

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева»

На правах рукописи

КХУАТ ВАН КУЕТ

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

Специальность: 1.5.6 – Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
КАЛАШНИКОВА Елена Анатольевна
доктор биологических наук, профессор

Москва – 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,4-Д	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
БАП	6-бензиламинопурин
ГК	гибберелловая кислота
ДМСО	диметилсульфоксид
ИМК	индолил-3-масляная кислота
кин	6-фурфуриламинопурин (кинетин)
ЛПС	липополисахарид
МС	питательная среда Мурасиге и Скуга
НУК	α -нафтилуксусная кислота
ОП	оптическая плотность
ЭМ	эфирное масло
AP	alternative pathway, альтернативный путь
CP	classical pathway, классический путь
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
FRAP	ferric reducing antioxidant power assay, тест на восстановительную антиоксидантную силу железа
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry, газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МС)
GP	Germination percentage, процент всхожести
GRI	Germination rate index, Индекс скорости прорастания
HPLC	high performance liquid chromatography, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)
HSCCC	high-speed counter-current chromatography, высокоэффективная противоточная хроматография (ВЭПТХ)
MGT	Mean germination time, Среднее время прорастания
MIC	minimum inhibitory concentration, минимальная ингибирующая концентрация
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, 3-

	(4,5-диметилтиазол-2-ил) -2,5-дифенил-тетразолиум бромид
PGRs	Plant growth regulators, регуляторы роста растений
TBA	thiobarbituric acid test, тиобарбитуровая кислота
TFC	total flavonoid content, суммарное содержание флавоноидов (ССФ)
TPC	total phenolic content, суммарное содержание фенольных соединений (ССФС)
SEM	scanning electron microscopy, сканирующая электронная микроскопия
UV-Vis	ultraviolet-visible spectroscopy, оптическая спектроскопия

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Морфо-физиологическое описание растений рода <i>Amomum</i>	12
1.1.1 <i>Amomum tsao-ko</i> Crevost & Lemarié	12
1.1.2 <i>Amomum longiligulare</i> T.L. Wu.	15
1.2 Фитохимия и биологическая активность <i>Amomum tsao-ko</i> Crevost & Lemarié и <i>Amomum longiligulare</i> T.L. Wu	18
1.2.1 Черный кардамон (<i>Amomum tsao-ko</i> Crevost & Lemarié) ...	18
1.2.2 Пурпурный кардамон (<i>Amomum longiligulare</i> T.L. Wu)	25
1.3 Изучение <i>Amomum tsao-ko</i> Crevost & Lemarié и <i>Amomum longiligulare</i> T.L. Wu. <i>in vitro</i>	29
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	32
2.1 Объект исследования	32
2.2 Методы исследований	33
2.2.1 Введение в культуру <i>in vitro</i> семян	33
2.2.2 Введение в культуру <i>in vitro</i> корневищ	37
2.2.3 Влияние питательной среды на микроразмножение	38
2.2.4 Укоренение и адаптация микроклонов	39
2.2.5 Условия выращивания <i>in vitro</i> <i>A. tsao-ko</i> Crevost & Lemarié и <i>A. longiligulare</i> T.L. Wu.	41
2.2.6 Получение растительных экстрактов и определение их биологической активности	42
2.2.7 Определение суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов	50
2.2.8 Проведение микроскопических исследований семян	51
2.3 Статистическая обработка результатов эксперимента	51
ГЛАВА 3 ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> ПЕРВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ <i>AMOMUM TSAO-KO</i> И <i>AMOMUM LONGILIGULARE</i>	52
3.1 Получение стерильной культуры <i>A. tsao-ko</i>	52
3.1.1 Введение в культуру <i>in vitro</i> семян	52
3.1.2 Введение в культуру <i>in vitro</i> корневищ	63
3.2 Получение стерильной культуры <i>A. Longiligulare</i>	65
3.2.1 Введение в культуру <i>in vitro</i> семян	65
3.2.2 Введение в культуру <i>in vitro</i> корневищ	76
ГЛАВА 4 ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ И УКОРЕНЕНИЯ <i>AMOMUM TSAO-KO</i> И <i>AMOMUM LONGILIGULARE</i> В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	80

4.1 Размножение и укоренение <i>Atomum tsao-ko</i> в культуре <i>in vitro</i>	80
4.1.1 Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение <i>A. tsao-ko in vitro</i>	80
4.1.2 Укоренение микропобегов <i>A. tsao-ko in vitro</i>	86
4.1.3 Адаптация микроклонов <i>A. tsao-ko ex vitro</i>	88
4.2 Размножения и укоренения <i>Atomum longiligulare</i> в культуре <i>in vitro</i>	91
4.2.1 Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение <i>A. longiligulare in vitro</i>	91
4.2.2 Укоренение микропобегов <i>A. longiligulare in vitro</i>	97
4.2.3 Адаптация микроклонов <i>A. longiligulare ex vitro</i>	99
ГЛАВА 5 БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ОРГАНОВ АМОМУМ ТСАО-КО И АМОМУМ ЛОНГИЛИГУЛАРЕ	102
5.1 Влияние экстрактов двух видов <i>Atomum</i> на морфофизиологические показатели семян разных таксономических групп	102
5.1.1 Экстракты, полученные из <i>Atomum tsao-ko</i>	102
5.1.2 Экстракты, полученные из <i>Atomum longiligulare</i>	115
5.2 Влияние экстрактов двух видов <i>Atomum</i> на рост фитопатогенных грибов <i>in vitro</i>	131
5.2.1 Экстракты, полученные из <i>Atomum tsao-ko</i>	131
5.1.2 Экстракты, полученные из <i>Atomum longiligulare</i>	143
5.3 Содержание фенольных соединений в различных экстрактах двух видов <i>Atomum</i>	151
5.3.1 Содержание фенольных соединений в экстрактах <i>Atomum tsao-ko</i>	151
5.3.2 Содержание фенольных соединений в экстрактах <i>Atomum longiligulare</i>	153
Заключение.....	158
Список литературы	160

ВВЕДЕНИЕ

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 *Atomium* 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 *Atomium*. Сейчас используется название *Atomium* Roxb. В 1810 году именно Роксбург определил *Atomium* по его лабеллуму, пыльнику и плодам (Lamxay, Newman, 2012).

Особого внимания заслуживают черный кардамон (*Atomium tsao-ko* Crevost & Lemarié) и пурпурный кардамон (*Atomium longiligulare* T.L. Wu.) – входящие в состав 188 видов *Atomium*. 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, Джаи 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 лекарственным растением с прекрасным экспортным потенциалом. В традиционной медицине семена черного кардамона и пурпурного кардамона 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 *Atomum*, 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 *Atomum* 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 *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu;

- установить оптимальные условия предобработки семян *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum 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 *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu к условиям *ex vitro*;

- получить растительные экстракты из различных органов интактных растений *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum 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 *Atomum* (*Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum 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 HNO_3 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 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*.

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.

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 *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum 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 вида 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 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 корня.

Практическая значимость. Предложенная технология культивирования *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum 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 *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu. Объектом исследования является черный кардамон (*Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié) и пурпурный кардамон (*Atomum 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, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова (Москва, 2022)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 4 статьи в международных изданиях (Scopus, и Web of Science).

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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Морфо-физиологическое описание растений рода *Atomium*

1.1.1 *Atomium tsao-ko* Crevost & Lemarié

Atomium tsao-ko Crevost & Lemarié (кардамон черный) - растение, которое в народе называют «Кардамон» или «Do-ho». Оно широко распространено в провинциях Ха Джианг, Лао Кай, и Лай Чау во Вьетнаме (Pham, 2000; Nguyen, 2005, 2017).

Кардамон черный вырастает до 2-3 м высотой, имеет 4-12 псевдостеблей в кусте, корневище крупное, беловатое, в процессе роста и развития становятся светло-коричневое. Листья зеленые, язычок цельный, яйцевидной формы, длиной 0,6-1,2 см; лезвие сидячее или длинное, оттянутое, продолговатое, голое с обеих сторон. Соцветие, возникающее у основания побега, включает в себя около 2-4 соцветий на побеге. Соцветия имеют длину около 20 см, а в каждом соцветии 5-25 цветков. Чашечка трубчатая, 3-зубчатая, красновато-бела. Венчик трубчатый, желтоватый, лабеллум длиной 1,5-3,2 см, желтый, на вершине складчатый. Пыльник соединительно-отросток 3-лопастный. Капсула красная, сохнувшая коричневая, продольно-исчерченная, продолговатая или эллиптическая, голая (Wu, Larsen, 2000; Lamxay, Newman, 2012) (Рис. 1.1).

Кардамон черный - особенно тенелюбивый, влаголюбивый вид, поэтому выращивать его можно только под пологом леса, на высоте 1300-2200 м, при средней годовой температуре 13-15,3 °С, где обычно частые туманы и годовое количество осадков 3500-3800 мм, а влажность воздуха более 90% (Nguyen, 2017; Hoat, Thuan, 2005; Thom, Lai, To, 2006; Hai, 2013). Таким образом, он распространен и его культивируют на высоких территориях с влажной почвой, богатой гумусом, и в полутени вечнозеленых лесов, принадлежащих северной средней полосе и гористой местности Вьетнама (провинции Лай Чау, Лао Кай, Йен Бай, Ха Джианг, Туен Куанг, и Као Банг). Кроме того, черный кардамон

также выращивают в Китае (провинция Юньнань) и Лаосе (провинция Пхонгсали) (Pham, 2000; Nguyen, 2005; Lamxay, Newman, 2012).



Рис. 1.1. *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié: (А) лес черного кардамона; (Б) однолетний саженец; (В) побеги соцветий; (Г–Д) распустившиеся соцветия; (Е) свежие капсулы; (Ж–З) сушеные капсулы (провинция Лай Чау, Вьетнам, фото Ма А Чанга, 2020 г.)

Растение обладает очень характерным ароматом и вкусом, что позволяет его широко использовать в качестве ароматизатора и пряного ингредиента во многих традиционных вьетнамских блюдах, например, вьетнамская лапша из говядины, куриное травяное блюдо, тушеное мясо с овощами и т.д. Кроме того, семена черного кардамона (*Amomum tsao-ko*) вьетнамского происхождения богаты эфирным маслом, содержание которого составляет 1-1,4% от сухого веса. Основными компонентами эфирного масла кардамона являются 1,8-цинеол (30,6%), 2-деценан (17,3%), гераниаль (10,6%) и нераль (7,0%) (Dung, Viê, Leclercq, 1992).

В настоящее время серия исследований показала, что эфирные масла, дитерпеноиды, диарилгептаноиды, флавоноиды, бициклические нонаны и фенольные соединения являются основными химическими составляющими черного кардамона (Peng, Ma, Zhang, 2006; Yang et al., 2008; Sabulal, Baby, 2021). Кроме того, в недавних исследованиях сообщалось об антиоксидантной, антипролиферативной, противогрибковой, противомикробной, нейропротекторной, противовоспалительной и липазно-ингибирующей активности эфирного масла, экстрагированного из ароматных стручков семян черного кардамона (Qiu et al, 1999; Yang et al., 2010; Li et al., 2011; Zhang, Lu, Jiang, 2015). Во Вьетнамской традиционной медицине сушеный черный кардамон используется для лечения диспепсии, тошноты, малярии, неприятного запаха изо рта, инфекций и т. д. (Nguyen, 2017; Loi, 2001; Moi, 2002). Благодаря этим ценностям черный кардамон стал одной из основных культур жителей северных средних и горных районов Вьетнама.

Ареал выращивания черного кардамона постоянно расширяется. Китай - главный экспортный рынок вьетнамского кардамона. Ежегодно провинция Лаокай экспортирует в Китай ок. 4000 тонн сушеного черного кардамона, что дает экономическую ценность более 500 миллиардов донгов (Moi, 2002; Нao, 2020). Однако за последние два года из-за воздействия эпидемии Covid-19 экспорт черного кардамона сильно пострадал.

Во Вьетнаме сушеный кардамон часто покупают китайские торговцы по цене от 110 000 до 130 000 донгов за кг. Из-за высокой экономической ценности кардамона посевные площади этого растения быстро увеличиваются с годами, но в основном увеличение площадей происходит спонтанно из-за низкого урожая и качества получаемой продукции.

Кардамон в основном размножается семенами и сегментами корневища. Эти способы имеют как свои преимущества, так и недостатки. Например, по опыту местных жителей Вьетнама установлено, что растения, которые вырастают из семян, имеют более высокий урожай, хорошее качество плодов и такие растения долговечны, чем растения, полученные из сегментов корневища.

Поэтому в настоящее время местные жители в основном используют саженцы, полученные из семян. Однако из-за твердой кожуры семена имеют низкий потенциал прорастания. Кроме того, начало формирования плодов у растений полученных из семян, на 1-2 года дольше, чем у растений, полученных из корневищ. Растения, выращенные из сегментов корневища, восприимчивы к заболеваниям, вызываемым вирусами, грибами или бактериями, они часто дают более низкий урожай и качество плодов, чем растения, выращенные из семян. Таким образом, эти методы имеют ограничения и не отвечают потребностям производства. Решить эту проблему можно путем выращивания элитных сортов, полученных путем клонального микроразмножения *in vitro*.

1.1.2 *Amomum longiligulare* T.L. Wu.

Пурпурный кардамон (*Amomum longiligulare* T.L. Wu), относящийся к семейству Имбирные (Zingiberaceae), является ценным лекарственным растением во Вьетнаме (Nguyen, 1999; Lamxay, Newman, 2012; Lim, 2013). Плоды кардамона содержат эфирные масла со многими ценными химическими соединениями, такими как камфен, β -пинен, лимонен, камфара; борнеол и сапонины (Nguyen et al., 1994; Chau et al., 2015; Anh et al., 2020; Sabulal, Baby, 2021). Эфирное масло амомума обладает антибактериальным, противогрибковым, активирующим действие на макрофаги и укрепляющим иммунитет действием (Do et al., 1994; Do, 2001; Chau et al., 2015; Anh et al., 2020; Sabulal, Baby, 2021; Zhou et al., 2021; Zhu et al., 2021).

Во вьетнамской традиционной медицине сушеный пурпурный кардамон используют для лечения мастопатии у беременных женщин, диареи, расстройства желудка, рвоты, болей в животе, зубной боли, онемии и т.д. (Loi, 2001; Nguyen, 1999, 2017; Lamxay, Newman, 2012; Lim, 2013). Кроме того, его плоды не только широко используются в медицине, но и часто используются в качестве приправы. Он известен как третья по дороговизне специя в мире после шафрана и ванили (Do, 2005). Пурпурный кардамон распространен в Китае (провинции Гуандун и

Хайнань), Таиланде, Лаосе и Вьетнаме. Во Вьетнаме пурпурный кардамон выращивают в основном в провинциях Центрального нагорья (таких как провинции Дак Лак, Джиа Лай, Бинь Динь, Фу Йен, и Куанг Нгай). Здесь их часто сажают вместе с белым амомумом (*Atomium villosum* Lour.) под пологом леса. Между тем, в северных провинциях (таких как провинции Фу Тхо, Тхай Бинь, Хоа Бинь, Хай Дуонг, Лай Чау, и Ха Джианг) он растет в небольших количествах в диком состоянии (Pham, 2000; Nguyen, 2005, 2017; Lamxay, Newman, 2012).

Пурпурный кардамон - тропическое теневыносливое дерево, живущее под пологом леса с кроной около 0,5-0,6 м. Для него подходящая среднегодовая температура 22-28°C. Это многолетнее травянистое растение с крепкими корневищами, распространяющееся под гумусом почвы или над землей. Высота растения около 1,5-3,0 м. Его листья зеленые, гладкие, узкоэллиптические или ланцетные, примерно 30-45 см в длину и 4-6 см в ширину. Соцветие колосовидное, возвышающееся примерно на 20 см от основания зрелых побегов или примерно на 5-10 см от основания новых побегов. Растение имеет 5-25-цветков, белого цвета. Плод яйцевидный, красно-коричневого цвета в молодом возрасте и пурпурно-коричневого цвета в зрелом возрасте. Кожура плода имеет мягкие слоистые шипики длиной до 1 мм (Рис. 1.2). Пурпурный кардамон похож на *A. villosum* Lour. и *A. uliginosum* J. Koenig, которые также являются раскидистыми растениями с гладкими листьями. Растения имеют короткие соцветия с продолговато-ланцетными, лодочковидными прицветниками, цветки белые с желтой центральной полосой на лепестках. Пурпурный кардамон отличается от обоих этих видов своей высотой (Pham, 2000; Wu, Larsen, 2000; Nguyen, 2005, 2017; Lamxay, Newman, 2012; Gao et al., 2022).



Рис. 1.2. Растения пурпурного амомума (*Amomum longiligulare* T.L. Wu) в провинции Ха Джианг, Вьетнам. (А–Б) растения пурпурного амомума и среда его произрастания; (В) корневища; (Г) язычки; (Д) лопасти; (Е–Ж) распустившиеся соцветия; (З) молодые капсулы; (И) зрелые капсулы; (К) высушенные капсулы (Фото Туонг Н. Д., 2020 год)

В последние годы, помимо внутреннего рынка, пурпурный кардамон экспортировали в зарубежные страны с объемом производства около 1000 тонн в год, экспортной стоимостью около 10 миллионов долларов США в год, из которых Китай является основным экспортным рынком. При закупочной цене в саду около 15-20 долларов США/кг сухофруктов, в среднем, 1 гектар пурпурного кардамона принесет людям от 750 до 1200 долларов США (Nguyen, 1999; Do, 2001). Обладая такой экономической ценностью, пурпурный кардамон считается

“деревом сокращения бедности” этнических меньшинств во многих северных горных провинциях Вьетнама (таких как провинции Лао Кай, Хоа Бинь, Йен Бай, и Ха Джианг).

На самом деле, местные жители обычно используют семена (половое размножение) или корневища (бесполое размножение) здоровых растений для размножения пурпурного кардамона (Nguyen, 1999; Do, 2001). Однако оба метода имеют ограничения при применении к крупномасштабному производству. Плоды пурпурного кардамона имеют много семян, но получение многочисленных саженцев обходится дорого. Похожий на черный кардамон, семена пурпурного кардамона имеют низкую скорость естественного прорастания, что является причиной, указанной местными жителями. С другой стороны, если при семенном размножении время выращивания от проростков до коммерческих растений, дающих цветы и плоды, обычно занимает от 4 до 5 лет, то при корневищном размножении это занимает всего 2-3 года. Однако этот метод всегда дает более низкий урожай и качество плодов по сравнению с растениями, выращенными из семян, поскольку сегменты корневища восприимчивы к вирусным, грибковым и бактериальным заболеваниям. Кроме того, разрушительный сбор корневищ для бесполого размножения приводит к потере материнского растения. Поэтому задача состоит в том, чтобы найти способ размножения, для получения высококачественного, здорового от болезней посадочного материала пурпурного амомума, не влияя при этом на экосистему естественного леса. Применение методов размножения растений *in vitro*, благодаря его преимуществам, действительно стало необходимым решением в селекции сельскохозяйственных культур в целом и пурпурного кардамона в частности.

1.2 Фитохимия и биологическая активность *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu

1.2.1 Черный кардамон (*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié)

Фитохимические вещества являются основой лекарственных растений, а также важным резервуаром для разработки лекарств-кандидатов. В 1970-х годах были проведены исследования фитохимических веществ *A. tsao-ko*, в результате которых было идентифицировано более 250 мономерных соединений (Pu et al., 2022; Yang et al., 2022). Такие химические компоненты в основном включают терпены, диарилгептаноиды, флавоноиды, фенольные кислоты, алифатические соединения и т.д. (Pu et al., 2022; Yang et al., 2022).

Терпены в основном содержатся в летучем масле, добываемом из плодов *A. tsao-ko* в низких концентрациях (Sim et al., 2019; Pu et al., 2022; Yang et al., 2022). Терпены в составе *A. tsao-ko* представлены в основном монотерпеноидами (более 40 соединений), сесквитерпеноидами (3 соединения), дитерпеноидами (6 соединений) и тритерпеноидами (включая β -ситостерин и даукостерин) (Martin et al., 2000; Kikuzaki et al., 2004; Peng et al., 2006; Lee et al., 2008; Yang et al., 2009; Song, 2013; Hong et al., 2015; Liu et al., 2018, 2020; Sun et al., 2018; Hong et al., 2021; Jin et al., 2022). Диарилгептаноидные соединения, которые характеризуются одним 1,7-дифенилгептановым скелетом, также были основными соединениями, выделенными из плодов *A. tsao-ko*. На сегодняшний день из *A. tsao-ko* выделено и идентифицировано 49 диарилгептаноидов, включая 23 линейных диарилгептаноида и 26 циклических диарилгептаноидов (Moon et al., 2005; Zhang et al., 2015; Lee et al., 2008; Kim et al., 2019a; He et al., 2020a, 2020b).

Флавоноиды и фенольные кислоты, соединения с высокой биологической активностью и содержанием, широко обнаружены в корнях, плодах, листьях и коре растений *A. tsao-ko*. На сегодняшний день в *A. tsao-ko* выделено и идентифицировано 77 флавоноидов (включая 11 флавонов, 4 флавонола и их соответствующие гликозилированные производные, 5 флаванонов, 13 халконов и 42 флавана) и 47 фенольных кислот (Song, 2003; Lee et al., 2008; Wang et al., 2009; Kim et al., 2019b). Кроме того, *A. tsao-ko* также содержит простые алифатики, в основном в составе летучего масла. В настоящее время в растительном препарате выделено более 25 алифатических веществ, которые относятся к 4 классам, включая жирные кислоты (Liu et al., 2018, 2020; Lee et al., 2019), алифатические

альдегиды (Yang et al., 2009), алифатические спирты (Yang et al., 2009; Kim et al., 2016; Lee et al., 2019) и алифатические эфиры (Hong et al., 2015; Lee et al., 2019).

Помимо вышеупомянутых соединений, в *A. tsao-ko* существуют дополнительные компоненты, такие как один кумарин, фенилэтанонидный гликозид, пиррол-2-карбоновая кислота (Wang et al., 2009; Hong et al., 2015; Liu et al., 2020).

Биологическая активность эфирного масла (ЭМ), экстрактов и выделенных соединений *A. tsao-ko* (в основном из плодов) была изучена несколькими исследовательскими группами (Pu et al., 2022; Yang et al., 2022). Большинство биоактивных свойств оценивалось в экспериментах *in vitro*, включая антибиотическую, противоопухолевую, противораковую, противовоспалительную, антидиабетическую, нейропротекторную и снижающую триацилглицерол активность плазмы и печени. В то же время, в этих исследованиях авторы также определили группы соединений, которые играют основную роль в биологической активности (Табл. 1.1).

Антибиотическая активность. Как этанольные, так и этилацетатные экстракты плодов *A. tsao-ko* показали ингибирующую активность против *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Klebsiella pneumonia*, грамотрицательной бактерии, вызывающей пневмонию с высокой заболеваемостью и смертностью (Rahman et al., 2017; Liu et al., 2018).

Эфирное масло *A. tsao-ko* также проявило антибиотическую активность *in vitro*. Оно оказывало ингибирующее действие на широкий спектр микроорганизмов, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии, такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, и *Pseudomonas aeruginosa*, с минимальной ингибирующей концентрацией (МИС) от 22,49 до 1438,91 $\mu\text{g}/\text{мл}$ (Dai et al., 2016b). Эфирное масло *A. tsao-ko* обладало значительной токсичностью в отношении насекомых-хранителей продуктов, *Tribolium castaneum* и *Lasioderma serricorne* (Wang et al. 2014). Эксперимент *in vivo* также показал, что эфирное масло *A. tsao-ko* обладает антибиотической активностью. При внутримышечном введении 0,92 г/кг/д эфирное масло *A. tsao-ko* могло защитить мышей от

инфекции *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli*, показав 100% выживаемость (Dai et al., 2016b).

Таблица 1.1

Соединения с подтвержденной биологической активностью из *A. tsao-ko* (Yang et al., 2022)

Виды биологической активности	Соединения, выделенные и идентифицированные из <i>A. tsao-ko</i>	Источники
Антибиотическая активность	Монотерпеноиды (Лимонен; Гераниол; 1,8-цинеол; Изотсаокоин), Дитерпеноиды (Коронадиен), Фенольные кислоты (Ванилиновая кислота; 3-О-метилгалловая кислота; 3,4-дигидроксибензойная кислота), жирные кислоты ((2E,7Z,10Z,13Z)-гексадека-2,7,10,13-тетраеновая кислота; (2E,7Z)-тетрадека-2,7-диеновая кислота; (E)-додек-2-еновая кислота; (E)-тетрадек-2-еновая кислота).	Martin et al. (2000); Moon et al. (2004); Wang et al. (2009, 2014); Dai et al. (2016a, b); Choi et al. (2018); Liu et al. (2018); Lee et al. (2019).
Противовоспалительная активность	Монотерпеноиды (8-оксогераниол; п-мент-1-ен-5,6-диол; 3α-гидроксикарвотагенон; цаокоин; изоцаокоин; 6-гидроксииндан-4-карбальдегид; 6,7-дигидроксииндан-4-карбальдегид), Фенольные кислоты ((-)-катехин; (+)-эпикатехин), Флавоноиды (Геранилированные пиранофлаваноны; Фарнезилированные пиранофлаваноны; 2',4',6'-тригидрокси-4-метоксихалкон; бозенбергин В; 4-гидроксибозенбергин В; фарнезилированные пиранохалконы), диарилгептаноиды ((+)-ганнокинол; мезоганнокинол; цаокоарилон; ганнокенин), жирные кислоты (6,7-дигидрокси-3,7-диметилокт-2-еновая кислота), алифатические спирты (2,8-декадиен-1,10-диол).	Martin et al. (2000); Moon et al. (2004); Lee et al. (2008); Yang et al. (2009); Jin et al. (2013); Zhang et al. (2014); Kim et al. (2016; 2019a, b); Choi et al. (2018); Liu et al. (2018); He et al. (2021).
Противоопухолевая и противораковая активность	Монотерпеноиды (8-гидрокси-2,6-диметил-1,6-октадиен-3-он; Изотсаокоин), Фенольные кислоты (2,6-диметокси-4-[(1R)-1-метоксиэтил]-фенол; 2,6-диметокси-4-[(1R)-1-метоксипропил]-фенол; 2,6-диметокси-4-метил-фенол; 2,6-диметокси-4-(метоксиметил)-фенол; 2,6-диметокси-4-(2-пропен-1-ил)-фенол; 4-гидрокси-3-метокси-бензальдегид; 3,4-диметокси-бензойная кислота), диарилгептаноиды ((+)-ганнокинол), жирные кислоты ((E)-додек-2-еновая кислота), алифатические спирты ((2E,8E)-	Martin et al. (2000); Moon et al. (2004); Lee et al. (2008, 2019); Choi et al. (2018); Liu et al. (2018).

Виды биологической активности	Соединения, выделенные и идентифицированные из <i>A. tsao-ko</i>	Источники
	2,8-декадиен-1,10-диол; 1-ацетат 2,8-декадиен-10-ола; (2E)-1-ацетат 2-додецен-1-ола).	
Противоопухолевая и противораковая активность	Монотерпеноиды (8-гидрокси-2,6-диметил-1,6-октадиен-3-он; Изотсаокоин), Фенольные кислоты (2,6-диметокси-4-[(1R)-1-метоксиэтил]-фенол; 2,6-диметокси-4-[(1R)-1-метоксипропил]-фенол; 2,6-диметокси-4-метил-фенол; 2,6-диметокси-4-(метоксиметил)-фенол; 2,6-диметокси-4-(2-пропен-1-ил)-фенол; 4-гидрокси-3-метокси-бензальдегид; 3,4-диметокси-бензойная кислота), диарилгептаноиды ((+)-ганнокинол), жирные кислоты ((E)-додек-2-еновая кислота), алифатические спирты ((2E,8E)-2,8-декадиен-1,10-диол; 1-ацетат 2,8-декадиен-10-ола; (2E)-1-ацетат 2-додецен-1-ола).	Martin et al. (2000); Moon et al. (2004); Lee et al. (2008, 2019); Choi et al. (2018); Liu et al. (2018).
Антиоксидантная активность	Фенольные кислоты (протокатехуальдегид; ванилиновая кислота; 3-О-метилгалловая кислота; 3,4-дигидроксибензойная кислота; 2,6-диметокси-фенол), Флавоноиды ((-)-катехин; (+)-эпикатехин), диарилгептаноиды ((+)-ганнокинол; мезо-ганнокинол), жирные кислоты ((2E,7Z,10Z,13Z)-гексадека-2,7,10,13-тетраеновая кислота).	Martin et al. (2000); Lee et al. (2008, 2019); Wang et al. (2009); Jin et al. (2013); Zhang et al. (2014); Choi et al. (2018); Liu et al. (2018); He et al. (2020a, 2021).
Антидиабетическая активность	Флавоноиды ((+)-афзелехин; бразилин; проантоцианидин А-2), флаванол-ментановые конъюгаты (Амомуцаокин А; В; С; Е; F; G; H), гибриды флаванола с жирными спиртами (Цаокофлаванол А; В; F; J; K; L; R; S), флаванол-монотерпеноидные гибриды (цаокол А; В), диарилгептаноиды (цаокопиранол А; В; D; E; F; H; I; J; K; феогептаноксид; энгельгептаноксид С).	He et al. (2020a, 2020b, 2021).
Липидоснижающая активность	Жирные кислоты ((2E,7Z,10Z,13Z)-гексадека-2,7,10,13-тетраеновая кислота; (2E,7Z)-тетрадека-2,7-диеновая кислота; (2E)-2-додеценовая кислота; (2E)-2-тетрадеценовая кислота).	Liu et al. (2018); Lee et al. (2019).

Виды биологической активности	Соединения, выделенные и идентифицированные из <i>A. tsao-ko</i>	Источники
Нейропротекторная активность	Фенольные кислоты (кверцетин), диарилгептаноиды (2,3-дигидро-2-(4'-гидрокси-фенилэтил)-6-[(3",4"-дигидрокси-5"-метокси)фенил]-4-пирон; 4-дигидро-2-(4'-гидрокси-фенилметил)-6-[(3",4"-дигидрокси-5"-метоксифенил)метилен]-пиран-3,5-дион).	Zhang et al. (2014, 2015, 2016).
Антикомплементарная активность	Фенольная кислота (гидрохинон), диарилгептаноид (1,7-бис(4-гидроксифенил)-3-гептен-5-он (1,7-бис(4-гидроксифенил)-4(Е)-гептен-3-он)).	Jin et al. (2013); He et al. (2020a).

Противовоспалительная активность. Было доказано, что этаноловые экстракты и некоторые очищенные соединения из плодов *A. tsao-ko* обладают противовоспалительной активностью (Lee et al., 2008; Li et al., 2014; Kim et al., 2016; Choi et al., 2018). Обработанные липополисахаридом (ЛПС) клетки макрофагов RAW 264.7 и микроглиальные клетки BV2 обычно используются для оценки эффектов и изучения возможного молекулярного механизма противовоспалительной активности (Pu et al., 2022; Yang et al., 2022). Противовоспалительная активность плодов *A. tsao-ko* указывает на возможность их использования в качестве мощного терапевтического средства для лечения воспалительных заболеваний.

Противоопухолевая/раковая и антиоксидантная активность. Сообщалось, что этилацетатная фракция и фракция петролейного эфира 95% этаноловых экстрактов плодов *A. tsao-ko* показали > 60% ингибирования при 400 мг/мл против нескольких линий раковых клеток, включая Hela, HepG-2, SMMC-7721 и A549 (Zhang et al., 2015).

Исследование Lee et al. (2019) показало, что гексановая фракция 50% этаноловых экстрактов семян *A. tsao-ko* проявила ингибирующее действие на сфингозин-киназы 1 и 2 (SPHK1/2), выполняющие важную функцию в клеточных и физиологических процессах, на 39% и 67% от контроля соответственно (Lee et al., 2019).

Соединения из 95% этанольных экстрактов или 70% ацетоновой фракции дихлорметановых экстрактов плодов *A. tsao-ko* обладали антиоксидативной активностью. Эти соединения включали фенольные кислоты, флавоноиды, диарилгептаноиды и жирные кислоты (Martin et al., 2000; Liu et al., 2018).

Также было доказано, что эфирное масло *A. tsao-ko* обладает антиоксидантной и противоопухолевой активностью. Анализ цитотоксичности методом МТТ (3- (4,5-диметилтиазол-2-ил) - 2,5-дифенилтетразолий бромид) показал, что эфирное масло *A. tsao-ko* было цитотоксичным для клеточных линий HepG2, Hela, Bel-7402, SGC-7901 и PC-3 (Yang et al., 2010). Оно обладало слабой антиоксидантной активностью, измеренной с помощью радикального анализа DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), теста на тиобарбитуровую кислоту (ТВА) и теста на восстановительную антиоксидантную силу железа (FRAP) (Yang et al., 2010).

Антидиабетическая активность: Водные экстракты семян *A. tsao-ko* показали очевидную ингибирующую активность против α -амилазы и α -глюкозидазы *in vitro* с IC50 1,04 мг/мл и 1,4 мг/мл (Hussain et al., 2018). Метаноловые экстракты (МЭ) и полярная фракция МЭ плодов *A. tsao-ko* ингибировали активность α -глюкозидазы с IC50 0,02 мг/мл *in vitro* (Yu et al., 2010). Недавно было продемонстрировано, что 50% этанол-водный экстракт сушеных плодов *A. tsao-ko* обладает значительной ингибирующей α -глюкозидазу активностью (IC50 = 38,6 мкг/мл) (He et al., 2020b).

Липидоснижающая активность: Метаноловые экстракты плодов *A. tsao-ko* могли снизить уровень липидов в организме мышей примерно на 50% от контроля, а (?)-эпикатехин считался основным активным компонентом (Yu et al. 2008, 2010). С помощью анализа *in vitro* Liu et al. (2018) доказали, что жирные кислоты (включая (2E,7Z,10Z,13Z)-гексадека-2,7,10,13-тетраеновую кислоту; (2E,7Z)-тетрадека-2,7-диеновую кислоту, (E)-додек-2-еновую кислоту; и (E)-тетрадек-2-еновая кислота) проявили ингибирующее действие на активность липазы, и когда концентрация составляла 50 мкг/мл, их ингибирование составило 50,7%; 61,56%; 59,37%; и 49,32%, соответственно (Liu et al. , 2018).

Нейропротекторная активность: H₂O₂-индуцированное повреждение нервов клеток РС-12 обычно используется для оценки нейропротекторной активности. 95% этаноловый экстракт и этилацетатная фракция плодов *A. tsao-ko* также показали мощный защитный эффект в отношении повреждения клеток РС-12, индуцированного H₂O₂ (Zhang et al., 2014, 2015, 2016).

Антикомплементарная активность: В попытке найти антикомплементарные агенты под руководством фракционирования и выделения, ориентированного на биоактивность, Jin et al. (2013) получили 14 соединений из этанольного экстракта сушеных плодов *A. tsao-ko*. Все 14 соединений проявили антикомплементарную активность в отношении классического пути (СР) и альтернативного пути (АР) при оценке *in vitro* (Jin et al., 2013).

1.2.2 Пурпурный кардамон (*Amomum longiligulare* T.L. Wu)

Исследований химического состава *A. longiligulare* в целом было немного, большинство публикаций посвящено химическому составу эфирных масел, выделенных из этого вида. По данным Lim (2013), в состав эфирного масла семян *A. longiligulare* (примерно 1,7-3%) входят: борнеол (19%), D-камфора (33%), борнилацетат (26,5%), D-лимонен (7%), α-фелландрен (2,3%), α-пинен (1,8%) и линалоол (Lim, 2013). По данным Yanze et al. (2015), α-пинен, β-пинен, 1,8-цинеол, p-цимен, лимонен, камфен, борнилацетат и камфора являются основными составляющими масла семян *A. longiligulare* (Yanze et al., 2015). Anh et al. (2020) использовали газовую хроматографию-масс-спектрометрию (GC-MS) для идентификации 14 соединений в составе эфирного масла плодов *A. longiligulare*, собранных в Нинь Тхуан, Вьетнам. Из них D-лимонен (3,794%), D-камфора (19,15%), камфора (3,957%), (-)-борнилацетат (65,14%) и (E)-неролидол (4,64%) были идентифицированы как основные компоненты (Anh et al., 2020). Chau et al. (2015) выделили и исследовали состав эфирного масла из листьев, стеблей и корней *A. longiligulare* во Вьетнаме (46, 45 и 39 соединений были обнаружены в листьях, стеблях и корнях соответственно). Согласно этому исследованию,

основными компонентами масла листьев являются β -кариофиллен (26,6%), α -пинен (15,6%), эпоксид гумулена II (14,8%) и α -гумулен (12,5%); в масле стеблей - β -кариофиллен (37,4%), α -гумулен (16,5%) и гексагидрофармезилацетон (10,0%); в масле корней - камфен (15,7%), гексадекановая кислота (10,0%), октадекановая кислота (8,6%) и борнилацетат (7,8%) (Chau et al. , 2015). Hung et al. (2022) сообщили о химическом составе эфирного масла из листьев, корневищ и плодов *A. longiligulare*, полученного методом микроволновой гидродистилляции. Согласно этому исследованию, основными компонентами масла листьев являются α -гумулен (28,4%), α -пинен (24,9%), β -кариофиллен (17,3%), эпоксид гумулена II (7,3%) и β -пинен (4,7%); в масле корневища - β -кариофиллен (28,7%), бициклогермакрин (17,1%), эпоксид гумулена II (10,5%), камфен (7,9%) и α -пинен (5,7%); в масле плодов - камфора (40,7%) и борнилацетат (34,2%) (Hung et al. , 2022).

Другие группы соединений, выделенные и идентифицированные из экстракта семян *A. longiligulare*, помимо эфирных масел, включают флавоноиды, диарилгептаноиды, сапонины-стероиды, дубильные вещества, макро- и микроэлементы. Do et al. (2001) выделили 3 соединения, присутствующие в нелетучей части семян *A. longiligulare*, из которых 2 соединения относятся к группе флавоноидов (включая эпикатехин и кверцитрин) и 1 монотерпеновое гликозидное соединение - (+)- ангеликоиденол-2-O- β -D-глюкопиранозид. Кроме того, Do et al. (2001) также идентифицировали в семенах *A. longiligulare* сапонин-стероидные соединения с содержанием 0,63%, дубильные вещества и 15 макро- и микроэлементов (Do et al., 2001). Три флавоноидных соединения, восемь диарилгептаноидных соединений, 4-(4-гидроксифенил)-2-бутанон, 4-метоксибензойная кислота и ситостерин были выделены Liu et al. (2013) из плодов *A. longiligulare* (Liu et al., 2013). С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и высокоскоростной противоточной хроматографии (HSCCC) Hao et al. (2014) выделили 17 соединений, в основном относящихся к группе флавоноидов, и 8 соединений группы диарилгептаноидов в плодах *A. longiligulare* (Hao et al., 2014).

На сегодняшний день имеется мало сообщений о биологической активности эфирных масел, экстрактов и выделенных соединений *A. longiligulare*.

Антибактериальная и противогрибковая активность: Несколько отчетов показали, что эфирное масло из плодов *A. longiligulare* обладает антибактериальной и противогрибковой активностью (Do et al, 2001; Lim, 2013; Rita de Cássia da Silveira e Sá et al., 2013; Hao et al., 2014).

Исследование Do et al. (2001) показало, что эфирные масла и этаноловые экстракты из семян *A. longiligulare* обладают антибактериальным и противогрибковым действием против трех штаммов: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, и *Candida stellatoidea*. Также, согласно этому исследованию, летучая фракция семян *A. longiligulare* (экстрагированная дихлорметановым растворителем) обладала антибактериальным и противогрибковым действием в отношении 5 штаммов: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida stellatoidea*, *Candida albicans*, и *Cladosporium curcumerinum* (Do et al., 2001).

Нелетучая фракция семян *A. longiligulare* (экстрагированная метанолом после экстракции дихлорметаном) обладала антибактериальной активностью против двух штаммов бактерий, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (Hao et al., 2014). Соединение (+)-ангеликоиденол-2-O- β -D-глюкопиранозид, выделенное из *A. longiligulare*, обладало противогрибковой активностью против двух штаммов *Cladosporium curcumerinum* и *Candida albicans* (Hao et al., 2014).

Недавно эфирные масла из листьев, корневищ и плодов *A. longiligulare* продемонстрировали антимикробную активность против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, и *Pseudomonas aeruginosa* с минимальной ингибирующей концентрацией (МИС) в диапазоне от 200 до 400 мкг/мл (Hung et al., 2022).

Антиоксидантная активность: Zhao et al. (2009) сообщили, что *A. longiligulare* проявляет хорошую антиоксидантную активность; полисахариды, выделенные из плодов *A. longiligulare*, обладают сильной свободной радикал-спасательной активностью; они могут значительно подавлять образование малонового диальдегида *in vitro* и повышать активность антиоксидантных

ферментов у мышей с повреждением печени, вызванным четыреххлористым углеродом (Zhao et al., 2009).

Lin et al. (2017) оценили антиоксидантную активность остатков плодов *A. longiligulare* с помощью DPPH и гидроксильного (OH•) радикала. Соответственно, этанол, дихлорметан и этилацетатные экстракты плодов *A. longiligulare* продемонстрировали активность DPPH по выведению свободных радикалов со значениями IC50 58,53; 51,69; и 43,49 мкг/мл, соответственно; этилацетатные и дихлорметановые экстракты продемонстрировали активность OH• по выведению свободных радикалов со значениями IC50 0,79 и 0,75 мг/мл, соответственно (Lin et al., 2017).

Эстрогенная активность: Фитоэстрогены, полученные из диетических источников, могут быть эффективным вспомогательным средством при лечении дефицита эстрогенов у людей (Limer et al., 2004). Исследование Nao et al. (2014) выделило восемь диарилгептаноидов из плодов *A. longiligulare* и показало, что они являются основными соединениями, обладающими эстрогенной активностью (Nao et al., 2014).

Противовоспалительная и иммуноукрепляющая активность: Gao et al. (2016) сообщили, что экстракт *A. longiligulare* может защитить повреждение слизистой желудка крыс, и механизм может быть связан с улучшением экспрессии белков TFF1 и TFF1 RNA (Gao et al., 2016; Yong, 2020).

В исследовании Zhu et al. (2021) сообщается, что два полисахарида (ALP1 и ALP2), полученные из плодов *A. longiligulare*, оказывают стимулирующее воздействие на иммуногенность антигена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни (Zhu et al., 2021). Zhou et al. (2021) успешно приготовили наночастицу полисахарида 1-PLGA из ALP1-полисахаридов, полученных из плодов *A. longiligulare*, и продемонстрировали ее способность повышать иммунитет на клетках RAW264.7 (Zhou et al., 2021).

1.3 Изучение *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu. *in vitro*

В последние десятилетия интерес к изучению растений рода *Amomum* культуре *in vitro* постоянно возрастает. Исследования проводятся по разным направлениям с использованием различных первичных эксплантов. Основные исследования проводят на семенах и реже на корневых сегментах, так как при их использовании сложнее получить асептическую культуру, так как корневища заражены различной микрофлорой. Исследования *in vitro* включают, например, подбор оптимальных условий стерилизации семян или изолированных зародышей; разработку протоколов размножения и укоренения микропобегов, установление оптимальных режимов адаптации микроклонов; проведение исследований по генетической трансформации, а также изучение вторичных метаболитов в разных органах растения. Большая часть исследований проводится в таких странах, как Индия, Танзания, Гватемала и др. Однако в разных странах произрастают разные виды кардамона, и предлагаемые методики и технологии не подходят к *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu. Поэтому для данных видов работ по культуре *in vitro* не достаточно, а полученные результаты не всегда воспроизводимы с высокой эффективностью.

Одной из проблем для кардамона является наличие твердой оболочки у семян, которая затрудняет их прорастание (Pham, 2000). Поэтому многие авторы применяют различные способы предобработки семян. Кроме того, изучается влияние минерального состава питательной среды на всхожесть семян. Например, в большинстве случаев для проращивания семян многих видов, таких как *Sophora toromiro* (Jordan, 2001), *Swainsona salsula* (Yang, 2001) и хлопок (Barampuram, Allen, Krasnyanski, 2014) применяют полный набор минеральных солей в питательной среде, содержащей агар. Однако для прорастания *in vitro* семян *Dianthus zeyheri* (Crouch, Van Staden, 1993), *Dalzellia zeylanica* (Uniyal, Ram, 1996) и *Bulbine canescense* (Bringmann, Noll, Rischer, 2002) рекомендуется использовать питательные среды с низким содержанием минеральных солей, которые для

данных культур считаются лучшими. С другой стороны, семена многих видов, таких как *Annona muricata* (Lemos, Blake, 1996), *Hypericum perforatum* cv. *anthos* (Murch et al., 2000) и *Annona cherimola* (Padilla, Encina, 2003) имеют самую высокую скорость прорастания и для этого процесса используют в качестве питательного субстрата только воду и агар. Вышеуказанные различия объясняются тем, что количество запасных веществ в семенах различно (Padilla, Encina, 2003). Srinivasa Rao et al. (1982) успешно проростили семена кардамона (*Elettaria cardamomum*) на питательной среде Уайта (1963), которая также является средой с низким содержанием минеральных солей (Srinivasa Rao et al., 1982).

Прорастание семян зависит не только от минерального состава питательной среды, но и от режимов стерилизации. Жесткие условия стерилизации, порой ингибируют прорастание семян, что ограничивает получение достаточного количества асептических растений.

Согласно опыту местных жителей, семена черного кардамона и пурпурного кардамона имеют низкую скорость естественного прорастания. Другие виды семейства Имбирных, например, *Alpinia malaccensis* Roscoe (Rivai, Wardani, Devi, 2015), *Alpinia galanga* Willd. (Baradwaj et al., 2016), коарима (*Aframomum corrorima* P.C.M. Jansen) (Eyob, 2009; Dawid, 2019), большой кардамон (*Amomum subulatum* Roxb.) (Bhowmick, Chattopadhyay, 1960) и зеленый кардамон (*Elettaria cardamomum* Maton) (Dahanayake, 2015) также показали плохую всхожесть семян и/или многие семена не смогли прорасти из-за наличия некоего состояния покоя, возможно, из-за твердой и непроницаемой оболочки семян. В этих исследованиях авторы применяли различные предпосевные обработки (включая механическую скарификацию, погружение в горячую или холодную воду, кислотную скарификацию и погружение в регуляторы роста растений), чтобы нарушить состояние покоя семян. На сегодняшний день подобные исследования семян черного кардамона и пурпурного кардамона все еще отсутствуют.

В мире проводят исследования по размножению *in vitro* некоторых видов рода *Amomum*. Sajina et al. разработали протокол размножения *A. subulatum* Roxb.,

который является наиболее экономически важным видом в Бенгалии - Индии (Sajina et al., 1997). Rao et al. культивировали *A. longiligulare* T.L. Wu *in vitro*. Предложенные условия культивирования позволили получить небольшое количество адвентивных побегов, всего 3,7 шт на эксплант (Rao et al., 2003). Ping (Ping, 2004), Hong и Na (Hong, Na, 2005) также размножили *in vitro* другой ценный вид рода - это белого амомума (*A. villosum* Lour.). В качестве первичного экспланта использовали почки, изолированные из корневища. Gao et al. также использовали корневища белого амомума для создания полной и эффективной системы быстрого размножения (Gao et al., 2022). Другое популярное лекарственное растение – это *A. krervanh* Pierre ex Gagner, которое произрастает в Таиланде и Камбодже. Для данного вида так же разработан протокол размножения *in vitro*, предусматривающий использование пазучных почек корневищ, в качестве первичного экспантанта (Rao et al., 2004; Tefera, Wannakrairoj, 2004). Во Вьетнаме метод культивирования растительных тканей также использовали для размножения некоторых видов этого рода, таких как *A. longiligulare* T.L. Wu. (Dang et al., 2011), *Atomum* sp. (Truong et al., 2017).

Таким образом, анализируя литературные данные следует заключить, что, как правило, исследования в культуре *in vitro* проводят на растениях *A. longiligulare* и совсем не изучен в культуре *in vitro* *A. tsao-ko*. Поэтому проводить исследования по изучению морфогенетического потенциала редких видов *Atomum in vitro* весьма актуальное направление исследований.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на кафедре биотехнологии Российского государственного аграрного университета-МСХА имени К.А. Тимирязева, под руководством доктора биологических наук, профессора Калашниковой Елена Анатольевны.

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили семена и корневища кардамона двух видов - *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu.

Amomum tsao-ko Crevost & Lemarié. 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 широты и 103°32'44,0" восточной долготы. После сбора урожая они были переданы в Российскую Федерацию на кафедру биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (капсулы были сохранены с помощью вакуумной упаковки (Croft et al., 2012)).

В лаборатории кусочки корневищ черного кардамона были использованы для культивирования инициации. С другой стороны, пакеты вакуумной упаковки, содержащие коробочки с семенами, сохраняли в холодильнике со стабильной температурой 5°C. Когда проводился эксперименты, то семена извлекали из коробочек, тщательно промывали водопроводной водой, чтобы удалить ариллус, и сразу же использовали для эксперимента, чтобы обеспечить влажность семян.

Ботаническая идентификация вида *A. tsao-ko* по образцу № QF 001 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).

Amomum longiligulare T.L. Wu. Зрелые растения и коробочки с семенами пурпурного кардамона были собраны 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 урожая они были переданы в Российскую Федерацию на кафедру биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (капсулы были сохранены с помощью вакуумной упаковки (Croft et al., 2012)).

