (производитель «Garden star») и Биогрунт (производитель «Фаско»)) для адаптации. Выживаемость микроклонов регистрировали через 1 и 3 месяца после пересадки в условия *ex vitro*.

Получение растительных экстрактов и определение их биологической активности. Растительные экстракты получали из семян, листьев, корневищ, корней и псевдопобегов интактных растений двух видов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu. по методике, разработанной на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Биологическую активность растительных экстрактов проверяли на семенах разных таксономических групп: рыжик яровой (*Camelina sativa* Crantz), киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.), капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L. cv. *Dubrava*)), лук (*Allium cepa* L. cv. *Stuttgarter risen*). Сухой растительный остаток растворяли в 0,03% (v/v) водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) для получения концентраций экстракта 0,10, 0,15 и 0,20 мг/мл для биопробы. Семена проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной растительными экстрактами. Учет проводили каждые двое суток, при этом учитывали процент прорастания (GP, %), среднее время прорастания (MGT, день) и индекс скорости прорастания (GRI), а также длину hypocотилия (см) и длину корня (см).

Определение фунгицидной активности растительных экстрактов. Исследования проводили на чистой культуре грибов *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Helminthosporium sativum* P.K. & V. Данные штаммы были выделены и идентифицированы сотрудниками лаборатории микологии Института фитопатологии РАН. В работе исследовали фунгицидное действие растительных экстрактов всех образцов в концентрациях 0,05 и 0,10 мг/мл. В качестве контроля выступала питательная среда без растительного экстракта, а также содержащая чистый растворитель ДМСО в концентрации 0,03% (v/v). Для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ), образуемых исследуемыми грибами, использовали метод прямого подсчёта в камере Горяева.

Определение суммарного содержания фенольных соединений (ССФС) и флаваноидов проводили в растительных экстрактах, полученных из семян, листьев, корней и псевдопобегов интактных растений двух видов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu. Определение ССФС проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 765 нм. с реагентом Фолин-Чокалтеу. Общее количество фенольных соединений измеряли в эквивалентах галловой кислоты (мкг галловой кислоты, эквивалентной GAE/мг экстракта).

Определение флаваноидов (ТФС) проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 415 нм. Содержание флаваноидов было выявлено в эквиваленте кверцетина (мкг кверцетинового эквивалента QE/мг экстракта).

Проведение микроскопических исследований семян. Подробная морфология и анатомия семян были оценены с помощью стереомикроскопа и сканирующего электронного микроскопа, модель JEOL JSM-6380. Для этого семена промывали водой, затем сушили, после этого промывали 70% этиловым спиртом в течение 3 минут, далее, семена помещали на стержни с золотопалладиевым покрытием и переносили на предметный столик электронного микроскопа для наблюдения. Работа была выполнена совместно с кандидатом биологических наук Барановой Екатериной Николаевной.

Статистическая обработка результатов эксперимента. Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (корпорация Microsoft, США). Дисперсионный анализ (ANOVA) проводился с использованием Statistica версии 10,0, а сравнение средних значений проводили с помощью теста множественного диапазона Дункана при уровне значимости $p \leq 0,05$.

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ПЕРВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ *AMOMUM TSAO-KO* И *AMOMUM LONGILIGULARE*

Введение в культуру *in vitro* семян

Исследования показали, что частота получения асептической культуры зависит от применяемого стерилизатора, его концентрации и временной экспозиции воздействия на семена. Установлено, что применение этанола в концентрации 70% было неэффективно, так как в этом варианте наблюдали проявление внешней инфекции в 100% случаев. При использовании раствора $HgCl_2$ в концентрации 0,1% и обработка семян в течение 10 минут был получен максимальный процент асептических семян (51,39-80,0%). При использовании гипохлорита кальция наилучшие результаты по получению асептических семян (19,4%) было зафиксировано в варианте использования стерилизующего агента в концентрации 10% и временной обработки в течение 10 минут. Различный стерилизующий эффект $HgCl_2$ и гипохлорита кальция можно объяснить различной активностью действующего вещества. Кроме того, семена имеют некоторые особенности в строении (Рис. 1, 2), например, семена имеют неровную поверхность, в углублениях которых могут скапливаться микроорганизмы, а присеменник (ариллус) трудно удаляется полностью с семян черного кардамона, поэтому его остатки могут быть источником развития микроорганизмов, что приводит к заражению семян. Для пурпурного кардамона слой ариллуса прилегает к эпидермису только вблизи хилума, поэтому его очень легко удалить.

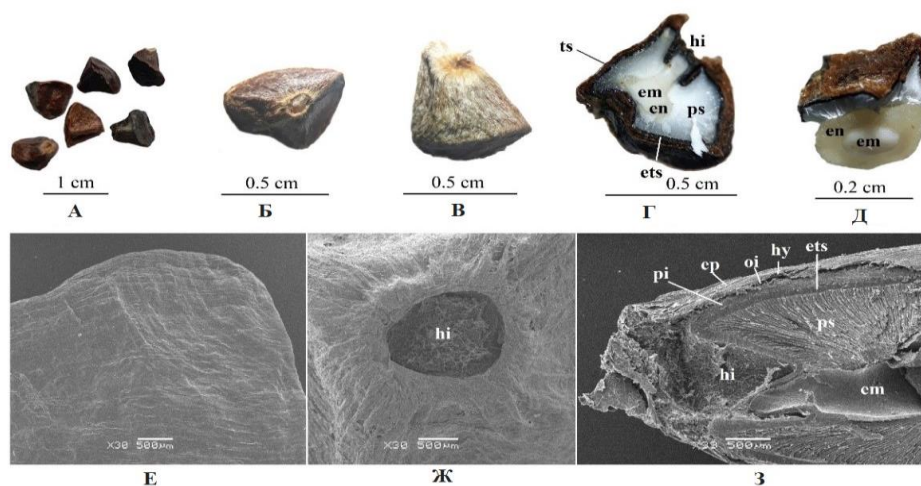


Рис. 1. Семена черного кардамона: (А–Б) морфологические характеристики семян; (В) семя, покрытое ариллусом; (Г–Д) анатомическая характеристика семян под стереомикроскопом: ts – эпидермальные клетки семенников, tg – покровный слой, hi – рубчик семени, ps – перисперм, en – эндосперм, em – зародыш; (Е–З) анатомическая характеристика семян под SEM: ep – эпидермальные клетки семенников, oi – слой масляных клеток

