

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕЗ *ATOMUM TSAO-KO CREVOST & LEMARIE* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

К.В. Кухат

аспирант, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия);
преподаватель, факультет биологии и сельского хозяйства,
Ханойский педагогический университет (г. Ханой, Республика Вьетнам)
E-mail: khuatquyetst@gmail.com

Х.Т. Нгуен

к.б.н., доцент кафедры биотехнологии растений,
Вьетнамский национальный аграрный университет (г. Ханой, Республика Вьетнам)
E-mail: nthaicnsh@vnua.edu.vn

Е.А. Калашникова

д.б.н., профессор, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: kalash0407@mail.ru

Р.Н. Киракосян

к.б.н., доцент, кафедра биотехнологии,
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева (Москва, Россия)
E-mail: mia41291@mail.ru

Актуальность. Перспективным направлением исследований в области биотехнологии является изучение *in vitro* эндемичных растений, используемых в народной медицине. К таким растениям относятся черный кардамон (*Atomum tsao-ko Crevost & Lemarie*). Экстракты и эфирное масло этого лекарственного растения применяют при лечении респираторных заболеваний, они обладают антимикробным действием, а также ингибируют развитие раковых клеток человека. Основной способ размножения *A. tsao-ko* – семенной и вегетативный. Однако эти способы имеют как преимущества, так и недостатки. Поэтому необходимо разрабатывать технологию быстрого размножения данной культуры *in vitro*.

Цель исследования – изучение *A. tsao-ko Crevost & Lemarie* в культуре *in vitro*.

Материал и методы. Объект исследования – семена *A. tsao-ko*, собранные в кардамоновом лесу в деревне Sin Cau (22° 23'04,5" N 103° 32'44,0" в.д.), коммуна Giang Ma, район Tam Duong, провинция Lai Chau, Северо-Западный регион Вьетнама. Семена поверхностно стерилизовали 0,1%-ным раствором сулемы в течение 10 мин, затем проводили скарификацию, после чего семена культивировали на питательной среде, содержащей различные концентрации минеральных солей по прописи Мурасига и Скуга (МС). На этапе размножения изучали влияние БАП (0,5–4 мг/л) и кинетана (0,5–2 мг/л) в сочетании с НУК (0,5–1 мг/л) на пролиферацию побегов и образование адвентивных почек. На конечном этапе клонального микро размножения исследовали влияние НУК и ИМК (0,25–1 мг/л) на укоренение микропобегов *A. tsao-ko*.

Результаты. Установлено, что скарификация приводит к повышению всхожести семян на 12% по сравнению с контрольным вариантом. Культивирование изолированных эксплантов на питательной среде, содержащей 1/16 нормы минеральных солей по МС, БАП 4 мг/л и НУК 0,5 мг/л способствовало получению самых высоких показателей по количеству адвентивных побегов, их росту и количеству корней из расчета на один эксплант. Наилучший результат по укоренению микропобегов получен на среде, содержащей 0,5 мг/л ИМК.

Ключевые слова: черный кардамон, морфогенез, клональное микро размножение, *in vitro*, лекарственные растения.

Для цитирования: Кухат К.В., Нгуен Х.Т., Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. Экспериментальный морфогенез *Atomum tsao-ko Crevost & Lemarie* в культуре *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(7):48–59. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-07-08>

В современном мире наметилась острая необходимость в поиске новых лекарственных препаратов, действие которых направлено на борьбу с трудно излечимыми болезнями. Перспективным направлением в этой области является изучение

редких и эндемичных растений, используемых в народной медицине, природные ресурсы которых находятся на грани исчезновения.

В настоящее время большой интерес представляют растения рода *Atomum* Roxb. (семейство

Zingiberaceae Lindl.), насчитывающего от 150 до 188 видов растений [1], из которых 21 вид зарегистрирован во Вьетнаме [2]. Родовое название впервые было предложено Линнеем в 1753 г., но, как объяснили Бергт и Смит (1968 г.), ни один из видов, выделенных Линнеем, на сегодняшний день не входит в состав рода *Amomum*. В настоящее время используется название *Amomum* Roxb. В 1810 г. именно Роксбург определил *Amomum* по его лабеллуме, пыльнику и плодам.

Особого внимания заслуживает *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie – один из 188 видов *Amomum*. Он был открыт Crevost & Lemarie в 1917 г., распространен в Китае, Лаосе и Вьетнаме [1]. Во Вьетнаме это растение известно как «Кардамон» или «Do-ho» и широко распространено в провинциях Ha Giang, Lao Cai и Lai Chau. *A. tsao-ko* состоит в классе однодольных и является многолетним травянистым растением. Это один из ценных недревесных продуктов леса и важное лекарственное растение с прекрасным экспортным потенциалом в торговле лекарственными травами. В традиционной медицине семена *A. tsao-ko* используют как лекарство при респираторных заболеваниях, миалгии, неврозах, ревматизме и каменной болезнью в почках, а также применяют от болей и вздутия в животе, икоты, рвоты, диареи, малярии, кариеся и др. [3–5].

Согласно Li Wei et al. [6], эфирное масло *A. tsao-ko* обладает противомикробным (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus* и *Escherichia coli*) и противогрибковым (*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus sp.* и *Penicillium sp.*) действием. Кроме того, экстракт сухофруктов *A. tsao-ko* оказывает ингибирующее действие на рост клеток рака шейки матки Hela, опухолевых клеток печени HepG-2 и SMMC-7721 и клеток рака легкого A549 [7]. Все эти исследования еще раз подтверждают ценность данного растения.

Основные способы размножения *A. tsao-ko* – семенной и вегетативный (корневищами) [8]. 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, эти методы имеют ограничения и не отвечают потребностям производства. Решить данную проблему можно путем выращивания элитных сортов, полученных клональным микроразмножением *in vitro*.