В лаборатории кусочки корневищ черного кардамона были использованы для культивирования инициации. С другой стороны, пакеты вакуумной упаковки, содержащие капсулы с семенами, сохранял в холодильнике со стабильной температурой 5°C. Когда проводили эксперименты, то семена извлекали из коробочек, тщательно промывали водопроводной водой, чтобы удалить ариллус, и сразу же использовали для эксперимента, чтобы обеспечить влажность семян.

Ботаническая идентификация вида *A. longiligulare* по образцу № QA 001 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).

2.2 Методы исследований

2.2.1 Введение в культуру *in vitro* семян

Влияние типа стерилизующего вещества и времени его воздействия на эффективность обеззараживания семян черного кардамона и пурпурного кардамона

Семена черного кардамона и пурпурного кардамона замачивали в теплой воде в течение 8 часов перед поверхностной стерилизацией. После этого семена выдерживали под проточной водой комнатной температуры в течение 1 часа. Затем их погружали в жидкое мыло на 10 минут, после чего промывали непосредственно под проточной водой. На следующем этапе семена помещали в марлевые мешочки и переносили в ламинар-бокс, где проводили поверхностную стерилизацию 70%-ным этанолом в течение 30 секунд с последующим погружением в 0,1%-ный (мас./об.) водный раствор хлорида ртути (HgCl₂) или

5%-ный и 10%-ный, (мас./об.) 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) (Murashige, Skoog, 1962).

Черный кардамон. Чтобы предотвратить риск потери культур из-за заражения, в один культуральный сосуд помещали только одно семя. Каждая обработка была повторена три раза с 25 семенами для каждой.

Пурпурный кардамон. В каждый культурный сосуд высевали по три семени. Каждая обработка была повторена три раза с 30 семенами для каждой.

Данные оценивались через 10 суток после посева.

Влияния различных разбавленных концентраций базальной среды МС на прорастание *in vitro* семян черного кардамона и пурпурного кардамона

Состав базальной среды может влиять на прорастание *in vitro* семян черного кардамона и пурпурного кардамона. 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

Появление корешка у семян регистрировалось как прорастание (Islam, Kato-Noguchi, 2013). Параметры прорастания семян определяли по следующей формуле (Xuan et al., 2004; Gonçalves, Ferraz, Romano, 2009; Islam, Kato-Noguchi, 2014; Miranda-Arámbula, Reyes-Chilpa, Anaya, 2021):

Процент всхожести (GP); количество проросших семян в процентах от общего количества испытанных семян выражается как:

$$(GP, \%) = \frac{\text{проросшие семена}}{\text{общее количество протестированных семян}} \times 100 \quad (1)$$

Среднее время прорастания (MGT) дано в соответствии со Scott с соавторами (Scott et al., 1984)

$$(\text{Дней по MGT}) = \frac{\sum T_k \times N_k}{S} \quad (2)$$

где T_k - количество суток от начала эксперимента, N_k - количество проросших семян за сутки, а S - общее количество проросших семян.

Индекс скорости прорастания (GRI) рассчитывался для каждой обработки с использованием следующего уравнения:

$$GRI = \left(\frac{G1}{1} \right) + \left(\frac{G2}{2} \right) + \dots + \left(\frac{Gi}{i} \right) \quad (3)$$

где G - это сутки, на которые наблюдали прорастание 1, 2..., а i представляет соответствующий дню прорастания (Esechie, 1994).

Влияния различных методов предварительной обработки семян на прорастание семян и рост проростков черного кардамона и пурпурного кардамона в условиях *in vitro*

Семена черного кардамона и пурпурного кардамона обладают плохим прорастанием, в силу твердой оболочки. 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), кислотную скарификацию (HCl 10 мин, HCl 15 мин, HNO₃ 10 мин и HNO₃ 15 мин) и погружение в регуляторы роста растений (ГК в течение 24 часов и НУК в течение 24 часов) (Табл. 2.1). Для проведения данного эксперимента случайным образом были отобраны семена без повреждений равномерного размера и цвета.

Варианты обработки семян черного кардамона и пурпурного кардамона

Способ обработки	Обозначение	Описание	Примечание
	Контроль	Семена без обработки.	
Механический	ME	- <u>Черный кардамон</u> : Семена скарифицировали стерильным скальпелем вручную, разрезая 1,0-1,5 мм кожуры на противоположной стороне участка от места прикрепления семени. - <u>Пурпурный кардамон</u> : Семена скарифицировали стерильным скальпелем вручную, разрезая 0,5-1,0 мм кожуры на противоположной стороне участка от места прикрепления семени.	Выполните после этапа стерилизации и посевного материала.
Физический	HW2m, HW4m	Горячая вода: семена замачивали в кипящей дистиллированной воде при 100 ° С и оставляли на 2 и 4 мин.	Выполняется перед стерилизацией посевного материала
	CW	Холодная вода: семена замачивали в холодной воде (4 ± 1 °С) на 24 часа.	
Химическая	NAS10m, NAS15m	Семена замачивали в 50% -ной азотной кислоте (HNO ₃) на 10 и 15 мин.	
	HAS10m, HAS15m	Семена замачивали в 25%-ной соляной кислоте (HCl) на 10 и 15 мин.	
	GA24h	Семена замачивали в гибберелловой кислоте (ГК ₃) 200 ppm в течение 24 часов.	
	NAA24h	Семена замачивали в нафтилуксусной кислоте (НУК) 200 ppm в течение 24 часов.	

Вышеупомянутые обработанные семена были промыты водопроводной водой. Затем семена промывали под проточной водопроводной водой после

мытья в жидком мыле в течение 10 минут. На следующем этапе семена подвергались поверхностной дезинфекции с использованием лучшей формулы дезинфекции, обнаруженной в предыдущих экспериментах. После поверхностной дезинфекции семена промывали четыре-пять раз стерильной дистиллированной водой перед переносом в культуральные сосуды с оптимальным составом среды для прорастания и роста, выявленным в предыдущих экспериментах.

2.2.2 Введение в культуру *in vitro* корневищ

***Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié**

Перед введением в культуру *in vitro* сегменты корневища *A. tsao-ko* разрезали на отдельные узловыe 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 (мас./об.) на 10 минут и затем промывали под проточной водопроводной водой. Последующие действия проводили в условиях ламинар-бокса. Сегменты корневищ помещали в марлевые мешочки и переносили в ламинар-бокс, где проводили поверхностную стерилизацию 70%-ным этанолом в течение 30 секунд с последующим погружением в 0,05%-ный или 0,1%-ный (мас./об.) водный раствор хлорида ртути ($HgCl_2$) или 5%-ный и 10%-ный, (мас./об.) раствор гипохлорита кальция на 4, 8 или 12 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) (Murashige, Skoog, 1962).

***Amomum longiligulare* T.L. Wu.**

Первичным эксплантом служили сегменты корневища с пазушными почками (3,0-4,0 см в длину). Перед введением в культуру *in vitro* корневища очищали от чешуйчатых листьев, затем их промывали водопроводной водой с мылом (60 минут), а затем в условиях ламинар-бокса изолировали пазушные почки. Почку промывали 70%-ным этанолом в течение 1 минуты, после чего

стерилизовали водным раствором хлорида ртути [HgCl_2 : 0,05% или 0,1% (по массе)] или гипохлорита кальция [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$: 5% или 10% (по массе)] в течение 4, 8 или 12 минут соответственно. Затем эксплантаты четыре раза промывали стерильной дистиллированной водой и дополнительно подрезали перед переносом во флаконы для культивирования.

Эксплантаты культивировали на базальной среде МС, в которую для инициации культивирования добавляли индивидуально различные концентрации 6-бензиламинопурина (БАП: 0,5-3,0 мг/л) и кинетина (Кп: 0,5-3,0 мг/л). В качестве контроля служила среда без регуляторов роста.

2.2.3 Влияние питательной среды на микроразмножение

Amomum tsao-ko Crevost & Lemarié

С проростков высотой около 2-3 см, полученных из семян, удаляли листья, корни и изолировали верхушки побегов, которые в дальнейшем использовали в качестве эксплантатов для размножения и укоренения микропобегов. Верхушки побегов культивировали на твердой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС (Murashige, Skoog, 1962), а также различные гормоны ауксинового и цитокининово типа действия. Среду дополняли из класса ауксинов - α -нафталинуксусной кислотой (НУК) в концентрации 0,5, 1,0 и 4,0 мг/л или 2,4-дихлорфеноксиксусной кислотой (2,4-Д) в концентрации 1,0 и 2,0 мг/л. Из класса цитокининов использовали 6-бензиламинопуридин (БАП) в концентрации 1,0 - 4,0 мг/л. Каждый эксперимент по вариантам проводили в двух аналитических и 12 биологических повторностях. Визуальные наблюдения проводили один раз в неделю, оценивая при этом высоту побегов (см), коэффициент размножения, количество адвентивных побегов (шт).

Микропобеги, полученные из корневищ, длиной 1,5–2,0 см с 3–4 листьями использовали в качестве эксплантов для дальнейших исследований по микроразмножению. Микропобеги культивировали на твердой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС и дополненную индивидуально различными концентрациями БАП (0,5-2,0 мг/л) и кинетина (0,5-2,0 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).

Atomum longiligulare T.L. Wu.

Микропобеги, полученные из корневищ, длиной 1,5-2,0 см с 3-4 листьями использовали в качестве эксплантов для отработки методики по размножению. Побеги культивировали на агаризованной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, в которую индивидуально добавляли различные цитокинины: 6-бензиламинопурина (БАП: 0,5-3,0 мг/л) и кинетина (Кн: 0,5-3,0 мг/л). Кроме того, было изучено влияние ауксинов в сочетании с цитокининами на микроразмножение (БАП или кинетин (0,5-3,0 мг/л) в сочетании с нафтилуксусной кислотой (НУК: 0,25 и 0,5 мг/л)). В качестве контроля служила среда без регуляторов роста. Наблюдения проводили после 10 недель культивирования.

2.2.4 Укоренение и адаптация микроклонов

Atomum tsao-ko Crevost & Lemarié

Для укоренения микропобегов использовали удлиненные, здоровые побеги длиной 4-4,5 см, имеющие 4-6 листьев, полученные в предыдущих экспериментах. Микропобеги переносили на твердую агаризованную питательную среду МС с добавлением различных ауксинов - индол-3-масляной кислоты (ИМК) в концентрации 0; 0,25; 0,50; 0,75; и 1,00 мг/л или нафталинуксусной кислоты (НУК) в концентрации 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 следующие показатели: число укоренившихся микропобегов (%), количество корней на одном растении (шт) и длина корней (мм).

В дальнейшем, укоренившиеся микропобеги были перенесены на этап адаптации. Для этого, с колбы, в которой были сформированы микроклоны, имеющие высоту 4,0-5,0 см и 3-4 листа, снимали крышку и оставляли в таком положении на двое суток. После этого микроклоны извлекали из питательной среды, тщательно промывали корневую систему в проточной водопроводной воде и затем обрабатывали 0,5%-ным раствором Бавистина в течение 10 минут. Последняя операция была необходима для предотвращения грибкового заражения. Далее микроклоны были перенесены в почвенный субстрат. В эксперименте использовали два типа почвы: Грунт универсальный (производитель «Garden star»), содержащий питательные вещества (мг/100 л) N-300, P-300, K-400 и Биогрунт (производитель «Фаско»), состоящий из высокогорного и низинного торфа, песка, биогумуса, доломитовой муки и полного минерального удобрения (Рис. 2.1). Выживаемость микроклонов регистрировалась через 1 и 3 месяца после пересадки в условия *ex vitro*.



Рис. 2.1. Грунт, используемый при адаптации микроклонов

Atomum longiligulare T.L. Wu.

Для укоренения микропобегов использовали удлиненные, здоровые побеги длиной 3,0-3,5 см, имеющие 4-5 листьев, полученные в предыдущих экспериментах. Микропобеги переносили на твердую агаризованную питательную среду МС с добавлением различных ауксинов: 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 10 недель с начала культивирования в изучаемых условиях выращивания. При этом учитывали следующие показатели: число укоренившихся микропобегов (%), количество корней на одном растении (шт) и длина корней (мм).

В дальнейшем, укоренившиеся микропобеги были перенесены на этап адаптации. Для этого, с колбы, в которой были сформированы микроклоны, имеющие высоту 4,0-6,0 см и 3-4 листа, снимали крышку и оставляли в таком положении на 2 суток. После этого микроклоны извлекали из питательной среды, тщательно промывали корневую систему в проточной водопроводной воде и затем обрабатывали 0,5%-ным раствором Бавистина в течение 10 минут. Последняя операция была необходима для предотвращения грибкового заражения. Далее микроклоны были перенесены в почвенный субстрат. В эксперименте использовали два типа почвы: Грунт универсальный (производитель «Garden star») и Биогрунт (производитель «Фаско»). Выживаемость микроклонов регистрировалась через 1 и 3 месяца после пересадки в условия *ex vitro*.

2.2.5 Условия выращивания *in vitro* *A. tsao-ko* Crevost & Lemarié и *A. longiligulare* T.L. Wu.

Во всех экспериментах *in vitro* использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасига и Скуга, а также 0,8% агара и 3% сахарозы. рН доводили до 5,6–5,8 с помощью 1 н. NaOH перед автоклавированием. Автоклавирование питательной среды проводили при 121 °С и при 1,1 атм в течение 20 мин.

Культуры на всех этапах исследований выращивали в световой комнате, где поддерживалась температура 25±2 °С и 16-часовой фотопериод при освещении белыми люминесцентными лампами, с интенсивностью света 3000 люкс.

2.2.6 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. Для этого, сухую массу заливали 96%-ным этанолом и оставляли экстрагироваться в течение 72 часов, после чего экстракт дважды пропускали через фильтровальную бумагу с целью разделения экстракта на твердую и жидкую фракцию. Затем, жидкую фракцию переливали в заранее взвешенную пустую пробирку и оставляли на 1 неделю в открытом состоянии для испарения спирта. В результате испарения, на дне пробирки оставался слабо выраженный осадок. Такую пробирку взвешивали и путем вычитания из этой величины массу пустой пробирки, определяли количество экстрагируемого вещества. Растительные экстракты получали по ранее разработанной на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева схеме (Калашникова и др. 2004, 2018, 2020). Схема получения растительных экстрактов приведена на рисунке 2.2.

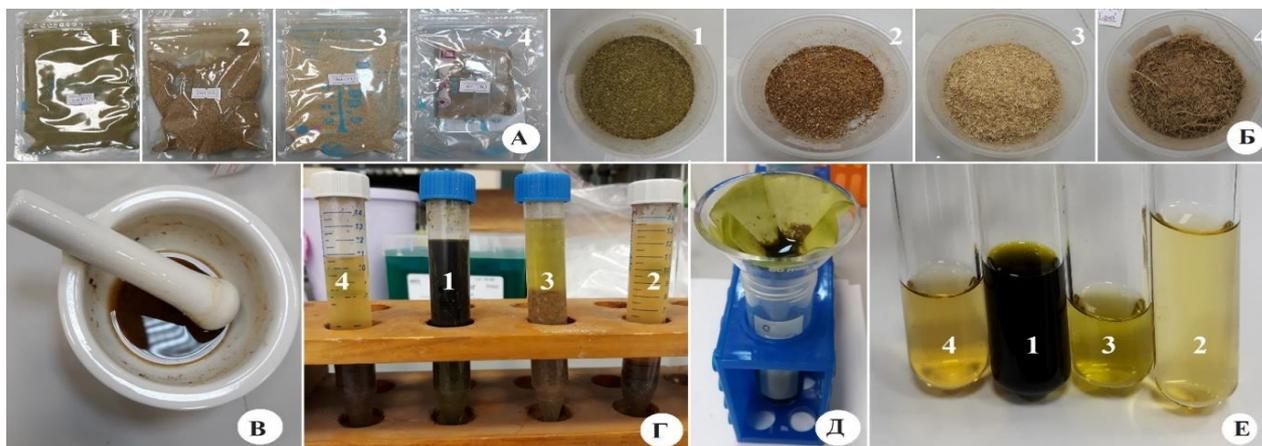


Рис. 2.2. Схема приготовления экстрактов из семян, листьев, корневищ, корней и псевдопобегов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu: А – порошки исследуемого растительного сырья в вакуумной упаковке; Б – начальная навеска каждого порошка растительного сырья; В – гомогенизация растительного порошка с этанолом с помощью пестика и ступки; Г – гомогенизированный материал; Д – фильтрация экстракта через фильтровальную бумагу; Е – полученные растительные экстракты. Примечание: (1) порошок листьев; (2) порошок семян; (3) порошок псевдостебля; (4) порошок корневищ и корней

Определение биологической активности экстрактов. Исследования проводили на семенах разных таксономических групп: 1) двудольные (рыжик яровой (*Camelina sativa* Crantz), киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.), капуста белокочанная (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L. cv. *Dubrava*)), 2) однодольные - лук (*Allium cepa* L. cv. *Stuttgarter risen*). Для этого, 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 (Kalashnikova et al, 2004, 2020; Aslani et al., 2014; Islam et al., 2014). Эксперимент проводили в 6-ти ячеистых планшетах, а семена раскладывали на два слоя фильтровальной бумаги, смоченной рабочими растворами экстрактов. В каждую ячейку добавляли по 1 мл исследуемого раствора. Планшет с контрольной культурой обрабатывали 1 мл 0,03% (v/v) водного раствора ДМСО (Aslani et al., 2014; Islam et al., 2014). В каждую ячейку помещали по 6 шт семян при пятикратной повторности (Рис. 2.3).

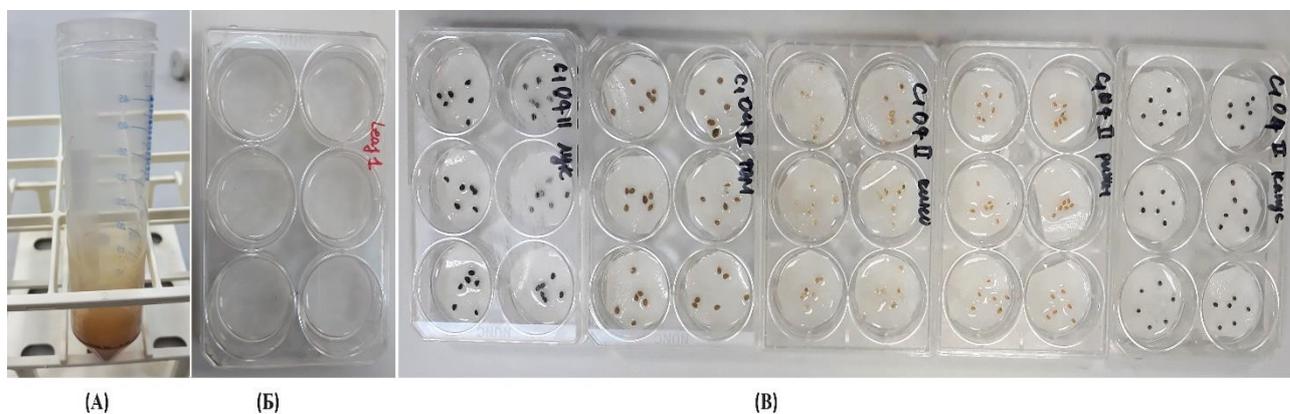


Рис. 2.3. Определение биологической активности экстрактов на семенах: А - пробирка содержит исходный экстракт; (Б) стерилизованный 6-луночный планшет для культивирования клеток; (В) семена пяти видов растений высевают в отдельные планшеты (по 6 семян в лунку).

Учет проводили каждые двое суток, при этом учитывали процент прорастания (GP, %), среднее время прорастания (MGT, день) и индекс скорости прорастания (GRI), а также длину гипокотилия (см) и длину корня (см) (Scott et al, 1984; Esechie, 1994; Xuan et al., 2004; Khanh et al., 2008; Gonçalves et al., 2009;

Verma et al., 2012; Islam et al., 2013, 2014; Aslani et al., 2014; Bari, Kato-Noguchi, 2017; Miranda-Arámbula et al., 2021).

На 12-е сутки измеряли длину корешков, длину гипокотилия и свежую массу тестируемых проростков. В дальнейшем проростки высушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С в течение 24 часов, после чего измеряли сухую массу.

Ингибирующий или стимулирующий эффект (I) растительных экстрактов на биометрические показатели проростков растений разных таксономических групп рассчитывали по формуле (4), приведенного Kordali et al. (Kordali et al., 2009):

$$(I, \%) = \left(\frac{\text{Контроль} - \text{Экстракты}}{\text{Контроль}} \right) \times 100 \quad (4)$$

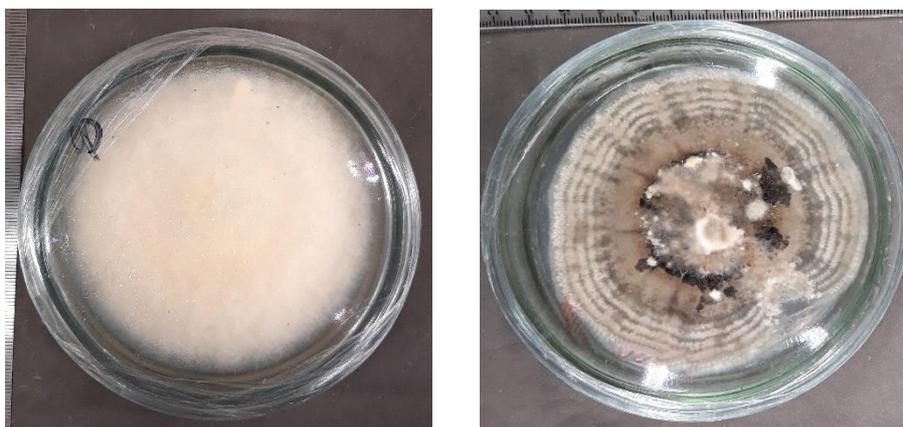
Определение фунгицидной активности растительных экстрактов.

Исследования проводили на чистой культуре грибов *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Helminthosporium sativum* P.K. & B. (Рис. 2.4).

Данные штаммы были выделены и идентифицированы сотрудниками лаборатории микологии Института фитопатологии РАН.

Для эксперимента использовали живые культуры *Fusarium oxysporum* Schlecht. и *Helminthosporium sativum* P.K. & B., длительно хранившиеся в холодильнике при температуре + 4 °С.

Грибы первоначально размножали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, не содержащей фитогормоны. Выращивали грибы в чашках Петри в условиях световой комнаты при температуре 25 °С, 16-часовом фотопериоде, при интенсивности света 3000 лк. Пересадку осуществляли при необходимости на 5-7 сутки в ламинар-боксе.



а

б

Рис. 2.4. Чистая культура *Fusarium oxysporum* (а) и *Helminthosporium sativum* (б)

Растворенный в ДМСО сухой растительный остаток, полученный из семян, листьев, корней и псевдопобегов интактных растений двух видов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu., добавляли в состав питательной среды после ее автоклавирования (Рис. 2.5).



Рис. 2.5. Добавление экстракта в питательную среду

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 питательная среда, в которую добавляли чистый растворитель ДМСО в концентрации 0,03% (v/v).

Мицелий грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*) диаметром 2 мм помещали в центр чашки Петри (d = 90 мм). После инкубации грибов на разных вариантах питательной среды (для *F. oxysporum* 7 суток и для *H. sativum* 10 суток)

проводили измерение диаметра колонии грибов (мм). Кроме того проводили измерение диаметра гриба в динамике (каждые день с момента посадки). Измерение гриба проводили с помощью линейки в двух плоскостях, как это показано на рисунке 2.6.

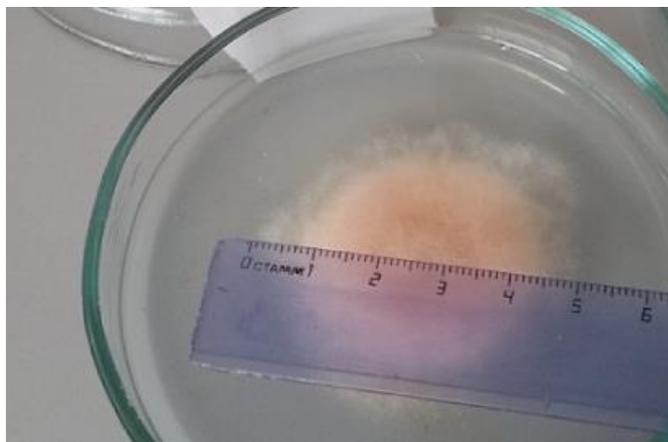


Рис. 2.6. Измерение диаметра гриба

Противогрибковую активность растительных экстрактов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu. рассчитывали в процентах ингибирования (I) роста колоний в соответствии со следующим уравнением (5) (Kordali S., Sakir A., Akcin T.A., et all, 2009):

$$\text{Ингибирование (I, \%)} = \left(\frac{C - T}{C} \right) \times 100 \quad (5)$$

где, C и T - диаметр колонии гриба на контрольной среде (МС + 0,03% ДМСО) и среде с добавлением экстракта, соответственно.

Удельная суточная скорость роста (μ) гриба была рассчитана в соответствии со следующим уравнением (6) (Trenkenshu, 2019):

$$\mu = \frac{(\ln D2 - \ln D1)}{(t2 - t1)} \quad (6)$$

где D1 и D2 представляют собой диаметр грибковой колонии на контрольной среде (МС + 0,03% ДМСО) или среде с добавлением экстракта в момент времени t1 и t2, соответственно.

Для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ), образуемых грибами *Fusarium oxysporum* при культивировании на каждом из исследуемых вариантов сред, использовали метод прямого подсчёта в камере Горяева. Подготовку суспензий проводили следующим образом: стерильным скальпелем отделяли от колонии гриба сегмент прямоугольной формы площадью 45 мм² (10 мм × 45 мм) таким образом, чтобы сегмент располагался на линии радиуса чашки Петри диаметром 90 мм (Рис. 2.7).

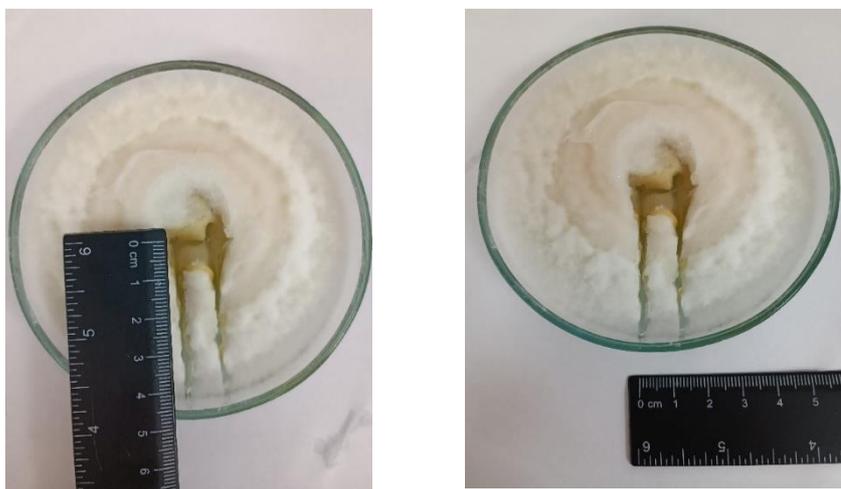


Рис. 2.7. Размер сегмента колонии гриба, отделённого для приготовления суспензии.

Пробу гриба срезали скальпелем с питательной среды и помещали в градуированную пробирку типа Falcon ёмкостью 50 мл и добавляли дистиллированную воду до объёма 15 мл. С целью получения однородной суспензии, содержимое пробирки гомогенизировали в течение 30 секунд с помощью погружного ротационного гомогенизатора Heidolph Silent Crusher M («Heidolph», Германия), используя скоростной режим «5» (Рис. 2.8).



Рис. 2.8. Гомогенизация суспензии гриба

Полученной суспензией с помощью дозатора заполняли камеру Горяева («Минимед», Россия), имеющую глубину $0,1 \pm 0,004$ мм, объём $0,9$ мм³, площадь сетки 9 мм², сторону большого квадрата $0,2 \pm 0,002$ мм, сторону малого квадрата $0,05 \pm 0,004$ мм и сторону сетки $3 \pm 0,005$ мм (Рис. 2.9).



Рис. 2.9. Камера Горяева («Минимед», Россия)

Суспензию в камере Горяева анализировали при помощи микроскопа, используя окуляры с увеличением $20\times / 0,40$, $10\times / 0,25$ и $40\times / 0,65$. При подсчёте КОЕ учитывали только конидии. Подсчёт числа конидий производили в 10-ти больших квадратах камеры Горяева, выбирая квадраты по диагонали сверху вниз справа налево (Рис. 2.10).

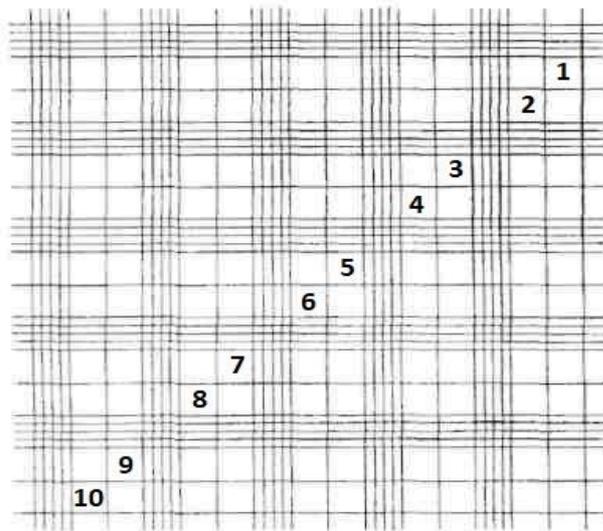


Рис. 2.10. Схема выбора квадратов для подсчёта КОЕ

Учитывали те конидии, которые находились в выбранном большом квадрате целиком либо более чем на 50 % (Рис. 2.11).

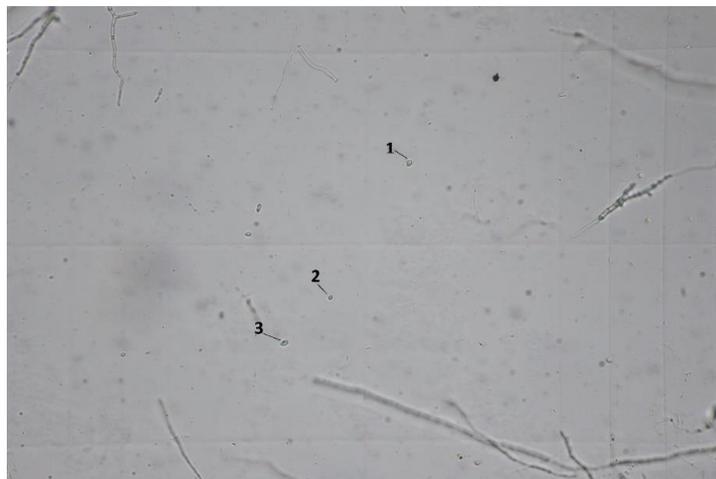


Рис. 2.11. Микроконидии в больших квадратах сетки камеры Горяева.

Увеличение с объективом 10х/ 0,25

Для определения концентрации КОЕ в 1 мл суспензии (М) использовали формулу (7):

$$M = a \times 2,5 \times 10^5 \quad (7)$$

где a – среднее количество конидий в 10-ти больших квадратах сетки камеры. Измерения проводили в 10-кратной повторности для каждой суспензии.

2.2.7 Определение суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов

Фенольные соединения определяли в растительных экстрактах, полученных из семян, листьев, корней и псевдопобегов интактных растений двух видов *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu. Для этого навеску растительного материала гомогенизировали 96 %-ным раствором этилового спирта в ступке, после чего экстракт переливали в стеклянную колбу и помещали в холодильник ($4\pm 2^\circ\text{C}$) на 48 ч. для прохождения экстракции. Затем полученную смесь фильтровали через фильтровальную бумагу дважды. Полученный чистый раствор использовали для определения суммарного содержания фенольных соединений (TPC) и флаваноидов (TFC).

Определение ССФС проводили с помощью спектрофотометра. Смесь 200 мкл раствора экстракта с 400 мкл разбавленного реагента Фолин-Чокалтеу (10%) тщательно перемешивали. Затем добавляли 1600 мкл раствора Na_2CO_3 (700 мм) и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Оптическую плотность (ОП) измеряли при 765 нм с помощью спектрофотометра UV-Vis. Стандартная кривая галловой кислоты была получена при тех же условиях, что и выше, с использованием диапазона концентраций. Общее количество фенольных соединений измеряли в эквивалентах галловой кислоты (мкг галловой кислоты, эквивалентной GAE/мг экстракта) (Singh et al., 2005; Ainsworth, Gillespie, 2007; Khalloufi et al., 2012; Mahdavia, Saharkhiz, 2015).

Определение флаваноидов (TFC) проводили по следующей методике: смесь 1500 мкл раствора экстракта с 75 мкл раствора хлорида алюминия (10%), 75 мкл ацетата калия (1 М) и 2100 мкл дистиллированной воды тщательно перемешивали. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. Измерение оптической плотности проводили при 415 нм с помощью

спектрофотометра UV-Vis относительно стандартной кривой, полученной с помощью кверцетина. Содержание флавоноидов было выявлено в эквиваленте кверцетина (мкг кверцетинового эквивалента QE/мг экстракта) (Garg, Shaikh, Muley, 2012).

2.2.8 Проведение микроскопических исследований семян

Характеристики формы, цвета и размера семян исследовали с помощью стереомикроскопа (Zeiss Stemi DV4).

Подробная морфология и анатомия семян были оценены с помощью стереомикроскопа и сканирующего электронного микроскопа, модель JEOL JSM-6380. Для проведения исследований семян *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu. на сканирующем электронном микроскопе, их первоначально промывали водой и затем сушили. После этого их промывали 70% этиловым спиртом в течение 3 минут, чтобы очистить их от мусора. 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.

2.3 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 $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3

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

На первом этапе клонального микроразмножения необходимо получить хорошо растущую стерильную культуру. Это можно достичь путем применения стерилизующих веществ, позволяющих освободить первичные экспланты от внешней инфекции. Для этого применяют различные стерилизаторы, например, ртуть- и хлорсодержащие препараты. Наиболее эффективные стерилизующие агенты – это сулема (гипохлорид ртути ($HgCl_2$)) в концентрации 0,1% и гипохлорид кальция ($Ca(ClO)_2$) в концентрации 5-10%. Для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* исследования в культуре *in vitro* ранее не проводились, поэтому разработка технологии получения стерильной культуры растений данного вида, является первостепенной задачей в работах по клеточной инженерии.

3.1 Получение стерильной культуры *A. tsao-ko*

3.1.1 Введение в культуру *in vitro* семян

Для получения стерильной культуры семян *A. tsao-ko* применяли два стерилизатора. Основные результаты исследований, приведены в таблице 3.1.

Результаты исследований показали, что частота получения стерильной культуры зависит от применяемого стерилизатора и его временной экспозиции воздействия на семена. Так, экспериментально установлено, что применение 70%-ного этанола была неэффективно, так как в этом варианте наблюдали 100% проявление внешней инфекции. При использовании 0,1%-ного раствора хлорида ртути и обработка семян в течение 10 минут был получен максимальный выход стерильных семян и этот показатель составил 51,39%. В случае использования гипохлорита кальция лучшие результаты (19,4%) были получены в варианте использования стерилизатора в концентрации 10% и временной экспозиции воздействия на семена в течение 15 минут.

Таблица 3.1

Влияние различных стерилизующих агентов на процент свободных от загрязнений семян черного кардамона (*A. tsao-ko*) через 10 суток после посева

Стерилизующий агент	Концентрация (% , w/v)	Время воздействия (мин.)	Стерильные семена (%) *	Зараженные семена (%) *
Этиловый спирт	70	1	0,00 ± 0,00 g	100,00 ± 0,00 a
Ca(ClO) ₂	5	5	2,78 ± 1,39 f,g	97,22 ± 1,39 b
Ca(ClO) ₂	5	10	5,56 ± 1,38 e,f	94,44 ± 1,38 b,c
Ca(ClO) ₂	5	15	11,11 ± 3,67 d,e	88,89 ± 3,67 c,d
Ca(ClO) ₂	10	5	6,94 ± 1,38 e,f	93,06 ± 1,38 b,c
Ca(ClO) ₂	10	10	15,28 ± 1,39 c,d	84,72 ± 1,39 d,e
Ca(ClO) ₂	10	15	19,44 ± 3,67 c	80,56 ± 3,67 d,e
HgCl ₂	0,1	5	20,83 ± 2,40 c	79,17 ± 2,40 e
HgCl ₂	0,1	10	51,39 ± 5,01 a	48,61 ± 5,01 g
HgCl ₂	0,1	15	37,50 ± 2,40 b	62,50 ± 2,40 f

* Средние значения (% , среднее ± 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.

Различный стерилизующий эффект хлорида ртути и гипохлорита кальция можно объяснить различной активностью действующего вещества. Кроме того, семена имеют некоторые особенности в строении семян. Например, поверхность семян кардамона имеет неровную поверхность, в углублениях которых могут скапливаться микроорганизмы, а присеменник (ариллус) трудно удалить полностью с семян, поэтому его остатки могут быть источником развития микроорганизмов, что приводит к заражению семян.

В связи с тем, что не существует никакой информации о строении и морфологии семян вида *A. tsao-ko*, то представлялся интерес провести исследования такого плана. Детальное изучение поверхности семян было

проведено с применением стереомикроскопа и электронного микроскопа (SEM), а также были получены биометрические показатели семян.

Установлено, что семена черного кардамона имели диаметр около 0,35-0,7 см, форму многоугольника, цвет коричневый или черный и были покрыты серовато-белыми мембранными ариллусами (Рис. 3.1 А– В). У них был острый, слегка пряный, ароматный запах. Масса 100 свежих и сушеных семян составила 9,536 г и 6,114 г, соответственно.

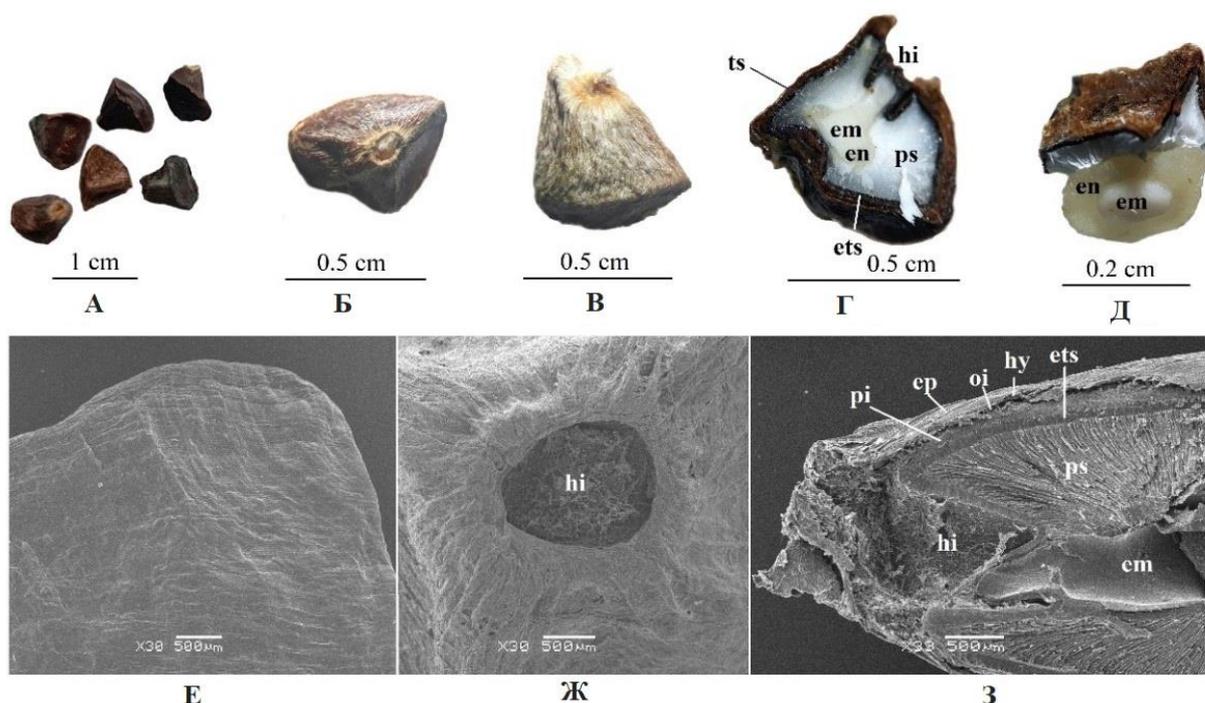


Рис. 3.1. Семена черного кардамона: (А–Б) морфологические характеристики семян; (В) семя, покрытое ариллусом; (Г–Д) анатомическая характеристика семян под стереомикроскопом: ts – эпидермальные клетки семенников, tg – покровный слой, hi – рубчик семени, ps – перисперм, en – эндосперм, em – зародыш; (Е–З) анатомическая характеристика семян под SEM: ep – эпидермальные клетки семенников, oi – слой масляных клеток

С помощью электронной микроскопии на продольном срезе семян черного кардамона были выделены шесть структур, в том числе эпидермальные клетки семенников, состоящие из одного слоя продольно вытянутых клеток; слой масляных ячеек прямоугольной формы; толстый покровный слой, красновато-коричневого цвета; полностью развитый линейный зародыш; мелкий эндосперм; перисперм вокруг эндосперма и зародыша (Рис. 3.1 Г– З).

Все эти особенности строения семян, в частности неровная поверхность, свидетельствуют о целесообразности применения более сильного стерилизатора, в частности, хлорида ртути, что и было подтверждено нашими исследованиями. Кроме того, было показано, что эффективность получения стерильных семян зависит и от временной экспозиции воздействия стерилизатора на них. Установлена прямая корреляция – с увеличением времени воздействия, увеличивается выход стерильных семян. Эффект обеззараживания поверхности семян 0,1% HgCl₂ был продемонстрирован на различных видах растений, например, гвоздика (*Dianthus caryophyllus* L.) (Khatun, Roy, Razzak, 2018) нут (*Cicer arietinum* L.) (Sadhu, 2020), черный грамм (*Vigna mungo* L. Hepper) (Adlinge et al., 2014), *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild (Venkatachalam, Kalaiarasi, Sreeramnan, 2015) и др. Высокая эффективность при обеззараживании поверхности семян 0,1% HgCl₂ наблюдалась также у некоторых видов семейства Имбирные, например, у зеленого кардамона (*Elettaria cardamomum* Maton) (Srinivasa Rao et al., 1982) и *Alpinia galanga* Willd. (Baradwaj et al., 2016). Вмешиваясь в ферменты и белки клеточных мембран и цитоплазмы загрязняющих патогенных микроорганизмов, ионы ртути в HgCl₂ эффективно дезинфицируют многие виды эксплантов. Однако длительное воздействие ионов ртути стимулирует микроорганизмы к образованию спор, которые делают их устойчивыми к дезинфицирующим средствам. Это, вероятно, является причиной снижения эффективности дезинфекции при увеличении времени экспозиции до 15 минут с тем же дезинфицирующим средством, 0,1% HgCl₂ (Табл. 3.1).

Таким образом, на основании первых исследований нами было установлено, что наилучшим вариантом получения высокого процента стерильных семян является обработка их 0,1%-ным раствором хлорида ртути в течение 10 минут. Данная схема стерилизации была применена в дальнейших исследованиях.

В эксперименте по оценке влияния различных разбавленных концентраций базальной среды МС, пять испытанных составов среды оказали значительное влияние на параметры прорастания семян черного кардамона (Табл. 3.2).

**Прорастание *in vitro* семян черного кардамона (*A. tsao-ko*) через 90 суток
после посева на питательные среды**

Вариант среды *	GP (%, среднее \pm SE) **	MGT (дней, среднее \pm SE) ***	GRI (среднее \pm SE) ****
МС	5,33 \pm 1,33 d	86,67 \pm 3,33 a	0,0153 \pm 0,0035 d
1/2-МС	9,33 \pm 1,33 c	75,56 \pm 0,55 b	0,0357 \pm 0,0048 c
1/4-МС	13,33 \pm 1,33 b	69,00 \pm 1,92 c	0,0562 \pm 0,0059 b
1/16-МС	21,33 \pm 1,33 a	67,11 \pm 2,56 c	0,1161 \pm 0,0124 a
Дистиллированная вода	20,00 \pm 2,31 a	68,72 \pm 0,43 c	0,1089 \pm 0,0131 a

*) МС = Murashige и Skoog (1962); 1/2- МС, 1/4- МС и 1/16- МС = базальная среда МС, разбавленная до концентрации 1/2, 1/4 и 1/16; **) GP (%) = Процент всхожести; средние значения были преобразованы в $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом; ***) MGT = Среднее время прорастания; ****) GRI = Индекс всхожести. В каждом столбце одинаковые буквы не имеют значительных различий при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана.

Данные, полученные в этом эксперименте, показали, что состав базальной среды существенно влияет на прорастание *in vitro* семян черного кардамона (Таблица 3.2). Параметры прорастания семян, полученные в среде с низким содержанием солей, были в целом лучше, чем в базальной среде с полным содержанием солей МС. Среди пяти протестированных сред среда МС, разбавленная до 1/16 концентрации, оказалась лучшей для проращивания семян черного кардамона. В этой среде были зарегистрированы лучшие значения параметров прорастания семян, в частности, самое высокое значение GP (21,33%), самое низкое значение MGT (67,11 суток) и самое высокое значение GRI (0,1161). Базальная среда с полноводными солями MS дала наименьшее значение GP (5,33%), наибольшее значение GMT (86,67 суток) и наименьшее значение GRI (0,0153).

В целом, результаты этого исследования показали, что среды с низким содержанием соли являются лучшими для прорастания семян кардамона *in vitro* (Рис. 3.2).

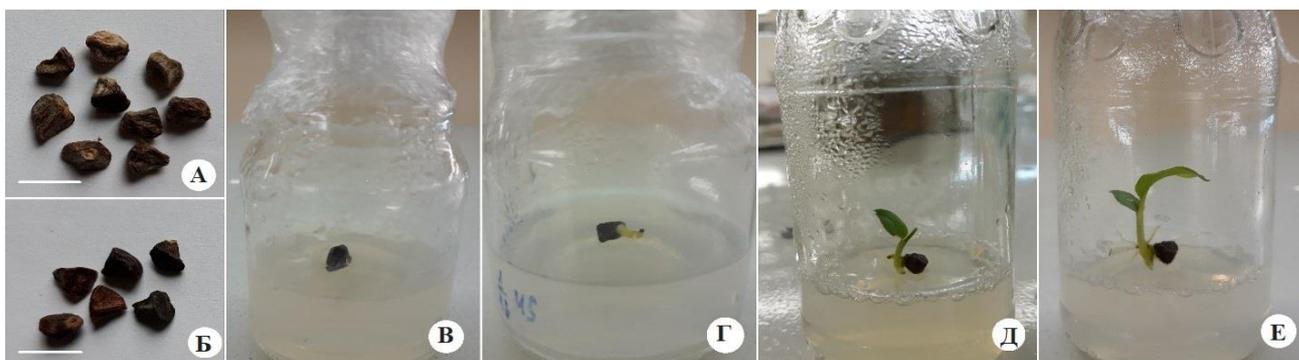


Рис. 3.2. Протокол прорастания семян черного кардамона (*A. tsao-ko*) *in vitro*: А - семена, покрытое ариллусом; Б – семена, ариллус был удален; В - семена инокулировали в среду МС, разбавленную до концентрации 1/16 после дезинфекции; Г - семена проросли через 50 дней инокуляции; Д - проросток, наблюдаемый через 70 дней после инокуляции семян; Е - проросток, наблюдаемый через 90 дней после инокуляции семян. Масштабные линейки = 1 см

Последовательность прорастания семян *A. tsao-ko in vitro* приведена на рисунке 3.3. Визуальные исследования показали, что прорастание семян начиналось с появления зародышевого корешка и формирования первичного корня. По мере прорастания семян наблюдали появление придаточных корней (Рис. 3.3 А–Б). Позже в процессе появился coleoptиль и первые настоящие листья (Рис. 3.3 В–Д).