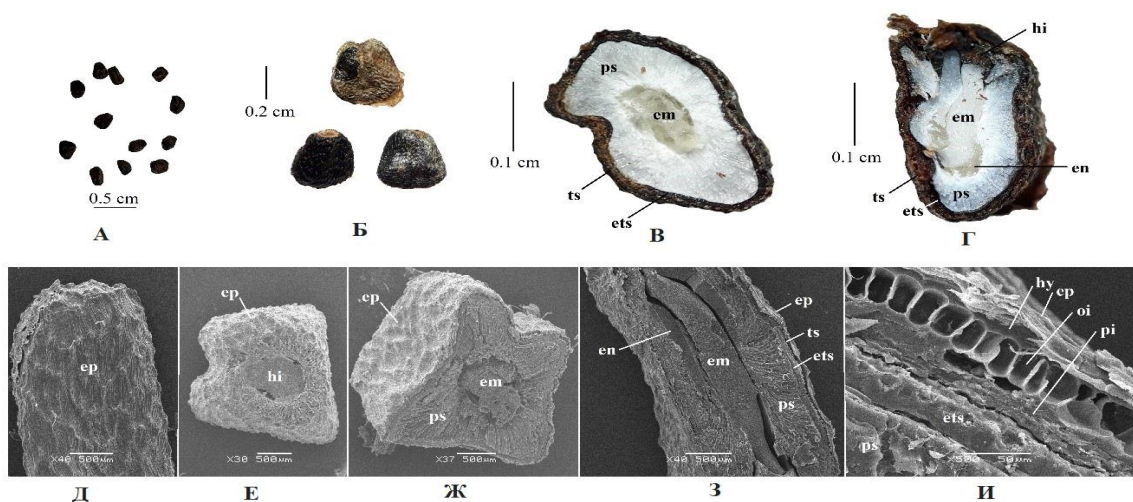


Рис. 2. Семя пурпурного кардамона: (А) морфологические характеристики семени; (Б) семя покрыто ариллусом (вверху), семена с ариллусом были удалены (внизу); (В–Г) анатомические характеристики семени под стереомикроскопом (В - поперечный срез семени; Г – продольный срез семени): ts – теста, ets – эндотеста, hi – хилум, ps – перисперм, en – эндосперм, em – эмбрион; (Д–И) анатомические характеристики семени под SEM: ep – эпидермальные клетки теста, hy – гиподерма, oi – слой жировых клеток, pi – пигментный слой. Столбики шкалы (Е–З) = 500 мкм

Возможно, именно по этой причине эффект дезинфекции поверхности семян пурпурного кардамона лучше, чем у черного кардамона при одинаковом дезинфицирующем средстве и времени воздействия. Анатомическое строение семян черного кардамона и пурпурного кардамона имеет сходство в строении как между собой, так и с семенами некоторых других видов семейства имбирных (Wu et al., 2014), но и отмечены различия: (1) теста и эндотеста толстая (эндотеста семян черного кардамона толще); (2)

перисперм очень развит, а эндосперм, который обеспечивает зародышу начальное питание, очень мал; (3) зародыш линейный и полностью развитый. Эти особенности, вероятно, являются причиной того, что естественная всхожесть семян пурпурного кардамона и черного кардамона довольно низкая.

На прорастание семян оказывает влияние не только стерилизующее вещества, но и состав питательной среды, на которой проращивают семена. В работе было испытано 5 вариантов питательных сред. Установлено, что наилучшей средой для прорастания семян была среда МС, разбавленная до концентрации 1/6. В этих условиях наблюдали более короткий период времени прорастания семян (33-67 суток) и самый высокий индекс всхожести (0,12-0,27). Визуальные исследования показали, что прорастание семян начинается с появления зародышевого корешка и формирования первичного корня. По мере прорастания семян наблюдали появление придаточных корней. Позже в процессе появляется coleoptиль и первые настоящие листья (Рис. 3).

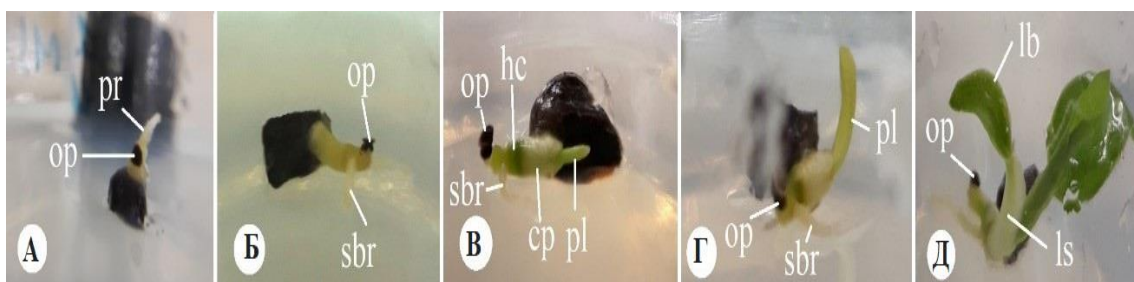


Рис. 3. Этапы прорастания *in vitro* семян черного кардамона и пурпурного кардамона на среде 1/16 МС: семена на среде (А); появление корешка(Б); формирование coleoptиля и зачатки первичного листа (В); формирование нормального листа (Г-Д): op - оперкулум; cp – coleoptиль, hc – гипокотиль, pl – первичный лист, sbr - корень на побегах, h - гаусторий, lb – листовая пластинка, ls – листовая оболочка

Основная цель следующего исследования заключалась в применении различных методов обработки семян (механическое (скарификация), химическое (регуляторы роста, кислоты и др.) и физическое (температурная обработка) воздействие) для нарушения покоя и повышения скорость прорастания семян (Рис. 4). Установлено, что для семян черного кардамона применение механической скарификации (МЕ) обеспечило самый высокий процент прорастания (68,0%) и самое низкое среднее время прорастания (53,7 суток). Для семян пурпурного кардамона наилучшие результаты были получены при использовании замачивания семян в растворе 25% HCl (HAS15m) в течение 15 мин (63,3%). В этом варианте было отмечено самое низкое среднее время прорастания (33,4 суток). Это различие, вероятно, связано с разницей в толщине семенной оболочки, особенно эндотесты семян

черного кардамона по сравнению с семенами пурпурного кардамона. Установленные способы предобработки семян оказала наилучшее влияние не только на параметры прорастания семян, но и на последующее развитие проростков (Табл. 1).