В мире проводят исследования по размножению *in vitro* некоторых видов рода *Amomum*, таких как *A. longiligulare* [9], *A. krekevanh* [10] и *A. subulatum* [11–13]. Однако во Вьетнаме исследования такого плана малочисленны. Как правило, исследования проводятся на растениях *A. longiligulare* [14], а вид *A. tsao-ko* совсем не изучен в культуре *in vitro*.

Ц е л ь р а б о т ы – изучить в культуре *in vitro* морфогенетический потенциал *A. tsao-ko* и установить оптимальные режимы выращивания на разных этапах клонального микроразмножения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Объектом исследования служили семена кардамона вида *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie. Созревшие семенные коробочки кардамона (*A. tsao-ko*) были собраны в октябре 2020 г. в кардамоновом лесу в деревне Sin Cau (22° 23'04,5" N 103° 32'44,0" в.д.), коммуна Giang Ma, район Tam Duong, провинция Lai Chau, Северо-Западный регион Вьетнама. Коробочки вскрывали и высушивали на открытом солнце в течение трех суток. Затем из коробочек извлекали семена, помещали в сухие пластиковые пакеты и в дальнейшем транспортировали в Российскую Федерацию на кафедру биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, где их хранили при температуре (27–28 °С) в эксикаторе в течение 24 ч.

Ботаническая идентификация вида *A. tsao-ko* Crevost & Lemarie проведена доктором Н.М. Там. Одна часть семян была перевезена в Россию, другая – депонирована в гербарный отдел (факультет ботаники), Ханойского педагогического университета (Республика Вьетнам).

Методы исследования. Семена кардамона замачивали в теплой воде в течение 8 ч перед поверхностной стерилизацией. После этого семена промывали под проточной водой комнатной температуры в течение 1 ч, затем обрабатывали жидким мылом 10 мин, после чего промывали вновь проточной водой. На следующем этапе семена помещали в марлевые мешочки и переносили в ламинар-бокс, где в течение 30 с проводили поверхностную стерилизацию 70%-ным этанолом с по-

следующим погружением в 0,1%-ный (масс/об.) водный раствор хлорида ртути ($HgCl_2$) или в 5%-ный и 10%-ный, (масс/об.) растворы гипохлорита кальция на 5, 10 или 15 мин. 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) [15].

В связи с тем, что семенная оболочка у черного кардамона очень плотная, перед посевом на питательную среду семена подвергали механической скарификации – с помощью скальпеля делали разрез семенной оболочки 1–1,5 мм на противоположном участке от места прикрепления семени. Контролем служили семена без механической скарификации. После этого семена переносили на пять вариантов сред для проращивания: 1 норма, 1/2 нормы, 1/4 нормы и 1/16 нормы минеральных солей по прописи МС. Также семена помещали на дистиллированную воду (контроль). Перед автоклавированием рН питательных сред доводили до 5,6–5,8 с помощью 1 н. NaOH. Чтобы предотвратить риск потери культур из-за заражения, в один культуральный сосуд помещали только одно семя. Каждый эксперимент проводили в трех аналитических и 25 биологических повторностях.

Семена считались проросшими, когда через покровы появлялись здоровые проростки. Визуальные наблюдения проводили через 30 суток с начала культивирования, каждые 10 дней до 90 суток.

Определяли следующие параметры:

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

$GP = (\text{проросшие семена} / \text{общее количество протестированных семян}) \times 100\%$;

среднее время прорастания (GMT), дано в соответствии со Scott et al. [16], вычисляется как

$$GMT = \sum T_k N_k / S,$$

где T_k – число суток от начала эксперимента; N_k – количество проросших семян за сутки; S – общее количество проросших семян;

индекс скорости прорастания (GRI), рассчитывали для каждой обработки с использованием следующего уравнения:

$$GRI = (G1/1) + (G2/2) + \dots + (Gi/i),$$

где G – на какие сутки наблюдается начало прорастания 1, 2, ..., i соответствует дню прорастания [17].

С полученных из семян проростков высотой 2–3 см изолировали верхушки побегов, которые в дальнейшем использовали в экспериментах по

изучению их морфогенетического потенциала в качестве первичного эксплантата. Верхушки побегов культивировали на твердой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи МС, а также различные гормоны ауксинового и цитокининово типа действия. Среду дополняли из класса ауксинов – α -нафталинуксусной кислотой (НУК) (Merck, Германия) в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л или 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) (Merck, Германия) в концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л. Из класса цитокининов использовали 6-бензиламинопуридин (БАП) (Merck, Германия) в концентрациях 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, число адвентивных побегов (шт.).

Для укоренения использовали микропобеги длиной 4–4,5 см, имеющие 4–6 листьев. Микропобеги культивировали на твердой агаризованной питательной среде МС с добавлением различных ауксинов – индол-3-масляной кислоты (ИМК) (Merck, Германия) или НУК в концентрациях 0; 0,25; 0,50; 0,75 и 1,00 мг/л. Учет результатов проводили через 8 недель с начала культивирования по следующим показателям: количество укоренившихся микропобегов (%), число корней на одном растении (шт.) и длина корней (мм).

В дальнейшем укорененные микропобеги высотой 4,0–5,0 см с 3–4 листьями переносили в почвенный субстрат для адаптации. Для этого с колбы, в которой были сформированы микроклоны, снимали крышку и оставляли в таком положении на двое суток. После этого микроклоны извлекали из питательной среды, тщательно промывали корневую систему проточной водопроводной водой и затем обрабатывали 0,5%-ным раствором Бавистина в течение 10 мин. Последняя операция необходима для предотвращения грибкового заражения. Далее микроклоны переносили 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. Выживаемость микроклонов учитывали через 1 и 3 мес. после пересадки в условия *ex vitro*.

Во всех экспериментах *in vitro* использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, а также 0,8% агара и 3% сахара. Перед автоклавированием рН доводили до 5,6–5,8 с помощью 1 н. NaOH. 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. Все работы проводили в соответствии с методическими рекомендациями, разработанными на кафедре биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева [18].