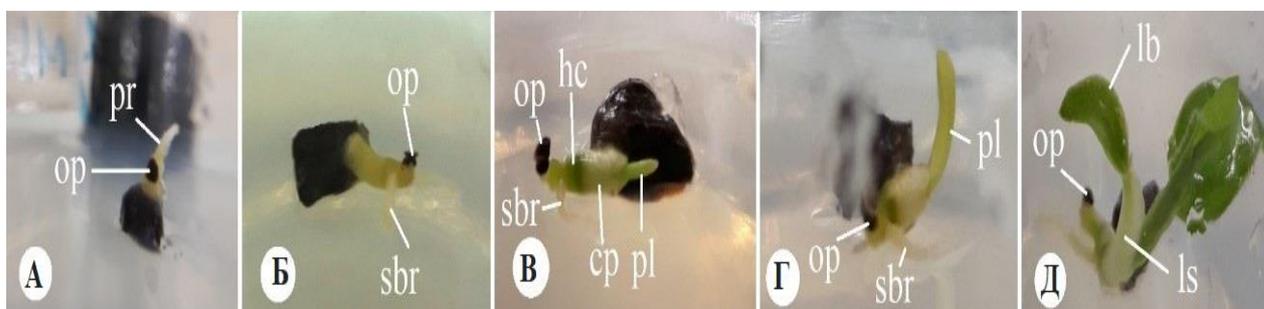


Рис. 3.3. Последовательность прорастания семян черного кардамона: (А–Б) формирование корешка: op – оперкулум, pr – первичный корень, sbr – придаточный корень; (В) формирование coleoptиля: cp – coleoptиль, hc – гипокотиль, pl – первичный лист; (Г–Д) – формирование нормального листа: lb – лист, ls – листовая оболочка

В большинстве случаев базальная среда с полным содержанием солей МС использовалась для проращивания семян многих видов растений, например, торомиро (*Sophora toromiro* Skotts.) (Jordan et al., 2001), свинсонпеа (*Swainsona salsula* Taub.) (Yang et al., 2001) и хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) (Barampuram, Allen, Krasnyanski, 2014). Однако многие отчеты также показали,

что среды с низким содержанием соли лучше всего подходят для проращивания семян *in vitro*, например, дикого розового диантуса (*Dianthus zeyheri* Sond.) (Crouch, Van Staden, 1993), *Dalzellia zeylanica* Wight (Uniyal, Ram, 1996) и *Bulbine caulescens* L. (Bringmann, Noll, Rischer, 2002). Некоторые исследования прорастания семян *in vitro* у некоторых видов семейства Имбирных дали схожие результаты. Srinivasa Rao et al. сообщили, что семена зеленого кардамона (*Elettaria cardamomum* Maton) успешно проросли на питательном агаре Уайта (Srinivasa Rao et al., 1982). По данным Ergete, разбавленная среда МС подходит для проращивания *in vitro* семян коарима (*Aframomum corrorima* P.C.M. Jansen) (Ergete, 2004). Наши результаты также показали, что среда с низким содержанием соли была лучшей для проращивания *in vitro* семян черного кардамона. Количество воды, впитанной семенами, регулирует гидролиз запасенных липидов в эндосперме, что является важным этапом прорастания семян и может быть причиной такого результата (George, 1993). Скорость имбибиции воды во время прорастания семян полностью зависит от осмотического потенциала внутренней и внешней среды семени. Поэтому культуральная среда с низким содержанием органических солей является более благоприятной для впитывания воды семенами.

На самом деле, согласно опыту местных жителей, семена черного кардамона имеют очень низкий процент естественного прорастания. Известно, что увеличить всхожесть семян можно за счет не только применяя механического воздействия (скарификация), но и за счет применения химических (регуляторы роста, кислоты и др.) и физических факторов (ионизирующее излучение, спектральный состав света, температурная обработка и др.). Для семян черного кардамона применение вышеуказанных приемов крайне важно, так как семена имеют очень плотную оболочку и маленький запас питательных веществ в эндосперме, что затрудняет их прорастание (Dawid, 2019).

Основная цель следующего исследования заключалась в применении различных методов обработки семян (смотри таблицу 2.1) для нарушения их

покоя, тем самым повышая скорость их прорастания. Полученные результаты приведены в таблице 3.3 и рисунок 3.4.

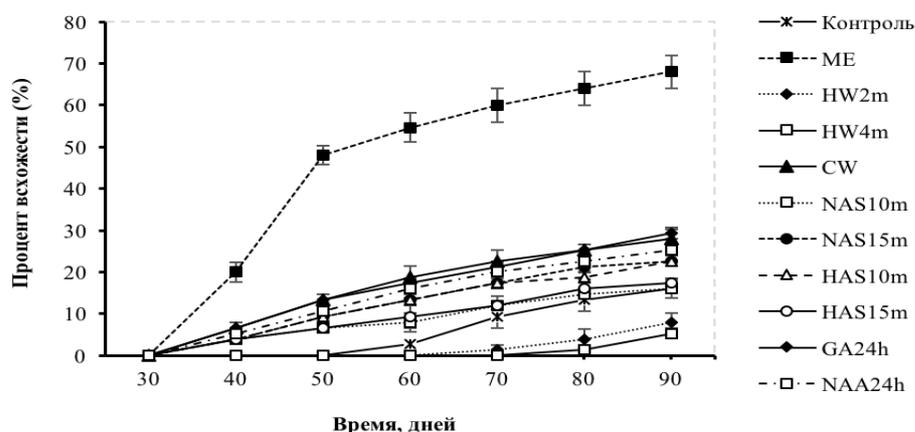


Рис. 3.4. Прорастание семян черного кардамона *in vitro* при различных видах обработки

Таблица 3.3

Различные виды обработки семян влияют на всхожесть семян черного кардамона, выращенных *in vitro*

Способ обработки	Стерильные семена (%) *	GP (%) **	MGT (суток) ***	GRI ****
Контроль	68,0 ± 2,3 c	16,0 ± 2,1 c	74,7 ± 2,9 b	0,05 ± 0,01 e
ME	69,3 ± 2,7 c	68,0 ± 4,0 a	53,7 ± 0,7 d	0,34 ± 0,02 a
HW2m	66,7 ± 2,7 c	8,0 ± 2,3 d	85,0 ± 2,9 a	0,02 ± 0,01 f
HW4m	68,0 ± 4,6 c	5,3 ± 1,0 d	88,3 ± 1,7 a	0,02 ± 0,00 f
CW	68,0 ± 2,3 c	28,0 ± 2,2 b	58,9 ± 1,4 cd	0,13 ± 0,01 b
NAS10m	78,7 ± 1,3 b	16,0 ± 2,0 c	61,4 ± 3,3 c	0,07 ± 0,01 de
NAS15m	84,0 ± 2,3 ab	22,7 ± 1,3 bc	61,1 ± 2,0 c	0,10 ± 0,01 cd
HAS10m	82,7 ± 1,3 ab	22,7 ± 1,3 bc	62,3 ± 1,5 c	0,10 ± 0,01 cd
HAS15m	86,7 ± 1,3 a	17,3 ± 1,0 c	62,5 ± 3,8 c	0,08 ± 0,01 de
ГК24h	66,7 ± 4,8 c	29,3 ± 1,2 b	61,4 ± 0,8 c	0,13 ± 0,01 b
НУК24h	62,7 ± 2,7 c	25,3 ± 1,1 b	60,6 ± 2,2 cd	0,11 ± 0,01 bc

Обработки: Контроль; ME - вымачивание в воде в течение 24 часов + скарификация скальпелем; HW2m и HW4m - вымачивание в горячей воде 100 °С в течение 2 и 4 минут, соответственно; CW - вымачивание в холодной воде 24 часа, NAS10m и NAS15m - вымачивание в 50% HNO₃ в течение 10 и 15 минут, соответственно; HAS10m и HAS15m - вымачивание в 25% HCl в течение 10 и 15 минут, соответственно; GA24h - вымачивание в 200 ppm GA3 в течение 24 часов, NAA24h - вымачивание в 200 ppm NAA в течение 24 часов. Значения, обозначенные разными

буквами, достоверно различаются на уровне альфа 0,05 согласно тесту множественного диапазона Дункана. Процентные значения были преобразованы по $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом. *) Среднее \pm стандартная ошибка. **) GP (%) = Процент всхожести. ***) MGT = Среднее время прорастания. ****) GRI = Индекс всхожести.

Результаты показали, что эффективность поверхностной стерилизации семян 0,1% HgCl₂ в течение 10 минут значительно отличалась между обработками семян после 10 суток с начала культивирования (Табл. 3.3). При кислотной скарификации семян процент стерильных семян был значительно выше по сравнению с другими видами обработки. Среди них семена, погруженные в 25% HCl на 15 минут и дезинфицированные 0,1% HgCl₂ в течение 10 минут на следующем этапе, дали самый высокий процент свободных от инфекции семян (86,7%). При других видах обработки семян не было статистически значимой разницы в проценте стерильных семян по сравнению с контролем.

Результаты также показали, что существует значительная разница в прорастании семян черного кардамона при различной обработке семян на уровне ($P \leq 0,05$) (Табл. 3.3). Применение механической скарификации (ME) обеспечило самый высокий средний процент прорастания (68,0%) и самое низкое среднее время прорастания (53,7 суток) после 90 суток с начала культивирования. При этой обработке для прорастания 50% семян потребовалось всего около 50 суток, в то время как во всех других вариантах обработки процент прорастания был ниже 50% (рис. 3.4). Обработка семян путем их погружения в холодную воду (CW) или обработка регуляторами роста растений (ГК 24 ч и НУК 24 ч) также показала значительно более высокий средний процент прорастания по сравнению с контролем. Кислотная скарификация семян (HCl 10 мин, HCl 15 мин, HNO₃ 10 мин и HNO₃ 15 мин) не оказала значительного влияния на процент прорастания семян черного кардамона, но значительно сократила время прорастания семян по сравнению с контролем. Обработка горячей водой (HW 2 мин и HW 4 мин) оказала отрицательное влияние на прорастание семян (Табл. 3.3). Кроме того, после культивирования семян в течение 90 суток не привело к прорастанию семян ни в одном из исследуемых вариантов обработки.

С другой стороны, применение скарификации, ГК (24 ч) и НУК (24 ч) значительно улучшили длину проростков *in vitro* и количество листьев после 20 суток с момента прорастания (90 суток). При других обработках семян не было статистически значимых различий в средней длине проростков и среднем количестве листьев по сравнению с контролем (Табл. 3.4, Рис. 3.5).

Таблица 3.4

Влияние различных видов обработки семян на рост проростков черного кардамона после 110 суток культивирования *in vitro*

Способ обработки	Длина проростка (см) *	Количество листьев (шт)*
Контроль	2,09 ± 0,11 bc	1,83 ± 0,15 b
ME	3,05 ± 0,07 a	3,07 ± 0,02 a
HW2m	1,87 ± 0,08 cd	1,62 ± 0,25 b
HW4m	1,66 ± 0,08 d	1,58 ± 0,28 b
CW	2,25 ± 0,05 b	2,70 ± 0,1 a
NAS10m	2,17 ± 0,07 bc	1,75 ± 0,14 b
NAS15m	2,23 ± 0,1 b	1,80 ± 0,17 b
HAS10m	2,10 ± 0,17 bc	2,62 ± 0,09 a
HAS15m	2,07 ± 0,11 bc	2,58 ± 0,14 a
GA24h	2,93 ± 0,1 a	2,79 ± 0,16 a
НУК 24h	2,81 ± 0,16 a	2,95 ± 0,07 a

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

Твердость семенной оболочки является важным фактором, влияющим на прорастание семян (Aref, 2011). Покой семян отмечен у нескольких видов *Zingiberaceae*, включая *Alpinia malaccensis* Roscoe (Rivai, Wardani, Devi, 2015), *Alpinia galanga* Willd. (Baradwaj et al., 2016), *Aframomum corrorima* (Braun) PCM Jansen (Eyob, 2009; Dawid, 2019), большой кардамон (Bhowmick, Chattopadhyay, 1960) и зеленый кардамон (Dahanayake, 2015). Несколько авторов (Alamgir and Hossain 2005a, 2005b; Azad et al., 2006a, 2006b, 2010a, 2010b, 2011) обсудили

различные методы предпосевной обработки для проращивания семян, чтобы нарушить режим покоя и повысить скорость прорастания. Наши исследования показали, что обработка семян оказала значительное влияние на параметры прорастания и роста семян черного кардамона. Среди применяемых способов обработки семян механическая скарификация оказала наилучшее влияние на параметры прорастания семян и последующее развитие проростков.

Hartmann (Hartmann et al., 1997), Copeland (Copeland, McDonald, 2012), Missanjo (Missanjo, Chioza, Kulapani, 2014) и Botseleng (Botsheleng, Mathowa, Mojeremane, 2014) в своих работах отметили, что механическая обработка является идеальным методом для нарушения целостности оболочки семян, что было продемонстрировано нами в наших исследованиях. Однако исследования, проведенные другими авторами, свидетельствуют об эффективности применения химических методов обработки семян. Согласно индийским ученым Radhamani с соавторами (Radhamani, Malik, Chandel, 1991), обработка семян *Elettaria cardamomum* серной кислотой (25%) в течение 10 минут и абсолютным спиртом (80%) в течение 30 минут оказалась лучшей среди всех исследуемых обработок для нарушения целостности семян и повышения их всхожести. Ученые из Шри-Ланки Dahanayake (Dahanayake, 2015) сообщил, что обработка семян HNO_3 в течение 15 минут была наиболее эффективной в отношении покоя семян *Elettaria cardamomum*. Однако, по мнению ряда авторов, существуют и другие эффективные химические вещества, оказывающие стимулирующий эффект на прорастание семян. Так, например, по данным Seid с соавторами (Seid et al., 2019), замачивание семян в 80% спирте в течение 30 мин было наиболее эффективным методом для нарушения покоя семян *E. cardamomum*, а для *A. corrorima* наилучший эффект был получен при использовании комбинированной обработки семян серной кислотой и гибберелловой кислотой (Euob, 2009). Анализ литературных данных показал, что помимо химических методов обработки семян существуют и физические методы, стимулирующие прорастание семян. Например, согласно Rivai и коллег (Rivai, Wardani, Devi, 2015), выдерживание

семян в горячей воде 75 °С в течение 5 мин приводило к увеличению всхожести семян *A. malaccensis*.

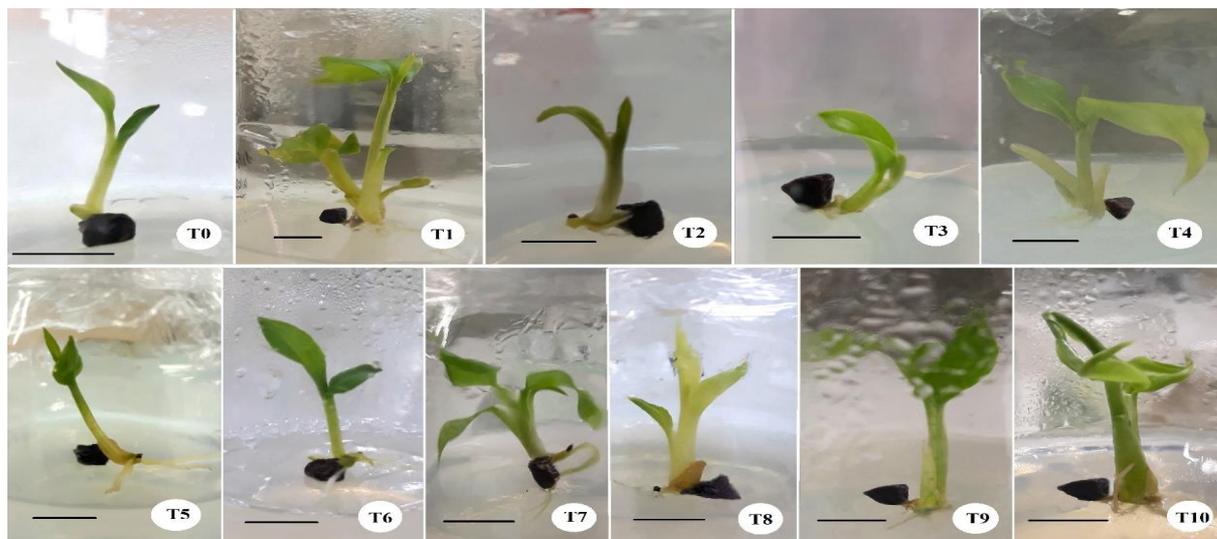


Рис. 3.5. Рост проростков черного кардамона на 110-й день при различной обработке семян: T0 - контроль; T1 - ME (скарификация скальпелем); T2 - HW2m (замачивание в горячей воде 100 °С на 2 минут); T3 - HW4m (замачивание в горячей воде 100°С на 4 минут); T4 - CW (замачивание в холодной воде 24 часа); T5 - NAS10m (замачивание в 50% HNO₃ на 10 минут); T6 - NAS15m (замачивание в 50% HNO₃ на 15 минут); T7 - HAS10m (замачивание в 25% HCl на 10 минут); T8 - HAS15m (замачивание в 25% HCl на 15 минут); T9 - GA24h (замачивание в 200 ppm GA3 на 24 часа); T10 - NAA24h (замачивание в 200 ppm NAA на 24 часа). Масштабные линейки = 1 см

3.1.2 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 грибковых патогенов, что затрудняет стерилизацию таких эксплантов. В нашем исследовании для стерилизации корневищ использовали HgCl₂ или Ca(ClO)₂ в различных концентрациях. Основные результаты приведены в таблице 3.5.

Исследования позволили установить некоторые закономерности в применении различных стерилизующих агентов: 1) с увеличением концентрации стерилизатора уменьшается инфицированность эксплантов; 2) с повышением времени воздействия стерилизатора на эксплант повышается выход асептической культуры; 3) использование хлорида ртути (HgCl₂) оказывает более выраженное

действие на ингибирование развития внешней инфекции, по сравнению с гипохлоридом кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). Наилучшие результаты по получению асептической культуры корневищ были отмечены при использовании HgCl_2 в концентрации 0,1% 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. Что касается $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, то наилучшие результаты получены в случае использования его в концентрации 10% и экспозиции воздействия 12 минут. В этом варианте частота прорастания асептических культур составила 6,73%, что примерно в 3 раза ниже по сравнению с лучшим вариантом HgCl_2 .

Таблица 3.5

Влияние типа стерилизующего агента и его временной экспозиции воздействия на эффективность стерилизации корневищ

Стерилизующий агент/ время воздействия	Инфицированные экспланты (%) *	Стерильные не проросшие экспланты (%) *	Стерильные проросшие экспланты (%) **
Контроль	100 a	0 g	0 h
0,05 (w/v) HgCl_2 / 4 мин.	80,36 ± 4,32 cd	14,07 ± 1,11 e	5,57 ± 0,22 ef
0,05 (w/v) HgCl_2 / 8 мин.	62,08 ± 3,88 ef	28,37 ± 1,89 c	9,55 ± 1,45 c
0,05 (w/v) HgCl_2 / 12мин.	57,30 ± 3,27 f	34,90 ± 2,88 b	7,80 ± 0,44 d
0,10 (w/v) HgCl_2 / 4 мин.	76,40 ± 4,01 cd	12,62 ± 1,11 e	10,98 ± 0,56 bc
0,10 (w/v) HgCl_2 / 8 мин.	54,06 ± 3,22 fg	27,65 ± 2,35 c	18,29 ± 1,02 a
0,10 (w/v) HgCl_2 / 12мин.	43,50 ± 2,45 g	45,35 ± 2,53 a	11,15 ± 0,55 b
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 4 мин.	96,35 ± 3,55 ab	1,85 ± 0,91 g	1,80 ± 0,06 g
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 8 мин.	89,65 ± 4,58 abc	5,95 ± 0,37 f	4,40 ± 0,23 f
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 12мин.	85,20 ± 4,55 bcd	10,35 ± 0,59 e	4,45 ± 0,28 f
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 4мин.	96,30 ± 3,34 ab	1,48 ± 0,08 g	2,22 ± 0,11 g
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 8мин.	84,40 ± 4,41 bcd	10,38 ± 0,67 e	5,22 ± 0,28 ef
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ /12 мин.	71,80 ± 3,89 de	21,47 ± 1,33 d	6,73 ± 0,35 de

*, ** Средние значения (% , среднее ± 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. **) Средние значения были преобразованы в \sqrt{X} перед статистическим анализом.

Наши результаты полностью согласуются с данными других авторов, например, Pradhan с коллегами (Pradhan et al., 2014), а также Poudel с коллегами (Poudel, Prasai, Shrestha, 2018), которые проводили исследования с *A. subulatum* Crevost & Lemarie. Поэтому наилучший вариант получения стерильной культуры можно рекомендовать для введения в культуру *in vitro* корневищ других видов кардамона.

3.2 Получение стерильной культуры *A. longiligulare*

3.2.1 Введение в культуру *in vitro* семян

Для получения стерильной культуры семян *A. longiligulare* применяли два стерилизующих средства – сулема (0,1%) и гипохлорит кальция (5 и 10%). В результате проведенных исследований установлено, что эффективность обеззараживания поверхности семян гипохлоритом кальция и сулемой значительно различалась между вариантами через 10 суток после высева семян на питательную среду *in vitro* (Табл. 3.6).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что простая обработка 70%-ным этанолом была неэффективной, так как имело место 100%-ное проявление контаминации семян. Наилучшие результаты по получению стерильной культуры (58,89 – 80,00%) были получены при использовании сулемы в различных временных экспозициях воздействия на семена. Причем в варианте обработки семян в течение 10 минут было зарегистрировано получение в 80,0% случаев стерильность культуры. Раствор гипохлорита кальция показал более низкую эффективность дезинфекции, чем раствор сулемы. Наилучшие результаты были достигнуты при концентрации 10% и при временной его экспозиции воздействия на семена в течение 15 минут – 41,11%. В результате проведения исследований, нами были выявлены некоторые закономерности - с увеличением времени воздействия повышалась эффективность дезинфекции. Однако следует отметить, что при дезинфекции семян 0,1%-ным раствором

сулемы в течение 15 мин был получен наилучший результат, но в последующие сутки наблюдений на поверхности многих семян появилась грибная инфекция.

Таблица 3.6

Влияние типа дезинфицирующего средства и времени воздействия на эффективность обеззараживания семян пурпурного кардамона через 10 суток после высева *in vitro*

Стерилизующий агент	Концентрация (% , w/v)	Время воздействия (мин.)	Стерильные семена (%) *	Зараженные семена (%) *
Этиловый спирт	70	1	0 e	100 a
Ca(ClO) ₂	5	5	18,89 ± 4,01 d	81,11 ± 4,01 b
Ca(ClO) ₂	5	10	28,89 ± 2,94 cd	71,11 ± 2,94 bc
Ca(ClO) ₂	5	15	32,22 ± 4,01 c	67,78 ± 4,01 c
Ca(ClO) ₂	10	5	20,00 ± 3,85 d	80,00 ± 3,85 b
Ca(ClO) ₂	10	10	38,89 ± 2,94 c	61,11 ± 2,94 c
Ca(ClO) ₂	10	15	41,11 ± 4,01 c	58,89 ± 4,01 c
HgCl ₂	0,1	5	58,89 ± 4,84 b	41,11 ± 4,84 d
HgCl ₂	0,1	10	80,00 ± 5,77 a	20,00 ± 5,77 e
HgCl ₂	0,1	15	70,00 ± 3,33 ab	30,00 ± 3,33 de

* Средние значения (% , среднее ± 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.

При работе с черным кардамоном был также зафиксирован наилучший дезинфицирующий эффект при использовании 0,1%-ного раствора сулемы. Однако для пурпурного кардамона дезинфицирующий эффект сулемы был выше, чем для черного кардамона. Это можно объяснить тем, что семена пурпурного амомума выделяют больше ароматических веществ, которые оказывают, вероятно, дополнительный дезинфицирующий эффект. В работах Srinivasa Rao с соавторами сообщается (Srinivasa Rao et al., 1982), проводимые с зеленым кардамоном (*Elettaria cardamomum* Maton) и Baradwaj et al. (Baradwaj et al., 2016) -

с *Alpinia galanga* Willd. также была продемонстрирована хорошая эффективность 0,1% HgCl₂ в дезинфекции поверхности семян.

В связи с тем, что не существует никакой информации о строении и морфологии семян вида *A. longiligulare*, то представлялся интерес провести исследования такого плана. Детальное изучение поверхности семян, а также продольного и поперечного среза было проведено с применением стереомикроскопа и электронного микроскопа (SEM), а также были получены биометрические показатели семян.

Семена пурпурного кардамона угловатые, диаметром 0,2–0,35 см, около 7-12 в зернышке, коричневые, затем черные, покрытые желтым мембранозным ариллузом. Они обладают слегка пряным и ароматным вкусом. Масса 100 свежих и сушеных семян составила $1,65 \pm 0,26$ и $1,22 \pm 0,15$ г соответственно.

От внешней до внутренней части семени наблюдаются структурные включения (Рис. 3.6):

(1) семенная оболочка. Она состоит из: эпидермиса семенной оболочки, имеющего волнистый рисунок поверхности и состоящего из одного слоя клеток; гиподермы, состоящей из одного слоя клеток, с коричнево-красным пигментом, удлиненной по касательной; жировых клеток, которые являются однослойными, крупными, субквадратичными; слоя пигмента, состоящего из нескольких слоев коричневых клеток; эндотеста, содержащего один слой частоклообразных склеренхиматозных клеток, коричнево-красного цвета.

(2) перисперма: хорошо развитая, состоящая из паренхимаподобных клеток, белого цвета и окружает эндосперм и эмбрион.

(3) эндосперм: маленький, серовато-белый, частично закрывающий зародыш.

(4) зародыш: линейный, белый и полностью развитый.

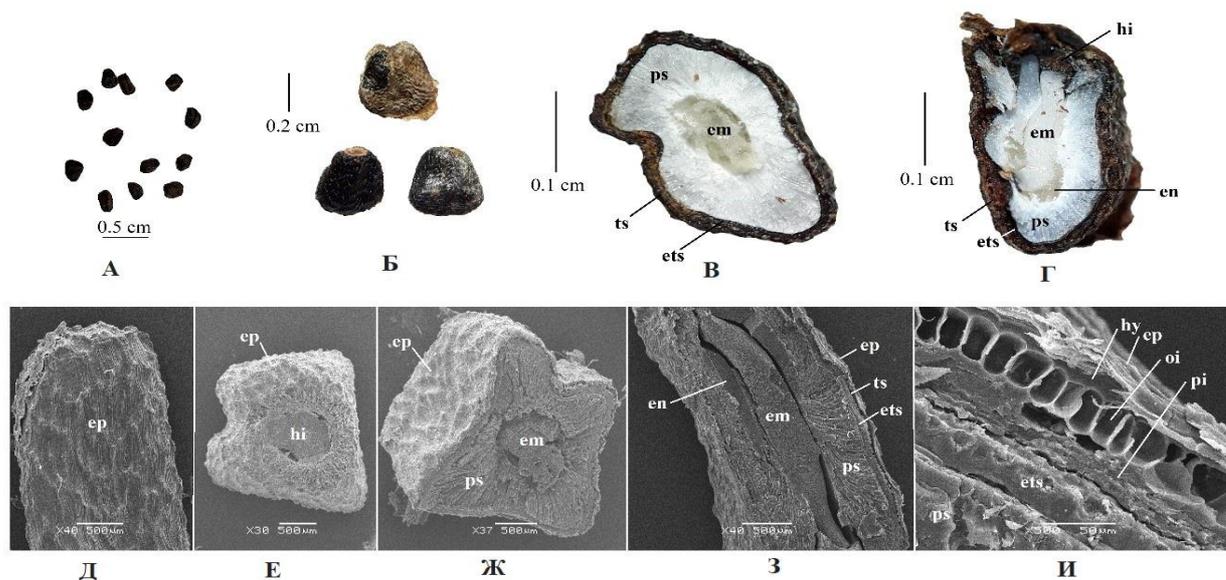


Рис. 3.6. Семя пурпурного амомума: (А) морфологические характеристики семени; (Б) семя покрыто ариллусом (вверху), семена с ариллусом были удалены (внизу); (В-Г) анатомические характеристики семени под стереомикроскопом (В - поперечный срез семени; Г – продольный срез семени): ts – теста, ets – эндотеста, hi – хилум, ps – перисперм, ep – 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

Результаты характеристики семян показали, что у обоих видов (черного кардамона и пурпурного кардамона) семена покрыты мембранным ариллусом. Однако у черного кардамона этот слой плотно прилегает ко всему слою эпидермиса и его трудно полностью удалить, в то время как у пурпурного кардамона слой ариллуса прилегает к эпидермису только вблизи хилума, поэтому его очень легко удалить. 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 пурпурного кардамона похоже на строение семян черного кардамона и некоторых других видов семейства имбирных (Wu et al., 2014), с тремя основными особенностями: (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, которые оказали значительное влияние на параметры прорастания пурпурного кардамона (Табл. 3.7, Рис. 3.7).

Таблица 3.7

Проращивание семян пурпурного кардамона *in vitro* через 60 суток после посева

Вариант среды *	GP (%, среднее ± SE) **	MGT (дней, среднее ± SE) ***	GRI (среднее ± SE) ****
МС	14,44 ± 2,94 с	39,17 ± 0,83 а	0,12 ± 0,028 с
1/2-МС	18,89 ± 1,11 bc	38,89 ± 0,74 а	0,15 ± 0,012 bc
1/4-МС	21,11 ± 1,11 ab	35,91 ± 1,20 ab	0,19 ± 0,018 bc
1/16-МС	27,78 ± 1,11 а	33,68 ± 1,35 b	0,27 ± 0,023 а
Дистиллированная вода	23,33 ± 1,93 ab	34,64 ± 1,15 b	0,21 ± 0,026 ab

*) МС = Murashige и Skoog (1962); 1/2- МС, 1/4- МС и 1/16- МС = базальная среда МС, разбавленная до концентрации 1/2, 1/4 и 1/16; **) GP (%) = Процент всхожести; средние значения были преобразованы в $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом; ***) MGT = Среднее время прорастания; ****) GRI = Индекс всхожести. В каждом столбце одинаковые буквы не имеют значительных различий при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана.

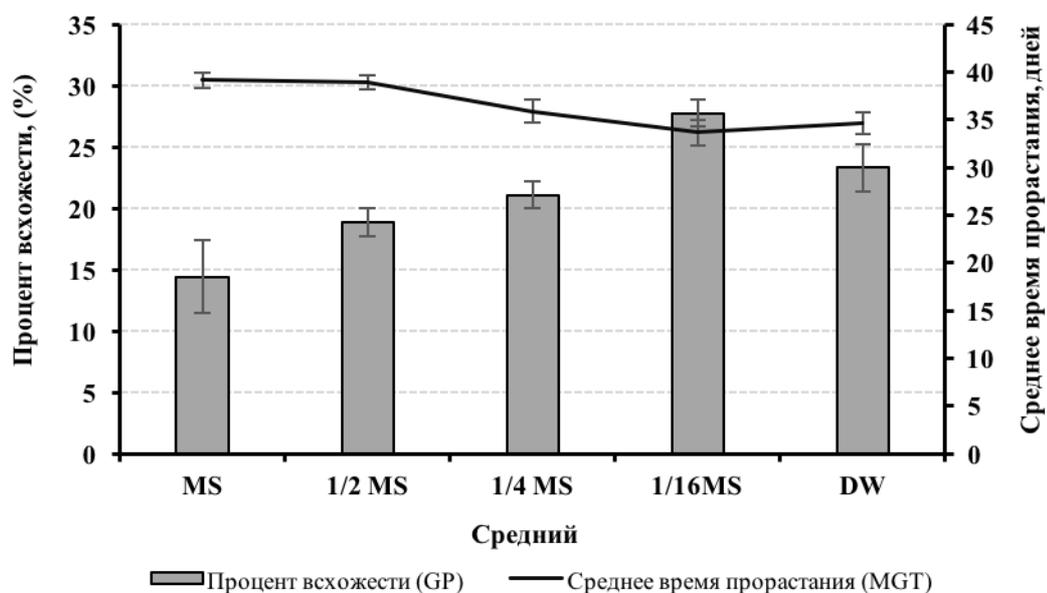


Рис. 3.7. Влияние различных питательных сред на процент прорастания (GP) и среднее время прорастания (MGT) семян пурпурного кардамона через 60 суток после посева

Результаты показали, что состав питательной среды оказывает существенное влияние на прорастание семян пурпурного кардамона *in vitro*. Установлено, что наименьший процент прорастания (GP), наибольшее среднее время прорастания (GMT) и наименьший индекс скорости прорастания (GRI) были зафиксированы на базовой среде с полным содержанием минеральных солей по прописи MS. Наилучшие результаты по учитываемым параметрам были получены на среде MS, разбавленной до концентрации 1/16, что привело к получению всхожести около 27,78%. Кроме того, семена, выращенные на среде 1/16 MS, прорастали в течение более короткого периода времени (33,68 суток) и имели самый высокий индекс всхожести (достигающий 0,27). В целом, результаты этого исследования показали, что среды с низким содержанием солей являются предпочтительнее для проращивания семян пурпурного амомума *in vitro*.

Этот результат согласуется с данными, полученными на черном кардамоне, представленными выше, а также с отчетами Srinivasa Rao et al. (Srinivasa Rao et al., 1982), которые успешно проращивали семена зеленого кардамона (*Elettaria*

cardamomum Maton) на питательной среде Уайта (1963), и Ergete (Ergete, 2004), который успешно проращивал семена эфиопского кардамона (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen) на разбавленной среде МС.

Процесс прорастания семян пурпурного кардамона мы проследили в динамике. Установлено, что появление корешка из семени отмечено на 34-ые сутки после посева (Рис. 3.8 Б), затем появлялся coleoptиль, который вырастал до 0,1-0,15 см (Рис. 3.8 В), затем наблюдали прекращение его роста и в дальнейшем происходило появление первого листа (Рис. 3.8 Г), который в дальнейшем увеличивался в размере и появлялись настоящие листья второго и третьего порядка (Рис. 3.8 Д). На другом конце зародышевой оси развивался основной корень и развивались придаточные корни.

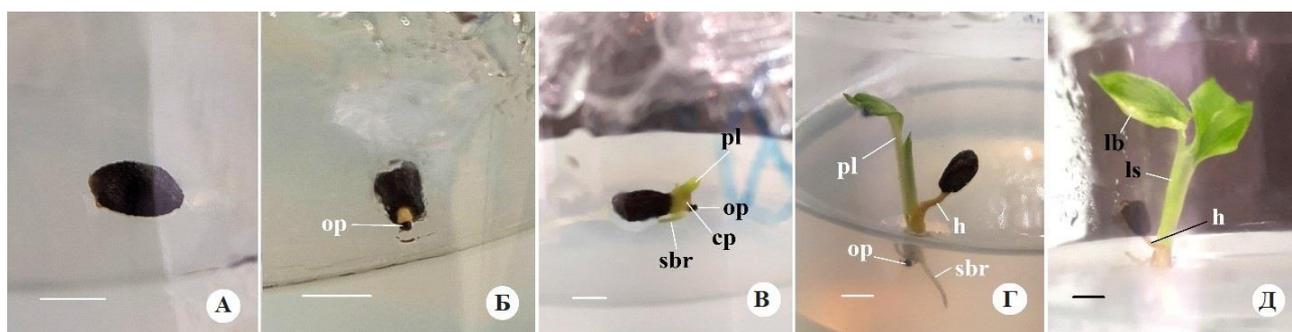


Рис. 3.8. Этапы проращивания *in vitro* семян пурпурного кардамона через 80 суток после посева на среду с 1/16 МС: (А) семена высевают на среду с 1/16 МС; (Б) появляется корешок (на 34-е сутки): *op* - оперкулум; (В) появляется coleoptиль и прокалывается первичным листом (на 40-е сутки): *cp* – coleoptиль, *hc* – гипокотиль, *pl* – первичный лист, *sbr* - корень на побегах; (Г-Д) первый лист растет, расширяется и дополняется дополнительными листьями (на 50-й и 80-й день посева соответственно): *h* - гаусторий, *lb* – листовая пластинка, *ls* – листовая оболочка. Столбики шкалы = 0,3 см.

Для пурпурного кардамона, как и для черного кардамона, были применены различные методы обработки семян (смотри таблицу 2.1) для нарушения их покоя, тем самым повышая время и скорость их прорастания. Основные результаты приведены в таблице 3.8 и рисунке 3.9.

**Различные виды обработки семян влияют на всхожесть семян пурпурного
кардамона, выращенных *in vitro***

Способ обработки	Стерильные семена (%) *	GP (%) **	MGT (дней) ***	GRI ****
Контроль	80,0 ± 1,92 b	28,9 ± 1,11 e	37,9 ± 0,45 ab	0,24 ± 0,01 e
ME	78,9 ± 2,22 b	57,8 ± 4,01 ab	34,7 ± 0,29 de	0,53 ± 0,03 ab
HW2m	78,9 ± 1,11 b	24,4 ± 2,94 e	38,7 ± 0,62 a	0,20 ± 0,02 e
HW4m	80,0 ± 1,92 b	26,7 ± 3,33 e	38,4 ± 0,46 a	0,22 ± 0,02 e
CW	78,9 ± 2,22 b	37,8 ± 2,94 d	37,3 ± 0,20 b	0,32 ± 0,02 d
NAS10m	84,4 ± 2,22 ab	53,3 ± 3,33 bc	34,6 ± 0,24 de	0,49 ± 0,03 b
NAS15m	85,6 ± 2,22 ab	56,7 ± 3,85 ab	33,8 ± 0,12 ef	0,54 ± 0,03 ab
HAS10m	85,5 ± 2,23 ab	58,9 ± 1,11 ab	35,1 ± 0,09 cd	0,54 ± 0,01 ab
HAS15m	86,7 ± 1,92 a	63,3 ± 1,92 a	33,4 ± 0,06 f	0,60 ± 0,02 a
GA24h	80,0 ± 1,92 b	45,6 ± 2,94 cd	35,9 ± 0,46 c	0,41 ± 0,02 c
NAA24h	81,1 ± 2,22 ab	44,4 ± 1,11 cd	35,2 ± 0,33 cd	0,41 ± 0,01 c

Обработки: Контроль; ME - вымачивание в воде в течение 24 часов + скарификация скальпелем; HW2m и HW4m - вымачивание в горячей воде 100 °С в течение 2 и 4 минут, соответственно; CW - вымачивание в холодной воде 24 часа, NAS10m и NAS15m - вымачивание в 50% HNO₃ в течение 10 и 15 минут, соответственно; HAS10m и HAS15m - вымачивание в 25% HCl в течение 10 и 15 минут, соответственно; GA24h - вымачивание в 200 ppm GA3 в течение 24 часов, NAA24h - вымачивание в 200 ppm NAA в течение 24 часов. Значения, обозначенные разными буквами, достоверно различаются на уровне альфа 0,05 согласно тесту множественного диапазона Дункана. Процентные значения были преобразованы по $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом. *) Среднее ± стандартная ошибка. **) GP (%) = Процент всхожести. ***) MGT = Среднее время прорастания. ****) GRI = Индекс всхожести.

Через 10 суток после посева семена, дезинфицированные 0,1% HgCl₂ в течение 10 мин, показали хорошие результаты во всех обработках (Таблица 3.8). В целом, не было статистически значимой разницы в проценте незараженных семян при обработке по сравнению с контролем, за исключением обработки кислотной скарификацией семян. При этой обработке процент незараженных семян был значительно выше, чем при других видах обработки. Среди них семена, которые были погружены в 25% HCl на 15 минут и дезинфицированы

0,1% $HgCl_2$ в течение 10 минут на следующем этапе, дали самый высокий процент незараженных семян, достигший 86,7%.

Кроме того, показано, что применение механической (ME) и химической скарификации (HCl 10 мин, HCl 15 мин, HNO_3 10 мин и HNO_3 15 мин) оказывало существенное влияние на прорастание семян пурпурного кардамона *in vitro*. Среди всех вариантов обработки, наилучшие результаты по прорастанию были получены при использовании замачивания семян в растворе 25% HCl в течение 15 мин (63,3%). В этом варианте было отмечено самое низкое среднее время прорастания (33,4 суток). В других вариантах для прорастания семян требовалось больше времени (примерно 45 суток). Обработка семян холодной водой (CW) или регуляторами роста растений (ГК 24h и НУК 24h) в течение 24 часов оказало так же положительное влияние на частоту прорастания семян, по сравнению с контролем. Следует отметить, что замачивание семян в горячей воде в течение 2 и 4 минут оказало ингибирующее влияние на прорастание семян. Кроме того, после 50-и суток после посева, всхожесть семян не наблюдалась (Рис. 3.9).

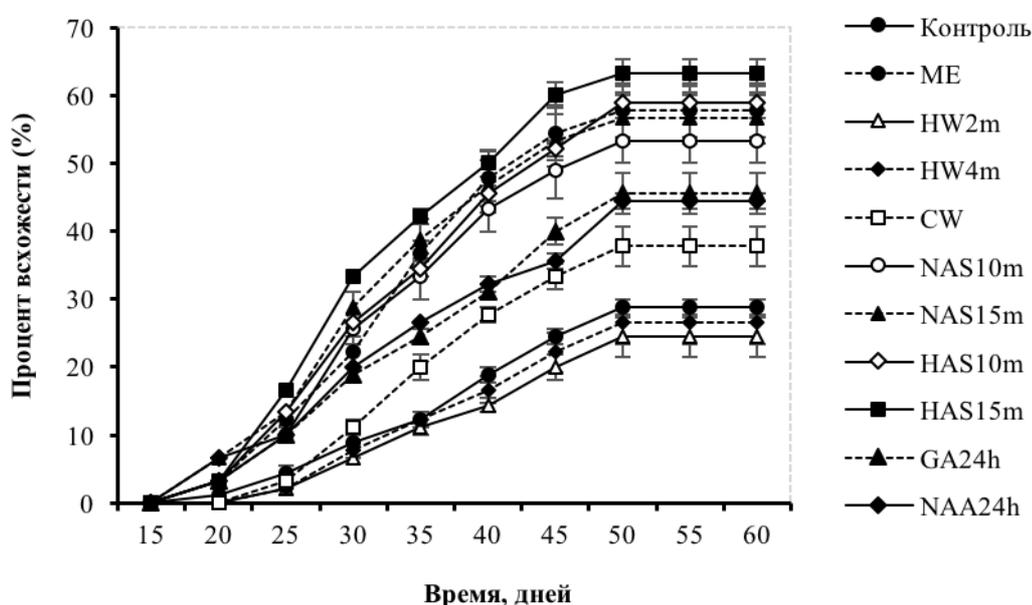


Рис. 3.9. Прорастание семян пурпурного амомума *in vitro* при различных видах обработки

В целом, проростки при химической скарификации и замачивании в регуляторах роста растений показали хороший рост, со значительно большей средней длиной и средним количеством листьев, чем в контроле (Табл. 3.9 и Рис. 3.10). При механической скарификации и обработке холодной водой проростки также хорошо развивались, их средняя длина была значительно выше, чем в контроле, но среднее количество листьев существенно не отличалось от контроля. Исследуемые параметры проростков при обработке погружением в горячую воду были ниже, чем в контроле.

Таблица 3.9

Различные виды обработки семян влияют на рост проростков пурпурного амомума после 80 суток культуры *in vitro*

Способ обработки	Длина проростка (см) *	Количество листьев *
Контроль	2,41 ± 0,17 cd	2,01 ± 0,06 c
ME	2,53 ± 0,09 c	2,17 ± 0,09 c
HW2m	1,79 ± 0,08 f	1,46 ± 0,05 d
HW4m	1,94 ± 0,07 ef	1,43 ± 0,06 d
CW	2,15 ± 0,13 de	2,03 ± 0,07 c
NAS10m	3,18 ± 0,05 a	2,58 ± 0,12 b
NAS15m	3,17 ± 0,09 a	2,52 ± 0,03 b
HAS10m	3,07 ± 0,08 ab	2,71 ± 0,10 ab
HAS15m	2,92 ± 0,19 ab	2,59 ± 0,09 b
GA24h	2,74 ± 0,07 bc	2,54 ± 0,16 b
NAA24h	3,08 ± 0,08 ab	2,96 ± 0,04 a

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

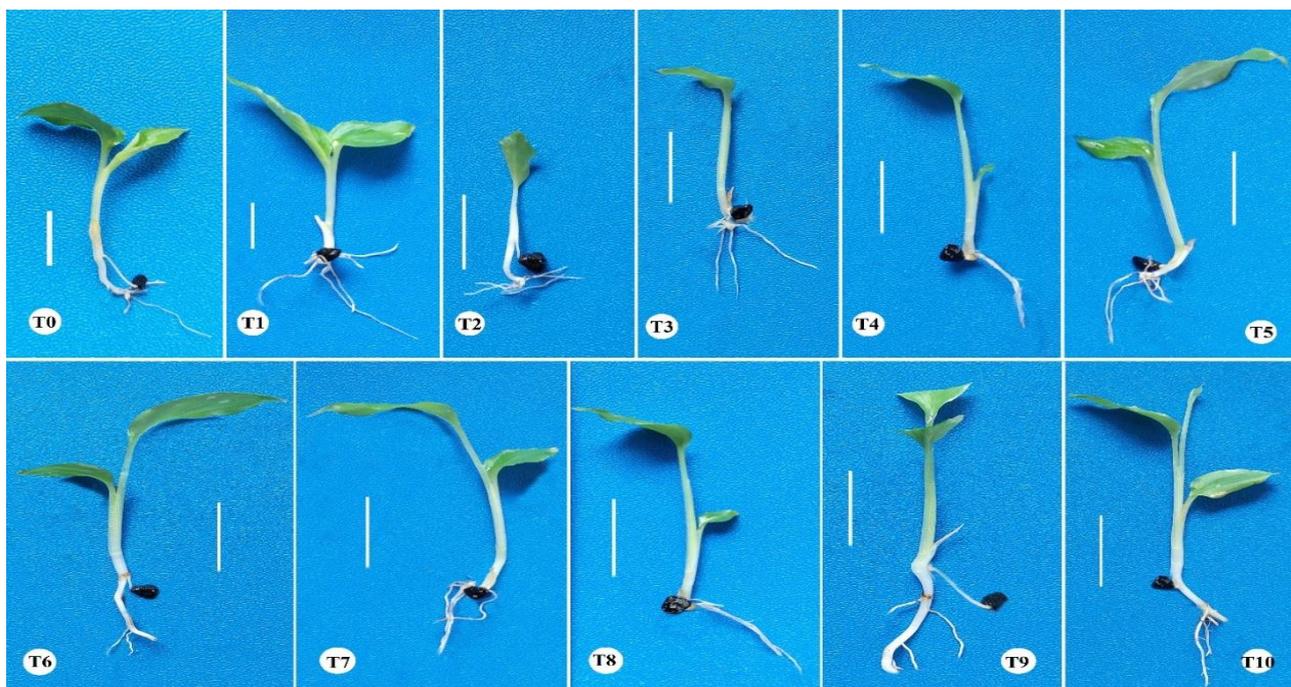


Рис. 3.10. Рост проростков пурпурного амомума на 80-е сутки при различной обработке семян: T0 - контроль; T1 - ME (скарификация скальпелем); T2 - HW2m (замачивание в горячей воде 100 °C на 2 минут); T3 - HW4m (замачивание в горячей воде 100 °C на 4 минут); T4 - CW (замачивание в холодной воде 24 часа); T5 - NAS10m (замачивание в 50% HNO₃ на 10 минут); T6 - NAS15m (замачивание в 50% HNO₃ на 15 минут); T7 - HAS10m (замачивание в 25% HCl на 10 минут); T8 - HAS15m (замачивание в 25% HCl на 15 минут); T9 - GA24h (замачивание в 200 ppm GA3 на 24 часа); T10 - NAA24h (замачивание в 200 ppm NAA на 24 часа).
Масштабные линейки = 1 см

Результаты исследования на черном кардамоне показали превосходную эффективность механической скарификационной обработки по сравнению с другими обработками, включая химическую скарификационную обработку. Однако в пурпурном амомуме меры химической скарификации были более эффективными в улучшении скорости прорастания семян. Это различие, вероятно, связано с разницей в толщине семенной оболочки, особенно эндотесты семян черного кардамона по сравнению с семенами пурпурного амомума. Сообщения о размножении *in vitro* семян нескольких видов семейства Имбирных также дали аналогичные результаты. Radhamani (Radhamani, Malik, Chandel, 1991) сообщил, что обработка семян зеленого кардамона в Индии 25% серной кислотой (H₂SO₄) в течение 10 минут и 80% абсолютным спиртом в течение 30 минут была наиболее эффективной для разрушения покоя семян. По данным Dahanayake

(Dahanayake, 2015), замачивание в 50% азотной кислоте (HNO_3) в течение 15 минут было наиболее эффективным для разрушения покоя семян зеленого кардамона в Шри-Ланке.

Таким образом, на основании проведенных исследований и полученных результатов установлено, что наилучшие условия предобработки семян пурпурного кардамона, обеспечивающие хорошую всхожесть семян и дальнейшее формирование проростков было при использовании кислот или регуляторов роста. Поэтому данные режимы обработки можно рекомендовать для дальнейших исследований по культивированию семян пурпурного амомума *in vitro*.

3.2.2 Введение в культуру *in vitro* корневищ

Поскольку экспланты были взяты из подземных корневищ, создание культуры, свободной от контаминации, было основной задачей исследований. Поверхности эксплантатов обычно содержат широкий спектр микробных загрязнений. Это приводит к необходимости разработки особых технологий и схем стерилизации для таких объектов с целью получения асептической культуры. В исследовании для стерилизации эксплантов использовали $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ или HgCl_2 в различных концентрациях (Табл. 3.10). Известно, что гипохлориты очень эффективны против бактерий. При разбавлении в воде концентрация используемой соли гипохлорита ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) приводит к образованию хлорноватистой кислоты (HOCl), концентрация которой коррелирует с бактерицидной активностью (Nakagawara et al., 1998). Гибель бактерий от HOCl , возможно, связано, по крайней мере частично, с летальным повреждением ДНК (Wlodkowski, Rosenkranz, 1975; Dukan, Belkin, Touati, 1999).

Применяемый в эксперименте этанол, также является мощным стерилизующим агентом, но в экспериментах его применение было кратковременным и составило всего несколько минут из-за его чрезвычайной фитотоксичности (Afolabi et al., 2009). Известно, что применение 70% этанола

перед стерилизацией растительных объектов HgCl_2 существенно улучшает контакт между HgCl_2 и поверхностью эксплантов. Ионы ртути в растворе HgCl_2 участвуют в поверхностной стерилизации, взаимодействуя с ферментами и белками в клеточной мембране и цитоплазме загрязняющих патогенных микроорганизмов (Smith, 2005).