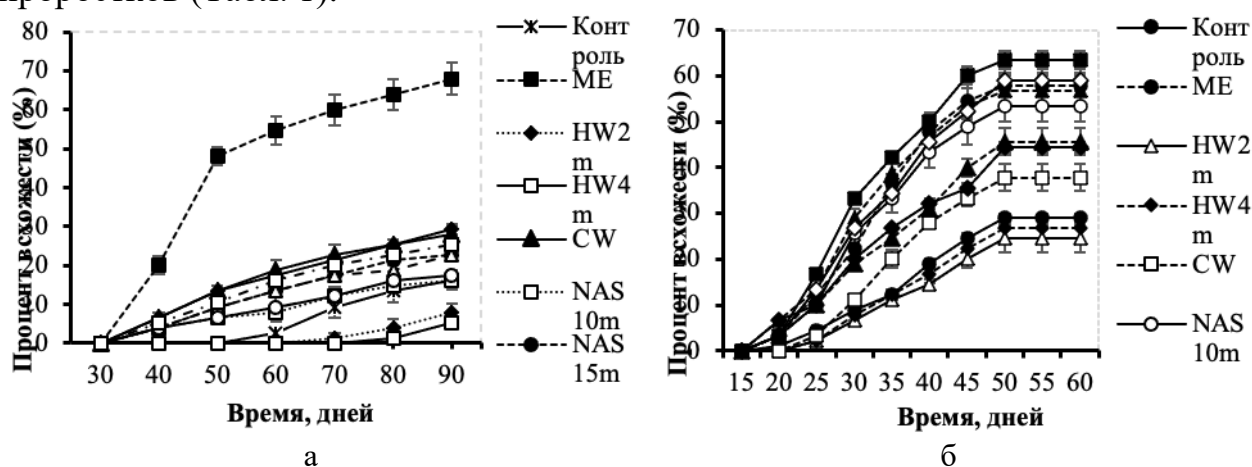


Рис. 4. Прорастание семян черного кардамона (а) и пурпурного кардамона (б) *in vitro* при различных видах обработки

Таблица 1 - Влияние различных видов обработки семян на рост проростков черного кардамона / пурпурного кардамона *in vitro*

Способ обработки	Длина проростка (см) *	Количество листьев (шт)*
Контроль	2,09 ± 0,11 / 2,41 ± 0,17	1,83 ± 0,15 / 2,01 ± 0,06
Механическая скарификация	3,05 ± 0,07 / 2,53 ± 0,09	3,07 ± 0,02 / 2,17 ± 0,09
Горячая вода 2мин	1,87 ± 0,08 / 1,79 ± 0,08	1,62 ± 0,25 / 1,46 ± 0,05
Горячая вода 4 мин	1,66 ± 0,08 / 1,94 ± 0,07	1,58 ± 0,28 / 1,43 ± 0,06
Холодная вода	2,25 ± 0,05 / 2,15 ± 0,13	2,70 ± 0,1 / 2,03 ± 0,07
HNO ₃ 10 мин	2,17 ± 0,07 / 3,18 ± 0,05	1,75 ± 0,14 / 2,58 ± 0,12
HNO ₃ 15мин	2,23 ± 0,1 / 3,17 ± 0,09	1,80 ± 0,17 / 2,52 ± 0,03
HCl 10 мин	2,10 ± 0,17 / 3,07 ± 0,08	2,62 ± 0,09 / 2,71 ± 0,10
HCl 15 мин	2,07 ± 0,11 / 2,92 ± 0,19	2,58 ± 0,14 / 2,59 ± 0,09
ГК 24 ч	2,93 ± 0,1 / 2,74 ± 0,07	2,79 ± 0,16 / 2,54 ± 0,16
НУК 24ч	2,81 ± 0,16 / 3,08 ± 0,08	2,95 ± 0,07 / 2,96 ± 0,04

* Средние значения ± стандартная ошибка (SE)

Введение в культуру *in vitro* корневищ

Получение стерильной культуры из сегментов корневищ является одной из сложных задач. Это, прежде всего, связано с тем, что корневища находятся в почве и содержат много бактерий и грибных патогенов, что затрудняет стерилизацию таких эксплантатов. Исследования позволили установить некоторые закономерности в применении различных стерилизующих агентов: 1) с увеличением концентрации стерилизатора и

времени воздействия, повышается эффективность получения асептических эксплантов; 2) использование HgCl_2 оказывает более выраженное действие на ингибирование развития внешней инфекции, по сравнению с $\text{Ca}(\text{ClO})_2$. Наилучшие результаты по получению асептической культуры корневищ черного кардамона были отмечены при использовании 0,1% HgCl_2 и временной экспозиции воздействия 8 минут. В этом варианте наблюдали самый высокий процент получения стерильной культуры (27,65%), из которых 18,29% были способны к дальнейшему росту. Для пурпурного кардамона наилучшие условия стерилизации корневищ - 0,1% HgCl_2 в течение 12 мин. В этом варианте наблюдали самое низкое заражение семян и самую высокую выживаемость - 53,3% и 35,6%, соответственно (Рис. 5).

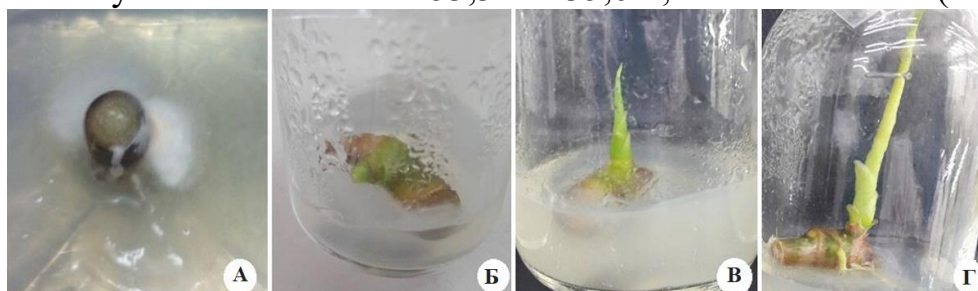


Рис. 5. *A. longiligulare in vitro*: (А) проявление бактериального заражения на корневище после стерилизации; (Б) получен асептичеккок культуры; (В-Г) формирование побегов из спящих почек

Таким образом, на основании проведенных исследований впервые для черного кардамона и пурпурного кардамона разработан протокол получения асептической культуры из подземных частей растения. Предлагаемая схема стерилизации позволяет получать высокий выход асептических культур, при сохранении жизнеспособности спящих почек, что проявлялось в их активном росте на питательных средах в условиях *in vitro*.

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И УКОРЕНЕНИЯ *AMOMUM TSAO-KO* И *AMOMUM LONGILIGULARE* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Влияние регуляторов роста на микроразмножение.