Средние значения полученных данных рассчитывали с использованием Microsoft office Excel 2010. Дисперсионный анализ (ANOVA) выполняли с использованием Sirichai Statistics 7.0, а средние значения сравнивали с использованием LSD с уровнем вероятности 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе клонального микроразмножения необходимо получить хорошо растущую стерильную культуру, чего можно достичь путем применения стерилизующих веществ, позволяющих освободить первичные экспланты от внешней инфекции. Для этого применяют различные стерилизующие вещества, например, ртуть- и хлорсодержащие препараты. Наиболее эффективные стерилизующие агенты – это сулема (гипохлорид ртути $HgCl_2$) в концентрации 0,1% и гипохлорит кальция $Ca(ClO)_2$ в концентрации 5–10% [19]. Для *A. tsao-ko* 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.

Для получения стерильной культуры семян *A. tsao-ko* применяли два стерилизатора ($HgCl_2$, $Ca(ClO)_2$). Очень плотная оболочка семян кардамона, вероятно, является основной причиной низкой всхожести семян. Одним из способов повышения посевных качеств семян является применение скарификации – механическое повреждение семенной оболочки.

В исследовании скарификация была применена после стерилизации семян. Контролем служил вариант, где использовали семена без механической обработки (табл. 1).

Результаты исследований показали, что получение стерильной культуры зависит от применяемого стерилизатора и его временной экспозиции воздействия на семена. Установлены общие закономерности: 1) с увеличением концентрации стерилизующего вещества и временной экспозиции повышается эффективность получения асептических семян; 2) применение скарификации повышает всхожесть семян и получение асептических проростков; 3) хлорид ртути $HgCl_2$ оказывает более сильное действие на ингибирование развития внешней инфекции семян по сравнению с гипохлоритом кальция $Ca(ClO)_2$. Экспериментально установлено, что наилучший результат по получению асептических семян и проростков был отмечен в варианте с применением 0,1%-ного раствора хлорида ртути и обработки семян в течение 10 мин. Максимальный выход стерильных семян в этом варианте составил 52,39%, а число проросших семян – 6,94%. В случае использования гипохлорита кальция все учитываемые показатели были существенно ниже на 0,05% уровне значимости.

Разный стерилизующий эффект хлорида ртути и гипохлорита кальция можно объяснить различной активностью действующего вещества. Кроме того, семена черного кардамона имеют некоторые особенности в строении (рис. 1). Например, поверхность семян кардамона имеет неровности, в углублениях которых могут скапливаться микроорганизмы, а присеменник (ариллус) во время работы трудно полностью удалить с семян, поэтому его остатки могут быть источником развития микроорганизмов, что и приводит к заражению семян.

Известно, что эффективность прорастания семян зависит не только от применяемых стерилизующих веществ и их временной экспозиции воздействия на эксплант, но и от состава питательной среды. Для *A. tsao-ko* эксперименты по культивированию семян *in vitro* ранее никем не проводились. Поэтому в следующей серии экспериментов изучали влияние минерального состава питательной среды на прорастание семян и формирование нормальных по морфологии проростков. За основу были взяты минеральные соли по прописи МС в разных концентрациях. Семена после стерилизации и скарификации культивировали на пяти вариантах питательных сред: 1 МС, 1/2 МС, 1/4 МС, 1/16 МС. Контролем служила стерильная дистиллированная вода. Наблюдения проводили в течение 90 суток. Основные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 1. Влияние стерилизующих агентов на получение асептической культуры семян кардамона (*A. tsao-ko*) через 90 суток после посева

Вариант опыта	Стерилизатор	Концентрация w/v, %	Время воздействия, мин	Стерильные семена, %, среднее ± SE*	Зараженные семена, %, среднее ± SE*	Проросшие семена, %, среднее ± SE*
Контроль	Ca(ClO) ₂	5	5	2,78±1,39 ^{f.g}	97,22±1,39 ^b	0,00±0,00 ^b
			10	5,56±1,38 ^{e.f}	94,44±1,38 ^{b.c}	0,00±0,00 ^b
			15	11,11±3,67 ^{d.e}	88,89±3,67 ^{c.d}	2,17±0,00 ^a
	Ca(ClO) ₂	10	5	6,94±1,38 ^{e.f}	93,06±1,38 ^{b.c}	2,78±1,39 ^a
			10	15,28±1,39 ^{e.d}	84,72±1,39 ^{d.e}	2,17±2,40 ^a
			15	19,44±3,67 ^c	80,56±3,67 ^{d.e}	2,78±1,39 ^a
	HgCl ₂	0,1	5	19,03±2,40 ^c	80,97±2,40 ^e	2,57±0,55 ^a
			10	48,40±5,01 ^a	51,60±5,01 ^g	3,64±1,39 ^a
			15	50,50±2,40 ^a	49,50±2,40 ^g	3,46±1,39 ^a
Скарификация	Ca(ClO) ₂	5	5	2,34±1,39 ^{f.g}	97,66±1,39 ^b	0,00±0,00 ^b
			10	5,00±1,38 ^{e.f}	95,00±1,38 ^{b.c}	0,00±0,00 ^b
			15	13,13±3,67 ^{d.e}	86,87±3,67 ^{c.d}	2,17±0,00 ^a
	Ca(ClO) ₂	10	5	7,00±1,38 ^{e.f}	93,00±1,38 ^{b.c}	4,78±1,39 ^a
			10	17,45±1,39 ^{e.d}	82,55±1,39 ^{d.e}	4,17±2,40 ^a
			15	21,06±3,67 ^c	78,94±3,67 ^{d.e}	3,78±1,39 ^a
	HgCl ₂	0,1	5	20,83±2,40 ^c	79,17±2,40 ^e	4,17±0,00 ^a
			10	52,39±5,01^a	47,61±5,01^g	6,94±1,39^a
			15	51,58±2,40 ^a	48,42±2,40 ^g	5,56±1,39 ^a
LSD _{0,05}	–			6,23	6,96	1,29

Примечание: * – преобразовано с использованием арксинуса перед анализом; в каждом столбце разные строчные буквы означают значительное отличие друг от друга при $p = 0,05$.