Таблица 3.10

Влияние стерилизующего вещества и его временного воздействия на получение асептической культуры корневидных

Стерилизующий агент/ время воздействия	Инфицированные экспланты (%) *	Стерильные не проросшие экспланты (%) **	Стерильные проросшие экспланты (%) *
Контроль	100 a	0 c	0 f
0,05 (w/v) HgCl_2 / 4 мин.	86,7 ± 3,8 c	2,2 ± 2,2 bc	11,1 ± 5,9 bcd
0,05 (w/v) HgCl_2 / 8 мин.	80,0 ± 3,8 cd	8,9 ± 2,2 a	11,1 ± 2,2 bcd
0,05 (w/v) HgCl_2 / 12мин.	73,3 ± 3,8 de	11,1 ± 2,2 a	15,6 ± 5,9 bc
0,10 (w/v) HgCl_2 / 4 мин.	77,8 ± 2,2 cde	11,1 ± 2,2 a	11,1 ± 4,4 bcd
0.10 (w/v) HgCl_2 / 8 мин.	64,4 ± 2,2 ef	11,1 ± 2,2 a	24,4 ± 4,4 ab
0,10 (w/v) HgCl_2 / 12мин.	53,3 ± 3,8 f	11,1 ± 2,2 a	35,6 ± 2,2 a
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 4 мин.	97,8 ± 2,2 ab	0 c	2,2 ± 2,2 ef
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 8 мин.	95,6 ± 2,2 b	0 c	4,4 ± 2,2 def
5 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 12мин.	86,7 ± 3,8 c	2,2 ± 2,2 bc	11,1 ± 2,2 bcd
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 4мин.	84,4 ± 2,2 cd	2,2 ± 2,2 bc	13,3 ± 0 bcd
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ / 8мин.	80,0 ± 3,8 cd	4,4 ± 2,2 ab	15,6 ± 2,2 bc
10 (w/v) $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ /12 мин.	75,6 ± 4,4 cde	6,7 ± 0 a	17,8 ± 4,4 bc

*, ** Средние значения (%), среднее ± 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. **) Средние значения были преобразованы в \sqrt{X} перед статистическим анализом.

Применение в качестве стерилизующего агента HgCl_2 и $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ приводило к получению асептических культур с разной эффективностью. Так, исследования показали, что при увеличении концентрации и времени стерилизации эксплантов $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ повышается эффективность получения асептических эксплантов с 2,2% до 17,8%. При использовании 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ выживаемость эксплантов составила

15,6% при экспозиции 8 минут и 17,8% - при экспозиции 12 минут. Однако эти режимы стерилизации были не оптимальными, так как наилучшие результаты были получены при использовании HgCl_2 . Самое низкое заражение и самая высокая выживаемость были 53,3% и 35,6%, соответственно, при использовании 0,1% HgCl_2 в течение 12 минут (Табл. 3.10, Рис. 3.11).

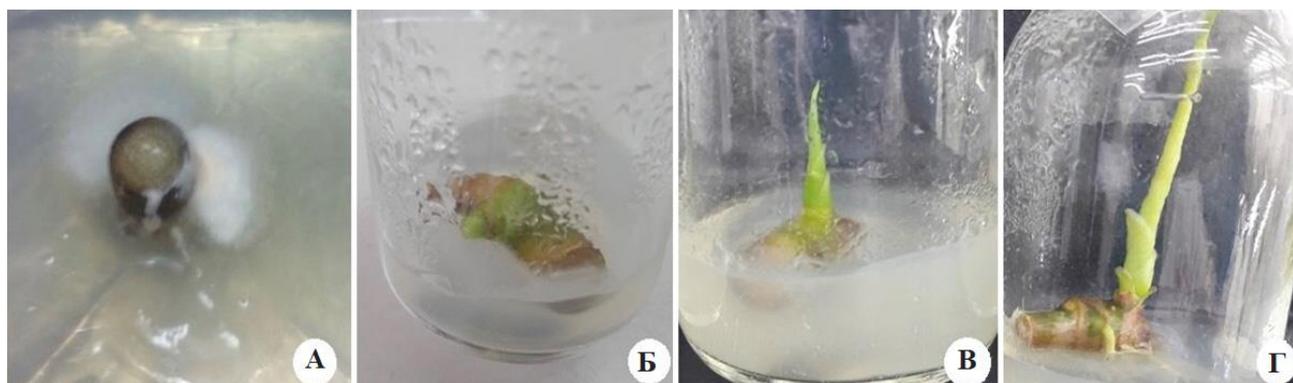


Рис. 3.11. *A. longiligulare in vitro*: (А) проявление бактериального заражения на экспланте после стерилизации; (Б) получен асептический эксплант (стерилизация 0,1% HgCl_2 в течение 12 минут); (В-Г) формирование побегов из спящих почек (после 6 и 8 недель культивирования соответственно)

Наши исследования еще раз подтверждают, что применение хлорида ртути (HgCl_2) в качестве стерилизующего средства, является очень эффективным при получении асептических культур, в частности, корневищ и спящих почек для многих видов *Zingiberaceae* (Quyet, et al., 2021; Truong, et al., 2017; Mrudul, et al., 2001; Neeta, Leela, Susan, 2002; Chan, L.K.; Thong, 2004; Yusuf, Khalid, Ibrahim, 2007; Sundram, Annuar, Khalid, 2012; Pradhan, Basistha, Subba, 2014; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018).

Заключение к главе 3

Исследования морфологических и анатомических характеристик семян черного кардамона и пурпурного кардамона, собранных во Вьетнаме, а также определение их посевных качеств проведены впервые. Ранее исследования семян черного кардамона и пурпурного кардамона *in vitro* никакими исследователями в

мире не проводились. Установлено, что семена черного кардамона и пурпурного кардамона имеют толстую и твердую семенную оболочку, небольшой эндосперм и зародыш. Это может быть причиной того, что их всхожесть часто бывает низкой и нерегулярной. Для повышения всхожести и получения равномерного прорастания семян целесообразно применять механическую, термическую или химическую обработку. Результаты исследований на черном кардамоне показывают более высокую эффективность механической скарификационной обработки по сравнению с другими видами обработки, включая кислотную скарификационную обработку. Между тем, в пурпурном кардамоне меры по применению кислотной скарификации были более эффективными в улучшении скорости прорастания семян.

Впервые для черного кардамона и пурпурного кардамона разработан протокол получения асептической культуры из подземных частей растения, в частности из корневищ, содержащих спящие почки. 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*.

ГЛАВА 4

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

4.1 Размножение и укоренение *Amomum tsao-ko* в культуре *in vitro*

4.1.1 Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение *A. tsao-ko in vitro*

Успех клонального микроразмножения зависит от правильного выбора состава питательной среды, в частности, гормонального состава. Основными гормонами, регулирующие процесс морфогенеза, являются цитокинины и ауксины, соотношение которых может приводить к индукции образованию адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте, к формированию боковых побегов, а также к образованию морфогенной и не морфогенной каллусной ткани. На основании литературных данных установлено, что наиболее часто при клонировании различных видов кардамона применяют в качестве цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП), в качестве ауксина – нафтилуксусную кислоту (НУК), а для каллусогенеза – 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Данные регуляторы роста были использованы и в наших экспериментах. Основные варианты сред приведены в таблице 4.1 и на рисунке 4.1. В качестве первичного экспланта использовали верхушечную часть проростков и культивировали на разных вариантах сред в течение 7 недель.

На основании проведенных исследований, нами установлено, что при различных комбинациях 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. В варианте с применением МС в сочетании с БАП 4,0 мг/л и НУК 0,5 мг/л был отмечен наилучший результат по морфогенезу. Так, среднее количество побегов составило

5,42 ± 0,30 шт, средняя длина побегов - 6,84 ± 0,27 см, а среднее количество корней - 16,17 ± 0,79 шт. В этом варианте в основании главного побега формировались адвентивные побеги, имеющие толстые стебли с темно-зелеными листьями, а также формировалось множество корней с корневыми волосками (Рис. 4.1ж).

Таблица 4.1

Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение черного кардамона *in vitro*

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

*, ** Средние значения ± 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

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 ± 0,22 шт, средняя длина побегов - 5,78 ± 0,22 см и среднее количество корней - 8,92 ± 0,71 шт. Самые низкие результаты по морфогенезу были получены на безгормональной питательной среде МС. В этом варианте учитываемые показатели имели следующие показатели: среднее количество побегов - 0,58 ±

0,08 шт, средняя длина побегов - $3,02 \pm 0,06$ см и среднее количество корней - $2,67 \pm 0,22$ шт.



Рис. 4.1. Влияние различных 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-D, (П) 1 мг/л БАП + 2 мг/л 2,4-D. Масштабные линейки = 1 см

Наши ранние исследования показали, что питательная среда МС, содержащая только БАП в концентрации 1 мг/л была наиболее оптимальной для культивирования корневищ черного кардамона (Khuat et al., 2021) (среднее

количество побегов: 4,54 и средняя длина побегов: 5,45 см). Однако в исследованиях с использованием верхушечной части проростков, морфогенетическая реакция, культивируемых эксплантов на эту среду, была умеренной: среднее количество побегов было $3,42 \pm 0,33$, шт., средняя длина побегов - $5,05 \pm 0,12$ см и среднее количество корней - $5,58 \pm 0,22$ шт. Аналогичные результаты по клональному микроразмножению были получены и другими авторами при работе с *A. subulatum* (Pradhan et al., 2014; Purohit et al., 2017), *A. longiligulare* (Dang et al., 2011) и *E. cardamomum* (Reghunath, Bajaj, 1992). Наши исследования показали, что на этапе микроразмножения, при использовании БАП в сочетании с НУК наблюдали и процесс ризогенеза. Поэтому разрабатывать протокол укоренения микропобегов *A. tsao-ko* не требуется, что ускоряет процесс получения микроклонов данного вида.

Известно, что существует еще один способ размножения растений *in vitro* – это получение растений-регенрантов из первичной и пересадочной каллусной ткани. Например, в 1989 году Reghunath (Reghunath, 1989) для клонирования *E. cardamomum* использовал каллусную культуру, полученную из кончиков зачатков побегов на среде МС дополненной 4 мг/л НУК или 1 мг/л 2,4-Д с 1 мг/л БАП. В этих условиях формировалась каллусная ткань в течение 28 суток культивирования. В наших исследованиях показано, что культивирование кончиков зачатков побегов на питательной среде МС дополненной ауксином 2,4-Д в сочетании с цитокинином БАП 1 мг/л приводило к формированию рыхлой каллусной ткани белого цвета (Рис. 4.1 О-П). Однако, последующее культивирование каллуса на индукционной питательной среде не приводило к регенерации побегов. В вариантах с применением НУК (4 мг/л НУК с 1 мг/л БАП) формирование каллусной ткани не отмечено (Рис. 4.1 Н).

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 *Atomum* (Sajina et al., 1997; Dang et al., 2011; Pradhan, Basistha, Subba, 2014; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018). В нашей работе были проведены исследования по сравнительной оценке действия

кинетина и БАП по отдельности на формирование адвентивных побегов кардамона (Табл. 4.2).

Таблица 4.2

Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов (наблюдения после 6 недель культивирования)

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

* 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.

На основании проведенных экспериментов установлено, что исследуемые цитокинины и концентрации оказывают стимулирующий эффект на индукцию образования адвентивных побегов. Причем, действие БАП в разных концентрациях превышало действие кинетина (Рис. 4.2). Так, наилучшие результаты были получены в варианте присутствия БАП в питательной среде в концентрации 1 мг/л. В этом варианте среднее количество адвентивных побегов на один эксплант (коэффициент размножения) было максимальным и составило 4,54, а средняя длина побегов – 5,45 см. Побегии характеризовались быстрым ростом, имели ярко-зеленый цвет стеблей и листовых пластинок. При увеличении концентрации БАП в питательной среде, коэффициент размножения уменьшался, но рост побегов в этих вариантах постоянно увеличивался. Визуальные наблюдения позволили установить, что при повышенных концентрациях БАП

формировались побеги с тонким стеблем и ланцетовидными листовыми пластинками, светло-желтого цвета. Этот результат полностью согласуется с предыдущими исследованиями *A. subulatum* Roxb. (Sajina et al., 1997; Pradhan, Basistha, Subba, 2014; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018) и *A. longiligulare* T.L.Wu. (Dang et al., 2011).

Добавление в питательную среду кинетина, так же приводило к образованию адвентивных побегов. Однако среднее количество их на один эксплант было ниже, чем при использовании БАП. Так, в варианте с использованием кинетина в концентрации 1,0 мг/л наблюдали увеличение количества побегов на эксплант по сравнению с контрольным вариантом (без гормонов). В этом варианте количество побегов на эксплант был самым высоким и составил 3,45, а высота побегов не превышала 3,12 см. Микропобеги имели толстые и крепкие стебли, а также листья правильной морфологии и темно-зеленого цвета (Рис. 4.2).

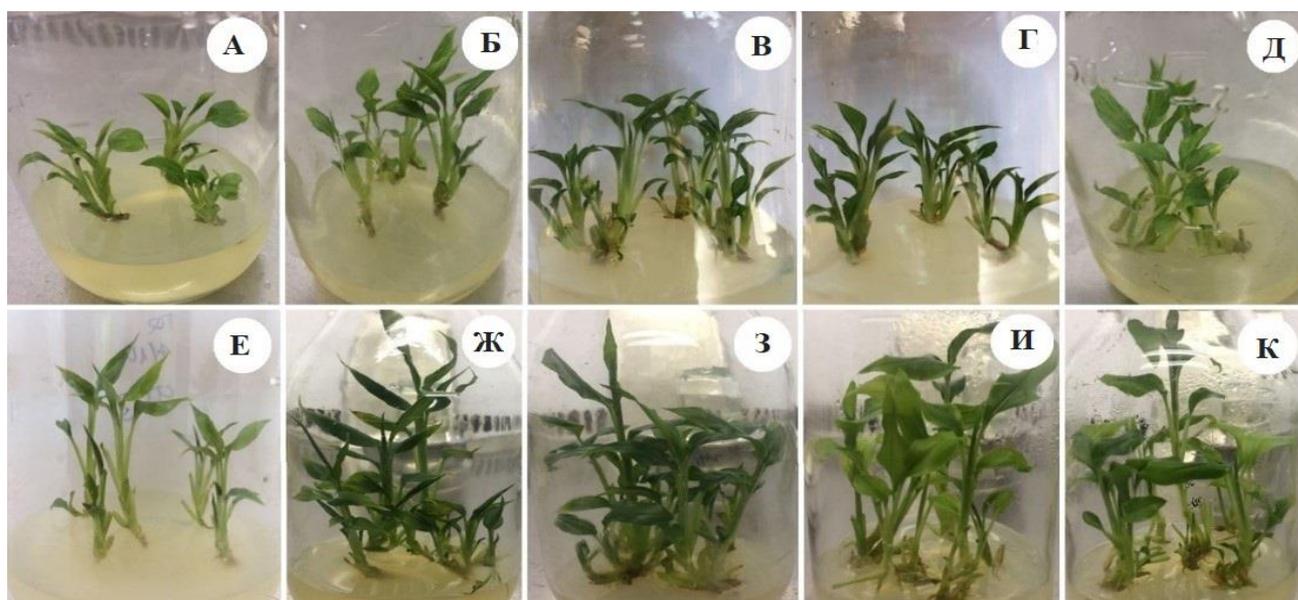


Рис. 4.2. Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов после 6 недель культивирования (А - кинетин 0,0 мг/л; Б - кинетин 0,5 мг/л; В - кинетин 1,0 мг/л; Г - кинетин 1,5 мг/л; Д - кинетин 2,0 мг/л; Е - БАП 0,0 мг/л; Ж - БАП 0,5 мг/л; З - БАП 1,0 мг/л; И - БАП 1,5 мг/л; К - БАП 2,0 мг/л)

При увеличении концентрации кинетина до 1,5–2,0 мг/л количество побегов уменьшилось до 2,56–2,75 побегов/эксплант (Табл. 4.2). Полученные микропобеги

имели тонкие стебли и листья светло-зеленого цвета. Применение кинетина для размножения некоторых видов рода *Atomium in vitro* также так же было изучено разными авторами. Согласно исследованию Pradhan с соавторами (2014) (Pradhan, Basistha, Subba, 2014), у *A. subulatum* Roxb. самый высокий коэффициент размножения (побеги/эксплантат) составил 9,34 и был получен на питательной среде, содержащей кинетин в концентрации 3,0 мг/л. Для *A. longiligulare* наиболее подходящей средой для быстрого размножения была среда, содержащая кинетин в концентрации 1,0 мг/л. Коэффициент размножения в этом случае составил 5,67 (Dang et al., 2011).

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что для размножения *A. tsao-ko* целесообразно применять питательную среду на основе минеральных солей по МС в сочетании с БАП 4,0 мг/л и НУК 0,5 мг/л.

4.1.2 Укоренение микропобегов *A. tsao-ko in vitro*

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 *Atomium* применяют ИМК и α -НУК, которые представляют собой два гормона из группы ауксинов (Dang et al., 2011; Truong et al., 2017; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018). В нашем эксперименте эти ауксины также были изучены для стимуляции корнеобразования *in vitro* побегов *A. tsao-ko*. Основные результаты приведены в таблице 4.3.

На основании проведенных исследований 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 (Рис. 4.3).

Так, в варианте с применением ИМК в концентрации 0,5 мг/л было получено наибольшее количество корней (5,6 корня/побег) с множеством корневых волосков. Однако, с повышением концентрации ИМК в питательной среде среднее количество корней на один побег уменьшалось (4.2-4.4 корня/побег), а сформировавшиеся корни были тонкими и не имели корневых волосков. Полученные результаты полностью согласуются с данными других авторов, работающих с *A. longiligulare* и *A. subulatum* Roxb. (Dang Ngoc Phuc et al., 2011; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018).

Таблица 4.3

Влияние ИМК и НУК на укоренение побегов, размноженных *in vitro*, после 8 недель культивирования

Регулятор роста растений, (мг/л)	Укоренение, (%)	Ср. кол-во корней на побег, (шт) *	Ср. длина корня, (см) *
МС (контроль)	75	2,1 ± 2,03 a	2,3 ± 1,35 a
МС + 0,25 ИМК	100	4,5 ± 0,69 d	5,2 ± 1,01 c
МС + 0,50 ИМК	100	5,6 ± 0,53 e	6,2 ± 1,56 e
МС + 0,75 ИМК	100	4,2 ± 1,23 c,d	5,5 ± 0,85 c,d
МС + 1,00 ИМК	100	4,4 ± 1,08 d	5,9 ± 0,69 d,e
МС + 0,25 НУК	100	3,5 ± 0,46 b,c	3,8 ± 0,85 b
МС + 0,50 НУК	100	3,8 ± 0,23 b,c,d	4,1 ± 0,46 b
МС + 0,75 НУК	100	3,5 ± 1,85 b,c	3,7 ± 1,63 b
МС + 1,00 НУК	100	3,2 ± 0,78 b	2,5 ± 1,87 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.

Как и в случае с ИМК, добавление НУК также стимулировало укоренение микропобегов в 100% случаев. Наилучшие результаты были получены в варианте с добавлением НУК в концентрации 0,5 мг/л. Однако на 0,05% уровне значимости существенных различий по вариантам не было обнаружено. Следует отметить, что только визуальные наблюдения позволили нам выявить различия по

морфологии корней по вариантам. Так, на среде с НУК 0,5 мг/л формировалось множество толстых корней, имеющих корневые волоски. Однако, с увеличением концентрации НУК в среде формировались тонкие корни без корневых волосков. Полученные результаты полностью согласуются с данными других исследователей (Phuong et al., 2017; Poudel, Prasai, Shrestha, 2018), которые показали, что для *Atotit sp.* среда МС с добавлением НУК была более эффективной в индукции корнеобразования, их числа и длины по сравнению с ИМК.

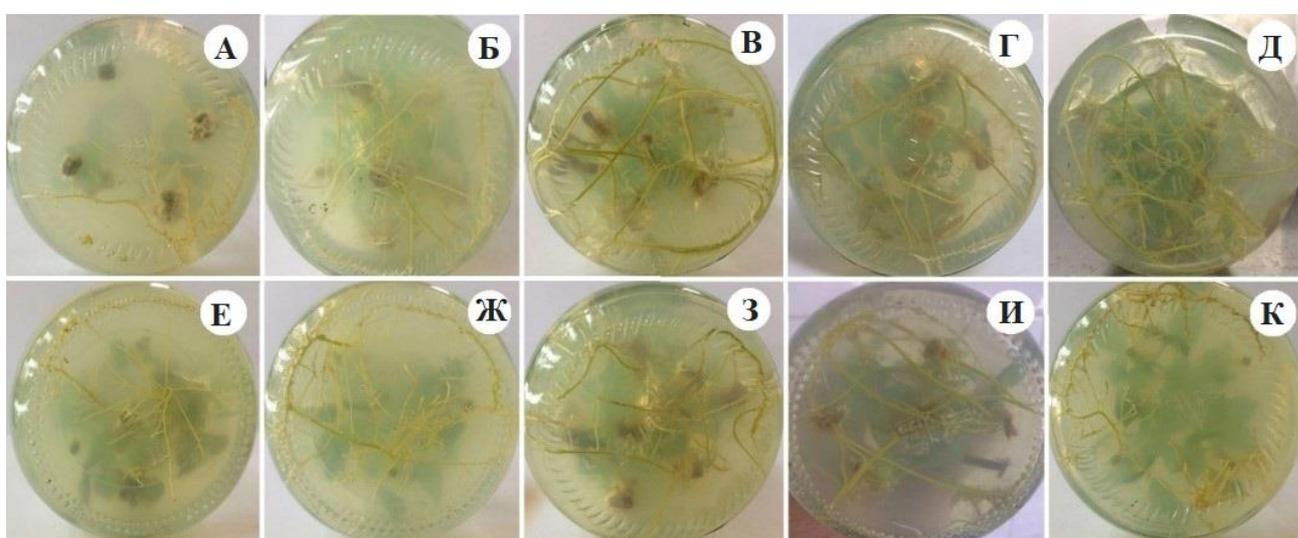


Рис. 4.3. Влияние ИМК и α -НУК на укоренение побегов, размноженных *in vitro*, через 8 недель культивирования (А - 0,00 мг / л ИМК; Б - 0,25 мг / л ИМК; В - 0,50 мг / л ИМК; Г - 0,75 мг / л ИМК; Д - 1,00 мг / л ИМК; Е - 0,00 мг / л НУК; Ж - 0,25 мг / л НУК; З - 0,50 мг / л НУК; И - 0,75 мг / л НУК; К - 1,00 мг / л НУК)

4.1.3 Адаптация микроклонов *A. tsao-ko ex vitro*

Полученные микроклоны *A. tsao-ko* 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. Основные результаты приведены в таблице 4.4.

Таблица 4.4

Эффективность адаптации микроклонов черного кардамона и их морфометрические характеристики

Тип почвы	Выживаемость (%)		Высота растений после 3 месяцев (см)	Кол-во листьев после 3 месяцев (шт)
	после 1 месяца	после 3 месяцев		
Грунт универсальный фирмы «Gardenstar»	75,6 ± 4,8	41,1 ± 4,2	13,2 ± 0,6	4,3 ± 0,2
Биогрунт фирмы «Фаско»	83,3 ± 1,9	48,9 ± 4,8	23,3 ± 0,5	5,7 ± 0,2

На основании полученных результатов установлено, что выживаемость микроклонов черного кардамона зависит от применяемого типа почвы. Так, 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 (Рис. 4.4). В этом варианте средняя выживаемость микроклонов составила 83,3% (через 1 месяц после высадки в почву), 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 на биогрунте фирмы Фаско составила 48,9%, а при использовании грунта универсального фирмы Gardenstar – 41,1%, что на 16% меньше предыдущего варианта. Преимущества биогрунта фирмы Фаско были установлены и по биометрическим показателям микроклонов. В этих условиях растения-регенеранты характеризовались активным ростом и высота побегов была в среднем в 2 раза больше (23,3 см), чем при использовании грунта

универсального (13,6 см). Аналогичная тенденция сохранялась и при учете такого показателя, как количество листьев на одно растение. В варианте с биогрунтом фирмы Фаско среднее количество листьев составило 5,7 шт, что на 25% больше, чем во втором варианте (грунт универсальный).

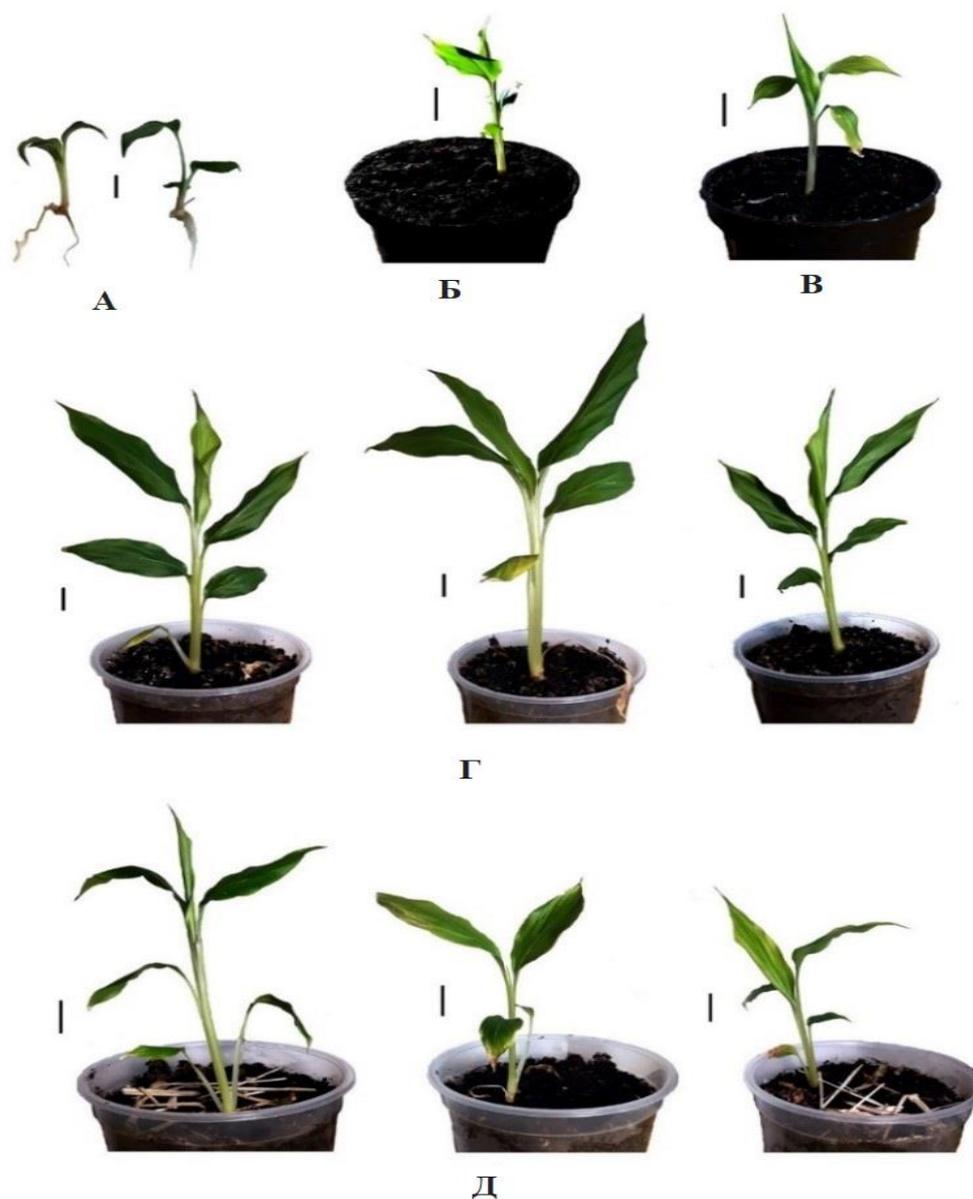


Рис. 4.4. Акклиматизация микроклонов, размноженных *in vitro*, после переноса их в тепличные условия: (А) микроклоны, размноженные *in vitro*; микроклоны после 1 (Б) и 3 (Г) месяцев посадки на биопочву Фаско; микроклоны после 1 (В) и 3 (Д) месяцев посадки в универсальный грунт Gardenstar. Шкала = 2 см.

4.2 Размножения и укоренения *Atomum longiligulare* в культуре *in vitro*

4.2.1 Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение *A. longiligulare in vitro*

Растительные клетки обладают большой способностью адаптироваться к изменениям окружающей среды при размножении, поскольку они обладают тотипотентностью (т.е. одна соматическая растительная клетка может дать начало целому растению без оплодотворения). Полученные стерильные экспланты корневищ с пазушными почками в дальнейшем культивировали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописис МС с добавлением различных цитокининов (БАП и кинетин) в концентрации 0,5-3,0 мг/л. Цитокинины добавляли в питательную среду индивидуально. Необходимо было установить оптимальные условия культивирования, обеспечивающие первичный рост почек и формирование побегов. Полученные результаты после 8 недель культивирования представлены в таблице 4.5.

Таблица 4.5

Влияние БАП и кинетина на регенерацию побегов

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	0,18 ± 0,02 f	0,22 ± 0,02 e	0,18 ± 0,02 e	0,22 ± 0,02 e
0,5	0,40 ± 0,04 e	0,56 ± 0,03 d	0,42 ± 0,05 d	0,60 ± 0,08 d
1,0	1,09 ± 0,02 a	1,53 ± 0,06 a	1,07 ± 0,07 a	1,61 ± 0,09 a
1,5	0,87 ± 0,03 b	1,23 ± 0,02 b	0,80 ± 0,04 b	1,30 ± 0,03 b
2,0	0,80 ± 0,04 bc	1,22 ± 0,07 b	0,75 ± 0,02 b	1,24 ± 0,04 b
2,5	0,71 ± 0,02 c	0,93 ± 0,05 c	0,69 ± 0,02 bc	1,20 ± 0,01 b
3,0	0,60 ± 0,04 d	0,86 ± 0,06 c	0,60 ± 0,04 c	0,93 ± 0,05 c

* 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. Данные были записаны для каждого экспланта и записаны после 8 недель культивирования.

Исследования показали, что в контрольном варианте (безгормональная среда) эксплантаты обладали очень низкой способностью к регенерации побегов (в среднем 0,18 побег/эксплант). В то время как при использовании питательной среды дополненной 1,0 мг/л БАП, коэффициент размножения увеличивался и составил в среднем 1,04 побег/эксплант. В этом варианте формировались хорошо развитые побеги с ярко зелеными листьями. При увеличении концентрации БАП с 1,5 до 3,0 мг/л коэффициент размножения уменьшался и формировались недоразвитые побеги. Вышеуказанные результаты могут быть обусловлены высокой концентрацией БАП в питательной среде. Аналогичные результаты были также зарегистрированы и на среде MS, дополненной кинетином. В среднем в варианте с кинетином формировалось 1,07 побега на эксплант. При повышении концентрации кинетина (1,5-3,0 мг/л) количество адвентивных побегов уменьшалось, при одновременном ухудшении их качества. При сравнении действия двух цитокининов установлено, что исследуемые гормоны в концентрации 1,0 мг/л оказывали одинаковое действие на формирование первичных побегов. Между полученными результатами не было статистически значимой разницы по количеству побегов. Наши данные не согласуются с результатами других авторов. Например, по данным Truong (Truong et al., 2017), среда MS, дополненная 2 мг/л БАП или 3 мг/л кинетина, оказывала наилучшее влияние на регенерацию побегов *in vitro* из корневищ *Atomium* sp.. В этих вариантах средний коэффициент размножения составил 1,83 и 1,6 побега/эксплант соответственно.

Полученные первичные микропобеги длиной 1,5-2,0 см с 3-4 листьями использовали в дальнейших исследованиях по оптимизации состава питательной среды для размножения. В этом исследовании мы определяли индивидуальные эффекты цитокининов (БАП, кинетин), а так же их сочетание с ауксином НУК, оказывающих влияние на размножение побегов *in vitro*.

Экспериментально установлено, что повторное культивирование микропобегов на питательных средах с БАП или кинетином привело к

значительному стимулированию образования множества адвентивных почек. Основные результаты приведены в таблице 4.6.

Таблица 4.6

Индивидуальное влияние БАП и кинетина на способность микропобегов к быстрому размножению *in vitro*

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 ± 0,06 e	0,65 ± 0,06 e	0,69 ± 0,06 f	0,65 ± 0,06 d
0,5	3,51 ± 0,02 c	5,21 ± 0,29 d	3,56 ± 0,06 b	5,09 ± 0,29 c
1,0	4,22 ± 0,06 a	5,23 ± 0,25 d	4,20 ± 0,07 a	5,14 ± 0,06 c
1,5	3,78 ± 0,08 b	5,59 ± 0,25 cd	3,38 ± 0,08 bc	6,05 ± 0,05 b
2,0	3,56 ± 0,06 c	6,15 ± 0,17 bc	3,18 ± 0,06 cd	6,20 ± 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. Данные были записаны для каждого экспланта и записаны после 10 недель культивирования.

Исследования показали, что в контрольном варианте (безгормональная среда) эксплантаты обладали очень низкой способностью к регенерации побегов (в среднем 0,69 побег/эксплант). В этом варианте формировались маленькие побеги с замедленным ростом. При культивировании микропобегов на среде с БАП (0,5-3,0 мг/л), наблюдали стимулирование роста побегов *in vitro*. Следует отметить, что при увеличении концентрации БАП с 0,5 до 1,0 мг/л количество образовавшихся побегов повышалось. Наибольшее количество побегов (4,22 побега/эксплант) было получено на среде с добавлением БАП в концентрации 1,0 мг/л. В этом варианте формировались хорошо развитые побеги с ярко зелеными листьями. Повышение концентрации БАП в питательной среде до 2,0-3,0 мг/л приводило к снижению морфогенетической активности клеток, что проявлялось в уменьшении количества полученных побегов. Однако, следует отметить, что в этих вариантах средняя длина побегов возрастала. Аналогичные результаты были

также зарегистрированы на среде МС, дополненной 1,0 мг/л кинетина. В этом варианте коэффициент размножения составил в среднем 4,2 побега на эксплант. При повышении концентрации кинетина (1,5-3,0 мг/л) количество образовавшихся побегов уменьшалось. При этом, как и в случае использования БАП, качество побегов ухудшалось. Между полученными результатами не было статистически значимой разницы по количеству побегов. Наши данные полностью согласуются с результатами других авторов. Например, Sajina (Sajina et al., 1997) изучали размножение *A. subulatum* Roxb. *in vitro* из почек корневища. Их результаты показали, что среда МС, дополненная 1,0 мг/л БАП, была наиболее подходящей для быстрого размножения побегов. Автора удалось получить высокий коэффициент размножения для данного вида, который составил 10-12 побегов на эксплант. Недавние исследования Truong (Truong et al., 2017) на *Atomit* sp., а также наши исследования с *A. tsao-ko* (Quyet, et al, 2021) показали положительное влияние БАП 1 мг/л на морфогенетическую активность культивируемых эксплантов.

В следующей серии экспериментов необходимо было установить влияние совместного применения ауксинов и цитокининов. В качестве цитокининов исследовали БАП и кинетин, в качестве ауксина – НУК (0,25 – 0,5 мг/л). Полученные результаты, после 10 недель культивирования, приведены в таблицах 4.7 и 4.8.

Таблица 4.7

Комбинированное влияние БАП и НУК на способность к быстрому размножению побегов *in vitro*

Гормоны (мг/л)		Ср. кол-во побегов, (шт) *	Ср. высота побегов, (см) *
БАП	НУК		
0,0	0,0	0,69 ± 0,06 i	0,65 ± 0,06 f
0,5	0,25	3,35 ± 0,10 f	6,09 ± 0,10 b
	0,5	3,09 ± 0,02 g	6,40 ± 0,30 b
0,1	0,25	5,38 ± 0,05 b	4,99 ± 0,06 de
	0,5	5,24 ± 0,06 bc	5,03 ± 0,12 de

1,5	0,25	5,96 ± 0,06 a	4,68 ± 0,12 e
	0,5	5,33 ± 0,04 b	5,22 ± 0,15 d
2,0	0,25	5,09 ± 0,06 cd	5,21 ± 0,07 d
	0,5	4,91 ± 0,08 d	5,64 ± 0,08 c
2,5	0,25	3,60 ± 0,14 e	6,12 ± 0,14 b
	0,5	3,20 ± 0,04 fg	6,47 ± 0,15 b
3,0	0,25	3,09 ± 0,06 g	6,95 ± 0,20 a
	0,5	2,82 ± 0,08 h	7,08 ± 0,12 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. Данные были записаны для каждого экспланта и записаны после 10 недель культивирования.

Таблица 4.8

Комбинированное влияние кинетина и НУК на способность к быстрому размножению побегов *in vitro*

Гормоны (мг/л)		Ср. кол-во побегов, (шт) *	Ср. высота побегов, (см) *
Кинетин	НУК		
0,0	0,0	0,69 ± 0,06 i	0,65 ± 0,06 e
0,5	0,25	3,45 ± 0,02 e	6,05 ± 0,40 c
	0,5	3,20 ± 0,04 f	6,52 ± 0,15 bc
0,1	0,25	4,31 ± 0,10 c	5,18 ± 0,09 d
	0,5	4,18 ± 0,08 c	5,26 ± 0,08 d
1,5	0,25	5,56 ± 0,08 a	5,08 ± 0,09 d
	0,5	5,07 ± 0,12 b	5,39 ± 0,08 d
2,0	0,25	3,71 ± 0,10 d	6,0 ± 0,02 c
	0,5	3,49 ± 0,06 de	6,15 ± 0,07 c
2,5	0,25	3,34 ± 0,07 ef	6,2 ± 0,15 c
	0,5	3,11 ± 0,08 fg	6,39 ± 0,21 c
3,0	0,25	2,89 ± 0,06 g	6,97 ± 0,22 ab
	0,5	2,58 ± 0,10 h	7,04 ± 0,16 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. Данные были записаны для каждого экспланта и записаны после 10 недель культивирования.

На основании проведенных исследований были установлены некоторые закономерности: 1) во всех вариантах питательных сред при увеличении концентрации НУК наблюдается уменьшение коэффициента размножения, 2) во всех вариантах питательных сред при увеличении концентрации НУК повышается скорость роста адвентивных микропобегов, 3) наилучшие результаты по коэффициенту размножения и росту побегов было получено 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 и формировались мощные побеги с ярко зелеными листьями и хорошо развитой корневой системой (Рис. 4.5).

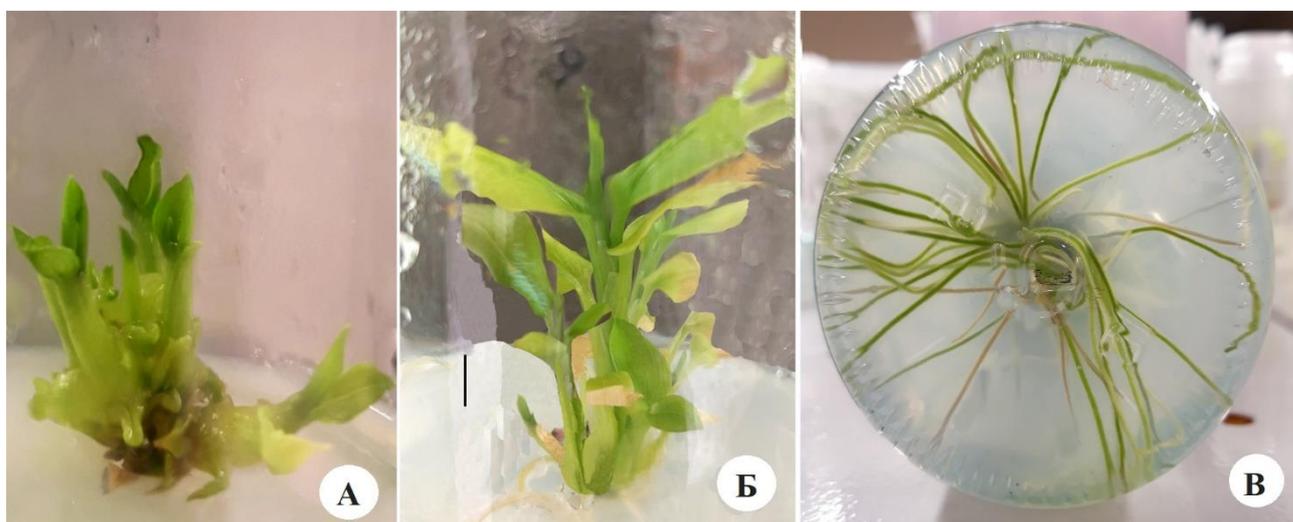


Рис. 4.5. Клональное размножение *A. longiligulare in vitro*: (А-Б) образование побегов (после 4 и 10 недель культивирования на среде быстрого размножения МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК); (В) индукция корней *in vitro* (после 8 недель культивирования на среде МС с добавлением 0,5 мг/л ИМК).
Шкала шкалы = 1 см.

Из всех исследуемых вариантов питательных сред, самыми не эффективными были среды, содержащие 3,0 мг/л БАП или 3,0 мг/л кинетина в сочетании с 0,5 мг/л НУК. В этих вариантах коэффициент размножения в среднем составил 2,82 и 2,58 побега/эксплант, соответственно. Однако следует отметить, что при уменьшении концентрации НУК до 0,25 мг/л, но с использованием 3 мг/л БАП или кинетина эффективность образования побегов была значительно выше,

чем на среде, дополненной 0,5 мг/л НУК. Вероятно, повышение концентрации ауксинов приводило к формированию дедифференцированных клеток, которые обладают, как правило, меньшим регенерационным потенциалом.

На основании полученных данных следует заключить, что из двух исследуемых цитокининов (БАП или кинетин) наибольшей стимулирующей активностью обладает БАП. Кроме того, между двумя оптимальными питательными средами (1,5 мг/л БАП + 0,25 мг/л НУК и 1,5 мг/л Кинетин + 0,25 мг/л НУК) наблюдалась статистически значимая разница в количестве образовавшихся адвентивных побегов. Соответственно, среда, сочетающая 1,5 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК, имела значительно лучшую эффективность формирования побегов, чем среда, сочетающая 1,5 мг/л кинетина и 0,25 мг/л НУК.

4.2.2 Укоренение микропобегов *A. longiligulare in vitro*

Полученные на этапе размножения микропобеги длиной 3-3,5 см с 4-5 листьями были перенесены на питательные среды для укоренения. В качестве индуктора корнеобразования в состав питательной среды добавляли ИМК (0,25-1,0 мг/л) и НУК (0,25-1,0 мг/л) Результаты после 8 недель культивирования представлены в таблице 4.9.

Исследования показали, что добавление ауксина (ИМК или НУК) в питательную среду оказывало стимулирующее действие на укоренение микропобегов *in vitro*, по сравнению с контрольным вариантом (без гормонов). Установлено, что ауксины стимулировали укореняемость микропобегов, повышали количество корней на одно растение, а также оказывали стимулирующее влияние на длину корня. Показано, что при использовании ИМК способность к укоренению микропобегов составило 100%. Причем, в базальной части побегов формирование каллусной ткани не было отмечено. Наибольшее количество корней (9,09 корней/побег) было получено на среде содержащей ИМК в концентрации 0,5 мг/л. В этих условиях развивалось множество корней, которые

характеризовались активным ростом. Однако, при увеличении концентрации ИМК в питательной среде до 0,75-1,0 мг/л, способность микропобегов к укоренению оставалась высокой (100%), но количество образовавшихся корней уменьшалось, они были тонкими и не имели разветвления.

Таблица 4.9

Влияние НУК и ИМК на укоренение побегов, размноженных *in vitro*, после 8 недель культивирования

Концентрация, (мг/л)	НУК			ИМК		
	укоренение, (%)	кол-во корней, (шт.)	длина корней (см)	укоренение, (%)	кол-во корней, (шт.)	длина корней (см)
0,0	78	1,62±0,06 d	2,5±0,28 c	78	1,62±0,06 e	2,5±0,28 b
0,25	100	6,58±0,19 c	8,17±0,14a	100	6,87±0,08 c	7,96±0,50 a
0,5	100	8,82±0,17 a	6,73±0,17b	100	9,09±0,12 a	7,17±,19 a
0,75	100	7,16±0,17 b	7,09±0,09b	100	7,44±0,08 b	7,66 ± 0,17a
1,0	100	6,56±0,16 c	7,1±0,02 b	100	6,33±0,14 d	8,1 ± 0,04 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. Данные были записаны для каждого экспланта и записаны после 8 недель культивирования.

При замене ИМК на НУК так же было отмечено 100%-ное укоренение микропобегов. Наилучшие результаты были получены при использовании НУК в концентрации 0,5 мг/л. В этом варианте среднее количество корней на один микропобег составило 8,82, а средняя длина корней - 6,73 см. Однако, при увеличении концентрации НУК в питательной среде до 0,75-1,0 мг/л, способность микропобегов к укоренению оставалась высокой (100%), но количество образовавшихся корней уменьшалось, они были тонкими и не имели разветвления.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что оптимальные режимы культивирования микропобегов *A. longiligulare*, обеспечивающие укоренение, является питательная среда МС, дополненная ИМК или НУК в концентрации 1,0 мг/л. Статистический анализ данных показал, что между двумя оптимальными средами не было статистически значимой разницы

по количеству корней. Наши данные полностью согласуются с результатами других авторов. Например, согласно Poudel et al. (Poudel, Prasai, Shrestha, 2018), среда МС, дополненная 1,0 мг/л ИМК, была наиболее подходящей для укоренения побегов большого кардамона (*A. subulatum* Roxb.) (4,8 корня/побег). Аналогичные результаты были получены нами при работе с черным кардамоном (*A. tsao-ko* Crevost & Lemarié) (5,6 корня/побег) (Khuat et al., 2021). В то же время, в работах Truong (Truong et al., 2017), проводимых на *Amomum* sp., показано, что наилучшие результаты по укоренению побегов *in vitro* были получены на среде МС, содержащей НУК в концентрации 0,6 мг/л.

4.2.3 Адаптация микроклонов *A. longiligulare* ex vitro

Укоренившиеся микроклоны *A. longiligulare* были перенесены на адаптацию *ex vitro*. 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*. Как и для черного кардамона было изучено два типа субстрата – биогрунт фирмы Фаско и грунт универсальный фирмы «Gardenstar». Основные результаты приедены в таблице 4.10.

Таблица 4.10

Влияние различных типов почв на эффективность адаптации микроклонов *A. longiligulare* и их морфометрические характеристики

Тип почвы	Выживаемость (%)		Высота растений после 3 месяцев (см)	Кол-во листьев после 3 месяцев (шт)
	после 1 месяца	после 3 месяцев		
Грунт универсальный фирмы «Gardenstar»	77.8 ± 6.1	56.7 ± 3.1	19.0 ± 1.3	4.6 ± 0.3
Биогрунт фирмы «Фаско»	84.4 ± 2.2	63.3 ± 5.0	31.3 ± 0.4	5.9 ± 0.1

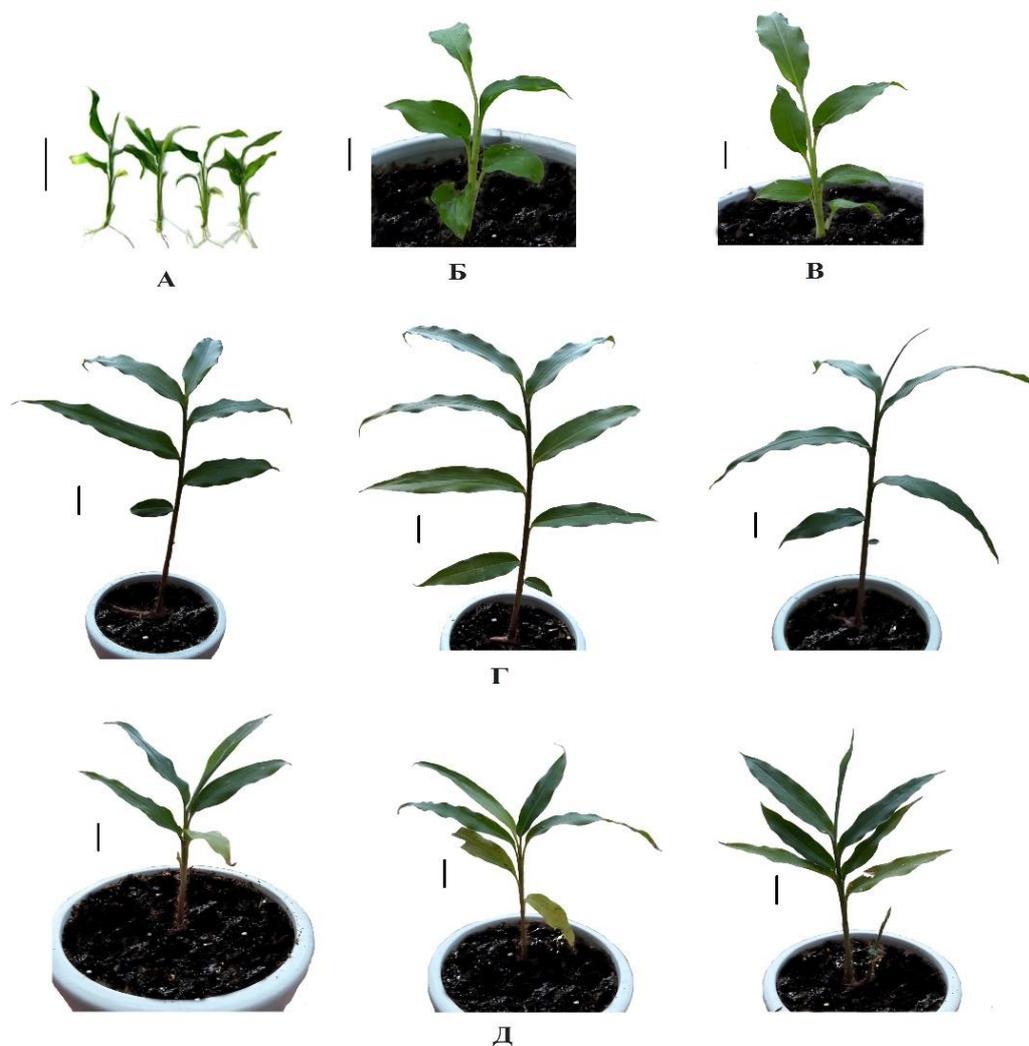


Рис. 4.6. Акклиматизация саженцев, размноженных *in vitro*, после переноса в тепличные условия: (А) саженцы, размноженные *in vitro*; саженцы после 1 (Б) и 3 (Г) месяцев посадки на биопочву Fasco; саженцы после 1 (В) и 3 (Д) месяцев посадки на почву Garden Star. Шкала шкалы = 2 см

Результаты, представленные в таблице 4.9, показали, что средняя выживаемость саженцев *ex vitro* на двух типах почв достигла 77,8-84,4% после одного месяца выращивания и 56,7-63,3% после 3 месяцев выращивания (рис. 4.6). Наилучшие результаты по приживаемости в условиях почвы были получены при использовании биопочвы «Фаско», Приживаемость растений-ргенерантов после месяца посадки составила 84,4% и 63,3% после 3 месяцев посадки. Кроме того, была отмечена тенденция хорошего роста микроклонов. Средняя длина побегов через 3 месяца была в среднем 31,3 см, а среднее количество листьев на одно растение 5,9 шт.