На основании проведенных исследований установлено, что при различных комбинаций регуляторов роста можно наблюдать различные морфогенетические реакции первичных эксплантов. Например, комбинация БАП и НУК приводила к индукции образования адвентивных побегов и корневой системы на эксплантах после 7 недель культивирования. Причем, вариант с применением МС в сочетании с БАП 4,0 мг/л и НУК 0,5 мг/л были отмечены наилучшие результаты по морфогенезу: среднее количество побегов составило $5,42 \pm 0,30$ шт, средняя длина побегов - $6,84 \pm 0,27$ см, а

среднее количество корней - $16,17 \pm 0,79$ шт (Табл. 2). Адвентивные побеги формировались в основании главного побега, имели толстые стебли с темно-зелеными листьями, а также формировалось множество корней с корневыми волосками (Рис. 6Ж).

Таблица 2 - Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение черного кардамона *in vitro*

Регуляторы роста растений, мг/л			Ср. кол-во побегов, шт.*	Ср. длина побега, см *	Ср. кол-во корней, шт. *	Индукция каллуса,% **
БАП	НУК	2,4-Д				
0,0	0,0	0,0	$0,58 \pm 0,08$ d	$3,02 \pm 0,06$ d	$2,67 \pm 0,22$ d	0,00 c
1,0	0,0	0,0	$3,42 \pm 0,33$ c	$5,05 \pm 0,12$ c	$5,58 \pm 0,22$ c	0,00 c
1,0	4,0	0,0	$0,00 \pm 0,00$ d	$0,00 \pm 0,00$ e	$0,00 \pm 0,00$ e	0,00 c
1,0	0,0	1,0	$0,00 \pm 0,00$ d	$0,00 \pm 0,00$ e	$0,00 \pm 0,00$ e	83,33 a
1,0	0,0	2,0	$0,00 \pm 0,00$ d	$0,00 \pm 0,00$ e	$0,00 \pm 0,00$ e	58,33 b
2,0	0,5	0,0	$3,67 \pm 0,51$ c	$5,08 \pm 0,09$ c	$5,42 \pm 0,33$ c	0,00 c
2,0	1,0	0,0	$3,75 \pm 0,38$ c	$5,54 \pm 0,17$ b	$5,83 \pm 0,22$ c	0,00 c
3,0	0,5	0,0	$4,00 \pm 0,38$ b,c	$5,82 \pm 0,21$ b	$5,92 \pm 0,46$ c	0,00 c
3,0	1,0	0,0	$4,08 \pm 0,41$ b,c	$5,75 \pm 0,13$ b	$6,25 \pm 0,28$ c	0,00 c
4,0	0,5	0,0	$5,42 \pm 0,30$ a	$6,84 \pm 0,27$ a	$16,17 \pm 0,79$ a	0,00 c
4,0	1,0	0,0	$4,92 \pm 0,22$ a,b	$5,78 \pm 0,22$ b	$8,92 \pm 0,71$ b	0,00 c

*, ** Средние значения \pm SE, за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. **) Средние значения были преобразованы в $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом



Рис. 6. Влияние регуляторов роста на размножение побегов

(А) контроль,
 (Б) 1,0 мг/л БАП,
 (В) 2,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК,
 (Г) 2,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК,
 (Д) 3,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК,
 (Е) 3,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК,
 (Ж) 4,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК,
 (З) 4,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК;

укоренение:
 (И) контроль,
 (К) 1,0 мг/л БАП,
 (Л) 4,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК,
 (М) 4,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК;

индукция каллуса:
 (Н) 1 мг/л БАП + 4 мг/л НУК,
 (О) 1 мг/л БАП + 1 мг/л 2,4-Д,
 (П) 1 мг/л БАП + 2 мг/л 2,4-Д.
 Масштабные линейки = 1 см

На втором месте был вариант среды МС, содержащей БАП 4,0 мг/л и НУК 1,0 мг/л. В этом варианте среднее количество побегов на один побег составил $4,92 \pm 0,22$ шт, средняя длина побегов - $5,78 \pm 0,22$ см и среднее количество корней - $8,92 \pm 0,71$ шт. Самые низкие результаты по морфогенезу были получены на безгормональной питательной среде МС. Присутствие в составе питательной среды 2,4-Д в сочетании с БАП приводило к формированию каллусной ткани (Рис. 6 О-П), которая не была способна к морфогенезу.

Среди регуляторов роста из группы цитокининов, помимо БАП, часто используют менее активный гормон – кинетин, который так же применяют для размножения *in vitro* разных видов рода *Amomum* (Sajina et al., 1997; Dang et al., 2011; Pradhan, Basistha, Subba, 2014; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018). Поэтому представлялся интерес провести сравнительный анализ действия двух гормонов (БАП и кинетин) на образование адвентивных почек и формирование побегов исследуемых видов кардамона (Табл. 3, 4).

Таблица 3 - Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов черного кардамона

Регуляторы роста растений, (мг/л)	Ср. кол-во побегов на эксплант, (шт) *	Ср. длина побегов, (см) *
МС (контроль)	$1,85 \pm 0,65$ a	$3,15 \pm 1,24$ a
МС + 0,5 Кинетин	$2,01 \pm 1,26$ a	$3,85 \pm 0,45$ c
МС + 1,0 Кинетин	$3,45 \pm 0,96$ c	$3,12 \pm 1,54$ a
МС + 1,5 Кинетин	$2,75 \pm 2,03$ b	$3,56 \pm 1,02$ b
МС + 2,0 Кинетин	$2,56 \pm 0,85$ b	$3,55 \pm 2,04$ b
МС + 0,5 БАП	$3,56 \pm 1,05$ c,d	$4,54 \pm 1,63$ d
МС + 1,0 БАП	$4,54 \pm 0,79$ e	$5,45 \pm 1,15$ e
МС + 1,5 БАП	$3,76 \pm 1,02$ d	$5,85 \pm 2,01$ f
МС + 2,0 БАП	$3,48 \pm 0,65$ c	$6,45 \pm 1,23$ g

* Средние значения \pm стандартная ошибка (SE); значения, сопровождаемые одной и той же буквой, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного ряда Дункана.