Таблица 2. Влияние скарификации и условий культивирования на всхожесть семян кардамона (*A. tsao-ko*) in vitro через 90 суток после посева

Вариант среды	Вариант обработки	GP, %± SE	GMT, сутки ± SE	GRI, среднее значение ± SE
1 MC	Контроль	5,33±1,33 ^e	86,67±3,33 ^a	0,0153±0,0035 ^e
	Скарификация	6,67±1,33 ^{d.e}	75,00±2,89 ^b	0,0226±0,0050 ^e
1/2 MC	Контроль	9,33±1,33 ^{c.d}	65,56±0,55 ^c	0,0357±0,0048 ^{d.e}
	Скарификация	12,00±2,31 ^c	58,33±1,67 ^d	0,0525±0,0116 ^d
1/4 MC	Контроль	13,33±1,33 ^c	60,00±1,92 ^{c.d}	0,0562±0,0059 ^d
	Скарификация	18,67±1,33 ^b	57,17±0,60 ^d	0,0825±0,0063 ^c
1/16 MC	Контроль	21,33±1,33 ^b	47,11±2,56 ^e	0,1161±0,0124 ^b
	Скарификация	33,33±1,33^a	43,98±0,23^e	0,1917±0,0067^a
Вода	Контроль	20,00±2,31 ^b	46,72±0,43 ^c	0,1089±0,0131 ^b
	Скарификация	22,33±1,33 ^b	45,13±2,22 ^c	0,1167±0,0178 ^b
LSD _{0,05}	–	4,17	5,72	0,02

Примечание: MC – Murashige и Skoog (1962); 1/2 MC, 1/4 MC и 1/16 MC – минеральные соли по MC, разбавленные до концентраций 1/2, 1/4 и 1/16; GP – процент всхожести; преобразовано с помощью преобразования арксинуса перед анализом; GMT – среднее время прорастания; GRI – индекс всхожести. В каждом столбце разные строчные буквы означают, что они значительно отличаются друг от друга при $p = 0,05$.

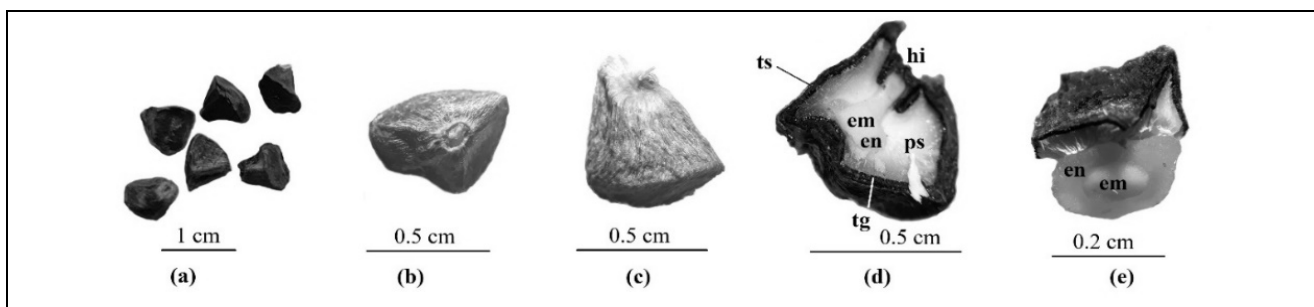


Рис. 1. Семена черного кардамона: (a,b) – морфологические характеристики семян; (c) – семя, покрытое эпидермисом; (d,e) – анатомическая характеристика семян под стереомикроскопом: ts – эпидермальные клетки семенников, tg – покровный слой, hi – рубчик семени, ps – перисперм, ep – эндосперм, em – зародыш

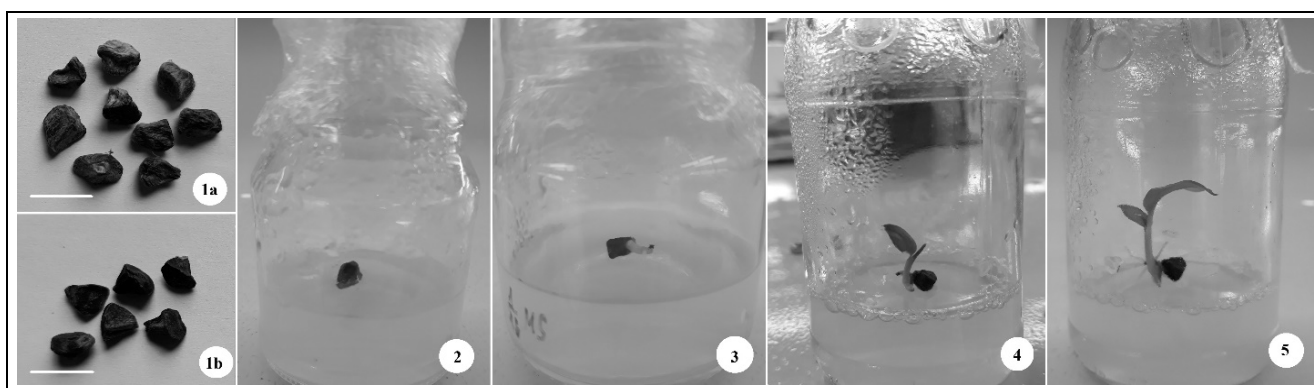


Рис. 2. Протокол прорастания семян кардамона (*A. tsao-ko*) *in vitro*: 1a – высушенные семена с пленчатыми кожухами; 1b – высушенные семена полностью удалены из плодов; 2 – семена инокулировали в среду 1/16 МС после их дезинфекции и скарификации; 3 – начало прорастания семян через 50 суток от начала инокуляции; 4 – проросток, через 70 суток после инокуляции семян; 5 – проросток, через 90 суток после инокуляции семян. Масштабные линейки = 1 см