Заключение к главе 4

Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* были разработаны эффективные протоколы микроразмножения с использованием в качестве экспланта верхушек побегов, изолированных со стерильных проростков, растений-регенрантов, а также из корневищ, содержащих пазушные почки. Предложенная технология позволит быстро размножить элитные растения и получить высококачественный посадочный материал. Протокол предусматривает использование для размножения верхушки 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 видов черного кардамона) и 1,5 мг/л БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (для видов пурпурного кардамона). В этих условиях для двух изучаемых видов наблюдается высокий коэффициент размножения, который в среднем составляет 5-6. Кроме того, в этих условиях формировались микропобеги высотой в среднем 5-8 см и средним количеством корней на одно растение 14-16 шт. Для укоренения целесообразно применять ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л. Полученные в этих условиях микроклоны успешно переносили адаптацию к условиям *ex vitro*. Использование биогрунта фирмы “Фаско” учитываемые показатели по адаптации были максимальными.

ГЛАВА 5

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

5.1 Влияние экстрактов двух видов *Amomum* на морфофизиологические показатели семян разных таксономических групп

5.1.1 Экстракты, полученные из *Amomum tsao-ko*

В работе было изучено действие этанольных экстрактов, полученных из разных частей *Amomum tsao-ko* на посевные качества семян пяти видов. В работе первоначально определяли всхожесть семян согласно ГОСТу. Установлено, что изучаемые экстракты оказывали, как правило, ингибирующий эффект на прорастание семян ($p \leq 0,05$). Основные результаты приведены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

Влияние растительных экстрактов черного кардамона на прорастания семян (GR, %) 5 видов сельскохозяйственных культур

Экстракт	Концентрация мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста **	Томат **	Лук **
Лист	0,10	100 a (0,0)	92,6 ± 0,9 b (7,4)	73,2 ± 6,1 abcd (12,4)	50,0 ± 4,2 bcde (33,6)	21,3 ± 0,9 d (39,6)
	0,15	99,1±0,9a (0,9)	84,3 ± 0,9de (15,7)	69,4 ± 7,0bcd (16,9)	44,4 ± 2,8cde (40,8)	13,9 ± 1,6 e (60,4)
	0,20	97,2±1,6 ab (2,8)	81,5 ± 0,9 e (18,5)	63,9 ± 5,8 cd (23,5)	21,3 ± 4,6 f (71,5)	11,1 ± 1,6 e (68,4)
Семена	0,10	100 a (0,0)	87,0 ± 1,9cd (13,0)	66,7 ± 4,2bcd (20,1)	43,5 ± 4,0 de (42,1)	25,0 ± 1,6 bcd (28,8)
	0,15	97,2±1,6ab (2,8)	87,0 ± 1,9cd (13,0)	63,0 ± 3,7 cd (24,5)	38,9 ± 3,2 e (48,2)	14,8 ± 2,4 e (57,9)

Экстракт	Концентрация мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста **	Томат **	Лук **
	0,20	94,4±3,2b (5,6)	75,0 ± 2,8 f (25,0)	59,3 ± 3,3 d (29,0)	15,7 ± 3,3 f (78,9)	11,1 ± 1,6 e (68,4)
Псевдо-стебель	0,10	100 a (0,0)	100 a (0,0)	75,9 ± 3,3abc (8,9)	60,2 ± 6,7 bc (20,0)	28,7±2,4abc (18,3)
	0,15	100 a (0,0)	90,7 ± 2,5bc (9,3)	67,6 ± 3,4bcd (18,9)	55,6 ± 7,0bcd (26,3)	24,1±2,5bcd (31,4)
	0,20	100 a (0,0)	89,8 ± 2,5bc (10,2)	64,8 ± 3,3bcd (22,3)	49,1±5,2bcde (34,9)	21,3 ± 2,4 d (39,3)
Корнев-ище и корень	0,10	100 a (0,0)	100 a (0,0)	77,8 ± 4,2 ab (6,7)	63,0 ± 5,2 ab (16,2)	30,6 ± 1,6ab (13,0)
	0,15	100 a (0,0)	100 a (0,0)	70,4 ± 3,3bcd (15,6)	59,3 ± 6,1 bcd (21,3)	25,0±1,6bcd (28,6)
	0,20	100 a (0,0)	100 a (0,0)	63,9 ± 1,6 cd (23,3)	48,2 ± 3,3 bcde (35,9)	22,2 ± 1,6cd (36,6)
Контроль		100 a (0,0)	100 a (0,0)	83,3 ± 1,6 a (0,0)	75,0 ± 3,2 a (0,0)	35,2 ± 0,9 a (0,0)

*, ** Средние значения (% , среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. (*) – значения процента прорастания были преобразованы в \sqrt{X} перед статистическим анализом. (**) – значения процента прорастания были преобразованы в $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

Из полученных результатов следует, что наибольший ингибирующий эффект проявили все изучаемые экстракты на семенах томата и лука. Экстракты черного кардамона не показали значительного ингибирования прорастания семян 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

Atotum tsao-ko (5,6% - рыжик, 25,0% - киноа, 29,0% - капуста, 78,9% - томат, 68,4% - лук).

Кроме того, в работе было изучено влияние экстрактов на прорастание семян по двум другим показателям - среднее время прорастания (MGT) (рис. 5.1) и индекс скорости прорастания (GRI) (рис. 5.2).

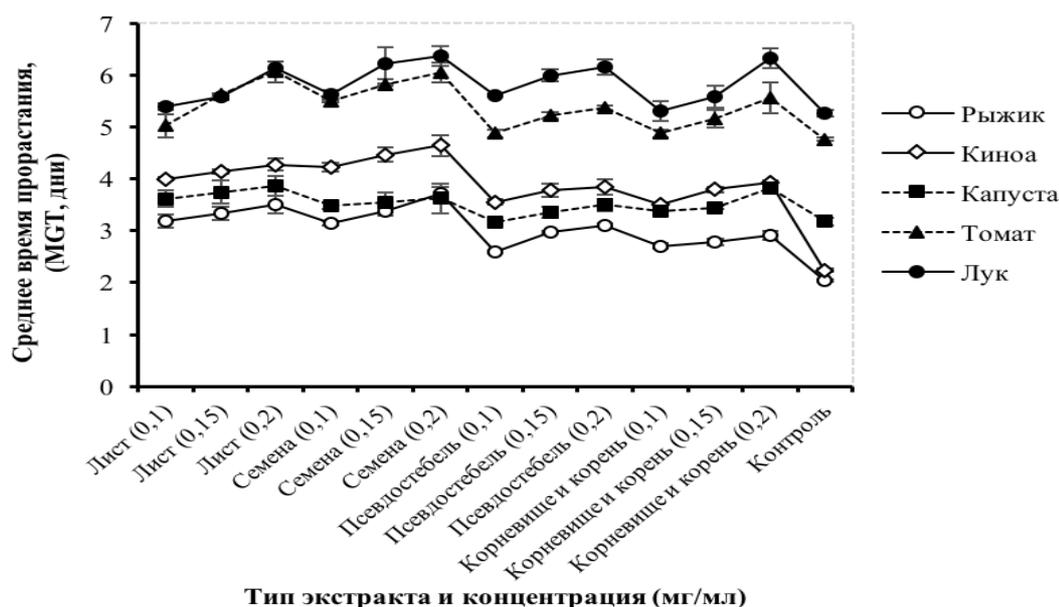


Рис. 5.1. Влияние растительных экстрактов черного кардамона на среднее время прорастания (MGT) семян 5 видов сельскохозяйственных растений

Экспериментально установлено, чем больше значение GRI по сравнению с контролем, тем ниже проявляется ингибирующее действие экстрактов, и наоборот. Однако, для MGT наблюдается обратная корреляция. Согласно этим двум показателям, во всех проведенных исследованиях наблюдался значительный ингибирующий эффект. Установлена общая тенденция - с увеличением концентрации экстрактов, увеличивается среднее время прорастания семян (MGT) и снижается индекс скорости прорастания (GRI). У всех пяти изучаемых видов сельскохозяйственных культур наблюдалось самое высокое значение MGT и самое низкое значение GRI при использовании экстракта, полученного из семян *Atotum tsao-ko* в концентрации 0,20 мг/мл. И наоборот, самые низкие значения MGT и самые высокие значения GRI наблюдали при использовании экстракта, полученного из псевдостебля или корневища и корня в концентрации 0,10 мг/мл.

Следует отметить, несмотря на то, что для семян рыжика исследуемые экстракты не оказали существенного ингибирующего влияния на прорастание семян, но при этом увеличивали среднее время прорастания (MGT) и снижали индекс скорости прорастания (GRI) по сравнению с контролем.

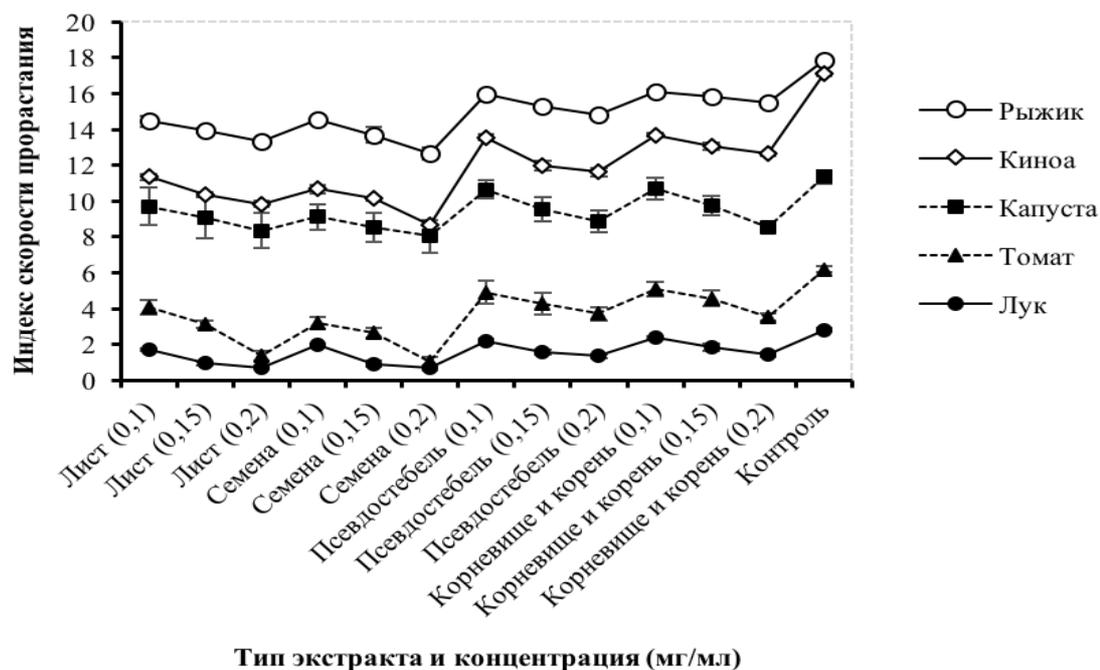


Рис. 5.2. Влияние растительных экстрактов черного кардамона на индекс скорости прорастания (GRI) семян 5 видов сельскохозяйственных растений

Таким образом, на основании проведенных исследований установлен аллелопатический эффект влияния растительных экстрактов, полученных из различных частей черного кардамона, на посевные качества тестируемых видов сельскохозяйственных культур.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние различных экстрактов черного кардамона на морфометрические показатели проростков тестируемых видов сельскохозяйственных культур (рыжик, киноа, капуста, томат и лук). Учет результатов проводили по длине корня и гипокотыля, а также по сырой и сухой массе проростков в конце эксперимента. Основные результаты приведены в таблицах 5.2, 5.3 и на рисунках 5.3-5.7.

Влияние растительных экстрактов черного кардамона на длину гипокотилия

5 видов сельскохозяйственных культур

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста *	Томат *	Лук *
Лист	0,10	9,0 ± 0,2 bc (22,4)	11,8 ± 0,8 bc (20,5)	7,2 ± 0,6 ab (9,0)	9,3 ± 1,1 bcd (26,8)	24,1 ± 0,9 bcd (27,8)
	0,15	7,6 ± 0,4 cde (34,5)	10,8 ± 0,2 bc (27,4)	7,1 ± 0,4 ab (10,7)	7,9 ± 0,4 cd (37,5)	23,4 ± 1,4 cd (30,0)
	0,20	6,6 ± 0,5 e (43,6)	10,3 ± 0,3 c (31,0)	6,8 ± 0,4 ab (14,5)	7,8 ± 0,5 d (38,4)	20,4 ± 1,6 d (38,9)
Семена	0,10	7,4 ± 0,4 de (36,1)	11,6 ± 0,4 bc (22,2)	6,7 ± 0,7 ab (15,5)	8,9 ± 0,6 cd (30,1)	21,7 ± 1,9 d (35,1)
	0,15	6,4 ± 0,5 e (45,1)	9,9 ± 0,6 c (33,4)	6,4 ± 0,3 b (19,5)	8,7 ± 1,0 cd (31,5)	12,6 ± 1,1 e (62,2)
	0,20	6,2 ± 0,3 e (47,1)	9,8 ± 0,4 c (33,8)	6,2 ± 0,2 b (21,5)	8,3 ± 0,3 cd (34,7)	11,2 ± 0,7 e (66,6)
Псевдостебель	0,10	11,4 ± 0,4 a (2,3)	13,2 ± 1,3 ab (11,4)	7,6 ± 0,5 ab (3,8)	10,2 ± 0,6 bc (19,8)	26,9 ± 1,7 bc (19,6)
	0,15	9,3 ± 0,2 b (19,8)	11,6 ± 0,4 bc (22,1)	7,2 ± 0,4 ab (9,1)	9,7 ± 0,6 bcd (23,5)	22,3 ± 1,8 d (33,2)
	0,20	8,7 ± 0,3 bcd (25,1)	10,4 ± 0,2 c (29,7)	7,1 ± 0,3 ab (10,2)	8,6 ± 0,2 cd (32,4)	20,3 ± 0,8 d (39,1)
Корневище и корень	0,10	11,5 ± 0,9 a (0,9)	13,2 ± 1,2 ab (11,0)	7,9 ± 0,2 a (0,0)	11,5 ± 0,6 ab (9,4)	32,7 ± 1,2 a (2,1)
	0,15	9,8 ± 0,4 b (16,0)	12,2 ± 0,8 c (17,8)	7,3 ± 0,3 ab (7,2)	10,2 ± 0,4 bc (19,8)	27,6 ± 1,0 b (17,4)
	0,20	9,7 ± 0,7 b (16,9)	11,6 ± 1,0 bc (22,1)	7,1 ± 0,4 ab (9,8)	9,7 ± 0,5 bcd (23,5)	23,1 ± 1,1 cd (30,7)
Контроль		11,6 ± 0,5 a (0,0)	14,9 ± 1,0 a (0,0)	7,9 ± 0,2 a (0,0)	12,7 ± 1,2 a (0,0)	33,4 ± 1,3 a (0,0)

* Средние значения (мм, среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

**Влияние растительных экстрактов черного кардамона на длину корешков 5
видов сельскохозяйственных культур**

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста *	Томат *	Лук *
Лист	0,10	45,7 ± 1,4 с (27,5)	18,1 ± 1,0 cd (31,8)	45,4 ± 1,8 bc (9,7)	22,6 ± 1,2 cd (28,3)	7,0 ± 1,2 cde (66,4)
	0,15	36,4 ± 0,5 е (42,3)	14,3 ± 0,8 е (45,9)	37,8 ± 0,9 ef (24,9)	18,8 ± 1,0 de (40,3)	6,4 ± 0,3 cde (69,2)
	0,20	28,2 ± 1,5 f (55,3)	12,4 ± 0,4 ef (53,2)	32,6 ± 0,6 g (35,1)	16,6 ± 1,4 ef (47,4)	4,7 ± 0,6 е (77,6)
Семена	0,10	42,5 ± 2,0 cd (32,6)	16,8 ± 0,4 d (36,6)	40,3 ± 1,0 de (19,8)	21,3 ± 0,7 cd (32,2)	6,2 ± 0,5 cde (70,4)
	0,15	26,4 ± 0,5 f (58,2)	11,9 ± 1,2 f (55,2)	35,9 ± 1,1 f (28,6)	15,8 ± 0,6 ef (49,9)	5,3 ± 0,8 de (74,8)
	0,20	18,9 ± 3,1 g (70,0)	11,7 ± 0,4 f (55,8)	32,0 ± 0,4 g (36,3)	13,8 ± 0,8 f (56,2)	4,8 ± 0,6 е (76,9)
Псевдостебель	0,10	53,3 ± 2,0 b (15,5)	22,2 ± 0,5 b (16,1)	47,1 ± 1,3 ab (6,2)	25,0 ± 1,8 bc (20,6)	7,8 ± 0,5 с (62,7)
	0,15	38,5 ± 0,5 de (39,0)	18,6 ± 1,4 cd (29,8)	44,9 ± 1,4 bc (10,6)	24,2 ± 1,9 bc (23,3)	7,4 ± 0,5 cd (64,8)
	0,20	38,1 ± 1,0 de (39,5)	16,8 ± 0,6 d (36,7)	41,5 ± 0,9 d (17,4)	21,5 ± 1,2 cd (31,8)	6,9 ± 0,6 cde (67,3)
Корневище и корень	0,10	56,1 ± 2,7 b (11,1)	22,6 ± 1,0 b (14,9)	49,5 ± 1,2 a (1,6)	26,9 ± 2,1 b (14,5)	12,2 ± 1,2 b (41,8)
	0,15	55,4 ± 2,7 b (12,2)	21,4 ± 0,5 b (19,3)	45,6 ± 1,0 bc (9,2)	25,4 ± 0,5 bc (19,2)	6,3 ± 0,4 cde (70,1)
	0,20	54,3 ± 0,4 b (13,8)	20,1 ± 0,6 bc (24,0)	43,5 ± 1,3 cd (13,4)	23,6 ± 1,6 bc (25,1)	5,5 ± 0,3 cde (73,9)
Контроль		63,1 ± 0,5 a (0,0)	26,5 ± 0,8 a (0,0)	50,3 ± 0,8 a (0,0)	31,5 ± 0,8 a (0,0)	20,9 ± 1,3 a (0,0)

* Средние значения (мм, среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

Результаты показали, что большинство этанольных экстрактов черного 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 семенах лука. Другие исследуемые сельскохозяйственные культуры были ранжированы следующим образом: томат, рыжика, киноа и капуста (рис. 5.3-5.7). Следует отметить, что наибольший ингибирующий эффект на рост корней и гипокотилия проростков проявили экстракты, полученные из листьев и семян. Причем самый высокий процент ингибирования длины гипокотилия и корешков (гипокотиль: рыжик – 47,1%, киноа – 33,8%, капуста – 21,5%, томат – 34,7%, лук – 66,6%; корешок: рыжик – 70,0%, киноа – 55,8%, капуста – 36,3%, томат – 56,2%, лук – 76,9%) был получен при использовании экстрактов из семян в концентрации 0,20 мг/мл. Кроме того, корни были более чувствительными к действию экстрактов по сравнению с гипокотилем.

С другой стороны, этанольные экстракты черного кардамона приводили к снижению сырой и сухой массы проростков всех тестируемых сельскохозяйственных культур (рис. 5.8, 5.9). На всех протестированных растениях в контрольном варианте сырая и сухая масса проростков была максимальной, по отношению с опытными вариантами. В результате проведенных исследований была установлена общая тенденция – с увеличением концентрации экстрактов снижалась сырая и сухая масса проростков. Кроме того, аналогично предыдущим исследованиям, показано, что экстракты, полученные из листьев и семян черного кардамона оказывали существенное влияние на уменьшение сырой и сухой массы проростков по сравнению с двумя другими изучаемыми экстрактами. Причем наибольший ингибирующий эффект был получен при использовании экстрактов семян в концентрации 0,20 мг/мл.

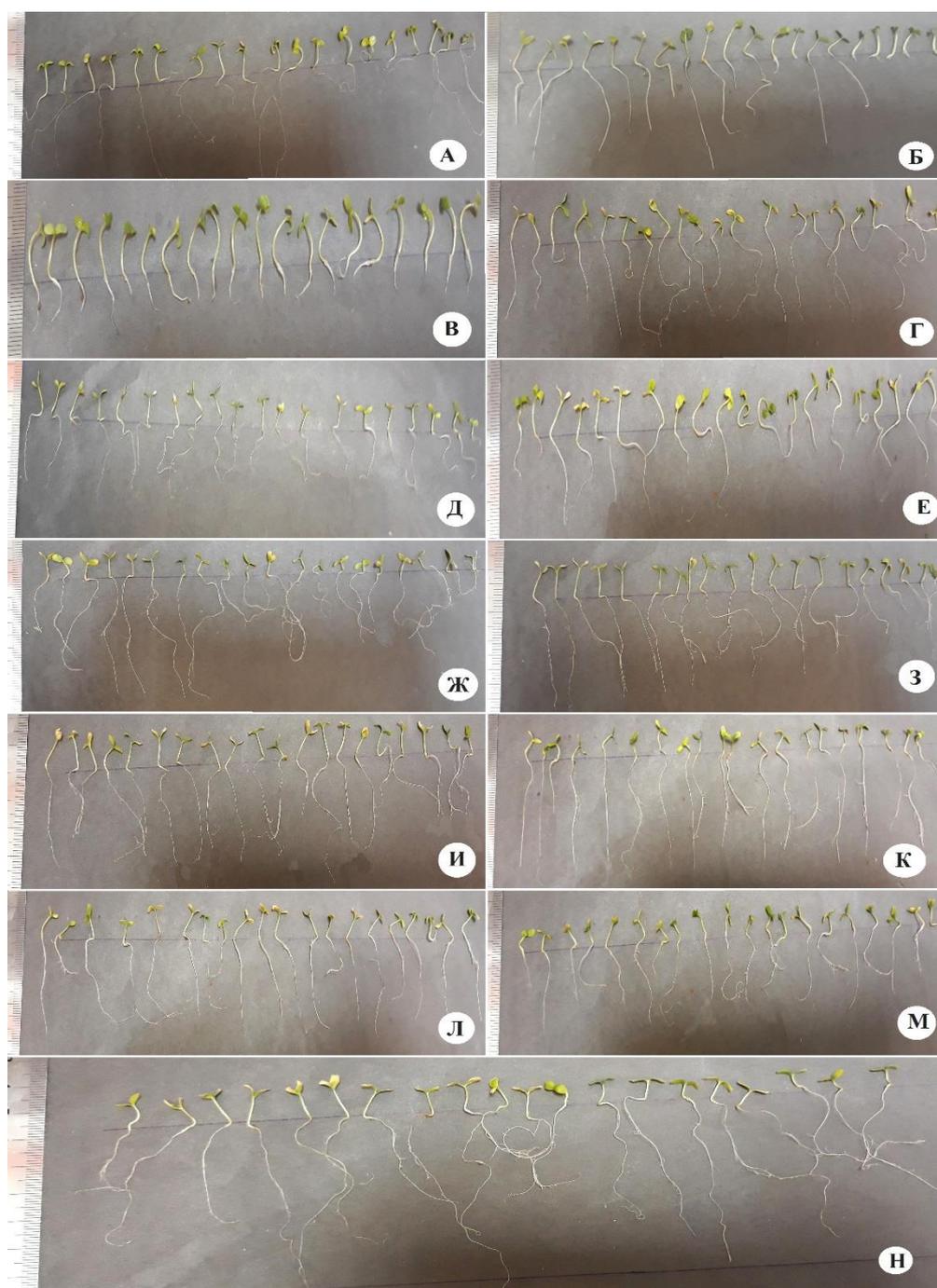


Рис. 5.3. Проростки ржи под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)



Рис. 5.4. Проростки киноа под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)

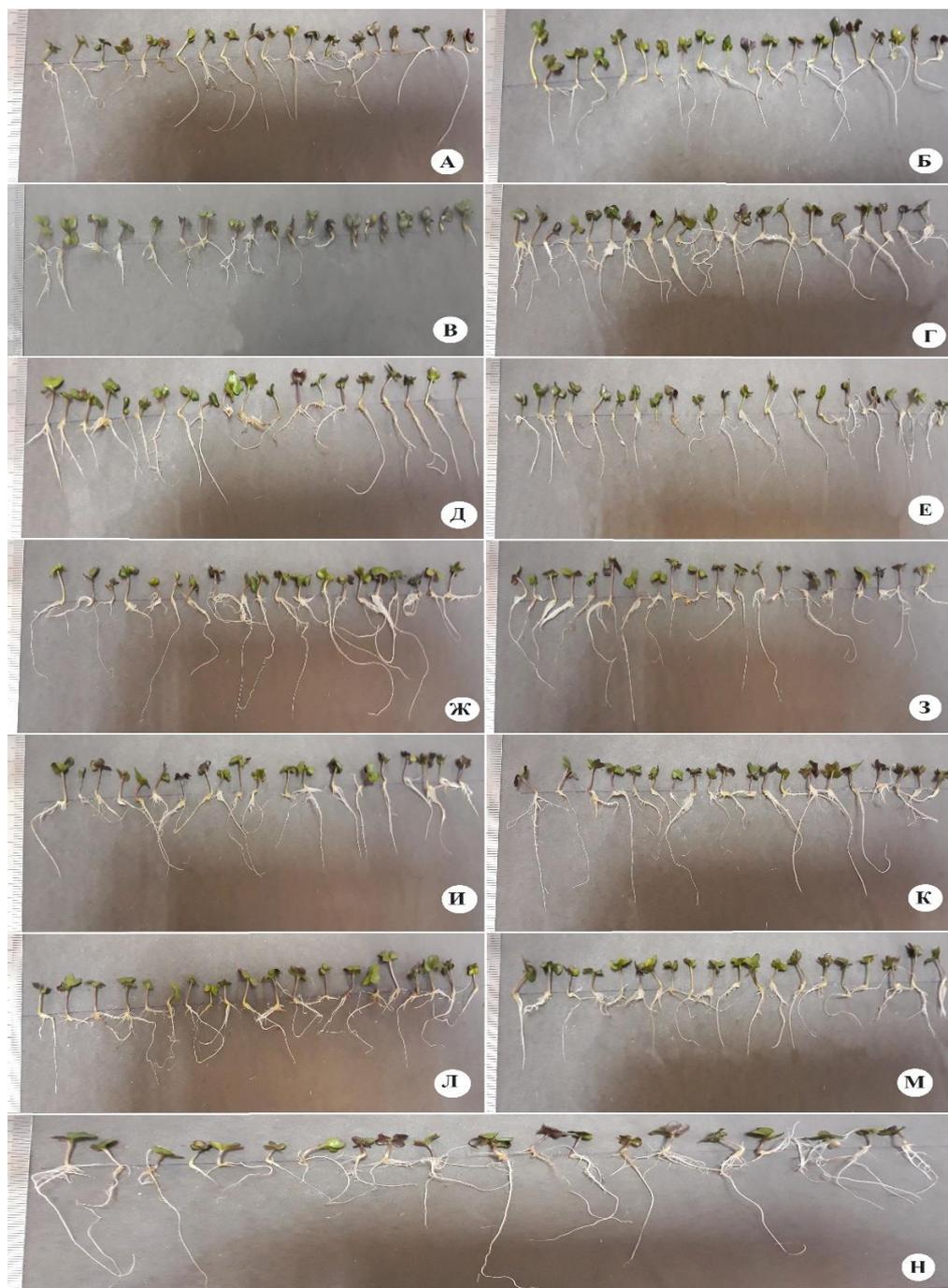


Рис. 5.5. Проростки капусты под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)

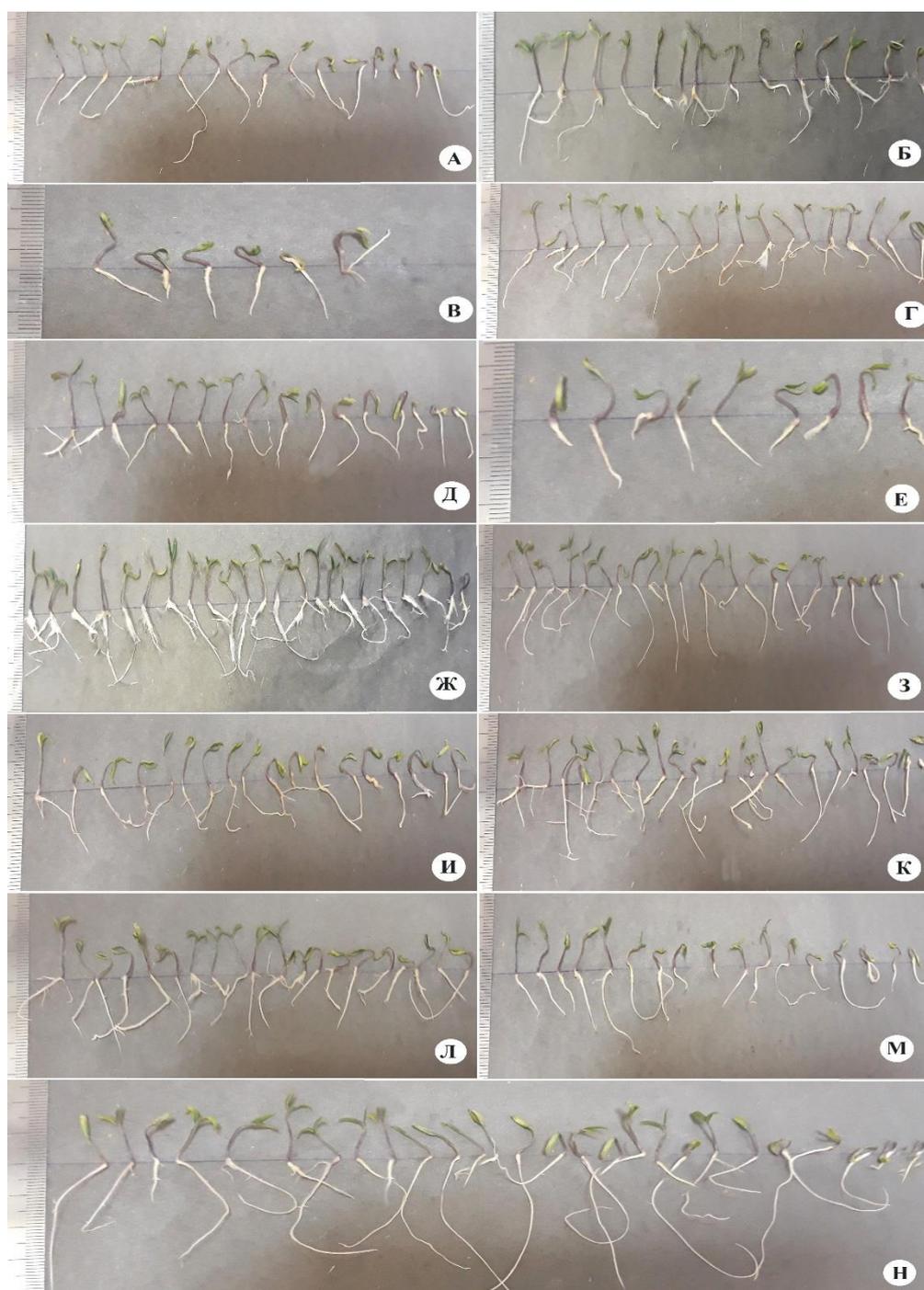


Рис. 5.6. Проростки томата под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)



Рис. 5.7. Проростки лука под воздействием различных экстрактов через 12 суток:
 А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)

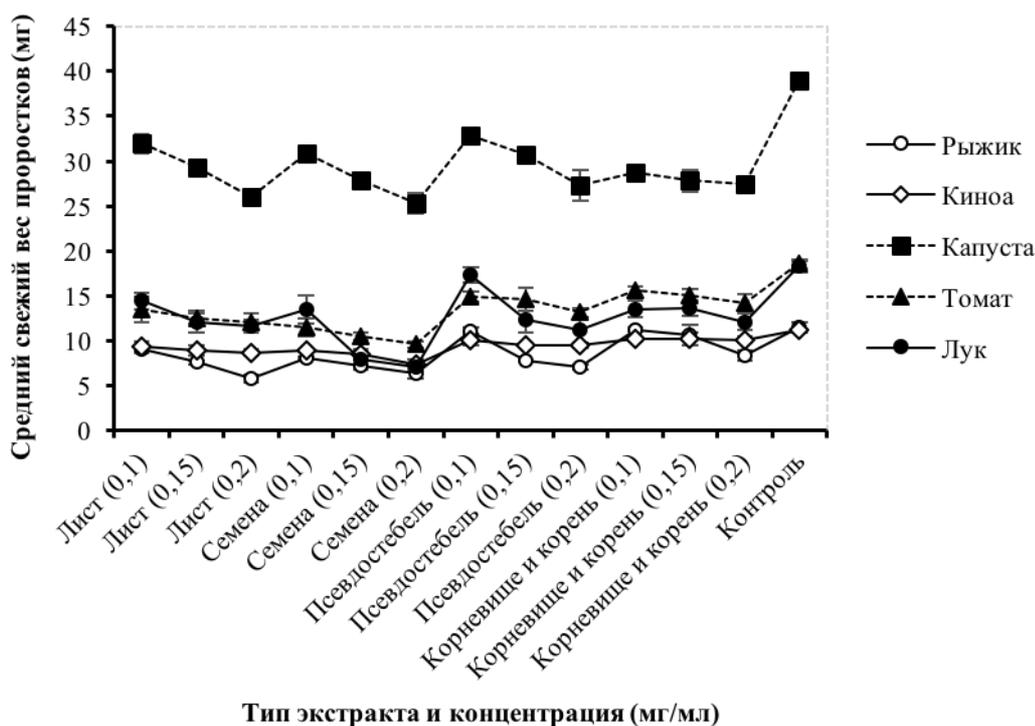


Рис. 5.8. Влияние растительных экстрактов черного кардамона на сырую массу 5 видов сельскохозяйственных культур

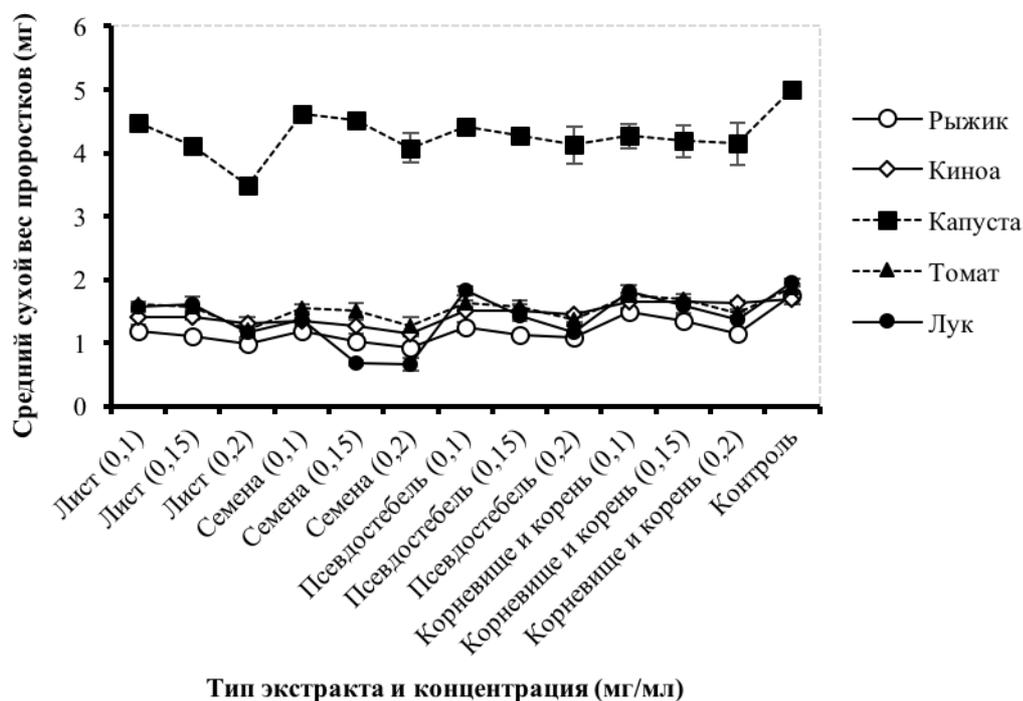


Рис. 5.9. Влияние растительных экстрактов черного кардамона на сухую массу 5 видов сельскохозяйственных культур

5.1.2 Экстракты, полученные из *Atomum longiligulare*

В следующей серии экспериментов было определено аллелопатическое действие этанольных экстрактов, полученных из листьев, семян, псевдостебля, а также корневища и корня пурпурного кардамона на процент прорастания семян пяти тестируемых видов (табл. 5.4).

Экспериментально установлено, что все изучаемые экстракты оказывали значительное ($p \leq 0,05$) влияние на посевные качества семян (рыжик, киноа, капуста, томат и лук). Показано, что самый высокий ингибирующий эффект был отмечен при использовании всех вариантов экстрактов при обработке семян лука. В то время, как на семена рыжика посевного исследуемые экстракты не оказали ингибирующего эффекта, исключение составила только концентрация экстракта 0,20 мг/мл, полученного из семян. Для остальных 3 видов ингибирующий эффект экстрактов был незначительный. В результате проведенных исследований были выявлены общие закономерности: 1 - при увеличении концентрации экстрактов с 0,10 - 0,20 мг/мл способность экстрактов ингибировать прорастание возрастала; 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 *Atomum longiligulare* (2,8% - рыжик, 9,3% - киноа, 19,8% - капуста, 23,5% - томат, 50,3% - лук).

Кроме того, в работе было изучено влияние экстрактов пурпурного кардамона на прорастание семян по двум другим показателям - среднее время прорастания (MGT) (Рис. 5.10) и индекс скорости прорастания (GRI) (Рис. 5.11).

**Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на прорастания
семян (GR, %) 5 видов сельскохозяйственных культур**

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста **	Томат **	Лук **
Лист	0,10	100 a (0,0)	93,5 ± 0,9 cd (6,5)	75,0 ± 1,6 cde (9,9)	72,2 ± 4,2 ab (3,8)	25,0 ± 1,6 bcde (29,0)
	0,15	99,1 ± 0,9 ab (0,9)	92,6 ± 0,9 d (7,4)	72,2 ± 1,6 def (13,2)	65,7 ± 4,6 abc (12,5)	20,4 ± 1,8 defg (42,3)
	0,20	98,1 ± 0,9 ab (1,9)	90,7 ± 0,9 d (9,3)	70,4 ± 2,5 efg (15,4)	61,1 ± 2,8 bc (18,5)	18,5 ± 2,4 fg (47,7)
Семена	0,10	100 a (0,0)	93,5 ± 0,9 cd (6,5)	74,1 ± 0,9 cdef (11,0)	69,4 ± 4,2 abc (7,5)	22,2 ± 1,6 defg (37,0)
	0,15	99,1 ± 0,9 ab (0,9)	93,5 ± 0,9 cd (6,5)	69,4 ± 1,6 fg (16,5)	67,6 ± 4,0 abc (10,0)	19,4 ± 1,6 efg (44,9)
	0,20	97,2 ± 1,6 b (2,8)	90,7 ± 0,9 d (9,3)	66,7 ± 3,2 g (19,8)	57,4 ± 3,3 c (23,5)	17,6 ± 1,8 g (50,3)
Псевдостебель	0,10	100 a (0,0)	99,1 ± 0,9 ab (0,9)	81,5 ± 0,9 ab (2,2)	72,2 ± 4,2 ab (3,8)	28,7 ± 1,9 bc (18,5)
	0,15	100 a (0,0)	97,2 ± 1,6 ab (2,8)	78,7 ± 0,9 abc (5,4)	71,3 ± 4,6 ab (5,0)	25,9 ± 1,9 bcd (26,4)
	0,20	100 a (0,0)	97,2 ± 1,6 ab (2,8)	75,9 ± 0,9 cd (8,8)	69,4 ± 4,2 abc (7,4)	24,1 ± 2,5 cdef (31,8)
Корневище и корень	0,10	100 a (0,0)	99,1 ± 0,9 ab (0,9)	82,4 ± 0,9 ab (1,1)	74,1 ± 3,3 ab (1,2)	30,6 ± 1,6 ab (13,2)
	0,15	100 a (0,0)	99,1 ± 0,9 ab (0,9)	78,7 ± 0,9 abc (5,5)	73,2 ± 4,0 ab (2,6)	25,0 ± 1,6 bcde (29,0)
	0,20	100 a (0,0)	96,3 ± 1,9 bc (3,7)	77,8 ± 0,0 bc (6,6)	71,3 ± 3,3 ab (5,0)	24,1 ± 2,5 cdef (31,8)
Контроль		100 a (0,0)	100 a (0,0)	83,3 ± 1,6 a (0,0)	75,0 ± 3,2 a (0,0)	35,2 ± 0,9 a (0,0)

*, ** Средние значения (%), среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. (*) – значения процента прорастания были преобразованы в \sqrt{X} перед статистическим анализом. (**) – значения процента прорастания были преобразованы в $\arcsin \sqrt{X}$ перед статистическим анализом. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

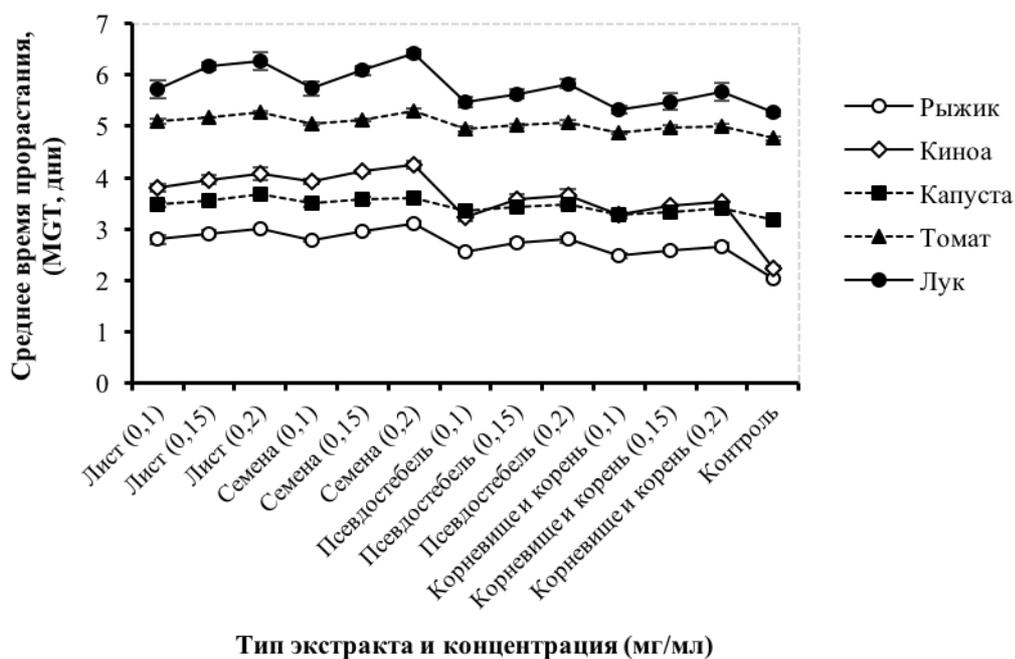


Рис. 5.10. Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на среднее время прорастания (MGT) семян 5 видов сельскохозяйственных растений

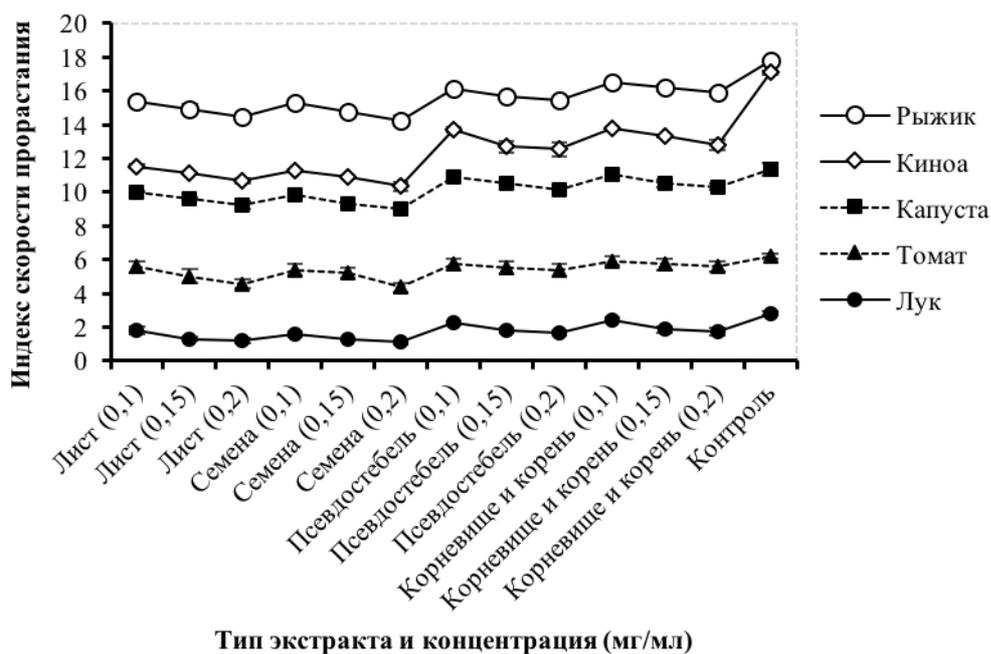


Рис. 5.11. Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на индекс скорости прорастания (GRI) семян 5 видов сельскохозяйственных растений

Данные, полученные в этом исследовании, показали, что увеличение концентрации экстрактов увеличивало значение MGT и уменьшало значение GRI

(рис. 5.10, 5.11). Чем выше значение GRI по сравнению с контролем, тем ниже ингибирование, и наоборот. Но для значения MGT значение обратное. Согласно этим двум показателям, во всех проведенных обработках наблюдался значительный ингибирующий эффект. У всех пяти видов самое высокое значение MGT и самое низкое значение GRI наблюдалось при использовании экстракта семян в концентрации 0,20 мг/мл. Напротив, самые низкие значения MGT и самые высокие значения GRI наблюдались при использовании экстракта псевдостебля или корневища и корня в концентрации 0,10 мг/мл.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние различных экстрактов пурпурного кардамона на морфометрические показатели проростков тестируемых видов сельскохозяйственных культур (рыжик, киноа, капуста, томат и лук). Учет результатов проводили по длине корня и гипокотилия, а также по сырой и сухой массе проростков в конце эксперимента. Основные результаты приведены в таблицах 5.5, 5.6 и на рисунках 5.12–5.18.

Результаты показали, что исследуемые этанольные экстракты пурпурного кардамона оказывали существенный ингибирующий эффект на длину гипокотилия и корня проростков по сравнению с контролем. Причем степень ингибирования увеличивалась с увеличением концентрации экстракта (таблица 5.5, 5.6).

Экспериментально доказано, что наибольший ингибирующий эффект проявили все экстракты на семенах лука. Другие исследуемые сельскохозяйственные культуры были ранжированы следующим образом: рыжик, киноа, томат и капуста (рис. 5.12-5.18). Следует отметить, что наибольший ингибирующий эффект на рост корней и гипокотилия проростков проявили экстракты, полученные из листьев и семян. Причем самый высокий процент ингибирования длины гипокотилия и корешков (гипокотиль: рыжик – 34,8%, киноа – 45,1%, капуста – 16,5%, томат – 37,0%, лук – 67,7%; корешок: рыжик – 54,9%, киноа – 51,1%, капуста – 39,4%, томат – 32,1%, лук – 83,8%) был получен при использовании экстрактов из семян в концентрации 0,20 мг/мл. Кроме того, корни были более чувствительными к действию экстрактов по сравнению с

гипокотилем, а ингибирующая активность экстрактов в отношении роста проростков зависела от концентрации и вида тестируемого растения.