Таблица 4 - Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов пурпурного кардамона

Регуляторы роста, мг/л	БАП		Кинетин	
	ср. кол-во побегов, шт *	ср. высота побегов, см *	ср. кол-во побегов, шт *	ср. высота побегов, см *
0,0	$0,69 \pm 0,06$ e	$0,65 \pm 0,06$ e	$0,69 \pm 0,06$ f	$0,65 \pm 0,06$ d
0,5	$3,51 \pm 0,02$ c	$5,21 \pm 0,29$ d	$3,56 \pm 0,06$ b	$5,09 \pm 0,29$ c
1,0	$4,22 \pm 0,06$ a	$5,23 \pm 0,25$ d	$4,20 \pm 0,07$ a	$5,14 \pm 0,06$ c
1,5	$3,78 \pm 0,08$ b	$5,59 \pm 0,25$ cd	$3,38 \pm 0,08$ bc	$6,05 \pm 0,05$ b
2,0	$3,56 \pm 0,06$ c	$6,15 \pm 0,17$ bc	$3,18 \pm 0,06$ cd	$6,20 \pm 0,11$ b

2,5	3,42 ± 0,05 c	6,58 ± 0,12 ab	3,02 ± 0,08 d	6,78 ± 0,14 a
3,0	2,71 ± 0,06 d	7,14 ± 0,13 a	2,47 ± 0,1 e	7,11 ± 0,23 a

* Средние значения ± стандартная ошибка (SE); значения, сопровождаемые одной и той же буквой, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного ряда Дункана.

Установлены некоторые закономерности: 1) исследуемые цитокинины и концентрации оказывают стимулирующий эффект на индукцию образования адвентивных побегов; 2) с увеличением концентрации гормонов (БАП и кинетин), уменьшался коэффициент размножения; 3) действие БАП в разных концентрациях превышало действие кинетина; 4) наилучшие результаты были получены в варианте БАП 1 мг/л или кинетин 1 мг/л. Однако были установлены и некоторые особенности ответной реакции изучаемых видов кардамона на гормональный состав питательной среды. Так, например, для пурпурного кардамона отмечена повышенная ответная реакция на присутствие в составе питательной среды кинетина (1 мг/л): коэффициент размножения выше в среднем на 20%, средняя длина побегов выше на 65% по сравнению показателями черного кардамона. Все микропобеги характеризовались быстрым ростом, имели ярко-зеленый цвет стеблей и листовых пластинок (Рис. 7).

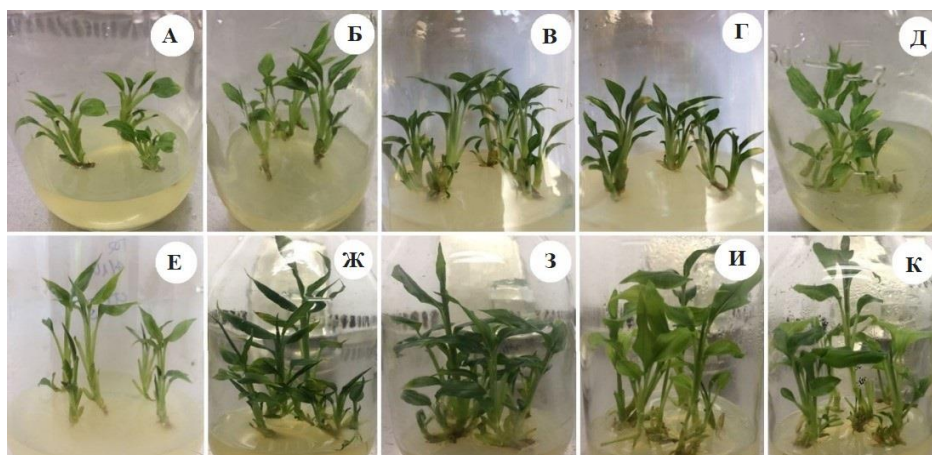


Рис. 7. Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов
 А - кинетин 0,0 мг/л;
 Б - кинетин 0,5 мг/л;
 В - кинетин 1,0 мг/л;
 Г - кинетин 1,5 мг/л;
 Д - кинетин 2,0 мг/л;
 Е - БАП 0,0 мг/л;
 Ж - БАП 0,5 мг/л;
 З - БАП 1,0 мг/л;
 И - БАП 1,5 мг/л;
 К - БАП 2,0 мг/л)

Морфогенетический потенциал культивируемых тканей зависит не только от применяемых цитокининов, но и от их сочетания с ауксинами. В работе было изучено влияние БАП или кинетина (0-3 мг/л) совместно с НУК (0,25 и 0,5 мг/л). На основании проведенных исследований были установлены некоторые закономерности во всех исследуемых вариантах питательных сред: 1) при увеличении концентрации НУК наблюдается уменьшение коэффициента размножения, 2) при увеличении концентрации НУК повышается скорость роста адвентивных микропобегов, 3) наилучшие результаты по коэффициенту размножения и росту побегов были получены на среде, содержащей БАП или кинетин 1,5 мг/л в сочетании с НУК 0,25 мг/л. В этих вариантах коэффициент размножения в среднем составил 5,96 и 5,56 побега на эксплант, соответственно. В этих вариантах формировались

мощные побеги с ярко зелеными листьями и хорошо развитой корневой системой.

Укоренение микропобегов.

Третий этап клонального микроразмножения – укоренение микропобегов. Это важный этап, на котором формируются корни, что позволяет микроклонам легко переносить адаптацию к условиям *ex vitro* за счет поглощения минеральных солей и воды из почвенного субстрата. Наиболее часто при укоренении микропобегов рода *Amomum* применяют ИМК и НУК, которые представляют собой два гормона из группы ауксинов (Dang et al., 2011; Truong et al., 2017; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018).

Установлено, что присутствие в составе питательной среде исследуемых ауксинов приводило к увеличению выхода укоренившихся микропобегов, среднему количеству корней на один микропобег, а также стимулировало рост корней, что проявлялось в таком важном показателе, как средняя длина корней. Показано, что ИМК проявляла более выраженный эффект на изучаемые показатели, по сравнению с НУК. Экспериментально доказано, что для укоренения микропобегов черного кардамона и пурпурного кардамона целесообразно применять ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л.

Адаптация микроклонов.

Полученные микроклоны черного кардамона и пурпурного кардамона были перенесены на четвертый этап клонального микроразмножения – адаптацию. Все микроклоны перед высадкой в грунт имели в среднем по 3-4 листа и высоту главного побега – 4,0-5,0 см. При адаптации, оценивали влияние субстрата на приживаемость микроклонов к условиям *ex vitro*. Изучали два типа субстрата – биогрунт фирмы Фаско и грунт универсальный фирмы «Gardenstar», которые наиболее часто применяются для выращивания большинства растений. Данные субстраты содержат торф и минеральные удобрения.