На основании полученных результатов установлено, что от состава питательной среды зависит эффективность прорастания семян черного кардамона *in vitro*. Показано, что при использовании питательной среды с полным набором минеральных солей по прописи МС, все учитываемые показатели, такие как процент прорастания (GP), время прорастания (GMT) и индекс скорости прорастания (GRI), были самыми низкими. Лучшие результаты получены на питательной среде, содержащей 1/16 нормы минеральных солей по прописи МС. В этом варианте всхожесть семян составила в контрольном варианте 21,33%, а в варианте с применением скарификации семян – 33,33%. Кроме того, прорастание семян наблюдали через 47,11 суток для необработанных (контрольных) семян и через 43,98 суток для скарифицированных семян. Также для этого варианта зарегистрирован самый высокий индекс скорости прорастания – 0,1917 для скарифицированных семян, а для контрольного варианта этот показатель составил 0,1161. Что касается варианта с применением в качестве питательной среды дистиллированной во-

ды, то в этих условиях выращивания учитываемые показатели были существенно ниже наилучшего варианта (1/16 МС), но выше по отношению к другим исследуемым вариантам. В целом результаты исследования показали, что питательные среды с низким содержанием минеральных солей оказывают существенное влияние на прорастание семян кардамона *in vitro* (рис. 2).

Таким образом, в результате многоплановых исследований предложен протокол получения асептических семян, а также проростков, которые были использованы в следующих экспериментах.

Успех клонального микроразмножения зависит от правильного выбора состава питательной среды, в частности гормонального баланса. Основными гормонами, регулирующими 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 [20]. На основании литературных данных установлено,

что наиболее часто при клонировании различных видов кардамона применяют в качестве цитокинина БАП, в качестве ауксина – НУК, а для каллусогенеза – 2,4-Д. Поэтому на втором этапе данные

регуляторы роста были исследованы. В качестве первичного экспланта использовали верхушечную часть проростков и культивировали на разных вариантах сред в течение 7 недель (табл. 3).

Таблица 3. Влияние различных регуляторов роста на микроразмножение черного кардамона (*A. tsao-ko*) in vitro

Регуляторы роста растений (концентрация, мг/л)			Среднее количество побегов, шт., среднее ± SE	Средняя длина выстрела, см, среднее ± SE	Среднее количество корней, шт., среднее ± SE	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 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00 ^c
1,0	0,0	1,0	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	83,33 ^a
1,0	0,0	2,0	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	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
LSD _{0.05}			0,87	0,45	1,15	10,42

Примечание: разные строчные буквы в каждом столбце означают значительное отличие друг от друга при $p = 0,05$. Данные регистрировали для каждого экспланта после 7 недель культивирования.

На основании проведенных исследований установлено, что различные морфогенетические реакции первичных эксплантов зависят от сочетания регуляторов роста в питательной среде. Например, 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 базальной части главного побега, наблюдали формирование мощных адвентивных побегов с темно-зелеными листьями, а также образование множества корней с корневыми волосками (рис. 3г).

На следующем месте по эффективности был вариант среды МС, содержащей БАП 4,0 мг/л и НУК 1,0 мг/л. В этом варианте среднее количество побегов на один эксплант составило 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±0,06 см и среднее количество корней – 2,67±0,22 шт. Полученные данные полностью подтверждают наши ранние исследования, проведенные с корневищами черного кардамона (*A. tsao-ko*) [21]. Аналогичные результаты по клональному микроразмножению были получены и другими авторами при работе с *A. subulatum* [22, 23], *A. longiligulare* [24] и *E. cardamomum* [25].

Известно, что существует еще один способ размножения растений *in vitro* – это получение растений-регенерантов из первичной и пересадочной каллусной ткани. Например, в 1989 г. Reghunath [25] 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 в сочетании 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 2,4-Д (1–2 мг/л) в сочетании с цитокинином БАП (1 мг/л) приводило к формированию рыхлой каллусной ткани белого

цвета (рис. 3,о-р). Однако последующее культивирование каллуса на индукционной питательной среде не вызывало регенерации побегов. В вари-

антах с применением НУК+БАП (1 мг/л+4 мг/л соответственно) формирование каллусной ткани не отмечено (рис. 3п).