Таблица 5.5

Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на длину гипокотыля 5 видов сельскохозяйственных культур

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста *	Томат *	Лук *
Лист	0,10	8,4 ± 0,13 c (28,2)	10,4 ± 0,42 bcd (29,8)	7,5 ± 0,06 bc (4,6)	9,4 ± 0,09 b (26,2)	22,3 ± 0,36 b (33,2)
	0,15	7,2 ± 0,11 ef (38,1)	9,7 ± 0,17 cdef (34,5)	7,0 ± 0,07 ef (11,2)	8,9 ± 0,08 bc (29,9)	15,9 ± 1,07 e (52,4)
	0,20	7,0 ± 0,06 f (39,6)	8,5 ± 0,09 ef (42,5)	6,6 ± 0,05 g (15,9)	8,2 ± 0,09 c (35,7)	11,5 ± 1,05 f (65,7)
Семена	0,10	8,6 ± 0,12 c (25,9)	9,3 ± 0,39 def (37,6)	7,4 ± 0,13 cd (6,1)	8,9 ± 0,04 bc (29,7)	22,6 ± 0,03 b (32,3)
	0,15	8,4 ± 0,16 c (27,6)	8,4 ± 0,19 ef (43,6)	6,7 ± 0,05 fg (14,9)	8,8 ± 0,10 bc (30,5)	16,8 ± 0,64 de (49,8)
	0,20	7,6 ± 0,08 de (34,8)	8,2 ± 0,33 f (45,1)	6,6 ± 0,19 g (16,5)	8,0 ± 0,07 c (37,0)	10,8 ± 0,77 f (67,7)
Псевдостебель	0,10	9,4 ± 0,16 b (19,1)	11,7 ± 0,67 b (20,9)	7,8 ± 0,05 a (0,5)	9,4 ± 0,26 b (26,2)	31,0 ± 0,91 a (7,2)
	0,15	9,4 ± 0,08 b (19,3)	9,7 ± 0,45 cdef (34,7)	7,4 ± 0,08 cd (6,5)	9,0 ± 0,07 bc (29,0)	20,1 ± 0,74 bc (39,8)
	0,20	8,0 ± 0,18 cd (31,1)	9,4 ± 0,50 def (36,5)	7,1 ± 0,08 de (10,0)	8,9 ± 0,11 bc (29,6)	18,5 ± 0,35 cde (44,7)
Корневище и корень	0,10	9,3 ± 0,10 b (20,1)	11,1 ± 0,69 bc (25,0)	7,8 ± 0,14 a (0,9)	9,7 ± 0,20 b (23,3)	22,6 ± 0,84 b (32,4)
	0,15	8,5 ± 0,14 c (27,0)	10,0 ± 0,31 cde (32,8)	7,2 ± 0,03 de (9,2)	9,3 ± 0,12 b (26,5)	19,0 ± 1,01 cd (43,1)
	0,20	8,1 ± 0,09 c (30,1)	9,2 ± 0,78 def (38,1)	7,0 ± 0,11 ef (11,7)	9,1 ± 0,10 bc (28,2)	17,0 ± 0,82 de (49,1)
Контроль		11,6 ± 0,46 a (0,0)	14,9 ± 1,03 a (0,0)	7,9 ± 0,22 a (0,0)	12,7 ± 1,15 a (0,0)	33,4 ± 1,31 a (0,0)

* Средние значения (мм, среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

**Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на длину
корешков 5 видов сельскохозяйственных культур**

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Рыжик *	Киноа *	Капуста *	Томат *	Лук *
Лист	0,10	41,4 ± 1,93 c (34,4)	14,6 ± 0,73 de (44,9)	36,8 ± 0,96 cd (26,7)	30,0 ± 0,65 ab (4,8)	12,6 ± 0,75 c (39,6)
	0,15	32,2 ± 1,23 def (49,0)	13,5 ± 0,66 e (48,9)	35,8 ± 1,50 d (28,7)	24,3 ± 0,53 de (22,9)	12,3 ± 1,15 c (41,3)
	0,20	30,6 ± 0,74 ef (51,5)	13,0 ± 0,52 e (50,9)	30,8 ± 1,21 e (38,6)	22,9 ± 1,11 ef (27,2)	7,4 ± 0,55 d (64,6)
Семена	0,10	44,1 ± 1,67 c (30,1)	16,4 ± 0,37 cd (38,1)	36,0 ± 1,29 d (28,4)	27,5 ± 0,51 bc (12,6)	7,3 ± 0,51 d (65,4)
	0,15	32,4 ± 0,41 de (48,7)	14,8 ± 0,98 de (44,2)	32,0 ± 2,15 e (36,3)	22,8 ± 1,06 ef (27,6)	6,5 ± 0,79 d (69,0)
	0,20	28,5 ± 0,61 f (54,9)	12,9 ± 0,55 e (51,1)	30,5 ± 2,01 e (39,4)	21,4 ± 0,82 f (32,1)	3,4 ± 0,60 e (83,8)
Псевдос- тебель	0,10	51,9 ± 1,82 b (17,7)	18,5 ± 0,77 bc (30,1)	42,6 ± 0,78 b (15,1)	30,9 ± 1,10 a (1,9)	18,9 ± 0,37 ab (9,6)
	0,15	41,8 ± 0,92 c (33,7)	17,4 ± 1,29 c (34,3)	40,1 ± 0,86 bc (20,2)	30,5 ± 0,85 a (3,3)	18,2 ± 0,17 b (13,1)
	0,20	33,5 ± 0,58 de (46,9)	14,4 ± 0,46 de (45,6)	36,7 ± 0,66 cd (27,0)	27,8 ± 1,21 bc (11,8)	6,6 ± 0,21 d (68,4)
Корнев- ище и корень	0,10	50,8 ± 1,16 b (19,4)	20,3 ± 0,74 b (23,4)	46,9 ± 1,11 a (6,6)	31,1 ± 0,17 a (1,1)	11,7 ± 0,93 c (44,0)
	0,15	41,5 ± 1,94 c (34,3)	17,7 ± 0,87 c (33,1)	37,1 ± 0,56 cd (26,2)	26,7 ± 0,68 cd (15,2)	10,5 ± 0,34 c (50,0)
	0,20	35,1 ± 0,94 d (44,3)	14,1 ± 0,72 de (46,8)	36,3 ± 0,37 cd (27,7)	26,5 ± 0,56 cd (15,8)	6,2 ± 0,64 d (70,5)
Контроль		63,1 ± 0,46 a (0,0)	26,5 ± 0,79 a (0,0)	50,3 ± 0,78 a (0,0)	31,5 ± 0,81 a (0,0)	20,9 ± 1,32 a (0,0)

* Средние значения (мм, среднее ± SE), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана. Значения в круглых скобках представляют собой процент ингибирования по сравнению с контролем.

С другой стороны, этанольные экстракты пурпурного амомума приводили к снижению сырой и сухой массы проростков всех тестируемых сельскохозяйственных культур (рис. 5.17, 5.18). На всех протестированных растениях в контрольном варианте сырая и сухая масса проростков была максимальной, по отношению с опытными вариантами. В результате проведенных исследований была установлена общая тенденция - с увеличением концентрации экстрактов снижалась сырая и сухая масса проростков. Кроме того, аналогично предыдущим исследованиям, показано, что экстракты, полученные из листьев и семян пурпурного амомума оказывали существенное влияние на уменьшение сырой и сухой массы проростков по сравнению с двумя другими изучаемыми экстрактами. Причем наибольший ингибирующий эффект был получен при использовании экстрактов семян в концентрации 0,20 мг/мл.

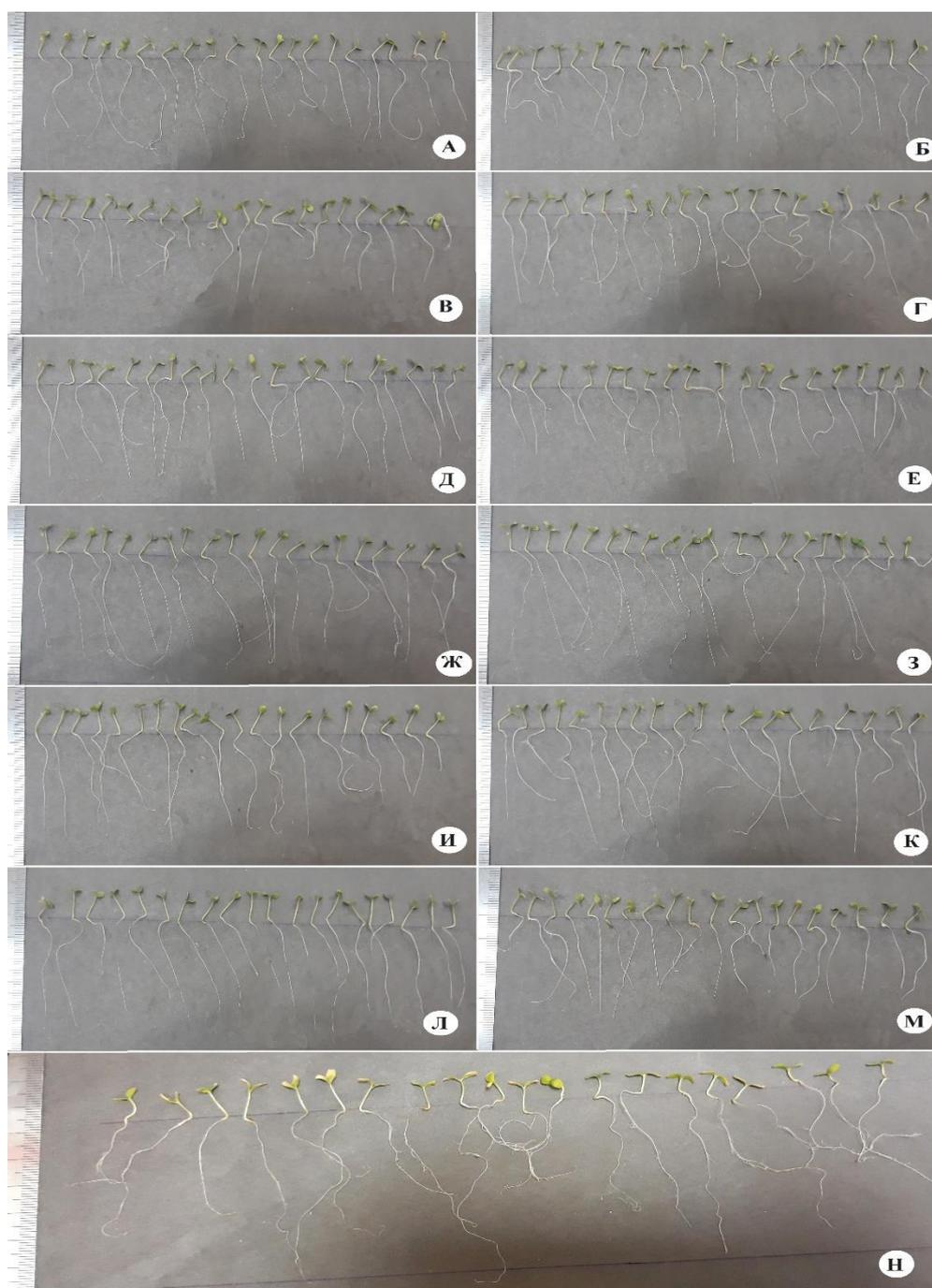


Рис. 5.12. Проростки рыжика под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)



Рис. 5.13. Проростки киноа под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)



Рис. 5.14. Проростки капусты под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)

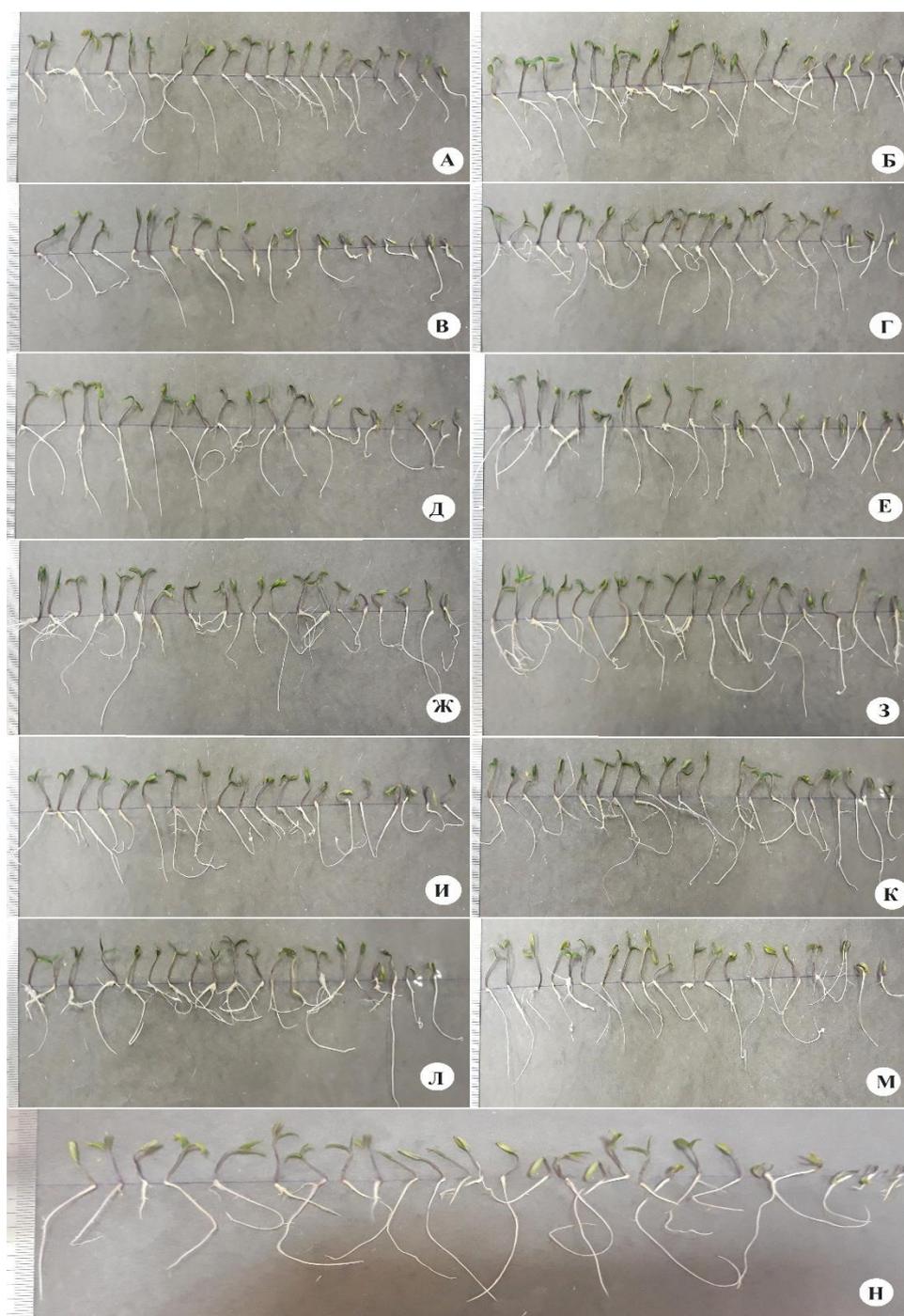


Рис. 5.15. Проростки томата под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)



Рис. 5.16. Проростки лука под воздействием различных экстрактов через 12 суток: А – 0,10 мг/мл экстракт семян; Б – 0,15 мг/мл экстракт семян; В – 0,20 мг/мл экстракт семян; Г – 0,10 мг/мл экстракт листьев; Д - 0,15 мг/мл экстракт листьев; Е – 0,20 мг/мл экстракт листьев; Ж – 0,10 мг/мл экстракт корневища и корня; З – 0,15 мг/мл экстракт корневища и корня; И – 0,20 мг/мл экстракт корневища и корня; К – 0,10 мг/мл экстракт псевдостебля; Л – 0,15 мг/мл экстракт псевдостебля; М – 0,20 мг/мл экстракт псевдостебля; Н – контроль (0,03% (v/v) водный раствор ДМСО)

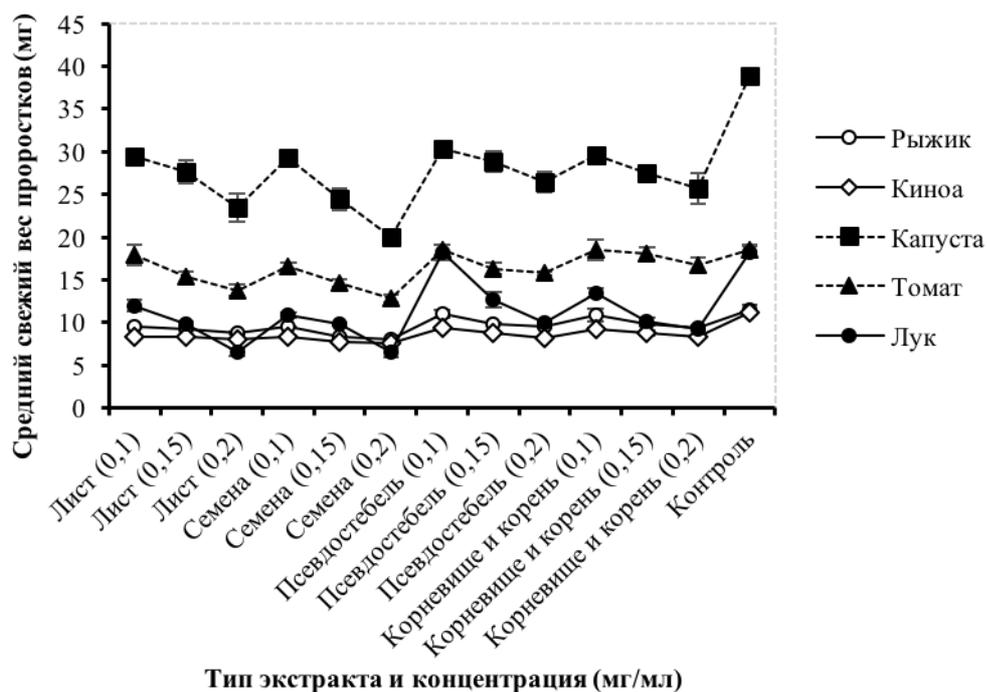


Рис. 5.17. Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на сырую массу 5 видов сельскохозяйственных культур

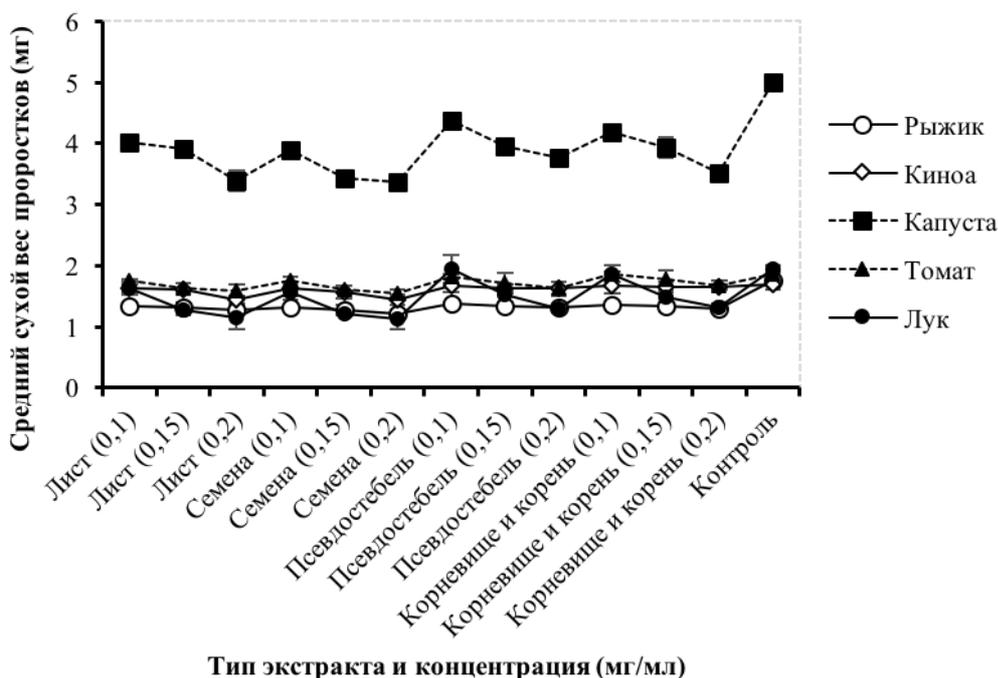


Рис. 5.18. Влияние растительных экстрактов пурпурного кардамона на сухую массу 5 видов сельскохозяйственных культур

В заключении следует отметить, что этанольные экстракты различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона оказывали аллелопатическое влияние на исследуемые виды растений (рыжик, киноа, капусту, томаты и лук).

Анализируя свои данные и результаты других авторов мы пришли к выводу, что аллелопатический эффект экстрактов черного кардамона и пурпурного амомума зависит от 3 основных факторов, включая: (1) тип экстракта; (2) концентрации экстракта; (3) исследуемого вида растений. Эти три фактора играют важную роль в ингибирующем или стимулирующем воздействии экстрактов на прорастание семян и формирование проростков исследуемых видов растений (Verdeguer, Blaizquez, Boira, 2009; Saharkhiz, Esmaeili, Merikhi, 2010; Bich, Kato-Noguchi, 2012; Poopraiboonpipat et al., 2013).

Анализ результатов показал, во-первых, что величина эффектов фитотоксичности при одинаковых уровнях концентрации в исследуемых видах растений зависела от первичного экспланта, из которого были получены экстракты (семена, листья, псевдостебель, корневище и корень). Показано, что экстракты из семян и листьев обладали более сильными ингибирующими свойствами, чем два других экстракта. Вероятно, причиной разницы являются более высокие значения суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов (раздел 5.3) в семенах и листьях. Разными авторами было показано, что эфирное масло семян черного кардамона и пурпурного амомума содержит большое количество окисляющих монотерпенов (например, α -пинен, β -пинен, мирцен, камфен, D-лимонен, камфора и т.д.), сесквитерпенов (например, кариофиллен и гумулен) и фенольных веществ (например, эпикатехин, кверцитрин, галловая кислота и др.) (Dung, Bien, Leclercq, 1992; Chau et al., 2015; Anh et al., 2020; Sabulal, Baby, 2021), которые в значительных концентрациях могут быть важными компонентами аллелопатического действия. Некоторые авторы сообщают о высокой фитотоксичности экстрактов, полученных из листьев на тестируемых растениях. Так, например, Khanh с соавторами (Khanh et al., 2005) сообщили, что листовые экстракты пяти лекарственных и бобовых растений обладали наибольшим гербицидным действием, за ними располагались по своей активности экстракты, полученные из корней и стеблей. Arowosegbe и Afolayan (Arowosegbe, Afolayan, 2012) также обнаружили, что ингибирующая эффективность листовых экстрактов *Aloe ferox* Mill., полученных из репы

(*Brassica rapa* L.), свеклы (*Beta vulgaris* L.) и моркови (*Daucus carota* L.) был выше, чем экстракты корней. Аналогичные результаты были получены Turk и Tawaha (Turk, Tawaha, 2003) на экстрактах черной горчицы (*Brassica nigra* L.). Экспериментально установлено, что листовые экстракты обладали наибольшим ингибирующим действием, в то время как стеблевые экстракты оказывали наименьшее ингибирующее действие на прорастание семян чечевицы (*Polygala tatarinowii* Regel.). Islam в соавторстве (Islam, Kato-Noguch, 2014) обнаружили, что экстракты растений базилика незначительно задерживают прорастание семян, но, например, экстракты листьев оказывают существенное воздействие на максимальную скорость прорастания семян, за которыми по своей активности следуют экстракты корней и семян. Напротив, Хан с коллегами (Han, Pan, Wu, 2008) сообщили, что экстракт стебля имбиря проявлял наибольшее ингибирующее воздействие во всех исследуемых концентрациях, в то время как экстракт корневища не обладал выраженным ингибирующим действием.

Во-вторых, различные концентрации этанольных экстрактов, полученных из различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона оказывали различное ингибирующее воздействие на прорастание семян и рост проростков исследуемых видов растений. Это, вероятно, связано с различным содержанием фенольных соединений в экстрактах: чем выше их концентрация, тем выше ингибирующий эффект исследуемых концентраций. Нами показано, что при самой высокой концентрации экстракта (0,20 мг/мл) все экстракты значительно ингибировали прорастание семян изучаемых видов растений по сравнению с контрольным вариантом. Наши результаты согласуются с результатами Randhawa и др. (Randhawa, Cheema Ali, 2002), Hoque и др. (Hoque et al., 2003), An и др. (An, Pratley, Haig, 2005), Batlang и др. (Batlang, Shushu, 2007) и Ashrafi и др. (Ashrafi et al., 2009), которые обнаружили, что степень ингибирования увеличивается с увеличением концентрации экстрактов. Аналогичные результаты были получены Han et al. (Han, Pan, Wu, 2008) и Pukclai et al. (Pukclai, Kato-Noguchi, 2013). Они сообщили, что степень фитотоксичности экстрактов имбиря и сиамского

кардамона (*Amomum krervanh* Pierre) зависела от концентрации и что фитотоксичность увеличивалась с увеличением концентрации экстракта.

В-третьих, наши исследования показали, что экстракты черного кардамона и пурпурного кардамона оказали наибольшее ингибирующее влияние на рост проростков лука, по сравнению с другими исследуемыми видами растений. Из этого следует, что для ингибирования роста различных видов растений необходимы разные концентрации экстрактов. Это, вероятно, связано с физиолого-биохимическими особенностями каждого исследуемого вида (Kobayashi, 2004). Кроме того, различные реакции семян на действие одного и того же экстракта могут быть обусловлены строением семян и проницаемостью семенной оболочки (Hanley, Whiting, 2005). Так, например, Наг и др. (Naq et al., 2010) предположили, что смесь различных соединений, содержащихся в экстрактах, может действовать антагонистическим или синергетическим образом на различные виды растений. Mahdaviikia и соавт. (Mahdaviikia, Saharkhiz, 2015) обнаружили, что водный экстракт растения мяты перечной проявлял различный ингибирующий эффект в отношении двух садовых культур (томат и редис) и трех видов сорняков (полевой вьюнок, портулак и джунглевый рис). Согласно Хан и др. (Han, Pan, Wu, 2008) водный экстракт имбиря оказал большее влияние на семена кукурузы, чем на семена сои, что свидетельствует о видовой специфичности. Пуклаи и соавт. (Pukclai, Kato-Noguchi, 2013) сообщили, что двудольные растения (кресс-салат и люцерна) были более чувствительны к водно-метанольным экстрактам сиамского кардамона по сравнению с однодольными растениями (пшеница). Ислам и др. (Islam, Khan, Kato-Noguchi, 2013) также указали, что на семена салата в большей степени оказывают влияние экстракты личи (*Litchi chinensis* Sonn.), чем экстракты, полученные из газонных трав.

Кроме того, наши исследования показали, что корневая система проростков оказалась более чувствительной к действию изучаемых экстрактов, по сравнению с гипокотилем. Это можно объяснить тем, что именно корневая система обеспечивает большее поглощение веществ экстрактов, чем гипокотиль (Tefera, 2002; Nishida et al., 2005). Таким образом, по росту корней можно оценивать

токсичное действие экстрактов и использовать этот показатель в качестве тест-системы.

5.2 Влияние экстрактов двух видов *Atomum* на рост фитопатогенных грибов *in vitro*

5.2.1 Экстракты, полученные из *Atomum tsao-ko*

Fusarium oxysporum

Исследования показали, что изучаемые экстракты оказывают различное фунгицидное действие на рост мицелия *Fusarium oxysporum*. Все экстракты по активности можно ранжировать следующим образом: семя, лист, корневище и корень, псевдостебель (Табл. 5.7, Рис. 5.19, 5.20). Причем фунгицидная активность экстрактов возрастает с увеличением их концентрации. Существенный ингибирующий эффект на роста мицелия *F. oxysporum* был получен при использовании экстрактов из семян и листа. В этом варианте наблюдали снижение роста мицелия на 16,4% по сравнению с контролем (MS + 0,03% ДМСО).

Таблица 5.7

Влияние экстракта черного кардамона (*Atomum tsao-ko*) на культуру гриба *Fusarium oxysporum in vitro*

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Дни инкубации *					
		2	3	4	5	6	7
Корневище и корень	0,05	19,0 ± 0,57	28,7 ± 0,85	41,7 ± 1,35	52,8 ± 1,55	63,6 ± 0,75	70,4 ± 0,53 ab (9,9)
	0,10	22,8 ± 1,08	32,3 ± 0,98	47,0 ± 0,59	51,9 ± 2,27	59,2 ± 4,95	68,6 ± 6,67 ab (12,2)
Псевдостебель	0,05	21,8 ± 0,89	31,4 ± 0,91	44,9 ± 0,71	57,0 ± 0,87	68,6 ± 0,62	74,7 ± 0,93 ab (4,4)
	0,10	20,1 ± 0,32	29,9 ± 0,37	42,4 ± 0,64	51,7 ± 0,64	63,9 ± 0,94	71,7 ± 0,86 ab (8,2)

Экстракт	Концентрация, мг/мл	Дни инкубации *					
		2	3	4	5	6	7
Семя	0,05	19,7 ± 0,68	30,3 ± 0,78	44,1 ± 0,75	54,1 ± 0,89	63,3 ± 0,73	66,7 ± 1,74 b (14,6)
	0,10	16,7 ± 0,62	25,9 ± 0,56	38,2 ± 0,94	47,3 ± 1,03	59,0 ± 0,87	65,3 ± 1,37 b (16,4)
Лист	0,05	22,4 ± 0,83	33,3 ± 0,64	47,6 ± 0,73	55,3 ± 2,71	58,0 ± 4,16	67,2 ± 6,97 b (14,0)
	0,10	17,1 ± 0,56	26,8 ± 0,51	38,6 ± 0,41	48,8 ± 0,86	58,9 ± 0,37	65,3 ± 0,98 b (16,4)
Контроль (МС + ДМСО)		21,5 ± 0,5	30,9 ± 0,48	45,7 ± 0,91	58,3 ± 0,72	67,6 ± 1,24	78,1 ± 1,19 a (0,0)
Контроль (МС)		23,1 ± 1,05	33,1 ± 1,07	47,4 ± 1,29	59,4 ± 1,51	70,1 ± 2,85	79,1 ± 2,41 a

* Средние значения (диаметр колоний, мм) ± стандартная ошибка (SE); значения, обозначенные одинаковыми буквами в одном столбце, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана. Значения в скобках – процент ингибирования роста мицелия по сравнению с контролем (MS + 0,03% ДМСО).

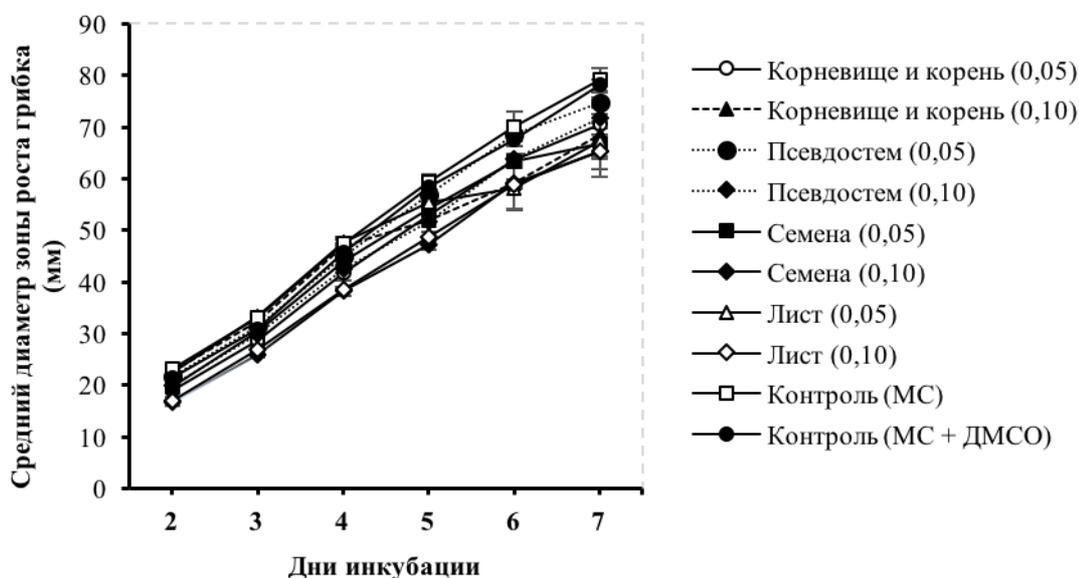


Рис. 5.19. Влияние экстракта черного кардамона (*Amomum tsaoko*) на культуру гриба *Fusarium oxysporum in vitro*

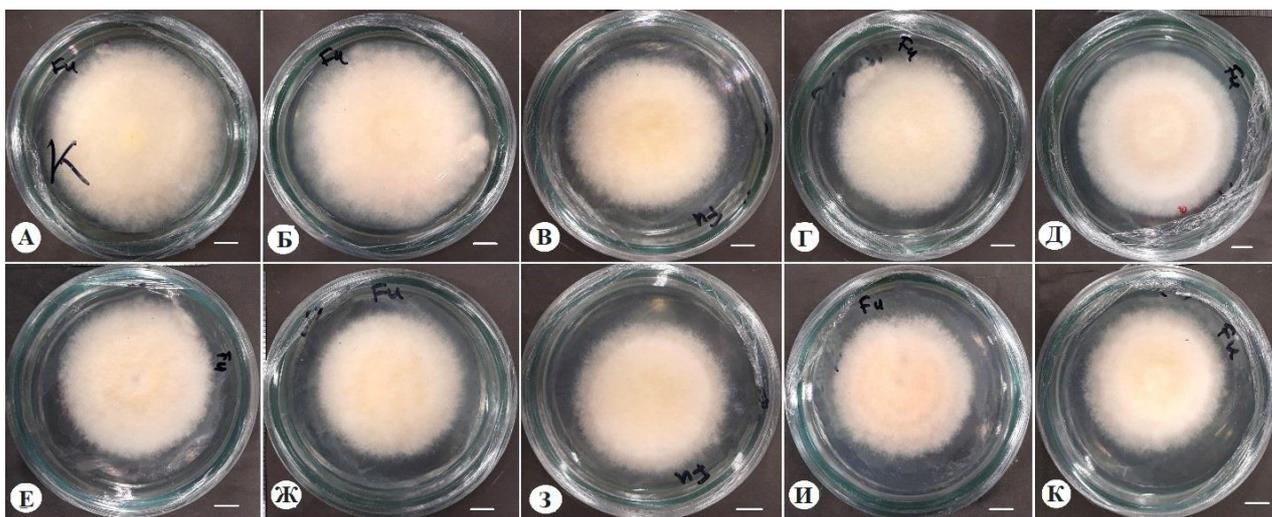


Рис. 5.20. Рост *Fusarium oxysporum* через 7 суток с начала культивирования *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов: А – Контроль (МС); Б – Контроль (МС + ДМСО); В – корневище и корень (0,05 мг/мл); Г – корневище и корень (0,10 мг/мл); Д – псевдопобег (0,05 мг/мл); Е – псевдопобег (0,10 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 баров = 1 см

Кроме того, в варианте с применением экстракта, полученного из семян, наблюдали самый низкий показатель по удельной скорости роста (μ) гриба (Табл. 5.8, Рис. 5.21). Установлено, что при длительном выращивании грибов в этом варианте учитываемый показатель снижался на протяжении всего времени эксперимента. К концу 7-х суток удельная скорость роста *Fusarium oxysporum* была меньше контрольного варианта в абсолютных величинах на 50%.

Влияние экстрактов, полученных из различных органов черного кардамона, на удельную суточную скорость роста (μ) гриба *F. oxysporum*

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации					
		2	3	4	5	6	7
Корневище и корень	0,05	1,13	0,41	0,37	0,24	0,19	0,10
	0,10	1,22	0,35	0,38	0,10	0,13	0,15
Псевдостебель	0,05	1,19	0,37	0,36	0,24	0,19	0,09
	0,10	1,15	0,40	0,35	0,20	0,21	0,12
Семя	0,05	1,14	0,43	0,38	0,20	0,16	0,05
	0,10	1,06	0,44	0,39	0,21	0,22	0,10
Лист	0,05	1,21	0,40	0,36	0,15	0,05	0,15
	0,10	1,07	0,45	0,36	0,23	0,19	0,10
Контроль (МС + ДМСО)		1,19	0,36	0,39	0,24	0,15	0,14
Контроль (МС)		1,22	0,36	0,36	0,23	0,17	0,12

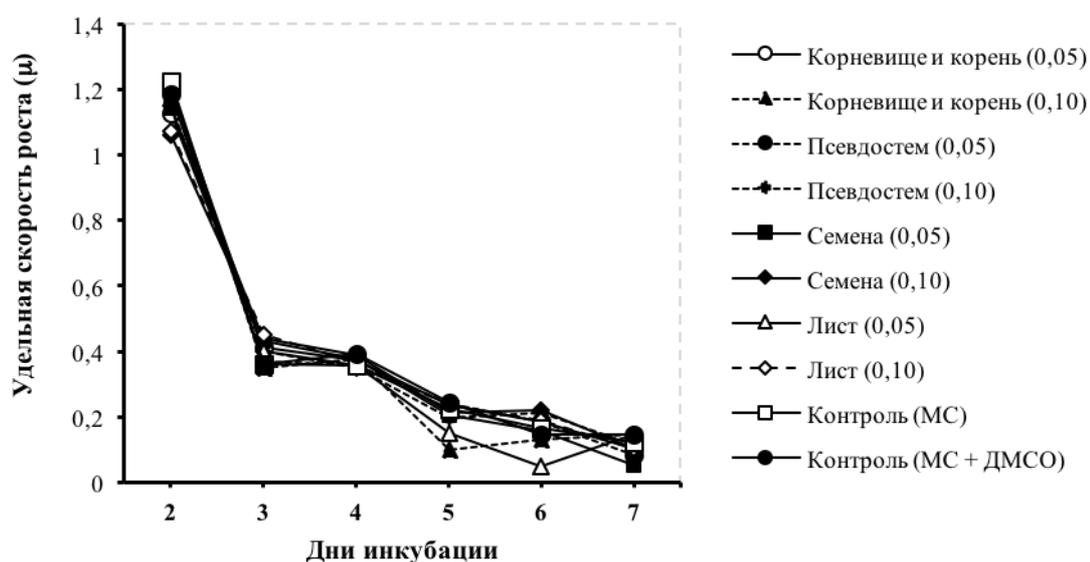


Рис. 5.21. Удельная суточная скорость роста (μ) грибка *Fusarium oxysporum*, культивируемого *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов черного кардамона

Что касается числа колониеобразующих единиц (КОЕ) *Fusarium oxysporum*, то их количество так же изменяется в зависимости от применяемого экстракта. Однако установлена закономерность - с увеличением концентрации экстракта количество КОЕ уменьшалось (Табл. 5.9). Во всех вариантах макроконидии отсутствовали, но было зафиксировано наличие микроконидий, что характерно для форм фузариума.

Таблица 5.9

Влияние экстрактов, полученных из различных органов черного кардамона, на количества КОЕ колоний *F. oxysporum* на чашках Петри

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Концентрация КОЕ в 1 мл приготовленной суспензии	Количество КОЕ в пробе, взятой с сегмента колонии площадью 45 мм ²	Количество КОЕ на 1 чашку Петри с площадью ростовой поверхности 550 мм ²
Лист	0,05	547500 ± 70232	8212500	10037500
	0,10	77500 ± 17485	512500	637500
Семя	0,05	237500 ± 20980	4562500	7875000
	0,10	32500 ± 12757	387500	595833
Псевдостебель	0,05	537500 ± 74221	8062500	10854166
	0,10	95000 ± 46197	975000	1058333
Корневище и корень	0,05	497500 ± 19937	7462500	10120833
	0,10	82500 ± 17966	637500	979166
Контроль (МС + ДМСО)		662500 ± 19668	8937500	11812500
Контроль (МС)		592500 ± 27674	8435520	10927400

Таким образом, проведенные исследования позволили заключить, что экстракты, полученные из различных органов черного кардамона можно применять в борьбе с грибными болезнями растений, в частности с *Fusarium oxysporum*, и на их основе разрабатывать биопрепараты с фунгицидной активностью.

Наши исследования подтверждают результаты, полученные другими исследователями. Так, например, сообщалось, что экстракты или эфирные масла многих видов растений рода *Amomum* (семейство имбирных) оказывают различное влияние на ингибирование роста мицелия многих видов грибов. Например, эфирные масла, извлеченные из листьев и корневища *A. glabrum*, были способны ингибировать рост *Candida albicans* при минимальных значениях вещества (10,23 мкг/мл) (Nguyen, Le, Tran, 2020); эфирные масла, экстрагированные из корневища и стебля *A. rubidum*, проявляли значительную ингибирующую активность в отношении *Aspergillus niger* и *C. albicans* при концентрации 50 мкг/мл (Le, Nguyen, Ly, 2019); фруктовые масла трех различных сортов *A. subulatum*, подавляли рост мицелия грибов *C. albicans* при концентрации 1,25 - 2,5 мг/мл (Alam, Majumdar, Alam, 2019); фруктовые масла *A. subulatum* проявляли значительную ингибирующую активность в отношении 3 штаммов грибов (*C. albicans*, *A. niger* и *Saccharomyces cerevisiae*) (Agnihotri, Wakode, 2010); эфирные масла, выделенные из семян и кожуры *A. subulatum*, показали значительную активность в отношении *A. niger* при концентрации 313 мкг/мл и 19,5 мкг/мл (Satyal, Dosokyb, Kincerb, 2012); эфирные масла, выделенные из листьев *A. Subulatum* были эффективны против двух штаммов *Aspergillus flavus*, Navjot 4NSt и Saktiman 3NSt, со 100% ингибированием роста (Singh et al., 2018); масла, выделенные из побегов *A. verum* были способны ингибировать рост мицелия только одного патогенного гриба *C. albicans* при концентрации вещества 0,313 мг/мл (Tangjitjaroenkun et al., 2020).

Helminthosporium sativum

В результате проведенных исследований установлено, что изучаемые экстракты оказывают не одинаковое действие на рост мицелия *H. sativum* (Табл. 5.10). Причем в процессе культивирования мицелия гриба на средах с разными экстрактами, отмечена их разная активность. Так, например, было отмечено, что в течение первых 3-х суток выращивания *H. sativum* в вариантах с экстрактами наблюдали их стимулирующий эффект на рост мицелия. На 4-е сутки – этот показатель был на уровне контроля, а начиная с 5-х суток и до конца наблюдений (10-е сутки) – на всех средах с экстрактами отмечали ингибирование роста мицелия (10,2–37,1%). Причем, фунгицидная активность зависела от применяемого экстракта и его концентрации. Установлена обратная корреляция между ростом мицелия гриба и увеличением концентрации экстракта - с увеличением концентрации экстракта в питательной среде, повышается его фунгицидная активность. Все экстракты по активности можно ранжировать следующим образом: семя, лист, псевдостебель, корневище-корень (Табл. 5.10) (Рис. 5.22, 5.23). При использовании экстрактов, полученных из семян и листьев, наблюдали максимальный ингибирующий эффект рост мицелия *H. sativum*. В этих вариантах рост мицелия снизился в среднем на 29,6–37,1%, а при использовании самого не активного экстракта (полученного из корневища и корня) - на 10,2–20,1%. Было сделано предположение, что ингибирующий эффект экстрактов можно объяснить именно наличием в них веществ вторичного синтеза, например, фенольной природы. Однако ингибирующим эффектом может обладать и растворитель – ДМСО. Поэтому, мы параллельно заложили эксперимент с чистым ДМСО (0,03%). На десятый день наблюдения средние диаметры колоний грибов на двух контрольных средах существенно не отличались. Это доказывает, что водный раствор ДМСО в концентрации 0,03% не ингибирует рост грибов.

**Влияние экстракта черного кардамона (*Amomum tsao-ko*) на культуру гриба
*H. sativum in vitro***

Экстракта	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации *				
		2	4	6	8	10
Корневище и корень	0,05	14,6 ± 0,37	21,8 ± 1,29	26,8 ± 2,18	33,0 ± 1,80	39,7 ± 2,80 ab (10,2)
	0,10	13,6 ± 0,26	20,4 ± 0,37	24,9 ± 0,46	29,6 ± 0,85	35,3 ± 0,44 bcd (20,1)
Псевдостебель	0,05	13,5 ± 0,75	20,0 ± 1,37	24,2 ± 1,45	30,4 ± 1,50	37,8 ± 1,45 bc (14,5)
	0,10	12,9 ± 0,36	19,4 ± 1,62	23,8 ± 1,32	27,9 ± 1,48	32,5 ± 1,14 cde (26,5)
Семя	0,05	12,6 ± 0,80	18,4 ± 1,17	22,4 ± 1,13	26,5 ± 1,35	31,1 ± 1,08 de (29,6)
	0,10	11,9 ± 0,60	17,5 ± 2,06	21,4 ± 2,63	25,2 ± 2,29	28,8 ± 3,46 e (34,8)
Лист	0,05	12,0 ± 0,95	17,8 ± 1,11	21,9 ± 1,00	25,6 ± 1,17	30,1 ± 1,87 de (31,9)
	0,10	11,6 ± 0,28	16,9 ± 0,80	20,6 ± 0,95	24,0 ± 0,70	27,8 ± 1,57 e (37,1)
Контроль (МС + ДМСО)		14,9 ± 0,24	22,4 ± 0,56	28,2 ± 0,54	35,4 ± 0,51	44,2 ± 1,19 a (0,0)
Контроль (МС)		14,6 ± 0,14	21,9 ± 0,68	27,8 ± 0,41	34,9 ± 0,85	43,1 ± 2,06 a

* Средние значения (диаметр колоний, мм) ± стандартная ошибка (SE); значения, обозначенные одинаковыми буквами в одном столбце, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана. Значения в скобках – процент ингибирования роста мицелия по сравнению с контролем (MS + 0,03% ДМСО).

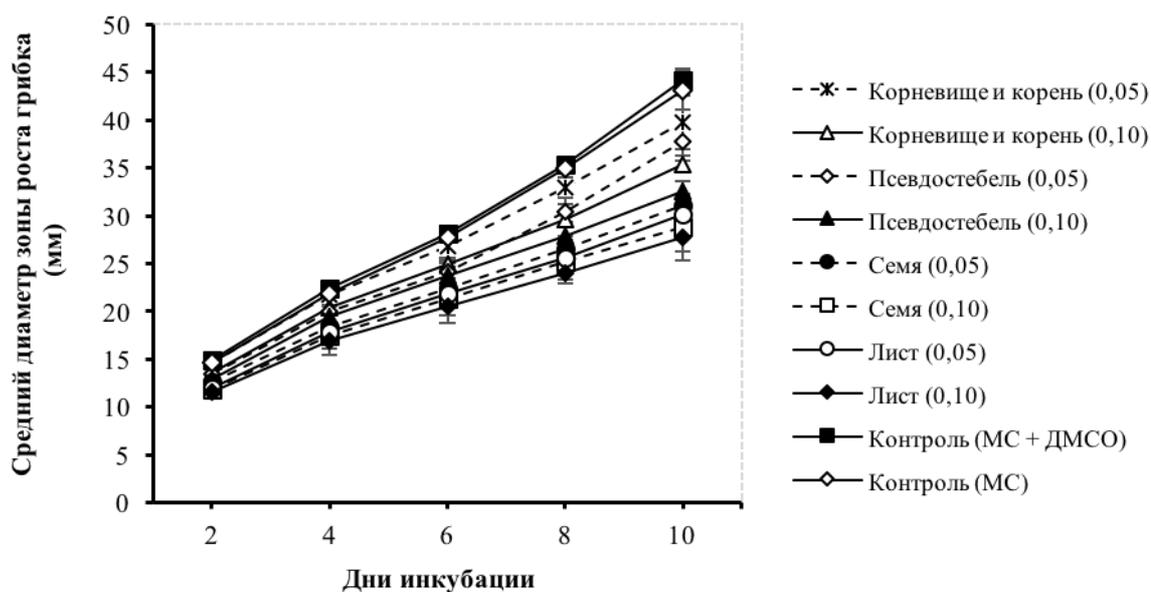


Рис. 5.22. Влияние экстракта черного кардамона (*Amomum tsaoko*) на культуру гриба *Helminthosporium sativum in vitro*

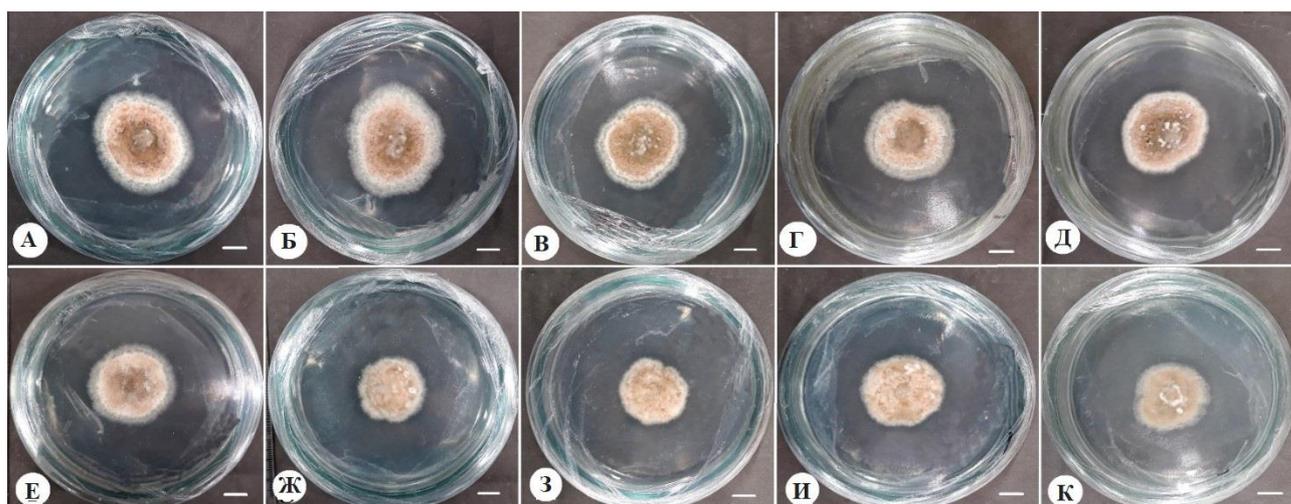


Рис. 5.23. Рост мицелия гриба *Helminthosporium sativum* через 10 суток культивирования *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов: А – Контроль (МС); Б – Контроль (МС + ДМСО); В – корневище и корень (0,05 мг/мл); Г – корневище и корень (0,10 мг/мл); Д – псевдопобег (0,05 мг/мл); Е – псевдопобег (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 баров = 1 см.