Установлено, что из двух изученных вариантов почв, наилучшие результаты по адаптации, а так же по биометрическим показателям растений-регенерантов были получены при выращивании растений в биогрунте фирмы Фаско. В этом варианте средняя выживаемость микроклонов черного кардамона составила 83,3% (через 1 месяц после высадки в почву), а выживаемость пурпурного кардамона - 84,4%, что на 10% выше при использовании грунта универсального фирмы Gardenstar. Однако следует отметить, что в процессе адаптации наблюдали гибель микроклонов в исследуемых субстратах. Через 3 месяца выращивания выживаемость микроклонов черного кардамона составила 48,9%, а выживаемость

пурпурного кардамона составила 63,3%. При использовании грунта универсального фирмы Gardenstar выживаемость была в среднем ниже на 16%. Преимущества биогрунта фирмы Фаско были установлены и по биометрическим показателям микроклонов. В этих условиях растения-регенеранты характеризовались активным ростом и высота побегов у черного кардамона - 31,3 см. Аналогичная тенденция сохранялась и при учете количества листьев на одно растение (Рис. 8).



Рис. 8. Адаптация микроклонов кардамона к условиям *ex vitro*: (А) микроклоны, размноженные *in vitro*;

микроклоны после 1(Б) и 3 (Г) месяцев посадки в биогрунт фирмы Фаско;

микроклоны после 1 (В) и 3 (Д) месяцев посадки в грунт универсальный фирмы Gardenstar

Шкала измерений - 2 см

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ОРГАНОВ *AMOMUM TSAO-KO* И *AMOMUM LONGILIGULARE*

Влияние экстрактов двух видов *Атомит* на морфофизиологические показатели семян разных таксономических групп.

В работе было изучено действие этанольных экстрактов, полученных из разных частей интактных растений изучаемых видов *Атомит* на посевные качества семян (рыжик яровой (*Camelina sativa* Crantz), киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.), капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L. cv. *Dubrava*)), лук (*Allium cepa* L. cv. *Stuttgarter risen*)).

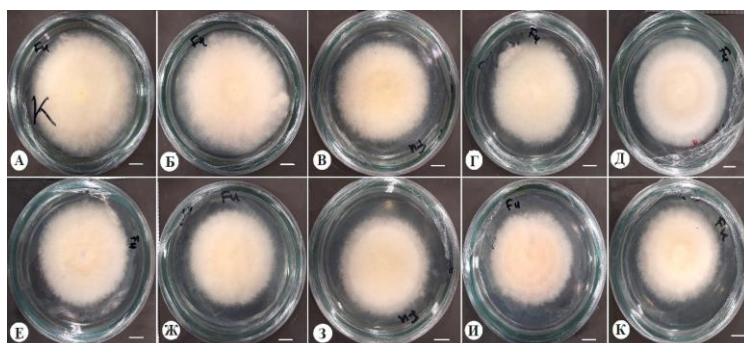
Установлено, что наибольший ингибирующий эффект все изучаемые экстракты проявили на семенах томата и лука и не показали значительного ингибирующего действия на семена рыжика. Была отмечена общая тенденция влияния экстрактов на посевные качества семян: 1) при увеличении концентрации экстрактов с 0,10 до 0,20 мг/мл отмечается увеличение ингибирующей активности их на прорастание семян; 2) исследуемые экстракты в концентрации 0,20 мг/мл оказали самый высокий ингибирующий эффект на прорастание семян тестируемых видов; 3)

наибольшей ингибирующей активностью характеризовались экстракты, полученные из семян.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние различных экстрактов кардамона на морфометрические показатели проростков тестируемых видов сельскохозяйственных культур. Результаты показали, что большинство этанольных экстрактов черного кардамона и пурпурного кардамона ингибировали рост гипокотилия и корня проростков исследуемых культур по сравнению с контролем. Установлено, что с увеличением концентрации экстракта степень ингибирования увеличивалась. Экспериментально доказано, что наибольший ингибирующий эффект проявили все экстракты на семена лука. Другие исследуемые сельскохозяйственные культуры были ранжированы следующим образом: при использовании экстрактов черного кардамона - томат, рыжика, киноа и капуста, при использовании экстрактов пурпурного кардамона - рыжик, киноа, томат и капуста. Следует отметить, что наибольший ингибирующий эффект на рост корней и гипокотилия проростков проявили экстракты, полученные из листьев и семян. Кроме того, корни были более чувствительными к действию экстрактов по сравнению с гипокотилем.

Влияние экстрактов двух видов *Атомит* на рост фитопатогенных грибов *in vitro*.

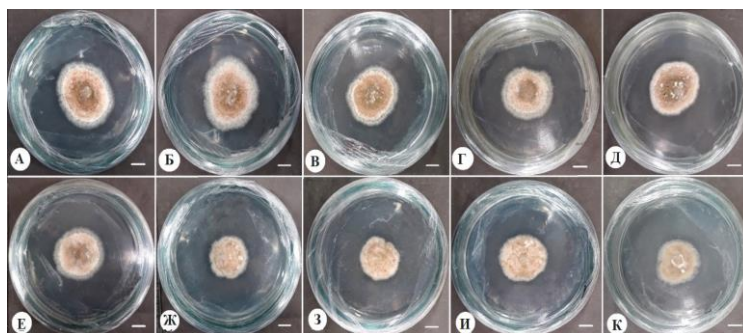
Исследования фунгицидной активности растительных экстрактов, полученных из разных частей кардамона, проводили на чистой культуре грибов *Fusarium oxysporum* и *Helminthosporium sativum*. Отмечена общая тенденция во всех обработках – с увеличением концентрации экстракта усиливалось его действие по отношению к росту колоний исследуемых грибов (Рис. 9). Причем, экстракты пурпурного кардамона показали большее ингибирующее действие на рост гриба *H. sativum*, чем на гриб *F. oxysporum*.



Fusarium oxysporum

Рис. 9 Влияние растительных экстрактов на рост грибов:

- А – Контроль (МС);
- Б – Контроль (МС + ДМСО);
- В – корневище и корень (0,05 мг/мл);
- Г – корневище и корень (0,10 мг/мл);
- Д – псевдопобег (0,05 мг/мл);



Е – псевдопобег (0,10 мг/мл);
 Ж – семена (0,05 мг/мл);
 З – семена (0,10 мг/мл);
 И – лист (0,05 мг/мл);
 К – лист (0,10 мг/мл).