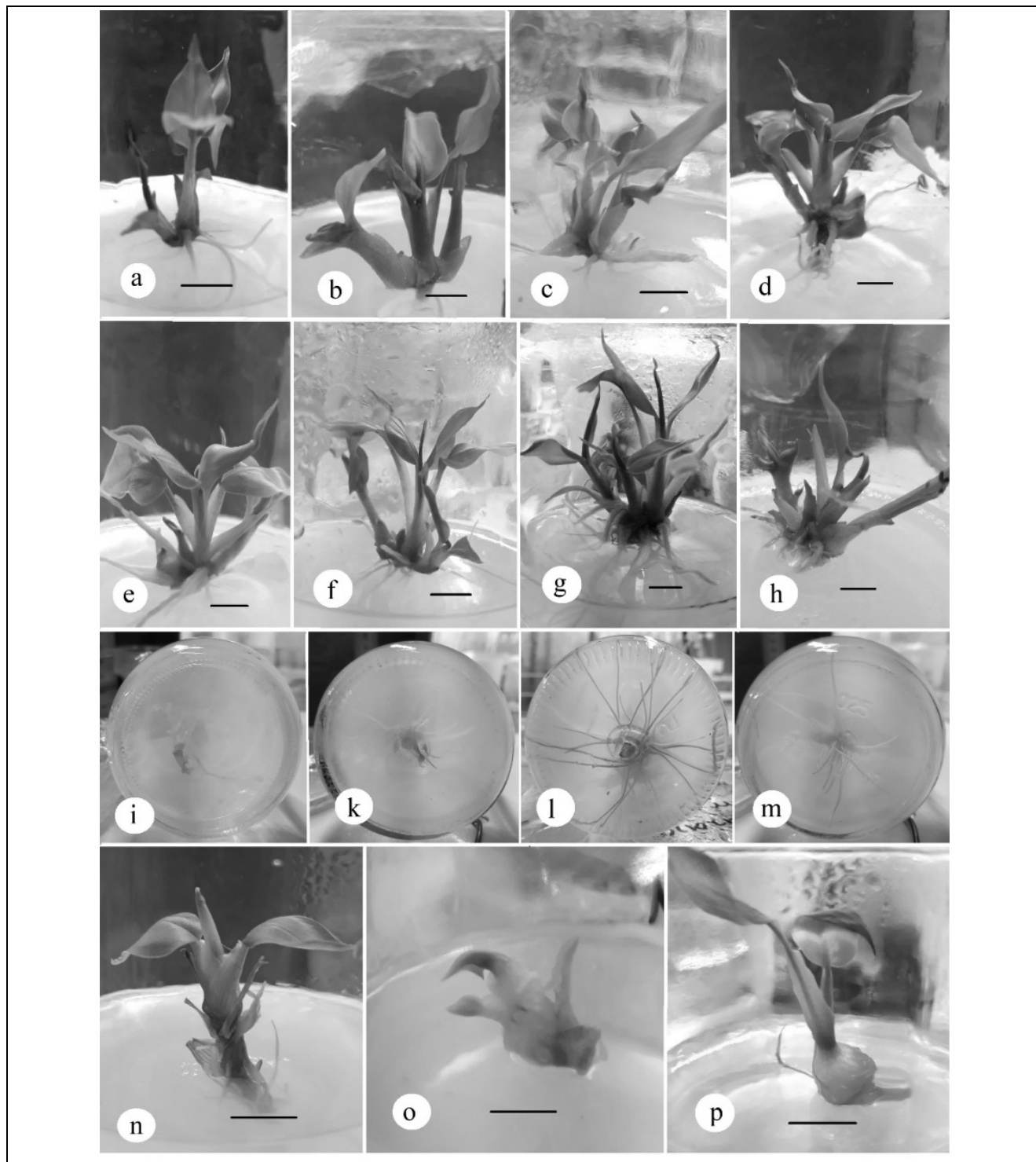


Рис. 3. Влияние различных регуляторов роста на размножение побегов: а – контроль, б – 1,0 мг/л БАП, с – 2,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК, d – 2,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК, е – 3,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК, f – 3,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК, г – 4,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК, h – 4,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК; укоренение: i – контроль, k – 1,0 мг/л БАП, l – 4,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК, m – 4,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л НУК; индукция каллуса: n – 1 мг/л БАП + 4 мг/л НУК, о – 1 мг/л БАП + 1 мг/л 2,4-Д, p – 1 мг/л БАП + 2 мг/л 2,4-Д. Масштабные линейки = 1 см

Среди регуляторов роста из группы цитокининов, помимо БАП, часто используют менее активный гормон – кинетин, который также применяют для размножения *in vitro* разных видов рода *Атомит* [11–14]. Была проведена сравнительная оценка действия кинетина и БАП по отдельности на формирование адвентивных побегов кардамона (табл. 4).

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). Так, наилучшие результаты были получены в варианте с присутствием 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. Побеги характеризовались быстрым ростом, имели ярко-зеленый цвет стеблей и листовых пластинок.

Таблица 4. Влияние цитокининов на регенерацию побегов (наблюдения после 6 недель культивирования)

Регуляторы роста растений, мг/л	Среднее количество побегов на эксплант, шт.	Средняя длина побегов, см
МС (контроль)	1,85 ^a	3,15 ^a
МС + 0,5 Кинетин	2,01 ^a	3,85 ^c
МС + 1,0 Кинетин	3,45 ^c	3,12 ^a
МС + 1,5 Кинетин	2,75 ^b	3,56 ^b
МС + 2,0 Кинетин	2,56 ^b	3,55 ^b
МС + 0,5 БАП	3,56 ^{c,d}	4,54 ^d
МС + 1,0 БАП	4,54^e	5,45^e
МС + 1,5 БАП	3,76 ^d	5,85 ^f
МС + 2,0 БАП	3,48 ^c	6,45 ^g
LSD _{0,05}	0,26	0,21

Примечание: разные строчные буквы означают значительное отличие друг от друга при $p = 0,05$.