Кроме того, в варианте с применением экстракта, полученного из семян и листьев, наблюдали самый низкий показатель по удельной скорости роста (μ) мицелия гриба (Табл. 5.11, Рис. 5.24). Установлено, что при длительном

выращивании грибов в этих вариантах учитываемый показатель снижался на протяжении всего времени эксперимента.

Таблица 5.11

Удельная суточная скорость роста (μ) гриба *Helminthosporium sativum*, культивируемого *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов черного кардамона

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации				
		2	4	6	8	10
Корневище и корень	0,05	0,99	0,20	0,10	0,10	0,09
	0,10	0,96	0,20	0,10	0,09	0,09
Псевдостебель	0,05	0,95	0,20	0,10	0,11	0,11
	0,10	0,93	0,20	0,10	0,08	0,08
Семя	0,05	0,92	0,19	0,10	0,08	0,08
	0,10	0,89	0,19	0,10	0,08	0,07
Лист	0,05	0,90	0,20	0,10	0,08	0,08
	0,10	0,88	0,19	0,10	0,08	0,07
Контроль (МС + ДМСО)		1,00	0,20	0,12	0,11	0,11
Контроль (МС)		0,99	0,20	0,12	0,11	0,11

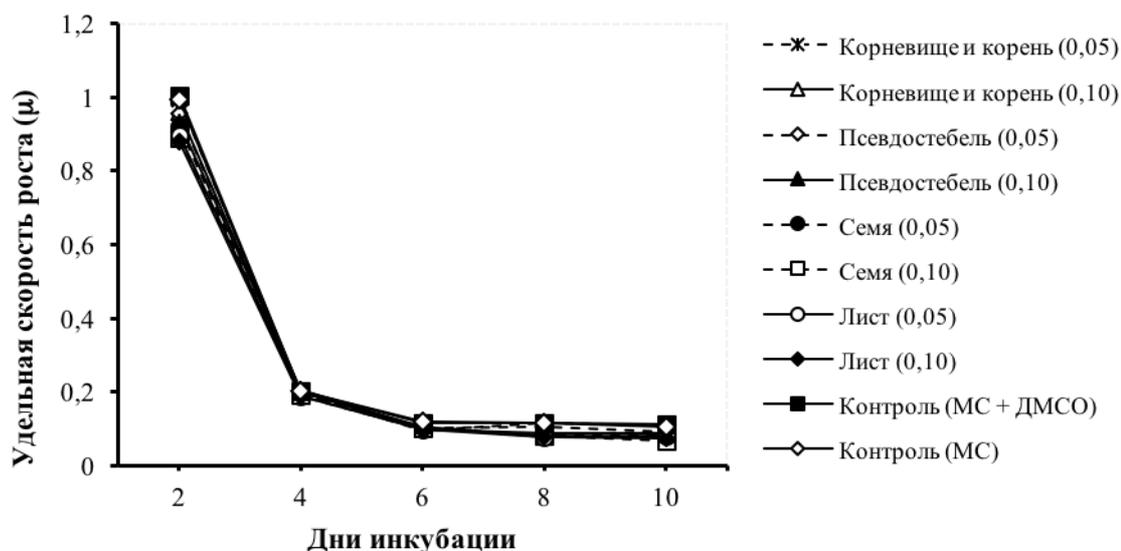


Рис. 5.24. Удельная суточная скорость роста (μ) грибка *H. sativum*, культивируемого *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов черного кардамона

Анализируя литературные источники, следует заключить, что работ по изучению противогрибковой активности экстрактов, полученных из различных частей растений черного кардамона, по отношению к *H. sativum* все еще недостаточно. В доступной для нас литературе удалось найти сообщения только о противогрибковой активности других видов растений в отношении *H. sativum*. Например, Qasem et al. (Qasem, Al-Abed, Abu-Blan, 1995) показали противогрибковую активность экстрактов из сухой биомассы *Inula viscosa* Ait. на *H. sativum*. Эти авторы также сообщили, что *Ranunculus asiaticus* L. ингибирует рост и образование спор *H. sativum* во все периоды инкубации (Qasem, Abu-Blan, 1996); Cosić et al. (Cosić et al., 2010) обнаружили, что масла тимьяна обыкновенного, листья корицы, гвоздики и аниса проявляют хорошую активность в отношении двенадцати фитопатогенных грибов, включая *H. sativum*; Deerika (Deerika, 2020) сообщил, что экстракт листьев *Tridax procumbens* L. обладал противогрибковой активностью в отношении *H. sativum*; Ez-Zriouli и др. (Ez-Zriouli et al., 2020) обнаружили, что эфирное масло *Origanum compactum* Benth. обладало мощной противогрибковой активностью в отношении *H. sativum*.

Наши исследования показали, что исследуемые экстракты черного кардамона по-разному оказывают действие на рост грибов двух видов. Экспериментально доказано, что фунгицидная активность экстрактов зависит от трех факторов: (1) типа экстракта; (2) концентрации экстракта; (3) фитопатогенных видов грибов. Установлено, что экстракты, полученные из семян и листьев, в концентрации 0,10 мг/мл в большинстве обработок показали наилучший противогрибковый эффект по отношению двух изученных видов грибов. Это можно объяснить тем, что в растительных экстрактах, полученных из разных частей одного и того же вида, содержится разный состав вторичных метаболитов, в частности веществ фенольной природы (результаты исследований суммарного содержания фенольных соединений и флаванов будут приведены в разделе 4.3). Данное утверждение было подтверждено не только нашими исследованиями, но и исследованиями других авторов (Talibi et al., 2012). Так,

например, было установлено, что эфирное масло кардамона черного содержит большое количество окисляющих монотерпенов и фенольных соединений (Dung, Bien, Leclercq, 1992), которые в повышенных концентрациях могут проявлять противогрибковую активность. В работах Satyal и соавт. (Satyal, Dosokyb, Kincerb, 2012) показано, что в состав масла *A. subulatum* входят α -пинен, β -пинен, 1,8-цинеол и α -терпинеол, которые и оказывали ингибирующее действие на рост гриба *A. niger*.

Ранние исследования разных авторов противогрибковой активности растительных экстрактов или эфирных масел некоторых видов семейства имбирных также показали противогрибковую активность в отношении *F. oxysporum*. Например, Rahman et al. (Rahman et al., 2000) сообщили, что эфирное масло из плодов двух видов, *Amomum subulatum* и *Elettaria cardamomum*, обладает хорошей противогрибковой активностью в отношении *F. oxysporum* в концентрации 200 мг/мл. Исследование Durrani et al. (Durrani et al., 2014) показали, что смесь этанольных экстрактов двенадцати распространенных специй (включая три вида семейства Zingiberaceae, включая имбирь (*Zingiber officinale*), куркуму (*Curcuma longa*) и кардамон (*Amomum krevanh*)) эффективна против гриба *F. oxysporium*. В отчетах Le et al. (Le et al., 2021) сообщалось, что эфирное масло, экстрагированное из корневищ, листьев и псевдостеблей вида *Amomum rubidum*, в малых концентрациях (50 мг/мл) обладало противогрибковой активностью в отношении *F. oxysporum*. Согласно Dai et al. (Dai et al., 2020) эфирные масла из листьев двух видов *Alpinia globosa* и *Alpinia tonkinensis* также обладали противогрибковой активностью в отношении *F. oxysporum* при концентрации 50 мкг/мл.

Наши исследования показали, что экстракты, полученные из черного кардамона, оказали большее ингибирующее действие на рост гриба *H. sativum*, чем на гриб *F. oxysporum*. Аналогичные результаты были получены Qasem (Qasem, 2011). Установлено, что с возрастом растений противогрибковая активность экстрактов возрастает.

Следует отметить, что изучение активности экстрактов, полученных из разных органов донорных растений черного кардамона, на рост двух видов грибов *F. oxysporum* и *H. sativum* были проведены впервые.

Таким образом, на основании проведенных исследований следует заключить, что экстракты, полученные из различных частей черного 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.

5.1.2 Экстракты, полученные из *Amomum longiligulare*

Fusarium oxysporum

Основные результаты по влиянию растительных экстрактов, полученных из различных частей пурпурного амомума приведены в таблице 5.12 и рисунке 5.25 и 5.26.

Таблица 5.12

Противогрибковое действие экстрактов пурпурного амомума на рост колоний *F. oxysporum* через 7 суток после инкубации при 25 °С

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации *					
		2	3	4	5	6	7
Корневище и корень	0,05	15,2 ± 0,44	28,2 ± 0,60	38,5 ± 0,87	46,1 ± 1,69	55,1 ± 1,35	66,2 ± 1,29 b (8,3)
	0,10	14,8 ± 1,07	26,9 ± 1,02	36,8 ± 1,12	44,1 ± 0,24	52,9 ± 1,20	62,9 ± 1,36 bc (12,9)
Псевдоостебель	0,05	15,7 ± 0,19	28,6 ± 0,41	39,2 ± 0,29	47,0 ± 0,43	56,2 ± 0,64	67,5 ± 0,98 ab (6,5)
	0,10	14,9 ± 0,68	26,0 ± 1,03	35,9 ± 1,17	42,4 ± 1,22	50,2 ± 1,43	59,8 ± 2,60 cd (17,2)
Семя	0,05	13,7 ± 0,19	24,6 ± 0,67	33,6 ± 0,43	39,8 ± 0,47	47,2 ± 0,59	56,2 ± 2,27 def (22,2)
	0,10	13,2 ± 0,64	23,1 ± 0,27	31,2 ± 0,29	37,0 ± 0,40	44,0 ± 2,76	51,6 ± 1,60

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации *					
		2	3	4	5	6	7
							f (28,5)
Лист	0,05	14,1 ± 0,95	24,8 ± 0,54	34,1 ± 0,83	40,6 ± 1,07	48,3 ± 2,09	57,3 ± 2,47 de (20,6)
	0,10	13,4 ± 0,48	23,5 ± 0,34	32,1 ± 0,46	37,9 ± 0,33	45,0 ± 1,08	53,0 ± 1,20 ef (26,6)
Контроль (МС + ДМСО)		15,9 ± 1,17	29,8 ± 0,89	41,5 ± 0,52	50,1 ± 0,82	60,5 ± 0,19	72,2 ± 0,68 a (0,0)
Контроль (МС)		15,5 ± 1,25	28,7 ± 1,12	40,8 ± 0,68	49,2 ± 1,02	59,6 ± 2,67	71,6 ± 1,75 a

* Средние значения (диаметр колоний, мм) ± стандартная ошибка (SE); значения, обозначенные одинаковыми буквами в одном столбце, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана. Значения в скобках – процент ингибирования роста мицелия по сравнению с контролем (МС + 0,03% ДМСО)

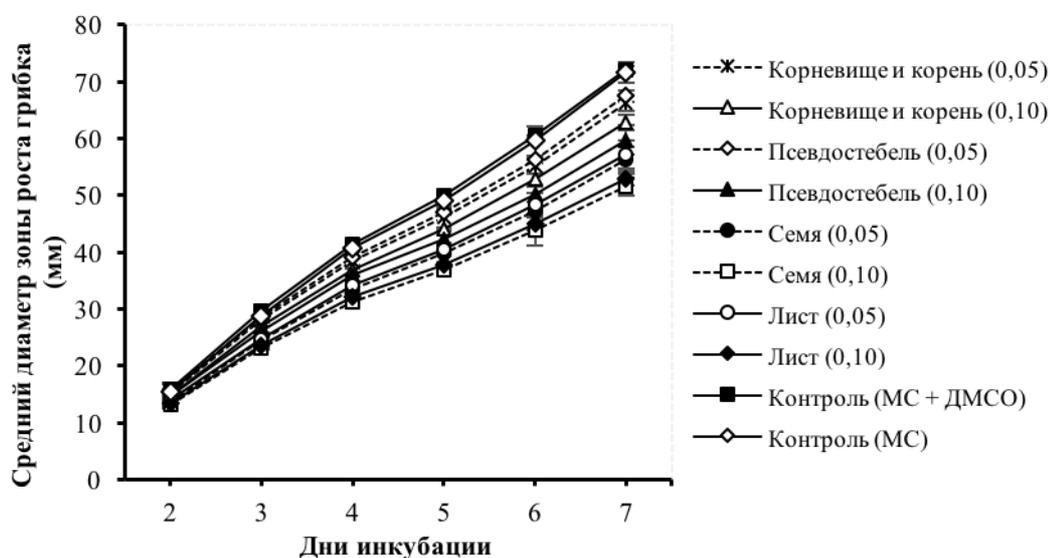


Рис. 5.25. Влияние экстракта пурпурного кардамона (*Atotum longiligulare*) на культуру гриба *Fusarium oxysporum in vitro*

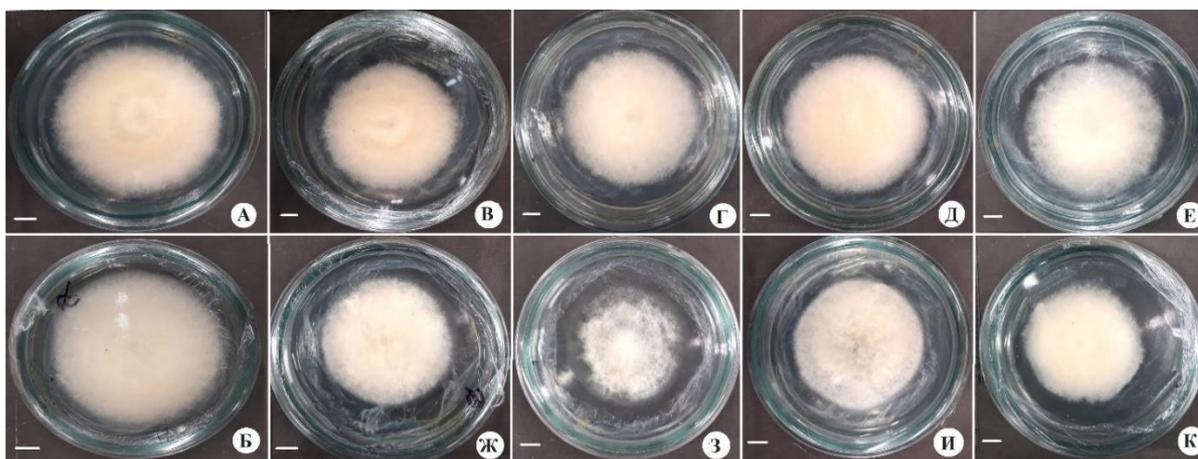


Рис. 5.26. Рост *Fusarium oxysporum* через 7 суток с начала культивирования *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов пурпурного амомума: А – Контроль (МС); Б – Контроль (МС + ДМСО); В – корневище и корень (0,05 мг/мл); Г – корневище и корень (0,10 мг/мл); Д – псевдопобег (0,05 мг/мл); 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 баров = 1 см.

Экспериментально установлено, что экстракты пурпурного амомума вызывали значительное ($p \leq 0,05$) ингибирование роста колоний *F. oxysporum*. Отмечена общая тенденция во всех обработках – с увеличением концентрации экстракта усиливалось его действие по отношению к росту колоний *F. oxysporum*. Эффект экстрактов был очевиден через 7 суток после инкубации. Однако, с другой стороны, изученные экстракты оказали различное противогрибковое действие на рост колоний *F. oxysporum*. В порядке убывания противогрибковой активности изученные экстракты расположились следующим образом: семена, листья, корневище + корень и псевдостебель. Значительный ингибирующий эффект на рост колоний *F. oxysporum* был получен при использовании экстракта семян в концентрации 0,10 мг/мл. При такой обработке наблюдалось снижение роста колоний *F. oxysporum* на 28,5% по сравнению с контролем через 7 суток после инкубации. Кроме того, при этой обработке наблюдался самый низкий показатель суточной скорости роста (μ) гриба *F. oxysporum* (табл. 5.13, рис. 5.27).

Влияние экстрактов, полученных из различных органов пурпурного кардамона, на удельную суточную скорость роста (μ) гриба *F. oxysporum*

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации					
		2	3	4	5	6	7
Корневище и корень	0,05	1,01	0,62	0,31	0,18	0,18	0,18
	0,10	1,00	0,60	0,31	0,18	0,18	0,17
Псевдостеб- ель	0,05	1,03	0,60	0,32	0,18	0,18	0,18
	0,10	1,00	0,56	0,32	0,17	0,17	0,17
Семя	0,05	0,96	0,59	0,31	0,17	0,17	0,17
	0,10	0,94	0,56	0,30	0,17	0,17	0,16
Лист	0,05	0,98	0,56	0,32	0,17	0,17	0,17
	0,10	0,95	0,56	0,31	0,17	0,17	0,16
Контроль (МС + ДМСО)		1,04	0,63	0,33	0,19	0,19	0,18
Контроль (МС)		1,02	0,62	0,35	0,19	0,19	0,18

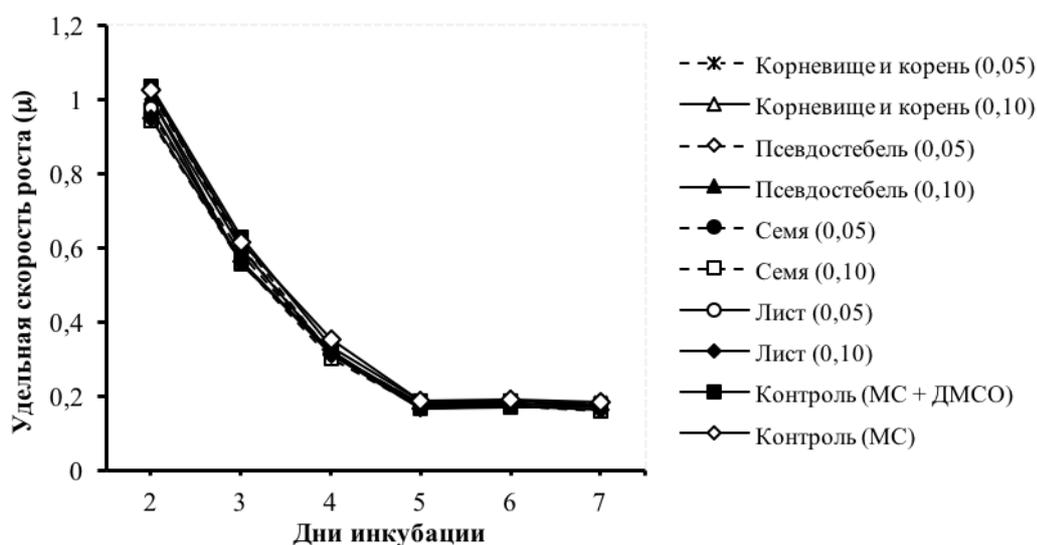


Рис. 5.27. Удельная суточная скорость роста (μ) *Fusarium oxysporum*, культивируемого *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов пурпурного кардамона

Helminthosporium sativum

Было определено противогрибковое действие этанольных экстрактов листьев, семян, псевдостебля, а также корневища и корня пурпурного амомума на рост колоний *H. sativum* (табл. 5.14, рис. 5.28, 5.29). Наблюдали значительное ($p \leq 0,05$) ингибирование роста колоний *H. sativum*, аналогичное тому, что было отмечено и для *F. oxysporum*. Отмечена общая тенденция во всех вариантах обработки - противогрибковое действие изученных экстрактов пурпурного амомума на рост культуры *H. sativum* усиливалось при увеличении концентрации этих экстрактов в среде (Табл. 5.14).

Таблица 5.14

Противогрибковое действие экстрактов пурпурного кардамона на рост колоний *H. sativum* через 10 суток после инкубации

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации *				
		2	4	6	8	10
Корневище и корень	0,05	11,7 ± 0,58	21,5 ± 0,70	26,9 ± 0,99	32,2 ± 0,95	37,6 ± 0,67 b (14,4)
	0,10	11,3 ± 0,49	20,5 ± 1,17	25,8 ± 1,32	30,6 ± 1,17	35,9 ± 0,91 bc (18,2)
Псевдостебель	0,05	11,4 ± 0,54	20,7 ± 0,89	25,1 ± 1,04	29,8 ± 1,06	34,8 ± 0,45 cd (20,7)
	0,10	10,8 ± 0,19	19,4 ± 1,06	23,6 ± 1,25	28,3 ± 1,18	32,9 ± 1,05 de (25,1)
Семя	0,05	10,9 ± 0,37	19,6 ± 0,41	24,1 ± 0,77	28,1 ± 0,79	32,6 ± 0,59 de (25,7)
	0,10	10,3 ± 0,60	18,1 ± 0,98	21,8 ± 0,78	24,9 ± 0,70	28,2 ± 1,09 f (35,8)
Лист	0,05	11,3 ± 0,66	20,1 ± 1,47	25,2 ± 1,15	28,9 ± 1,11	33,5 ± 0,74 cd (23,7)
	0,10	10,7 ± 0,51	19,1 ± 1,24	23,5 ± 1,21	26,8 ± 1,16	30,2 ± 1,34 ef (31,2)
Контроль (МС +		13,1 ± 0,96	24,1 ± 1,89	30,7 ± 1,61	37,0 ± 1,74	43,9 ± 0,92 a (0,0)

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации *				
		2	4	6	8	10
ДМСО)						
Контроль (МС)		12,6 ± 1,23	23,5 ± 1,56	29,6 ± 2,01	36,1 ± 1,86	42,8 ± 1,42 а

* Средние значения (диаметр колоний, мм) ± стандартная ошибка (SE); значения, обозначенные одинаковыми буквами в одном столбце, достоверно не отличаются при $p \leq 0,05$ согласно тесту множественного диапазона Дункана. Значения в скобках – процент ингибирования роста мицелия по сравнению с контролем (MS + 0,03% ДМСО).

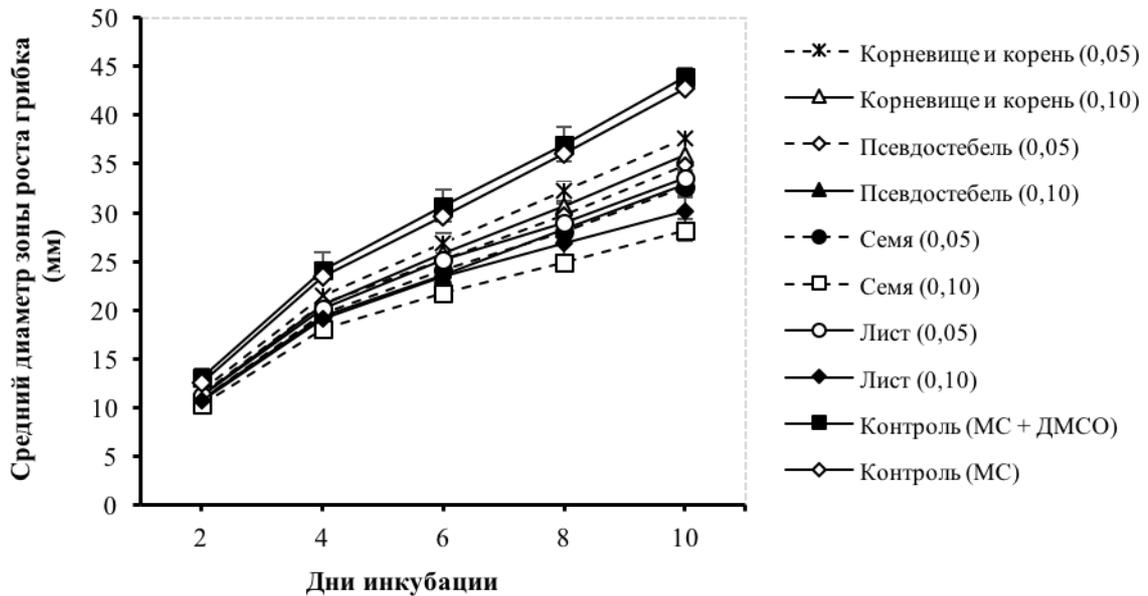


Рис. 5.28. Влияние экстракта пурпурного кардамона на культуру *H. sativum in vitro*

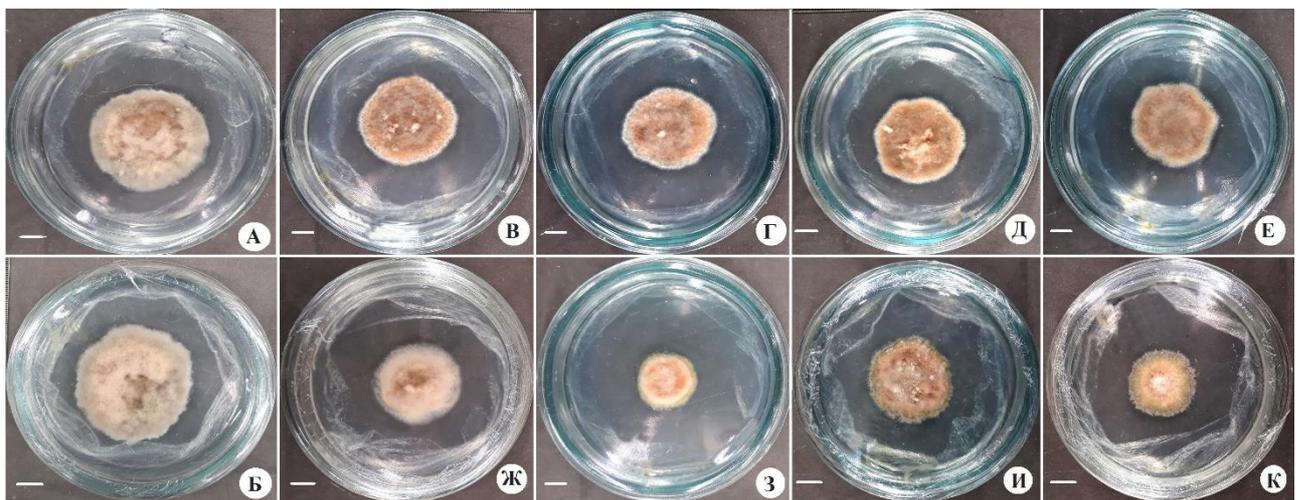


Рис. 5.29. Рост *Helminthosporium sativum* через 10 суток с начала культивирования *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов пурпурного амомуна: А – Контроль (МС); Б – Контроль (МС + ДМСО); В – корневище и корень (0,05 мг/мл); Г – корневище и корень (0,10 мг/мл); Д – псевдопобег (0,05 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 баров = 1 см

Эффект был очевиден через 10 суток после инкубации. В порядке убывания противогрибковой активности изученных экстрактов были семена, листья, псевдостебель и корневище + корень соответственно. Обработка с использованием экстракта семян в концентрации 0,10 мг/мл показала самый высокий ингибирующий эффект на рост грибковых колоний по сравнению с контролем через 10 суток после инкубации (достигнув 35,8%). Кроме того, самый низкий показатель суточной скорости роста (μ) гриба *H. sativum* наблюдался при обработке экстрактами семян и листьев (табл. 5.15, рис. 5.30).

Таблица 5.15

Влияние экстрактов, полученных из различных органов пурпурного кардамона, на удельную суточную скорость роста (μ) гриба *H. Sativum*

Экстракт	Концентрация (мг/мл)	Дни инкубации				
		2	4	6	8	10
Корневище и корень	0,05	0,88	0,30	0,11	0,09	0,08
	0,10	0,87	0,30	0,11	0,09	0,08
Псевдостебель	0,05	0,87	0,30	0,10	0,09	0,08
	0,10	0,84	0,29	0,10	0,09	0,08
Семя	0,05	0,85	0,29	0,10	0,08	0,07
	0,10	0,82	0,28	0,09	0,07	0,06
Лист	0,05	0,87	0,29	0,11	0,07	0,07
	0,10	0,84	0,29	0,10	0,07	0,06
Контроль (МС + ДМСО)		0,94	0,30	0,12	0,09	0,09
Контроль (МС)		0,92	0,31	0,12	0,10	0,09

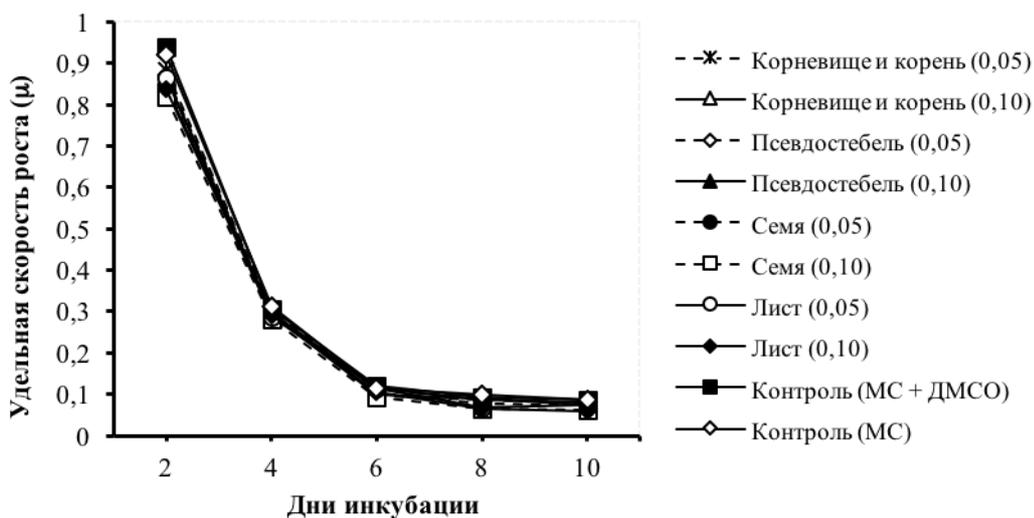


Рис. 5.30. Удельная суточная скорость роста (μ) гриба *H. sativum*, культивируемого *in vitro* на среде МС с добавлением различных экстрактов пурпурного амомума

Результаты исследований показали, что экстракты пурпурного кардамона показали большее ингибирующее действие на рост гриба *H. sativum*, чем на гриб *F. oxysporum*. Этот результат аналогичен результатам исследования черного кардамона, а также результатам Qasem (Qasem, 2011). Эксперименты по изучению фунгицидной активности растительных экстрактов пурпурного кардамона ранее проведены не были. Эти исследования проведены впервые.

С другой стороны, был проведен анализ теста Дункана ($p \leq 0,05$) для результатов изучения противогрибковой активности экстрактов 2 видов (*A. tsao-ko* и *A. longiligulare*) против *Fusarium oxysporum* и *Helminthosporium sativum* (не показано в таблице данных). Результаты анализа свидетельствуют о том, что активность экстрактов, полученных из различных органов против двух видов грибов (*Fusarium oxysporum* и *Helminthosporium sativum*), пурпурного кардамона была выше по сравнению с экстрактами черного кардамона при одинаковых концентрациях и условиях исследования.

Таким образом, на основании проведенных исследований следует заключить, что экстракты, полученные из различных частей пурпурного амомума 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.

5.3 Содержание фенольных соединений в различных экстрактах двух видов *Atomum*

5.3.1 Содержание фенольных соединений в экстрактах *Atomum tsao-ko*

Галловую кислоту использовали в качестве стандарта для определения общего содержания фенольных соединений в экстрактах. Был проведен эксперимент по установлению стандартной кривой между концентрацией галловой кислоты и увеличением значения оптической плотности с помощью реагента Фолина-Чокалтеу. Результаты показали, что существует положительная взаимосвязь между содержанием галловой кислоты и увеличением значения измерения оптической плотности, получаемого при взаимодействии с реагентом Фолина-Чокалтеу, в котором коэффициент определения R^2 составлял 0,9975, а значение $p < 0,001$. При взаимодействии с реагентом Фолина-Чокалтеу эта корреляционная функция использовалась для преобразования увеличения значения оптической плотности, получаемого экстрактами (рис. 5.31).

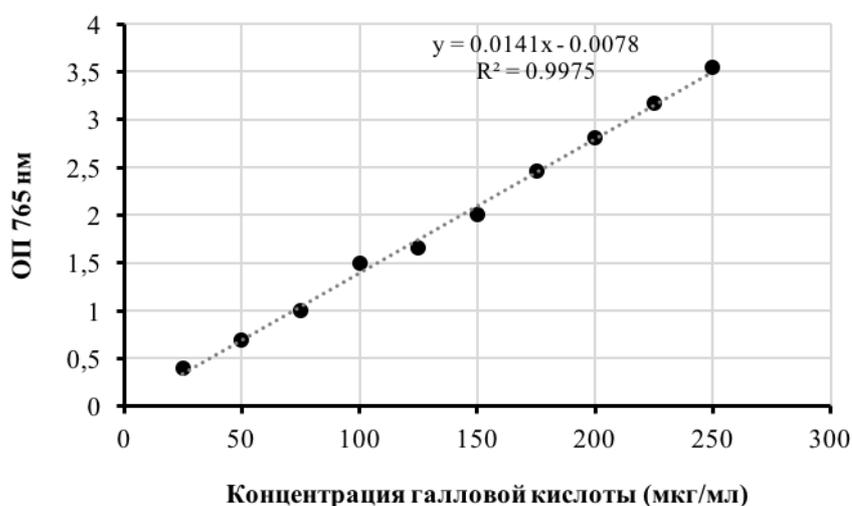


Рис. 5.31. Стандартная кривая между концентрацией галловой кислоты и увеличением значения оптической плотности

Результаты показали, что экстракт, полученный из семян имел самое высокое общее содержание фенольных соединений [(2,91 ± 0,02) мкг GAE/мг], за которым следовали экстракты листьев, псевдостебля, корневища и корня, которые составляли (2,67 ± 0,02) мкг GAE/мг, (1,51 ± 0,01) мкг GAE/мг и (1,21 ± 0,01) мкг GAE/мг соответственно (рис. 5.32).

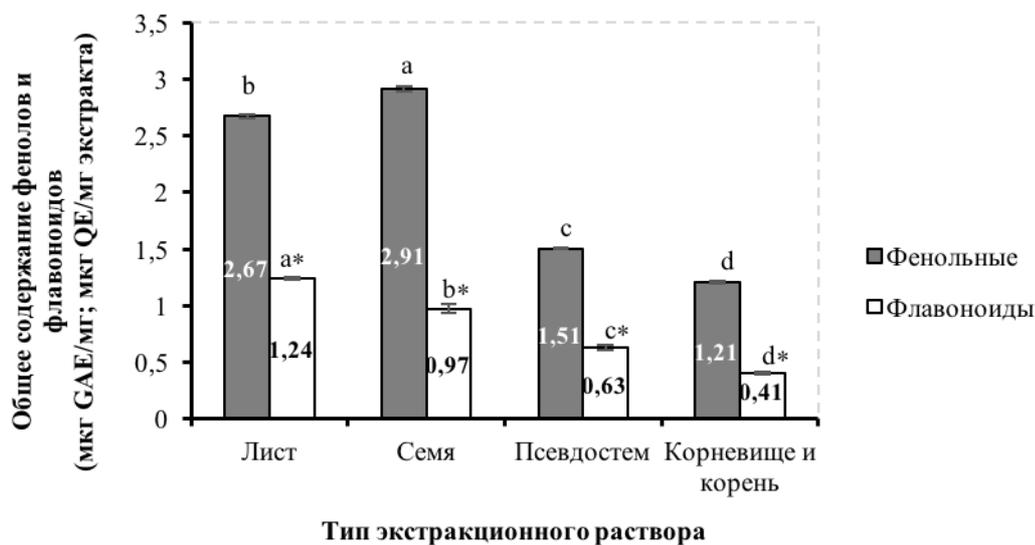


Рис. 5.32. Общее содержание фенольных соединений и флавоноидов в черном кардамоне. (*) указывают на значительное взаимодействие между оцениваемым параметром при уровне вероятности 0,05. Средние значения (общее содержание фенольных соединений или флавоноидов), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана

Общее содержание флавоноидов было указано в эквивалентах кверцетина со ссылкой на стандартную кривую ($Y = 0,0246X - 0,0169$ и $R^2 = 0,9974$) (рис. 5.33). Было обнаружено, что экстракт листьев имел самое высокое содержание флавоноидов, которое составляло [(1,24 ± 0,01) мкг QE/мг], за которым следовали экстракты семян, псевдостебля, корневища и корня, которые составляли (0,97 ± 0,04) мкг QE/мг, (0,63 ± 0,02) мкг QE/мг, и (0,41 ± 0,01) мкг QE/мг соответственно.

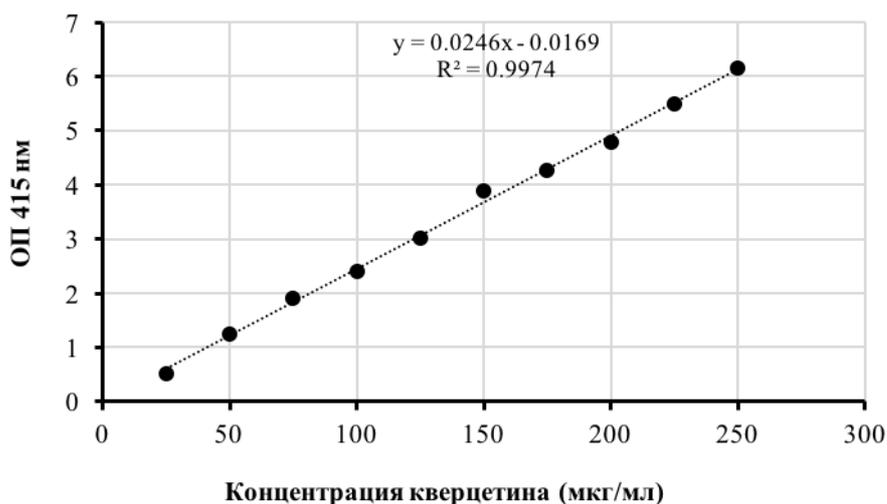


Рис. 5.33. Стандартная кривая между концентрацией кверцетина и увеличением значения оптической плотности

5.3.2 Содержание фенольных соединений в экстрактах *Atomum longiligulare*

Галловую кислоту использовали в качестве стандарта для определения общего содержания фенольных соединений в экстрактах. Был проведен эксперимент по установлению стандартной кривой между концентрацией галловой кислоты и увеличением значения оптической плотности с помощью реагента Фолина-Чокалтеу. Результаты показали, что существует положительная взаимосвязь между содержанием галловой кислоты и увеличением значения измерения оптической плотности, получаемого при взаимодействии с реагентом Фолина-Чокалтеу, в котором коэффициент определения R^2 составлял 0,9975, а значение $p < 0,001$. При взаимодействии с реагентом Фолина-Чокалтеу эта корреляционная функция использовалась для преобразования увеличения значения оптической плотности, получаемого экстрактами (рис. 5.34).

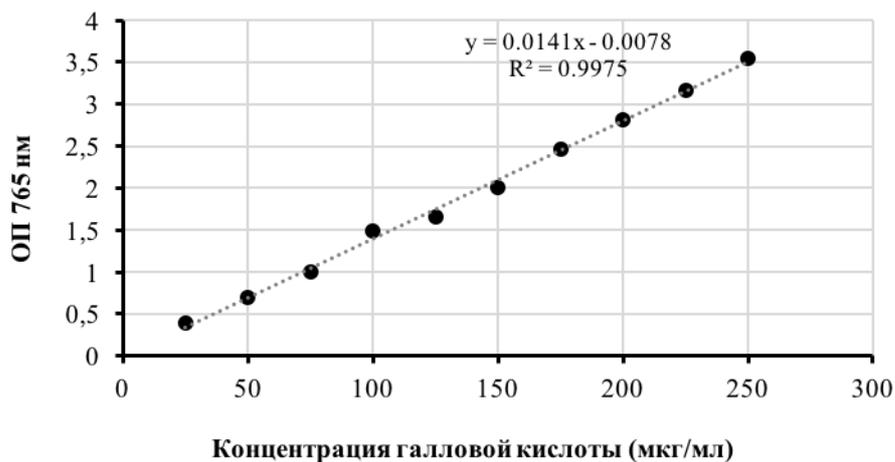


Рис. 5.34. Стандартная кривая между концентрацией галловой кислоты и увеличением значения оптической плотности

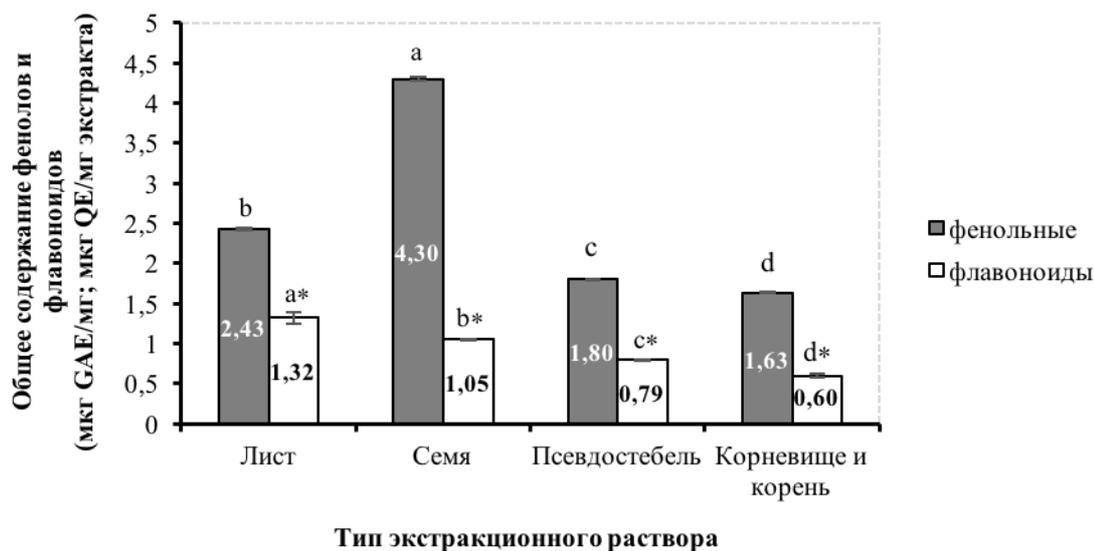


Рис. 5.35. Общее содержание фенольных соединений и флавоноидов в пурпурном кардамоне. (*) указывают на значительное взаимодействие между оцениваемым параметром при уровне вероятности 0,05. Средние значения (общее содержание фенольных соединений или флавоноидов), за которыми следует одна и та же буква, существенно не отличаются при $p \leq 0,05$ в соответствии с тестом множественного диапазона Дункана

Результаты показали, что экстракт семян имел самое высокое общее содержание фенолов [(4,30 ± 0,03) мкг GAE/мг], за которым следовали экстракты листьев, псевдостебля, корневища и корня, которые составляли (2,43 ± 0,02) мкг

GAE/мг, $(1,80 \pm 0,01)$ мкг GAE/мг и $(1,63 \pm 0,01)$ мкг GAE/мг соответственно (рис. 5.35).

Общее содержание флавоноидов было указано в эквивалентах кверцетина со ссылкой на стандартную кривую ($Y = 0,0246X - 0,0169$ и $R^2 = 0,9974$) (рис. 5.36). Было обнаружено, что экстракт листьев имел самое высокое содержание флавоноидов, которое составляло $[(1,32 \pm 0,07)$ мкг QE/мг], за которым следовали экстракты семян, псевдостебля, корневища и корня, которые составляли $(1,05 \pm 0,01)$ мкг QE/мг, $(0,79 \pm 0,01)$ мкг QE/мг, и $(0,60 \pm 0,02)$ мкг QE/мг соответственно (рис. 5.35).

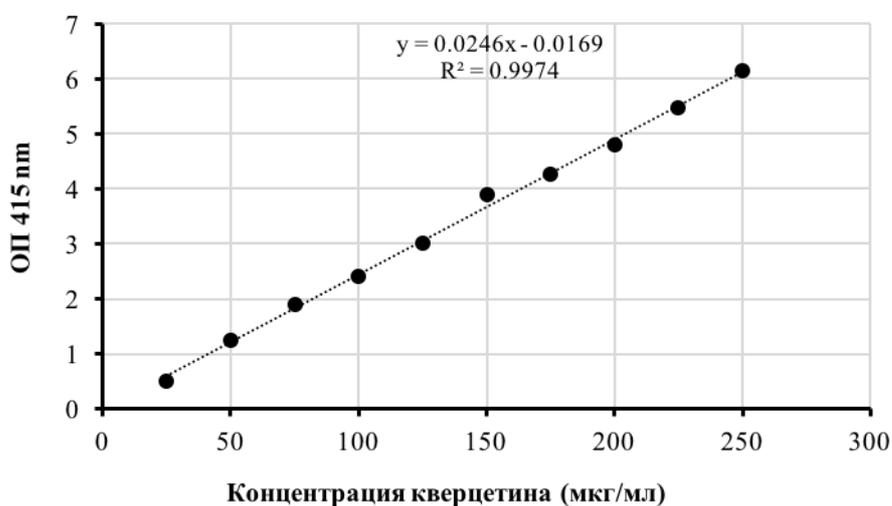


Рис. 5.36. Стандартная кривая между концентрацией кверцетина и увеличением значения оптической плотности

Следует заключить, что в этом исследовании было определено общее содержание фенолов и флавоноидов в этанольных экстрактах черного кардамона и пурпурного кардамона. Хотя результаты показали, что экстракты семян и листьев имели более высокое общее содержание фенолов и флавоноидов, чем два других экстракта, эти концентрации были довольно низкими. Аналогичные результаты были также зарегистрированы в этанольных экстрактах имбиря (*Zingiber officinale* Rosc.) и кардамона (*Elettaria cardamomum* L.) (TPC: 10,8 мг GAE/г и 2,2 мг GAE/г соответственно; TFC: 6,5 мг катехина/г и 1,43 мг катехина/г соответственно) (Przygodzka et al., 2014). Nurcholis и др. (Nurcholis et al., 2021)

определили, что экстракты *Atomum compactum* Sol. ex Maton, других видов рода *Atomum*, также имеют низкое содержание общего количества флавоноидов (экстракт этанола: 0,19 мг QE / г сухого веса; экстракт этилацетата: 2,26 мг QE/г сухой вес). Исследования Amir и соавторов (Amir et al., 2011) показали, что метанольный экстракт корневища имбиря имел низкие значения суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов ($1,45 \pm 0,01$ мг GA/г и $0,84 \pm 0,03$ мг QE/г соответственно). С другой стороны, в некоторых исследованиях по определению суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов, присутствующих в метанольных экстрактах некоторых видов имбиря, были зафиксированы значения от умеренных до высоких. Метанольный экстракт корневища *Atomum nilgircum* VP. У видов Thomas & M. Sabu значение суммарного содержания фенольных соединений составляло 6,96 мг GAE/г (Konappa et al., 2019), экстракт листьев составлял $95,4 \pm 1,19$ мг GAE/г (Konappa et al., 2017). Исследования Sunitha и соавторов (Sunitha, Thoppil, 2017) показали, что метанольный экстракт корневища *Atomum masticatorium* Thwaites имел значение суммарного содержания фенольных соединений $89,54 \pm 4,67$ мг GAE/г и TFC $58,28 \pm 3,32$ мг QE/г.

Анализируя литературные данные следует отметить, что: (1) различные виды и части растений семейства имбирных имеют разные значения суммарного содержания фенольных соединений и флаваноидов; (2) растворитель в метаноле, по-видимому, обеспечивает лучшую эффективность экстракции фенольных соединений и флавоноидов, чем растворитель в этаноле из экстрактов видов семейства имбирных.

Заключение по главе 5

Наши исследования, являются первым отчетом по изучению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов *Atomum tsao-ko* и *Atomum 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 этанольные экстракты различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона обладают аллелопатическим потенциалом для инвазивных видов растений, поскольку было показано, что тестируемые виды растений чувствительны к соединениям, присутствующим в исследуемых экстрактах. Для черного кардамона и пурпурного кардамона исследования такого плана были проведены впервые. Установлено, что изучаемые экстракты проявляют как ингибирующее, так и стимулирующее влияние на прорастание семян. Следует отметить, что ингибирующий эффект экстрактов можно использовать для борьбы с сорняками. Однако для этого необходимо провести дальнейшие исследования, например, со злаковыми культурами. Это может способствовать поиску продуктов, контролируемых инвазивные растения, которые менее токсичны для окружающей среды и здоровья человека.