Шкала измерений - 1 см

Helminthosporium sativum

Изученные экстракты оказали различное противогрибковое действие на рост колоний. В порядке убывания противогрибковой активности изученные экстракты расположились следующим образом: семена, листья, корневище + корень и псевдостебель. Максимальный ингибирующий эффект на рост колоний грибов был получен при использовании экстракта семян в концентрации 0,10 мг/мл. Наблюдали снижение роста колоний *F. oxysporum* на 16,4% при использовании экстракта семян черного кардамона и на 28,5% при использовании экстракта семян пурпурного кардамона по сравнению с контролем. Аналогичная тенденция наблюдалась и в исследованиях с *H. sativum*. Рост мицелия *H. sativum* снизился на 29,6% при использовании экстракта семян черного кардамона и на 35,8% при использовании экстракта семян пурпурного кардамона. Кроме того, в этих вариантах наблюдали самый низкий показатель суточной скорости роста (μ) грибов *F. oxysporum* и *H. sativum*.

Таким образом, на основании проведенных исследований следует заключить, что экстракты, полученные из различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона можно использовать в качестве альтернативных препаратов для борьбы с грибными болезнями растений. Это способствует развитию устойчивого органического сельского хозяйства и благоприятно влияет на окружающую среду и здоровье человека.

Содержание фенольных соединений в различных экстрактах двух видов *Atotum*

Различную биологическую активность экстрактов можно объяснить разным составом вторичных метаболитов, в частности веществ фенольной природы. Данное утверждение было подтверждено не только нашими исследованиями, но и исследованиями других авторов (Talibi et al., 2012). Экспериментально установлено, что экстракт из семян, который проявлял самую высокую биологическую активность, имел самое высокое общее содержание фенольных соединений ($2,91 \pm 0,02$ мкг GAE/мг), за которым следовали экстракты листьев ($2,67 \pm 0,02$ мкг GAE/мг), псевдостебля ($1,51 \pm 0,01$ мкг GAE/мг), корневища и корня ($1,21 \pm 0,01$ мкг GAE/мг) (данные приведены по черному кардамону). Что касается экстрактов пурпурного

кардамона, то учитываемые показатели были выше, что еще раз подтверждает их большую активность по сравнению с черным кардамоном (Рис. 10). Экстракт семян пурпурного кардамона имел самое высокое общее содержание фенолов ($4,30 \pm 0,03$ мкг GAE/мг), за которым следовали экстракты листьев ($2,43 \pm 0,02$ мкг GAE/мг), псевдостебля ($1,80 \pm 0,01$ мкг GAE/мг), корневища и корня ($1,63 \pm 0,01$ мкг GAE/мг).

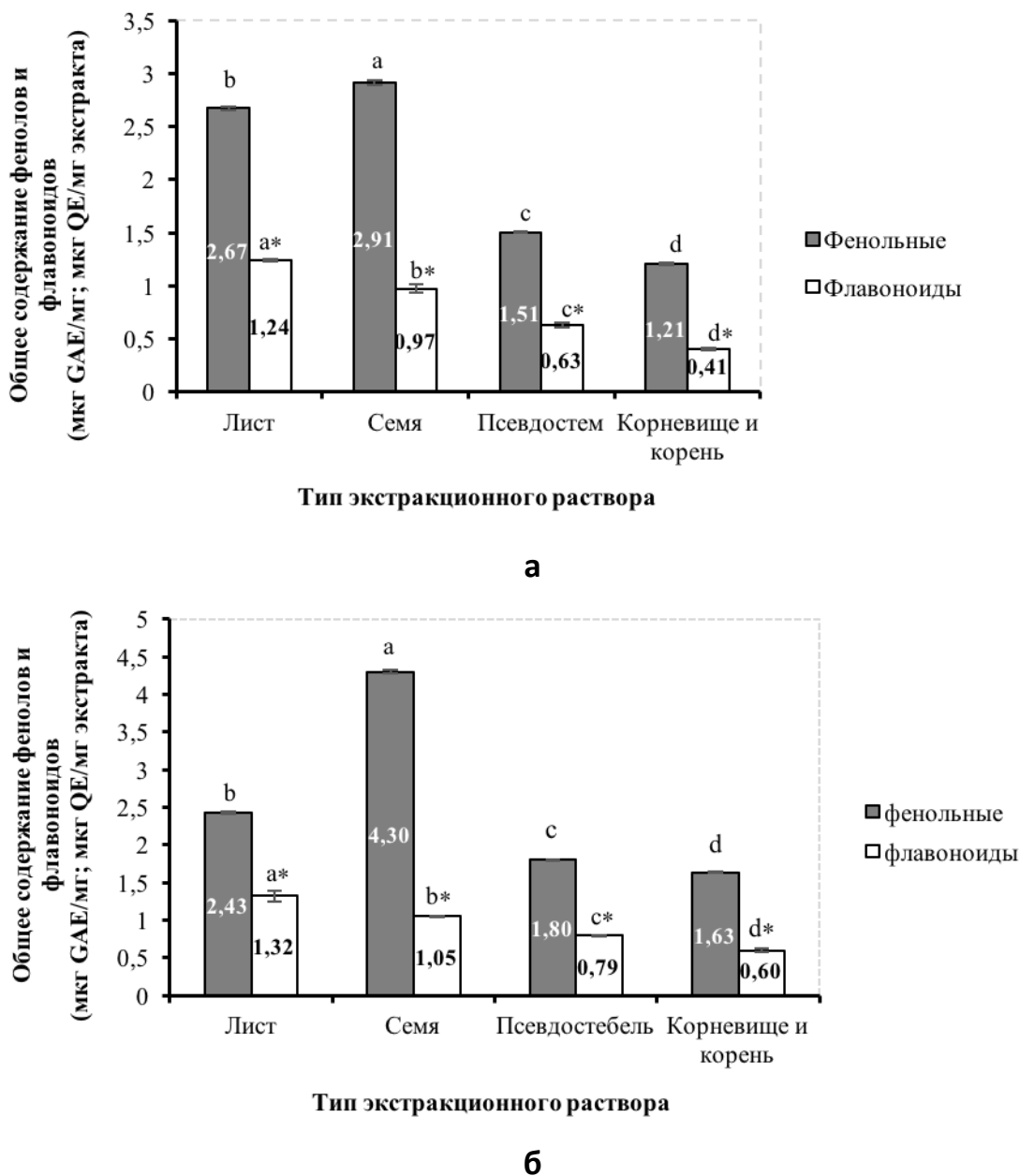


Рис. 10. Общее содержание фенольных соединений и флавоноидов в черном кардамоне (а) и пурпурном кардамоне (б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многоплановых исследований были получены результаты, по которым сделаны следующие выводы:

1. Впервые проведены исследования по изучению морфогенетического потенциала *in vitro* *Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare*, произрастающие во Вьетнаме, установлены биологические особенности их размножения *in vitro* и разработана технология клонального микроразмножения.