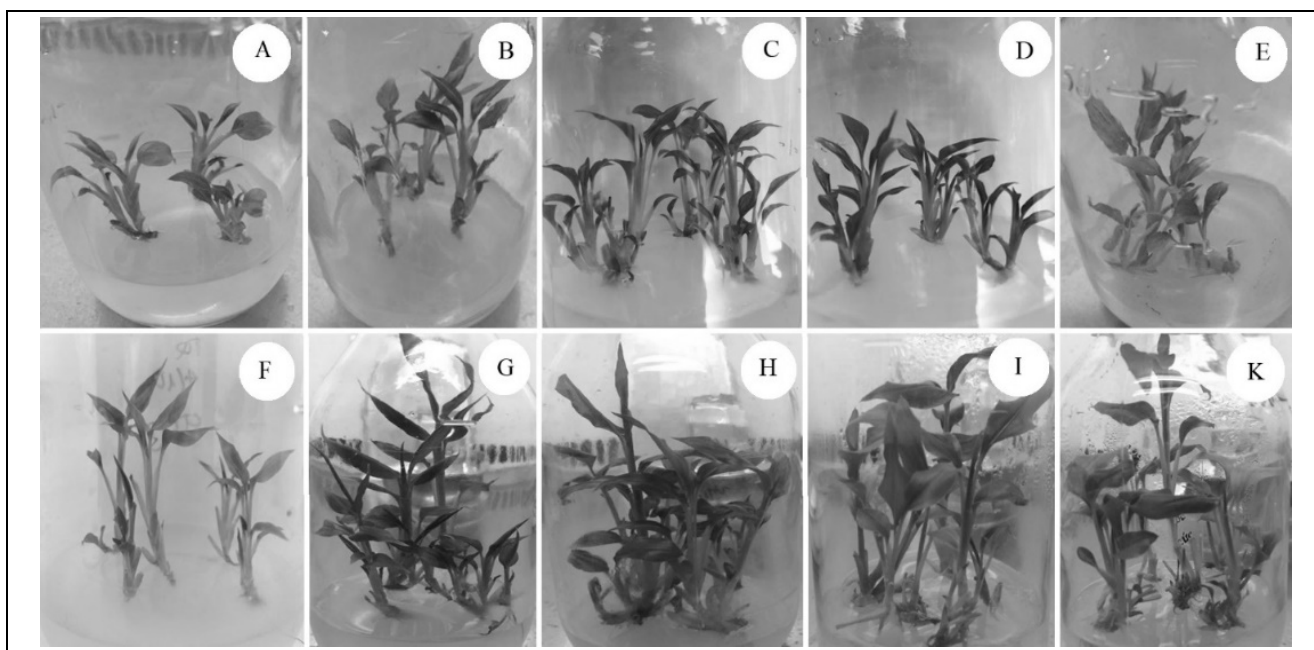


Рис. 4. Влияние кинетина и БАП на регенерацию побегов после 6 недель культивирования: А – кинетин 0,0 мг/л; В – кинетин 0,5 мг/л; С – кинетин 1,0 мг/л; D – кинетин 1,5 мг/л; E – кинетин 2,0 мг/л; F – БАП 0,0 мг/л; G – БАП 0,5 мг/л; H – БАП 1,0 мг/л; I – БАП 1,5 мг/л; K – БАП 2,0 мг/л)

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 исследованиями других авторов с *A. subulatum* Roxb. [11–13] и *A. longiligulare* T.L.Wu. [14].

Добавление в питательную среду кинетина также 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 все изучаемые показатели имели максимальные значения (среднее количество побегов на эксплант – 3,45 шт., высота побегов –

3,12 см). Микропобеги имели толстые и крепкие стебли, а также листья правильной морфологии и темно-зеленого цвета (рис. 4).

Таким образом, в результате исследований установлено, что БАП и кинетин в концентрации 1 мг/л оказывают высокий стимулирующий эффект на индукцию образования адвентивных почек и их дальнейший рост и формирование микропобегов для *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 такие ауксины, как ИМК и НУК [11, 14]. В нашем эксперименте эти ауксины также были исследованы (табл. 4).

Таблица 4. Влияние ИМК и НУК на укоренение побегов, размноженных *in vitro*, после 8 недель культивирования

Регулятор роста растений, мг/л	Укоренение, %	Среднее количество корней на побег, шт.	Средняя длина корня, см
МС	75	2,1 ^a	2,3 ^a
МС + 0,25 ИМК	100	4,5 ^d	5,2 ^c
МС + 0,50 ИМК	100	5,6 ^e	6,2 ^e
МС + 0,75 ИМК	100	4,2 ^{c,d}	5,5 ^{c,d}
МС + 1,00 ИМК	100	4,4 ^d	5,9 ^{d,e}
МС + 0,25 НУК	100	3,5 ^{b,c}	3,8 ^b
МС + 0,50 НУК	100	3,8 ^{b,c,d}	4,1 ^b
МС + 0,75 НУК	100	3,5 ^{b,c}	3,7 ^b
МС + 1,00 НУК	100	3,2 ^b	2,5 ^a
LSD _{0,05}		0,73	0,48

Примечание: разные строчные буквы означают, что они значительно отличаются друг от друга при $p = 0,05$.

На основании проведенных исследований установлено, что присутствие в составе питательной среды исследуемых ауксинов приводило к увеличению выхода укоренившихся микропобегов. Показано, что ИМК проявляла более выраженный эффект на изучаемые показатели, по сравнению с НУК. Так, в варианте с применением ИМК в концентрации 0,5 мг/л было получено наибольшее количество корней (5,6 корня/побег),

на которых формировалось множество 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. [13, 14].