Наши исследования показали, что экстракты, полученные из различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона можно использовать и в борьбе с фитопатогенами. Установлено, что экстракты, полученные из семян обладали большей фунгицидной активностью по сравнению с другими вариантами экстрактов. Вероятно, это связано с повышенным содержанием в них растворимых фенольных соединений и флаваноидов, которые при определенных концентрациях могут оказывать сильное ингибирующее влияние на рост мицелия грибов.

Полученные результаты могут быть использованы в исследованиях по разработке новых биологически активных препаратов на основе растительных экстрактов *Atomium tsao-ko* и *Atomium longiligulare*, проявляющих высокую биологическую и фунгицидную активность. Это позволит повысить морфофизиологические показатели растений, полученных из семян, и снизить фунгицидную нагрузку на растения и почву.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многоплановых исследований были получены результаты, которые имеют как теоретическое, так и практическое значение. На основании результатов были 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 формировались 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 корня.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 30556-98. Семена эфиромасличных культур. Методы определения всхожести. – Введ. 2000-06-30. – М.: СТАНДАРТИНФОРМ, 2010. – 8 с.
2. Калашникова, Е.А. Основы биотехнологии / Е.А. Калашникова, М.Ю. Чередниченко. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА, – 2016. – 187 с.
3. Калашникова, Е.А. Изучение биологической активности экстрактов полученных из микроклонов лекарственных растений разных таксономических групп в условиях *in vitro* / Е.А. Калашникова, С.М. Зайцева, Т.Т. Доан и др. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. - № 12. – С. 50-58.
4. Калашникова, Е.А. Клеточная инженерия растений: Учебник и практикум – 2-е изд. / Е.А. Калашникова. – М.: Издательство Юрайт, – 2020. – 333 с.
5. Adlinge, P.M. Rapid *in vitro* plant regeneration of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) var. Sarala, an important legume crop / P.M. Adlinge, K.C. Samal, S.R.V. Kumara // Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences. – 2014. – Vol. 84. – P. 823–827.
6. Afolabi, A.S. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds / A.S. Afolabi, O.B. Oyebanji, O. Nweke et al. // Afr. J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8(20). – P. 5395–5399.
7. Agnihotri, S. Antimicrobial activity of essential oil and various extracts of fruits of greater cardamom / S. Agnihotri, S. Wakode // Indian J. Pharmal. Sci. – 2010. Vol. 9. – P. 657–659.
8. Ainsworth, E.A. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent / E.A. Ainsworth, K.M. Gillespie // Nature protocols. – 2007. – Vol. 2(4). – P. 875–877.
9. Alam, A. Comparative study of metabolites and antimicrobial activities of essential oils extracted from three *Atomum subulatum* cultivars / A. Alam, R.S. Majumdar, P. Alam // Asian J. Pharm. Clin. Res. – 2019. – Vol. 12(6). – P. 219–223.

10. Alamgir, M. Effect of pre-sowing treatments on *Albizia procera* (Roxb.) Benth seeds and initials development of seedlings in the nursery / M. Alamgir, M.K. Hossain // J. Forest. Environ. – 2005a. – Vol. 3. – P. 53–60.
11. Alamgir, M. Effect of pre-sowing treatments on germination and initials seedling development of *Albizia saman* in the nursery / M. Alamgir, M.K. Hossain // J. Forest. Res. – 2005b. – Vol. 16(3). – P. 200–204.
12. Amir, M. Phytochemical analysis and *in vitro* antioxidant activity of *Zingiber officinale* / M. Amir, A. Khan, M. Mujeeb et al. // Free Radicals and Antioxidants. – 2011. – Vol. 1(4). – P. 75–81.
13. An, M. Whole-range assessment: A simple method for analysis allelopathic dose-response data / M. An, J.E. Pratley, T. Haig et al. // Nonlinearity in Biology, Toxicology and Medicine. – 2005. – Vol. 3. – P. 245–259.
14. Anh, T.T. Essential oil from *Amomum longiligulare* T.L. Wu cultivated in Ninh Thuan province, Vietnam / T.T. Anh, N.B. Ngoc, N.D. Phuc et al. // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. – 2020. – Vol. 991. – P. 012113.
15. Aref, I.M. Effects of seed pretreatment and seed source on germination of five *Acacia* spp. / I.M. Aref, H. Ali, E. Atta et al. // Afr. J. Biotech. – 2011. – Vol. 10(71). P. 15901–15910.
16. Arowosegbe, S. Assessment of allelopathic properties of *Aloe ferox* Mill. on turnip, beetroot and carrot / S. Arowosegbe, A.J. Afolayan // Biol. Res. – 2012. – Vol. 45. – P. 363–368.
17. Ashrafi, Z.Y. Study of bioassay the allelopathical effect of Neem (*Azadirachta indica*) n-hexane, acetone and water-soluble extracts on six weeds / Z.Y. Ashrafi, S. Sadeghi, H.M. Alizade et al. // OnLine Journal of Biological Sciences. – 2009. – Vol. 1. – P. 71–77.
18. Aslani, F. Allelopathic effect of methanol extracts from *Tinospora tuberculata* on selected crops and rice weeds / F. Aslani, A.S. Juraimi, M.S. Ahmad-Hamdani et al. // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil & Plant Science. – 2014. – Vol. 64(2). – P. 165–177.

19. Azad, M.S. Effect of pre-sowing treatment on seed germination of *Albizia lebbbeck* (L.) Benth. / M.S. Azad, M.W., Islam, M.A. Matin et al. // South Asian J. Agricult. – 2006a. – Vol. 1(2). – P. 32–34.
20. Azad, M.S. Effect of pre-sowing treatment on seed germination of Lohakath (*Xylia kerrii* Craib & Hutch.) / M.S. Azad, M.A. Matin, M.W. Islam et al. // Khulna University Studies. – 2006b. – Vol. 7(2). – P. 33–36.
21. Azad, M.S. Effect of pre-sowing treatments on seed germination of *Melia azedarach* / M.S. Azad, Z.A. Musa, A. Matin // J. Forest. Res. – 2010a. – Vol. 21(2). – P. 193–196.
22. Azad, M.S. Do pre-sowing treatments affect seed germination in *Albizia richardiana* and *Lagerstroemia speciosa* / M.S. Azad, N.K. Paul, M.A. Matin // Frontiers Agricult. in China. – 2010b. – Vol. 4(2). – P. 181–184.
23. Azad, M.S. Effect of different pre-sowing treatments on seed germination percentage and growth performance of *Acacia auriculiformis* / M.S. Azad, M.R. Manik, M.S. Hasan et al. // J. Forest. Res. – 2011. – Vol. 22(2). – P. 183–188.
24. Baradwaj, R.G. Non-deep simple morphophysiological dormancy in seeds of the rare *Alpinia galanga*: a first report for Zingiberaceae / R.G. Baradwaj, M.V. Rao, C.C. Baskin, et al. // Seed Sci. Res. – 2016. – Vol. 26(2). – P. 165–170.
25. Barampuram, S. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds / S. Barampuram, G. Allen, S. Krasnyanski // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2014. – Vol. 118. – P. 179–185.
26. Bari, I.N. Phytotoxic effects of *Cerbera manghas* L. leaf extracts on seedling elongation of four monocot and four dicot test species / I.N. Bari, H. Kato-Noguchi // Acta Agrobotanica. – 2017. – Vol. 70(3). – P. 1720.
27. Batlang, U. Allelopathic activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on growth and nodulation of bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) / U. Batlang, D.D. Shushu // Journal of Agronomy. – 2007. – Vol. 6. – P. 541–547.
28. Bhowmick, T.P. Germination of seeds of larger cardamom / T.P. Bhowmick, S.B. Chattopadhyay // Sci. Cult. – 1960. – Vol. 26. – P. 185–196.

29. Bich, T.T.N. Allelopathic potential of two aquatic plants, duckweed (*Lemna minor* L.) and water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), on terrestrial plant species / T.T.N. Bich, H. Kato-Noguchi // Aquatic botany. – 2012. – Vol. 103. – P. 30–36.
30. Botsheleng, B. Effects of pre-treatments methods on the germination of Pod mahogany (*Afzelia quanzensis*) and mukusi (*Baikiaea plurijuga*) seeds / B. Botsheleng, T. Mathowa, W. Mojeremane // Int. J. Inn. Res. Sci. Eng. Technol. – 2014. – Vol. 3(1). – P. 8108–8113.
31. Bringmann, G. *In vitro* germination and establishment of tissue cultures of *Bulbine caulescens* and of two *Kniphofia* species (Asphodelaceae) / G. Bringmann, T. Noll, H. Rischer // Plant Cell Reports. – 2002. – Vol. 21. – P. 125–129.
32. Chau, L. Constituents of essential oils from *Amomum longiligulare* T.L. Wu from Vietnam / L. Chau, T.D. Thang, L.T. Huong et al. // Chem. Nat. Compd. – 2015. – Vol. 51. – P. 1181.
33. Choi, C.W. *In vitro* anti-inflammatory activity of the components of *Amomum tsao-ko* in murine macrophage raw 2647 cells / C.W. Choi, J.Y. Shin, C. Seo // Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med. – 2018. – Vol. 15. – P. 26–34.
34. Copeland, L.O. Principles of seed science and technology / L.O. Copeland, M.F. McDonald. – Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, – 2012. – 488 p.
35. Cosić, J. *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi / J. Cosić, K. Vrandečić, J. Postić et al. // Poljoprivreda. – 2010. – Vol. 16(2). – P. 25–28.
36. Croft, M. Vacuum Sealing vs. Refrigeration: Which is the most effective way to store seeds? / M. Croft, A. Bicksler, J. Manson et al. // ECHO Asia Notes. – 2012. – Vol. 14. – P. 1–6.
37. Crouch, N.R. *In vitro* culture of *Dianthus zeyheri* subsp. *natalensis*, a South African carnation / N.R. Crouch, J. Van Staden // Plant cell, tissue and organ culture. – 1993. – Vol. 35. – P. 81–85.

38. Dahanayake, N. Application of seed treatments to increase germinability of cardamom (*Elettaria cardamomum*) seeds under *in vitro* conditions / N. Dahanayake // Sabaragamuwa University J. – 2015. – Vol. 14(2). – P. 101–107.
39. Dai, D.N. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oil from the leaves of *Alpinia globosa* and *Alpinia tonkinensis* / D.N. Dai, L.T. Huong, N.H. Hung et al. // Journal of Essential Oil Bearing Plants. – 2020. – Vol. 23(2). – P. 322–330.
40. Dai, M. Anti-*Trichomonas vaginalis* properties of the oil of *Amomum tsao-ko* and its major component, geraniol / M. Dai, C. Peng, F. Peng et al. // Pharm. Biol. – 2016a. – Vol. 54. – P. 445–450.
41. Dai, M. Anti-infectious efficacy of essential oil from Caoguo (*Fructus Tsaoko*) / M. Dai, C. Peng, F. Sun F // J. Tradit. Chin. Med. – 2016b. – Vol. 36. – P. 799–804.
42. Dang, N.P. *In vitro* propagation of *Amomum longiligulare* T.L.Wu. / N.P. Dang, T.T. Nguyen, T.T. Duong et al. // Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 9(4A). – P. 681–688.
43. Dawid, J. Effect of seed treatment and nursery potting media on emergence and seedling growth of korarima (*Aframomum cororima* (Braun) PCM Jansen) / J. Dawid // Int. J. Res. Stud. Sci. Eng. Technol. – 2019. – Vol. 6(12). – P. 20–30.
44. Deepika, C. Antifungal activity of leaf extracts of *Tridax procumbens* against *Helminthosporium sativum* isolated from *Luffa acutangula* / C. Deepika // International journal of innovative research in technology. – 2020. – Vol. 7(2). – P. 272–275.
45. Do, N.V. Study on application of clonal embryonic and artificial seed technology in rapid multiplication of some economically valuable plants / N.V. Do // Summary report on scientific topics KC. – 2005. – Vol. (2005). – P. 247–285.
46. Do, T.H.V. Study on antibacterial properties of *Amomum* seeds / T.H.V. Do, N.T. Le, D.M. Nguyen et al. // Journal of Science, Technology and Food. – 1994. – Vol. 390(12). – P. 466–467.
47. Do, T.L. Vietnamese medicinal plants and herbs / T.L. Do. – Hanoi: Medical Publishing House, – 2005. – 404 p.

48. Do, T.H.V. Study on some non-volatile chemical components and micronutrients of Vietnamese amomum (*Amomum longiligulare* T.L. Wu) / T.H.V. Do // Hanoi University of Science and Technology. – 2001. – P. 35–68.
49. Dukan, S. Reactive oxygen species are partially involved in the bactericidal action of hypochlorous acid / S. Dukan, S. Belkin, D. Touati // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – Vol. 367. – P. 311–316.
50. Dung, N.X. The essential oil of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemarié from Vietnam / N.X. Dung, L.K. Bien, P.A. Leclercq // J. Essential Oil Res. – 1992. – Vol. 4(1). – P. 91–92.
51. Durrani, A.I. The comparative study of antimicrobial activity of four different spices formulations using their essential oil and ethanolic extract / A.I. Durrani, A. Kauser, K. Shahzad et al. // Journal of faculty of Engineering and Technology. – 2014. – Vol. 21(2). – P. 82–92.
52. Ergete, T.W. In Vitro Propagation and Polyploid Induction of Korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen) and Krawan (*Amomum krervanh* Pierre) / T.W. Ergete // Kasetsart University. – 2004. – P. 52–75.
53. Esechie, H.A. Interaction of salinity and temperature on the germination of sorghum / H.A. Esechie // J. Agron. Crop Sci. – 1994. – Vol. 172. – P. 194–199.
54. Eyob, S. Promotion of seed germination, subsequent seedling growth and in vitro propagation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) PCM Jansen) / S. Eyob // J. Med. Plants Res. – 2009. – Vol. 3(9). – P. 652–659.
55. Ez-Zriouli, R. Study of the antifungal activity of *origanum compactum* essential oil against different plant pathogenic fungi / R. Ez-Zriouli, H. El-Yacoubi, A. Oubihi et al. // Plant Archives. – 2020. – Vol. 20(2). – P. 5331–5336.
56. Gagnepain, F. Flore générale de l'Indo-Chine / F. Gagnepain, H. Humbert, H. Lecomte. – Paris: Masson, 1908. – Vol. 6. – P. 1246.
57. Gao, Y. Effect of *Amomum longiligulare* on TFF1 and TFF1 mRNA of gastric mucosa in rats with hep-atogeniculcer / Y. Gao, T. Sun, Y.Q. Xie // Shanxi J. Traditional Chin. Med. – 2016. – Vol. 32. – P. 52–54.

58. Gao, J.R. Studies on the induction of basal stem cluster buds and nodes propagation of *Amomum villosum* Lour. / J.R. Gao, Y. Ren, X. Mai et al. // Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. – 2022. – Vol. 50. – P. 12673.
59. Garg, D. *In vitro* antioxidant activity and phytochemical analysis in extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* stem and leaves / D. Garg, A. Shaikh, A. Muley et al. // Free Radicals and Antioxidants. – 2012. – Vol. 2(3). – P. 41–46.
60. George, E.F. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology / E.F. George. – Westbury, UK: Exegetics limited, – 1993. – 574 p.
61. Gonçalves, S. Phytotoxic properties of *Drosophyllum lusitanicum* leaf extracts and its main compound plumbagin / S. Gonçalves, M. Ferraz, A. Romano // Scientia horticultrae. – 2009. – Vol. 122(1). – P. 96–101.
62. Hai, P.T. Module curriculum for production of non-timber forest products / P.T. Hai. – Hanoi: Information and media publisher, – 2013. – 230 p.
63. Han, C.M. Allelopathic effect of ginger on seed germination and seedling growth of soybean and chive / C.M. Han, K.W. Pan, N. Wu et al. // Scientia horticultrae. – 2008. – Vol. 116(3). – P. 330–336.
64. Hanley, M. Insecticides and arable weeds: effects on germination and seedling growth / M. Hanley, M. Whiting // Ecotoxicology. – 2005. – Vol. 14. – P. 483–490.
65. Hao, Y. Analysis and determination of oestrogen-active compounds in frutus amoni by the combination of highspeed counter-current chromatography and high performance liquid chromatography / Y. Hao, L. Jinpeng, D. Qizhen // Journal of Chromatography B. – 2014. – Vol. 954. – P. 36–42.
66. Hao, B.M. Cultural capital in developing the cardamom market of Dao people in Sapa town, Lao Cai province / B.M. Hao // J. Ethnic. Minorities Res. – 2020. – Vol 9(4).
67. Haq, R.A. Mulberry leaf water extract inhibits bermudagrass and promotes wheat growth / R.A. Haq, M. Hussain, Z.A. Cheema et al. // Weed Biol. Manag. – 2010. – Vol. 10. – P. 234–240.

68. Hartmann, H.T. The biology of propagation by cuttings / H.T. Hartmann, D.E. Kester, F.T. Davies et al. // *Plant Propagation: Principles and Practices*. – 1997. – Vol. 6. – P. 276–328.
69. He, X.F. Amomutsaokols A-K, diarylheptanoids from *Amomum tsao-ko* and their α -glucosidase inhibitory activity / X.F. He, H.M. Wang, C.A. Geng et al. // *Phytochemistry*. – 2020a. – Vol. 177. – P. 112418.
70. He, X.F. Tsaokopyranols A-M, 2,6-epoxydiarylheptanoids from *Amomum tsao-ko* and their α -glucosidase inhibitory activity / X.F. He, X.K. Zhang, C.A. Geng et al. // *J. Chen Bioorg. Chem.* – 2020b. – Vol. 96. – P. 103638.
71. He, X.F. The antidiabetic potency of *Amomum tsao-ko* and its active flavanols, as PTP1B selective and α -glucosidase dual inhibitors / X.F. He, J.J. Chen, X.Y. Huang et al. // *Ind. Crops Prod.* – 2021. – Vol. 160. – P. 112908.
72. Hoat, N.B. Techniques for growing, using, and processing medicinal plants / N.B. Hoat, N.D. Thuan. – Hanoi: Agricultural publisher, – 2005. – 132 p.
73. Hong, H. Tissue culture and plantlet regeneration of *Amomum villosum* / H. Hong, T.L. Na // *Plant physiology communications*. – 2005. – Vol. 1. – P. 57–61.
74. Hong, S.S. Amotsaokonal A–C, benzaldehyde and cycloterpenal from *Amomum tsao-ko* / S.S. Hong, J.H. Lee, Y.H. Choi et al. // *Tetrahedron Lett.* – 2015. – Vol. 56. – P. 6681–6684.
75. Hong, S.S. Monoterpenoids from the fruits of *Amomum tsao-ko* have inhibitory effects on nitric oxide production / S.S. Hong, J.E. Lee, Y.W. Jung et al. // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – P. 257.
76. Hoque, A. Allelopathic effects of different concentration of water extracts of *Eupatorium odoratum* leaf on germination and growth behaviour of six agricultural / A. Hoque, A. Romel, M. Uddin et al. // *Journal of Biological Sciences*. – 2003. – Vol. 3. – P. 741–750.
77. Hung, N. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oils in *Amomum longiligulare* from Vietnam / N. Hung, N.H. Toan // *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. – 2022. – Vol. 183(3). – P. 59–65.

78. Hussain, S.A. Comparative in vitro analysis of anti-diabetic activity of Indo-Pak black cardamom (*Amomum subulatum* Roxb) and Chinese black cardamom (*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire) / S.A. Hussain, A. Hameed, J. Fu et al. // Prog. Nutr. – 2018. – Vol. 20. – P. 403–414.

79. Islam, A.K.M.M. Allelopathic activity of *Litchi chinensis* Sonn / A.K.M.M. Islam, M.S.I. Khan, H. Kato-Noguchi // Acta Agric. Scand. B-S. P. – 2013. – Vol. 63. – P. 669–675.

80. Islam, A.K.M.M. Inhibitory activity of medicinal plant *Hyptis suaveolens*: could allelopathy be a cause? / A.K.M.M. Islam, H. Kato-Noguchi, H. // Emirates J. Food and Agric. – 2013. – Vol. 25. – P. 692–701.

81. Islam, A.K.M.M. Phytotoxic activity of *Ocimum tenuiflorum* extracts on germination and seedling growth of different plant species / A.K.M. Islam, H. Kato-Noguchi // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–8.

82. Jafri, M.A. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb.) / M.A. Jafri, K.J. Farah, S. Singh // Journal of Ethnopharmacology. – 2001. – Vol. 75(2-3). – P. 89-94.

83. Jin, J. Two new compounds and anticomplementary constituents from *Amomum tsao-ko* / J. Jin, Z. Cheng, D. Chen // Nat. Prod. Commun. – 2013. – Vol. 8. – P. 1715–1718.

84. Jin, X.Y. Chemical constituents from *Amomum tsaoko* / X.Y. Jin, X.X. Wang, H. Liu et al. // Chin. Tradit. Pat. Med. – 2022. – Vol. 44. – P. 2539–2542.

85. Jordan, M. *In vitro* regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants / M. Jordan, M. Larrain, A. Tapia et al. // Plant cell, tissue and organ culture. – 2001. – Vol. 66(2). – P. 89–95.

86. Khalloufi, F. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum* / F. Khalloufi, I. El-Ghazali, S. Saqrane et al. // Ecotoxicology and environmental safety. – 2012. – Vol. 79. – P. 199–205.

87. Khanh, T.D. Paddy weed control by medicinal and leguminous plants from Southeast Asia / T.D. Khanh, N.H. Hong, T.D. Xuan et al. // Crop Prot. – 2005. – Vol. 24. – P. 421–431.

88. Khanh, T.D. Weed-suppressing potential of dodder (*Cuscuta hygrophilae*) and its phytotoxic constituents / T.D. Khanh, L.C. Cong, T.D. Xuan et al. // *Weed Science*. –2008. – Vol. 56(1). – P. 119–127.
89. Khatun, M. Additive effect of coconut water with various hormones on in vitro regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) / M. Khatun, P.K. Roy, M.A. Razzak // *J. Anim. Plant Sci.* – 2018. – Vol. 28(2). – P. 589–596.
90. Khuat, V.Q. Plant regeneration of *Amomum tsaoko* Crevost & Lemarié *in vitro* / V.Q. Khuat, R. Kirakosya, E. Kalashnikova et al. // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* – 2021. – Vol. 677(4). – P. 042065.
91. Kikuzaki, H. Abscisic acid related compounds and lignans in prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC) / H. Kikuzaki, S. Kayano, N. Fukutsuka et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52. – P. 344–349.
92. Kim, J.G. Nitric oxide inhibitory constituents from the fruits of *Amomum tsao-ko* / J.G. Kim, T.P.L. Le, H.R. Hong et al. // *Nat. Prod. Sci.* – 2019a. – Vol. 25. – P. 76–80.
93. Kim, J.G. Pyranoflavanones and pyranochalcones from the fruits of *Amomum tsao-ko* / J.G. Kim, H. Jang, T.P.L. Le et al. // *J. Nat. Prod.* – 2019b. – Vol. 82. – P. 1886–1892.
94. Kim, M.S. 2,8-Decadiene-1,10-Diol Inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through inactivation of mitogen-activated protein kinase and Nuclear Factor- κ B signaling pathway / M.S. Kim, E.K. Ahn, S.S. Hong, et al. // *Inflammation*. – 2016. – Vol. 39. – P. 583–591.
95. Kobayashi, K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil / K. Kobayashi // *Weed Biol. Manag.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1–7.
96. Konappa, N.M. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf extracts of *Amomum nilgiricum* (Thomas) (Zingiberaceae) from Western Ghats, India / N.M. Konappa, C.N. Siddaiah, S. Krishnamurthy et al. // *Journal of Biologically Active Products from Nature*. – 2017. – Vol. 7(4). P. 311–330.
97. Konappa, N.M. Phytochemistry and antimicrobial activity of rhizome extracts of *Amomum nilgiricum* from the Western Ghats, India / N.M. Konappa, S.

Krishnamurthy, S. Chowdappa et al. // Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. – 2019. – Vol. 25(2). – P. 141–157.

98. Kordali, S. Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae) / S. Kordali, A. Cakir, T.A. Akcin et al. // Indus. Crops Prod. – 2009. – Vol. 29. – P. 562–570.

99. Lamxay, V. A revision of *Amomum* (Zingiberaceae) in Cambodia, Laos and Vietnam / V. Lamxay, M. Newman // Edinburgh Journal of Botany. – 2012. – Vol. 69(1). – P. 99–206.

100. Le, T.H. Antimicrobial activity of essential oil from the rhizomes of *Amomum rubidum* growing in Vietnam / T.H. Le, T.V. Nguyen, N.S. Ly et al. // Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod. – 2019. – Vol. 7(4). – P. 11–14.

101. Le, T.H. Antimicrobial activity of the essential oils from the leaves and stems of *Amomum rubidum* Lamxay & NS Lý / T.H. Le, T.V. Nguyen, L.N. Sam et al. // Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. – 2021. – Vol. 20(1). – P. 81–89.

102. Lee, K.Y. Inhibitory constituents of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 microglia isolated from *Amomum tsao-ko* / K.Y. Lee, S.H. Kim, S.H. Sung // Planta Med. – 2008. – Vol. 74. – P. 867–869.

103. Lee, S. Bioactive compounds from the seeds of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire, a Chinese spice as inhibitors of sphingosine kinases, SPHK1/2 / S. Lee, J.C. Lee, L. Subedi et al. // RSC Adv. – 2019. – Vol. 9. – P. 33957–33968.

104. Lemos, E. Micropropagation of juvenile and mature *Annona muricata* L. / E. Lemos, J. Blake // Journal of Horticultural Science. – 1996. – Vol. 71(3). – P. 395–403.

105. Li, B. *Amomum tsao-ko* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages via Nrf2-dependent heme oxygenase-1 expression / B. Li, H.J. Choi, D.S. Lee et al. // Am. J. Chin. Med. – 2014. – Vol. 42. – P. 1229–1244.

106. Li, W. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum tsao-ko* cultivated in Yunnan area / W. Li, P.J. Wang, M. Shigematsu et al. // In *Advanced Materials Research*. – 2011. – Vol. 183. – P. 910–914.
107. Lim, T.K. In edible medicinal and non-medicinal plants / T.K. Lim. – Dordrecht, Netherlands: Springer Publ., – 2013. – Vol. 5. – P. 801.
108. Limer, J.L. Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention / J.L. Limer, V. Speirs // *Breast Cancer Research*. – 2004. – Vol. 6. – P. 1–9.
109. Lin, D. Antioxidant activities of different extracts from *Amomum longiligulare* fruits / D. Lin, W. Yong, W. Na et al. // *Journal of Hainan Medical University*. – 2017. – Vol. 23(6). – P. 1–4.
110. Liu H., Q.S. Yan, D.L. Zou, X.L. Bu, B.J. Zhang, X.C. Ma, A.J. Leng, H.L. Zhang, D.W. Li, C. Wang, Identification and bioactivity evaluation of ingredients from the fruits of *Amomum tsaoko crevost et lemaire* / H. Liu, Q.S. Yan, D.L. Zou et al. // *Phytochem. Lett.* – 2018. – Vol. 28. – P. 111–115.
111. Liu, H. Chemical constituents from *Amomum tsao-ko* / H. Liu, M. Wang, Y. Xu et al. // *Chin. Tradit. Pat. Med.* – 2020. – Vol. 42. – P. 2648–2651.
112. Liu, J.P. Separation and Antioxidant Activity of the Chemical Constituents from *Eupatorium Fortuneiturch.* and *Amomum Longiligulare* T.L.Wu / J.P. Liu, Z.Z. Du, Y. Ye // *Food Science and Engineering, Zhejiang Technology and Business University*. – 2013. – Vol. (2013). – P. 1-9.
113. Loi, D.T. Vietnamese medicinal plants and herbs / D.T. Loi. – Hanoi: Medical Publishing House, – 2001. – P. 423–424.
114. Mabberley D.J. *Mabberley's Plant Book* / D.J. Mabberley. – UK: Cambridge University Press, – 2008. – Vol. 3. – 1041 p.
115. Mahdavikia, F. Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. cv. Mitcham) / F. Mahdavikia, M.J. Saharkhiz // *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. – 2015. – Vol. 2(4). – P. 146–153.

116. Martin, T.S. Constituents of *Amomum tsaoko* and their radical scavenging and antioxidant activities / T.S. Martin, H. Kikuzaki, M. Hisamoto et al. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 77. – P. 667–673.
117. Miranda-Arámbula, M. Phytotoxic activity of aqueous extracts of ruderal plants and its potential application to tomato crop / M. Miranda-Arámbula, R. Reyes-Chilpa, A.L. Anaya // *Botanical Sciences.* – 2021. – Vol. 99(3). – P. 487–498.
118. Missanjo, E. Effects of different pretreatments to the seed on seedling emergence and growth of *Acacia polyacantha* / E. Missanjo, A. Chioza, C. Kulapani // *Int. J. Forest. Res.* – 2014. – Vol. (2014). – P. 1–6.
119. Moi, L.D. Essential – oil plant resources in Vietnam / L.D. Moi. – Hanoi: Agricultural publisher, – 2002. – Vol. 2. – 120 p.
120. Moon S.S. Isotsaokoin, an antifungal agent from *Amomum tsao-ko* / S.S. Moon, J.Y. Lee, S.C. Cho // *J. Nat. Prod.* – 2004. – Vol. 67. – P. 889–891.
121. Moon, S.S. Tsaokoarylone, a cytotoxic diarylheptanoid from *Amomum tsao-ko* fruits / S.S. Moon, S.C. Cho, J.Y. Lee // *Bull. Kor. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 26. – P. 447–450.
122. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
123. Murch S.J. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. cv'Anthos') / S.J. Murch, K.L. Choffe, J.M.R. Victor et al. // *Plant Cell Reports.* – 2000. – Vol. 19(6). – P. 576–581.
124. Nakagarwara, S. Spectroscopic characterisation and the pH dependence of bacterial activity of the aqueous chlorine solution / S. Nakagarwara, T. Goto, M. Nara et al. // *Anal. Sci.* – 1998. – Vol. 14. – P. 691–698.
125. Nguyen, D.M. Study of chemical composition of *Amomum longiligulare* T.L. Wu seeds / D.M. Nguyen, V.T. Ngo, T.H.V. Do et al. // *Journal of Science, Technology and Food.* – 1994. – Vol. 390(12). – P. 464–465.

126. Nguyen, Q.B. *Amomum* is Medicinal and Poisonous Plants. In Plant Resources of South-East Asia / Q.B. Nguyen, L.S. Padua, N. Bunyaprapatsara, R.H.M.J. Lemmens. – Leiden, Netherlands: Backhuys Publ., 1999. – Vol. 12. – P. 113.
127. Nguyen, Q.B. Checklist of plant species of Vietnam / N.Q. Binh. – Hanoi: Agriculture Publishing House, – 2005. – Vol. 3. – P. 487–509.
128. Nguyen, Q.B. Flora of Vietnam / N.Q. Binh. — Hanoi: Publishing House of Natural Science and Technology, – 2017. – Vol. 21. – P. 127– 169.
129. Nguyen, T.C. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Amomum glabrum* S.Q.Tong (Zingiberaceae) from Vietnam / T.C. Nguyen, T.H. Le, M.H. Tran et al. // Invest. Med. Chem. Pharmacol. – 2020. – Vol. 3(2). – P. 44–47.
130. Nishida N. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. / Nishida N., Tamotsu S, Nagata N, Saito C, Sakai A. // J Chem Ecol. – 2005. – 31:1187–1203.
131. Nurcholis, W. Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts from accessions of *Amomum compactum* fruits / W. Nurcholis, D.N.S.B. Putri, H. Husnawati et al. // Annals of Agricultural Sciences. – 2021. – Vol. 66(1). – P. 58–62.
132. Padilla, I. *In vitro* germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) seeds / I. Padilla, C. Encina // Scientia Horticulturae. – 2003. – Vol. 97(3–4). – P. 219–227.
133. Peng, J.M. A survey of the research on *Amomum tsao-ko* in recent years / J.M. Peng, J. Ma, L.X. Zhang // Chin. Tradit. Pat. Med. – 2006. – Vol. 28. – P. 1036–1038.
134. Pham, H. H. An illustrated flora of Vietnam / P.H. Ho. – Hochiminh: Young Publishing House, – 2000. – Vol. 2. – P. 383–386.
135. Ping, J.L. Micropropagation of *Amomum villosum* Lour. / J.L. Ping // Subtropical Plant Science. – 2004. – Vol. 33. – P. 37–38.
136. Poonpaiboonpipat T. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) /

T. Poonpaiboonpipat, U. Pangnakorn, U. Suvunnamek et al. // *Ind. Crops Prod.* – 2013. – Vol. 41. – P. 403–407.

137. Poudel, K. Micropropagation and Acclimatization of Large Cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) / K. Poudel, H.K. Prasai, J. Shrestha // *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences.* – 2018. – Vol. 5(3). – P. 231–235.

138. Pradhan, S. *In vitro* micropropagation of *Amomum subulatum* (Zingiberaceae), a major traditional cash crop of Sikkim Himalaya / S. Pradhan, S. Pradhan, B.C. Basistha, et al. // *Int. J. Life Sci. Biotech. Pharma Res.* – 2014. – Vol. 3(2). – P. 169–180.

139. Przygodzka, M. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices / M. Przygodzka, D. Zielińska, Z. Ciesarová et al. // *LWT-Food Science and Technology.* – 2014. – Vol. 58(2). – P. 321–326.

140. Pu, Z.H. A review on quality control, toxicity and clinical application of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié / Z.H. Pu, B.S. Wang, S.Y. Zhang et al. // *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine.* – 2022. – Vol. (2022). – P. 100165.

141. Pukclai, P. Evaluation of allelopathic potential of *Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep. / P. Pukclai, H. Kato-Noguchi // *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences.* – 2013. – Vol. 13(3). – P. 343–347.

142. Purohit, S. Micropropagation and genetic fidelity analysis in *Amomum subulatum* Roxb.: a commercially important Himalayan plant. / S. Purohit, S.K. Nandi, S. Paul et al. // *J. Appl. Res. Med. Arom. Plants.* – 2017. – Vol. 4. – P. 21–26.

143. Qasem, J.R. Antifungal activity of clammy inula (*Inula viscosa*) on *Helminthosporium sativum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici / J.R. Qasem, A.S. Al-Abed, H.A. Abu-Blan // *Phytopathologia Mediterranea.* – 1995. – Vol. (1995). – P. 7–14.

144. Qasem, J.R. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi / J.R. Qasem, H.A. Aau-Blan // *Journal of phytopathology.* – 1996. – Vol. 144(3). – P. 157–161.

145. Qasem, J.R. Fungitoxic properties of scarlet pimpernel (*Anagallis arvensis*) against *Helminthosporium sativum* and *Fusarium oxysporum* / J.R. Qasem // *Allelopathy Journal*. – 2011. – Vol. 28(2). – P. 251–258.
146. Qiu, S. Pharmacological comparison between volatile oil and water extract / S. Qiu, D. Shou, L. Chen et al. // *China Journal of Chinese Materia Medica*. – 1999. – Vol. 24(5). – P. 297-299.
147. Radhamani, J. Structural changes associated with dormancy breaking treatments in cardamom / J. Radhamani, S.K. Malik, KP.S. Chandel // *Ind. J. Plant Gen. Res.* – 1991. – Vol. 4(2). – P. 27–33.
148. Rahman A.U. Antifungal activities and essential oil constituents of some spices from Pakistan / A.U. Rahman, M. Choudhary, A. Farooq et al. // *Jour. Chem. Soc. Pak.* – 2000. – Vol. 22(1). – P. 60–65.
149. Rahman, M.R.T. Anti-quorum sensing and anti-biofilm activity of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemarie on foodborne pathogens / M.R.T. Rahman, Z. Lou, F. Yu et al. // *Saudi. J. Biol. Sci.* – 2017. – Vol. 24. – P. 324–330.
150. Randhawa, M.A. Allelopathic effect of sorghum water extract on germination and seedling growth of *Trianthema portulacastrum* / M.A. Randhawa, Z.A. Cheema, M.A. Ali // *International Journal of Agriculture and Biology*. – 2002. – Vol. 4. – P. 383–384.
151. Rao, M. *In vitro* Culture of *Amomum longiligulare* T.L. Wu. / M. Rao, Z. Wenli, W. Fanhua et al. // *Chinese journal of tropical agriculture*. – 2003. – Vol. 4. – P. 1–4.
152. Rao, M. Tissue culture of *Amomum krervanh* / M. Rao, Z. Wenli, W. Fanhua et al. // *Plant physiology communications*. – 2004. – Vol. 2. – P. 208–211.
153. Reghunath B.R. *In vitro* studies on the propagation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) / B.R. Reghunath // *Kerala Agricultural Univ, Trichur*. – 1989. – Vol. 189.
154. Reghunath, B.R. High-Tech and Micropropagation / B.R. Reghunath, Y.P.S. Bajaj. – Berlin, Heidelberg: Springer, – 1992. – Vol. 3. – P. 175–198.

155. Rita de Cássia da Silveira e Sá. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes / Rita de Cássia da Silveira e Sá, Luciana Nalone Andrade, Damião Pergentino de Sousa // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – P. 1227–1254.
156. Rivai, R.R. Germination and breaking seed dormancy of *Alpinia malaccensis* / R.R. Rivai, F.F. Wardani, M.G. Devi // *Nusantara Biosci.* – 2015. – Vol. 7(2). – P. 67–72.
157. Sabulal, N. Chemistry of *Amomum* essential oils / N. Sabulal, S. Baby // *J. Essential Oil. Res.* – 2021. – Vol. 33(5). – P. 427–441.
158. Sadhu, S. High efficiency plant regeneration and genetic fidelity of regenerants by SCoT and ISSR markers in chickpea (*Cicer arietinum* L.) / S. Sadhu, P. Jogam, R.K. Thampu // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2020. – Vol. 141. – P. 465–477.
159. Saharkhiz, M.J. Essential oil analysis and phytotoxic activity of two ecotypes of *Zataria multiflora* Boiss. growing in Iran / M.J. Saharkhiz, S. Esmaeili, M. Merikhi // *Nat. Prod. Res.* – 2010. – 24(17). – P. 1598–1609.
160. Sajina, A. Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb) / A. Sajina, M.P. Mini, Z.C. John et al. // *Journal of Spices and Aromatic Crops*. – 1997. – Vol. 6(2). – P. 145–148.
161. Satyal, P. Chemical compositions and biological activities of *Amomum subulatum* essential oils from Nepal. / P. Satyal, N.S. Dosokyb, B.L. Kincerb et al. // *Nat. Prod. Commun.* – 2012. – Vol. 7(9). – P. 1233–1236.
162. Scott, S.J. Review of data analysis methods for seed germination 1 / S.J. Scott, R.A. Jones, W. Williams // *Crop. Sci.* – 1984. – Vol. 24. – P. 1192–1199.
163. Seid, H. Enhancement of seed germination and seedling growth of cardamom (*Elleteria cardamomum*) at Tepi south-western part of Ethiopia / H. Seid, T. Mulualem, G. Shiferaw et al. // *Acad. Res. J. Agri. Sci. Res.* – 2019. – Vol. 7(6). – P. 303–306.
164. Sim, S. *Amomum tsao-ko*-chinese black cardamom: detailed oil composition and comparison with two other cardamom species / S. Sim, S.K. Tan, B. Kohlenberg et al. // *Nat. Prod. Commun.* – 2019. – Vol. 14. – P. 1–12.

165. Singh, P. Efficacy of essential oil of *Amomum subulatum* as a novel aflatoxin B1 suppressor / P. Singh, B. Srivastava, A. Kumar et al. // J. Herbs Spices Med. Plants. –2008. – Vol. 14(3-4). – P. 208–218.
166. Singh, H.P. Phytotoxic effects of *Parthenium hysterophorus* residues on three *Brassica species* / H.P. Singh, D.R. Batish, J.K. Pandher et al. // Weed Biology and Management. – 2005. – Vol. 5(3). – P. 105–109.
167. Sinitha, K. Evaluation of antioxidant, anti-inflammation and chemical composition of methanolic extract of *Amomum masticatorium* Thwaites (Zingiberaceae) / K. Sinitha, J.E. Thoppil // Int. J. Pharmacogn. – 2017. – Vol. 4(12). – P. 413–418.
168. Smith, R.H. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments / R.H. Smith. – New Delhi: Elsevier Publishers, – 2005. – Vol. 2. – 231 p.
169. Song, Q.S. Chemical Ecology of Several Tropical Plants / Q.S. Song. – Kunming Institute of Botany: Chinese Academy of Sciences, – 2003. – P. 28.
170. Srinivasa Rao, N.K. Regeneration of plantlets from callus of *Elettaria cardamomum* Maton / N.K. Srinivasa Rao, S. Narayanaswamy, E.K. Chacko et al. // Proceedings: Plant Sciences. – 1982. – Vol. 91(1). – P. 37–41.
171. Sun, W.M. Effects of essential oils from Zingiberaceae plants on root-rot disease of *Panax notoginseng* / W.M. Sun, Y.N. Ma, Y.J. Yin et al. // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – P. 1021.
172. Talibi, I. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot / I. Talibi, L. Askarne, H. Boubaker et al. // Crop Prot. – 2012. – Vol. 35. – P. 41–46.
173. Tangjitjaroenkun, J. Chemical compositions of essential oils of *Amomum verum* and *Cinnamomum parthenoxylon* and their in vitro biological properties / J. Tangjitjaroenkun, R. Tangchitcharoenkhul, W. Yahayo et al. // J. Herbmed. Pharmacol. – 2020. – Vol. 9(3). – P. 223–231.
174. Tefera, T. Allelopathic effects of *Parthenium hysterophorus* extracts on seed germination and seedling growth of *Eragrostis tef*. / T. Tefera // J. Agron. Crop. Sci. – 2002. – Vol. 188. – P. 306–310.

175. Tefera, W. Micropropagation of Krawan (*Amomum krervanh* Pierre ex Gagnep) / W. Tefera, S Wannakrairoj // Science Asia. – 2004. – Vol. 30. – P. 9–15.
176. Thom, C.T. Techniques for growing some medicinal plants / C.T. Thom, P.T. Lai, N.T. To. – Hanoi: Labor Publishing House, – 2006. –178 p.
177. Trenkenshu, R.P. Calculation of the specific growth rate of microalgae / R.P. Trenkenshu // Marine Biological Journal. – 2019. – Vol. 4(1). – P. 100–108.
178. Truong, T.B.P. *In vitro* propagation of *Amomum* sp. in A Luoi district, Thua Thien Hue province / T.B.P. Truong, T.B.K. Than, D.T. Nguyen et al. // Hue University Journal of Science Natural Science. – 2017. – Vol. 126(1D). – P. 37–52.
179. Turk, M.A. Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.) / M.A. Turk, A.M. Tawaha // Crop Prot. – 2003. – Vol. 22. – P. 673–677.
180. Uniyal, P.L. *In vitro* germination and seedling development of *Dalzellia zeylanica* (Gardner) Wight (Podostemaceae) / P.L. Uniyal, H.M. Ram // Aquatic botany. – 1996. – Vol. 54(1). – P. 59–71.
181. Venkatachalam, P. Influence of plant growth regulators (PGRs) and various additives on in vitro plant propagation of *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild: A recalcitrant bamboo species / P. Venkatachalam, K. Kalaiarasi, S. Sreeramanan // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2015. – Vol. 13(2). – P. 193–200.
182. Verdeguer, M. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriosephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops / M. Verdeguer, M.A. Blaizquez, H. Boira // Biochem. Syst. Ecol. – 2009. – Vol. 37. – P. 362–369.
183. Verma, S.K. Greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) - A cardio-adaptogen against physical stress / S.K. Verma, V. Rajeevan, A. Bordia et al. // Journal of Herbal Medicine and Toxicology. – 2010. – Vol. 4(2). – P. 55–58.
184. Verma, S.K. Phytotoxic effects of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) extracts on germination and seedling growth of commercial crop plants / S.K. Verma, S.

Kumar, V. Pandey et al. // European Journal of Experimental Biology. – 2012. – Vol. 2(6). – P. 2310–2316.

185. Wang, W. Phenolic constituents from the fruits of *Amomum tsao-ko* (Zingiberaceae) / W. Wang, C.R. Yang, Y.J. Zhang // Acta Botanica Yunnanica. – 2009. – Vol. 31. – P. 284–288.

186. Wang, Y. Chemical constituents and insecticidal activities of the essential oil from *Amomum tsao-ko* against two stored-product insects. / Y. Wang, C.X. You, C.F. Wang et al. // J. Oleo. Sci. – 2014. – Vol. 63. – P. 1019–1026.

187. Wlodkowski, T.J. Mutagenicity of sodium hypochlorite for *Salmonella typhimurium* / T.J. Wlodkowski, H.S. Rosenkranz // Mutat. Res. – 1975. – Vol. 31. – P. 39–42.

188. Wu, M.H. Identification of seven Zingiberaceous species based on comparative anatomy of microscopic characteristics of seeds / M.H. Wu, W. Zhang, P. Guo et al. // Chinese Medicine. – 2014. – Vol. 9(1). – P. 1–7.

189. Wu, T.L. Flora of China / T.L. Wu, K. Larsen, P.H. Raven. – Beijing: Science Press and St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000. – Vol. 24. – P. 322 p.

190. Xuan, T.D. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica*. A. Juss) to crops and weeds / T.D. Xuan, E. Tsuzuki, T. Hiroyuki et al. // Crop protection. – 2004. – Vol. 23(4). – P. 335–345.

191. Yang, J. *In vitro* plant regeneration from cotyledon explants of *Swainsona salsula* Taubert / J. Yang, Z. Hu, G.Q. Guo et al. // Plant cell, tissue and organ culture. – 2001. – Vol. 66(1). – P. 35–39.

192. Yang X. Bicyclononane aldehydes and antiproliferative constituents from *Amomum tsao-ko* / X. Yang, P. Küenzi, I. Plitzko et al. // Planta Med. – 2009. – Vol. 75. – P. 543–546.

193. Yang, Y. Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko* / Y. Yang, Y. Yue, Y. Runwei et al. // Bioresour Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 4205–4211.

194. Yang, S. *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié: a comprehensive review on traditional uses, botany, phytochemistry, and pharmacology / S. Yang, Y. Xue, D. Chen et al. // *Phytochemistry Reviews*. – 2022. – Vol. (2022). – P. 1–35.
195. Yang, Y. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko* / Y. Yang, R.W. Yan, X.Q. Cai et al. // *J. Sci. Food Agric.* – 2008. – Vol. 88. – P. 2111–2116.
196. Yanze, L. *Dietary Chinese Herbs* / L. Yanze, W. Zhimin, Z. Jungzeng. – Verlag Wien: Springer, – 2015. – Vol. 1. – P. 293–300.
197. Yong, J. Progress of chemical components and biological activities of fructus amomi / J. Yong, C. Lu, Y. Xiao et al. // *Archives of Biotechnology and Biomedicine*. – 2020. – Vol. 4(1). – P. 1–4.
198. Yu, L. Effect of lipid extracted from Tsao-ko (*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire) on digestive enzyme activity, antioxidant activity, plasma and liver lipids, and blood glucose levels of mice / L. Yu, N. Shirai, H. Suzuki et al. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2008. – Vol. 54. – P. 378–383.
199. Yu, L., The effect of methanol extracts of tsao-ko (*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire) on digestive enzyme and antioxidant activity in vitro, and plasma lipids and glucose and liver lipids in mice / L. Yu, N. Shirai, H. Suzuki, et al. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. – 2010. – Vol. 56. – P. 171–176.
200. Zhang, T.T. Bioactivity evaluation of ingredients identified from the fruits of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire, a Chinese spice / T.T. Zhang, C.L. Lu, J.G. Jiang // *Food Funct.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1747–1754.
201. Zhang, T.T. Antioxidant and anti-tumour evaluation of compounds identified from fruit of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire / T.T. Zhang, C.L. Lu, J.G. Jiang // *J. Funct. Foods*. – 2015. – Vol. 18. – P. 423.
202. Zhang, T.T. Neuroprotective and antiinflammatory effects of diphenylheptanes from the fruits of *Amomum tsao-ko*, a Chinese spice / T.T. Zhang, C.L. Lu, J.G. Jiang // *Plant Foods Hum. Nutr.* – 2016. – Vol. 71. – P. 450–453.

203. Zhao, J. Antioxidative and antinitrosative effects of volatile oil from *A. longiligulare* T.L. Wu. on ulcerative colitis mice / J. Zhao, Y. Zhu, Z. Dong // Chin. Traditional Patent. Medi. – 2009. – Vol. 31. – P. 1334–1338.

204. Zhou, R. Preparation of *Amomum longiligulare* polysaccharides 1-PLGA nanoparticle and its immune enhancement ability on RAW264.7 cells / R. Zhou, L. Teng, Y. Zhu et al. // International Immunopharmacology. – 2021. – Vol. 99. – P. 108053.

205. Zhu, Y. Characterizations of glucose-rich polysaccharides from *Amomum longiligulare* T.L. Wu. fruits and their effects on immunogenicities of infectious bursal disease virus VP2 protein / Y. Zhu, X. Wang, C. Zhang et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 183. – P. 1574–1584.