2. Впервые проведены исследования морфологических и анатомических характеристик семян *A. tsao-ko* и *A. longiligulare*, а также определены их посевных качеств. Установлено, что для повышения всхожести и получения равномерного прорастания семян целесообразно применять для черного кардамона – механическую скарификацию (надрезы скальпелем), а для пурпурного кардамона – химическую скарификацию (замачивание в 50%-ной HNO_3 в течение 15 мин).

3. Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан протокол получения асептической культуры из семян, а также из подземных частей растения (корневища), содержащих спящие почки. Предлагаемая схема стерилизации (обработка эксплантов 0,1% раствором HgCl_2 в течение 8-10 мин) позволяет получать 51,39-80,0% асептических семян и 18,29–35,6% - асептических корневищ, сохраняя жизнеспособность спящих почек и обеспечивая прорастание семян *in vitro*.

4. Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан эффективный протокол микроразмножения с использованием в качестве экспланта верхушек побегов, которые культивируют на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, дополненной 1,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л НУК (для черного кардамона) и 1,5 мг/л БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (для пурпурного кардамона). В этих условиях коэффициент размножения составляет 5-6.

5. Установлено, что при укоренении микрочеренков целесообразно применять ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л. В этих условиях формируются микроклоны высотой в среднем 5-8 см и средним количеством корней на одно растение 14-16 шт.

6. Впервые изучена биологическая и фунгицидная активность экстрактов, полученных из разных органов *A. tsao-ko* и *A. longiligulare*. Показана их аллелопатическая активность по отношению к проросткам, полученных из семян 5 видов растений (капуста белокочанная, рыжик посевной, томат, киноа, лук), а также 2 видов фитопатогенных грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*). Установлено, что экстракты, полученные из семян *A.*

tsao-ko и *A. longiligulare* обладают большей биологической и фунгицидной активностью.

7. Экспериментально установлено, что суммарное содержание фенольных соединений в изучаемых экстрактах *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* различно. Показано, что в экстрактах, полученных из семян, суммарное содержание фенольных соединений было наибольшим и составило $4,30 \pm 0,03$ мкг ГАЕ/мг для пурпурного кардамона и $2,91 \pm 0,02$ мкг ГАЕ/мг для черного кардамона. Остальные экстракты по активности можно ранжировать следующим образом: листья, псевдостебли, корневища и корни.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные и в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Кухат, К.В.** Фунгицидная активность экстрактов, полученных из разных органов *Amomum tsao-ko in vitro* / **К.В. Кухат**, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян // Естественные и технические науки. – 2022. – Vol. 3(166). – P. 45–48.
2. **Кухат, К.В.** Экспериментальный морфогенез *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié в культуре *in vitro* / **К.В. Кухат**, Х.Т. Нгуен, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Vol. 25(7). – P. 48–59.
3. Kalasnikova, E.A. Effect of plant growth regulators on *in vitro* plant regeneration of purple amomum (*Amomum longiligulare* T.L. Wu.) / E.A. Kalasnikova, **Q.V. Khuat**, R.N. Kirakosyan // Russian Journal of Plant Physiology. – 2022. – Vol. 69(7). – P. 168.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

4. **Khuat, Q.V.** Plant regeneration of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié *in vitro* / **Q.V. Khuat**, N.T. Hai, N.T.L. Hai, P.T.T. Hang, R.N. Kirakosya, E.A. Kalashnikova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 677(4). – P. 042065 (**Scopus**).
5. **Khuat, Q.V.** *In vitro* germination of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié seeds / **Q.V. Khuat**, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan, N.T. Hai // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 848(1). – P. 012207 (**Scopus**).
6. **Khuat, Q.V.** Improvement of *in vitro* seed germination and micropropagation of *Amomum tsao-ko* (Zingiberaceae Lindl.) / **Q.V. Khuat**, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan, H.T. Nguyen, E.N. Baranova, M.R. Khaliluev, // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8. – P. 640 (**Scopus, WoS**).

7. **Khuat, Q.V.** Antifungal activity of black cardamom (*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemairé) plant extracts against *Fusarium oxysporum* Schlechtend and their prospect of developing fungicide for sustainable agricultural production / **Q.V. Khuat**, E.A. Kalashnikova, H.T. Nguyen, O.Y. Slovareva, R.N. Kirakosyan // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2022. – Vol. 1112(1). – P. 012103 (**Scopus**).

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях:

8. **Кухат, К.В.** Влияние условий культивирования на размножение *Amomum aromaticum* Roxb. *in vitro* / **К.В. Кухат**, Х.Т. Нгуен, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян // XX Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». – 2020. – С. 67.

9. **Кухат, К.В.** Размножение *Amomum aromaticum* Roxb. в условиях *in vitro* / **К.В. Кухат**, Х.Т. Нгуен, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян // Всероссийской научной конференции с международным участием «Растениеводство и Луговое хозяйство». – 2020. – С. 171–174.

10. **Khuat, V.Q.** Introduction to *in vitro* culture of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié seeds / **V.Q. Khuat**, E.A. Kalashnikova, R.N. Kirakosyan, T.H. Nguyen // XXI Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». – 2021. – С. 124.

11. Калашникова, Е.А. Введение в культуру *in vitro* семян *Amomum aromaticum* / Е.А. Калашникова, **В.К. Кухат**, Р.Н. Киракосян // В сборнике: ДОКЛАДЫ ТСХА. Сборник статей. – 2021. – С. 71–74.

12. **Кухат, К.В.** Общее содержание фенольных соединений в *Amomum longiligulare* T.L.Wu и *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié, собранных во Вьетнаме, / **К.В. Кухат**, Е.А. Калашникова, Р.Н. Киракосян // "Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты" XI Международный симпозиум и школа молодых ученых. – 2022. – С. 124.

13. **Кухат, В.К.** Технология клонального микроразмножения *Amomum longiligulare* / **В.К. Кухат**, Р.Н. Киракосян // В сборнике: Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова. Сборник статей. – 2022. – С. 312–316.

14. Kalasnikova, E.A., Antifungal activity of purple amomum (*Amomum longiligulare* T.L. Wu) plant extracts against *Fusarium oxysporum* Schlecht. and *Helminthosporium sativum* P. K. & B. / E.A. Kalasnikova, R.N. Kirakosyan, **V.Q. Khuat**, M.T. Ha, T.H. Nguyen // Journal of Science – HPU2. – 2022. – Vol. 1(2). – P. 52–62.