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. Только визуальные наблюдения позволили выявить различия по морфологии корней по вариантам. Так, на среде с НУК 0,5 мг/л формировалось множество толстых корней, имеющих корневые волоски. С увеличением концентрации НУК в среде формировались тонкие корни без корневых волосков. Полученные результаты полностью согласуются с данными других исследователей [13, 14], которые показали, что для *Amomum sp.* среда МС с добавлением НУК была более эффективной в индукции корнеобразования, их числа и длины по сравнению с ИМК.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований установлены оптимальные условия культивирования семян и верхушек побегов. Впервые для черного кардамона (*A. tsao-ko*) разработан протокол клонального микроразмножения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lamxay V., Newman M.F. A revision of *Amomum* (Zingiberaceae) in Cambodia, Laos and Vietnam. *Edinburgh Journal of Botany*. 2012; 69(1): 99–206.
2. Nguyen Q.B. *Flora of Vietnam* (Hanoi, Vietnam: Publishing House for Science and Technology). 2017. P. 128–164.
3. Jafri M.A., Javed K., Singh S. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effect of large Cardamom (fruits of *Amomum subulatum* Roxb.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 75(2–3): 89–94.
4. Do T.L. *Vietnamese medicinal plants and herbs* (Hanoi, Vietnam: Medical Publishing House). 2005; 404–405.
5. Verma S.K., Rajeevan V., Bordia A., Jain V. Greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) – A Cardio adaptogen against physical stress. *J. Herb. Med. Toxicol.* 2010; 4(2): 55–58.
6. Li W., Wang P.J., Shigematsu M., Lu Z.G. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum tsao-ko* cultivated in Yunnan area. *Advanced Materials Research*. 2011; 183: 910–14.
7. Zhang T.T., Lu C.L., Jiang J.G. Antioxidant and anti-tumour evaluation of compounds identified from fruit of *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18: 423–431.
8. Nguyen B.H., Nguyen D.T. *Planting techniques using and processing medicinal plants* (Hanoi, Vietnam: Agricultural publisher). 2005; 221–227.
9. Rao M., Wenli Z., Fanhua W., Chunlin Q., Guixiu H. *In vitro* Culture of *Amomum longiligulare* T.L. Wu. *Chinese journal of tropical agriculture*. 2003; 4: 1–4.
10. Tefera W., Wannakrairoj S. Micropropagation of Krawan (*Amomum krevanh* Pierre exgagnep). *Sci. Asia*. 2004; 30: 9–15.
11. Sajina A., Mini P.M., John C.Z., Nirmal B.K., Ravindran P.N., Peter K.V. Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 1997; 6(2): 145–148.
12. Pradhan S., Basistha B.C., Subba K.B. *In vitro* micropropagation of *Amomum subulatum* (Zingiberaceae), a major traditional cash crop of Sikkim Himalaya. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2014; 3(2): 169–180.
13. Poudel K., Prasai H.K., Shrestha J. Micropropagation and Acclimatization of Large Cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*. 2018; 5(3): 231–235.
14. Dang N.P., Nguyen T.T., Duong T.T.C., Truong T.B.P. *In vitro* propagation of *Amomum longiligulare* T.L.Wu. *Journal of Biotechnology*. 2011; 9 (4A): 681–688.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 1962; 15(3): 473–497.
16. Scott S., Jones R., Williams W. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop science*. 1984; 24(6): 1192–1199.
17. Esehie H. Interaction of salinity and temperature on the germination of sorghum. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1994; 172(3): 194–199.
18. Калашникова Е.А., Миронова О.Ю., Лаврова Н.В., Кочиева Е.З., Чередниченко М.Ю., Карсункина Н.П., Калашников Д.В., Пронина Н.Б. *Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии*. Изд. 2-е. М., 2004. [Kalashnikova E.A., Mironova O.Yu., Lavrova N.V., Kochieva E.Z., Cherednichenko M.Yu., Karsunkina N.P., Kalashnikov D.V., Pronina N.B. *Laboratornyj praktikum po sel'skohozyajstvennoj biotekhnologii*, Izd. 2-e. M., 2004.]
19. Калашникова Е.А., Киракосян Р.Н. *Современные аспекты биотехнологии*. М., 2016 [Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. *Sovremennye aspekty biotekhnologii*. M., 2016].
20. Quyet, K.V., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. *In vitro* germination of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie seeds. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2021; IOP Publishing.
21. Pradhan S. et al. *In vitro* micropropagation of *Amomum subulatum* (Zingiberaceae), a major traditional cash crop of Sikkim Himalaya. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2014; 3(2): 169.
22. Purohit S. et al. Micropropagation and genetic fidelity analysis in *Amomum subulatum* Roxb.: a commercially important Himalayan plant. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2017; 4: 21–26.
23. Phuc N.D. et al. *In vitro* propagation of *Amomum longiligulare* T.L. Wu. *Journal of Biotechnology*. 2011; 9(4A): 689–698.
24. Reghunath R.B., Bajaj Y. Micropropagation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *High-Tech and Micropropagation III*. 1992; 175–198.
25. Reghunath R.B. *In vitro* studies on the propagation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Kerala Agric Univ: Trichur, India*. 1989.

Поступила 23 февраля 2022 г.

EXPERIMENTAL MORPHOGENESIS OF *AMOMUM TSAO-KO* CREVOST & LEMARIE. IN VITRO CULTURE

© Authors, 2022

K.V. Quyét

Post-graduate Student, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia);
Teacher, Hanoi Pedagogical University № 2,
Biology and Agricultural Engineering Facult (Hanoi, Republic of Vietnam)
E-mail: kkuatquyetst@gmail.com

H.T. Nguyen

Ph.D. (Biol.), Department Plant Biotechnology,
Vietnam National University of Agriculture (Hanoi, Republic of Vietnam)
E-mail: nthaicnsh@vnua.edu.vn

E.A. Kalashnikova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: kalash0407@mail.ru

R.N. Kirakosyan

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Department of Biotechnology,
Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazeva (Moscow, Russia)
E-mail: mia41291@mail.ru

Relevance. A promising area of research in the field of biotechnology is the in vitro study of endemic plants used in folk medicine. Such plants include black cardamom (*Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie) – a medicinal plant. Extracts and essential oil are used in the treatment of respiratory diseases, have an antimicrobial effect, and also inhibit the development of human cancer cells. The main method of reproduction of *A. tsao-ko* is seed and vegetative. However, these methods have both advantages and disadvantages. Therefore, it is necessary to develop a technology for rapid reproduction of this culture *in vitro*.

Purpose of the study. To study *A. tsao-ko* Crevost & Lemarie *in vitro*.

Material and methods. The object of the study was *A. tsao-ko* seeds collected in the cardamom forest in the village of Sin Cau (22° 23'04.5"N 103 ° 32'44.0" VD), Giang Ma commune, Tam Duong district, Lai Chau province, Northwestern region of Vietnam. The seeds were superficially sterilized with 0.1% sulema solution for 10 minutes, then scarification was performed, after which the seeds were cultivated on a nutrient medium containing various concentrations of mineral salts according to Murashige and Skoog (MS). At the breeding stage, the effect of BAP (0.5–4 mg/l) and kinetin (0.5–2 mg/l) in combination with NAA (0.5–1 mg/l) on the proliferation of shoots and the formation of adventitious buds was studied. At the third stage of clonal micropropagation, the effect of NAA and IBA (0.25–1 mg/L) on the rooting of *A. tsao-ko* microbeads was studied.

Results. It was found that scarification leads to an increase in seed germination by 12% compared to the control variant. Cultivation of isolated explants on a nutrient medium containing 1/16 of the norm of mineral salts according to MS, BAP 4 mg/l and NAA 0.5 mg/l contributed to obtaining the highest rates in terms of the number of adventitious shoots, their growth and the number of roots per explant. The best result for rooting microshoots was obtained on a medium containing 0.5 mg/l of IBA.

Key words: black cardamom, morphogenesis, clonal micropropagation, in vitro, medicinal plants.

For citation: Quyét K.V., Nguyen H.T., Kalashnikova E.A., Kirakosyan R.N. Experimental morphogenesis of *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarie. *in vitro* culture. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(7):48–59. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-07-08>