

AUGIMO REGULIATORIŲ IR EKSPLANTO TIPO POVEIKIS KVAPIOJO BAZILIKO SOMATINIŲ LĄSTELIŲ DEDIFERENCIACIJAI

Justina DEVEIKYTĖ, Vytauto didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas: justina.deveikyte@vdu.lt

Natalija BURBULIS, Vytauto didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas: natalija.burbulis@vdu.lt

Santrauka

Tyrimo tikslas buvo įvertinti augimo reguliatorių ir eksplanto tipo poveikį kvapiojo baziliko kaliaus formavimosi dažniui (%) ir masei (mg). Tikslui pasiekti buvo išsikelti šie uždaviniai: 1. Nustatyti skirtingų eksplanto tipų (skilčialapių ir hipokotilių) gebą formuoti kalių; 2. Įvertinti augimo reguliatorių ir eksplanto tipo poveikį kaliaus masės augimui. Tyrimai atlikti Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijos Agronomijos fakulteto Augalų biologijos ir maisto mokslų katedros Agrobiotechnologijų laboratorijoje 2020–2021 metais. Tyrimais nustatyta, kad izoliuoti kvapiojo baziliko hipokotilių ir skilčialapių eksplantai maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių kaliaus neformavo. Intensyviausiai (100 %) skilčialapių kultūroje kaliaus genėzė vyko maitinamosiose terpėse, papildytose 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR ir 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais. Nustatyta, kad kvapiojo baziliko kaliaus masė efektyviai augtų, maitinamąją terpę tikslingiausia papildyti 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniu, kurio poveikyje gauta didžiausia vidutiniškai 633 mg hipokotilių ir 561 mg kaliaus masė skilčialapių kultūroje.

Reikšminiai žodžiai: kvapusis bazilikas, kaliaus formavimosi dažnis, augimo reguliatoriai, *in vitro*.

Įvadas

Kvapusis bazilikas (*Ocimum basilicum* L.) kilęs iš Centrinės Afrikos iki Pietryčių Azijos subtropinių regionų, tačiau šiais laikais jis auginamas daugelyje pasaulio regionų (Dahma et al., 2021). Lietuvoje auginama tik viena šio augalo rūšis – kvapusis bazilikas (*Ocimum basilicum* L.), nors bazilikų gentyje jų priskaičiuojama apie 60 rūšių. Tai notrelinių (*Laminaceae* Lindl.) šeimos vienmetis 20–50 cm aukščio žolinis augalas. Bazilikas naudojamas medicinoje, kulinarijoje kaip aromatinis prieskoninis augalas ir pramonės srityse, pavyzdžiui, farmacijos ar kosmetikos (Nahak et al., 2011; Altay et al., 2019; Majdi et al., 2020). Bazilikas turi eterinio aliejaus, kuriame yra biologiškai aktyvių medžiagų, turinčių antioksidacinių ir antimikrobinių savybių, todėl gali būti naudojamas gydantis nuo pykinimo, gerklės ar dantų skausmo, žarnyno veiklos sutrikimų ar netgi nuo vėžio (Ahmed et al., 2019).

Lietuvoje didėja susidomėjimas vietiniais prieskoniniais augalais, tarp kurių yra ir bazilikai. Jų auginimas mūsų šalyje tampa perspektyviu verslu (Maročkienė ir kt., 2012). Auginant bazilikus pramoniniu būdu Lietuvoje, labai svarbu atrinkti perspektyvias veisles, nes ne visos yra tinkamos mūsų klimatinei zonai. Norint turėti Lietuvos klimatui tinkamas veisles reikia ieškoti būdų, kaip efektyviau ir greičiau užauginti produktyvesnes, atsparesnes ligoms ir kenkėjams bazilikų veisles, tačiau nepamirštant ir maistinės jų kokybės. Vienas iš sprendimo būdų gali būti augalų mikrodauginimas *in vitro*. Vykdoma netiesioginė prieskoninių augalų organogenėzė *in vitro* per kaliaus tarpsnį įgalina sėkmingą augalų su pageidaujama požymiais regeneraciją bei aklimatizaciją (Sliesaravičius, Stanys, 2005; Wongsen et al., 2015; Santhi, 2019). Taip pat kultūroje *in vitro* yra galimybė padidinti kaliuje besikaupiančių metabolitų kiekį ir tokiu – alternatyviu – būdu išgauti antrinius metabolitus (Wongsen et al., 2015; Ahmed et al., 2019). Sėkmingai kaliaus indukcijai įvykdyti reikia parinkti tinkamą augimo reguliatorių derinį bei eksplanto tipą.

Tyrimo tikslas – įvertinti augimo reguliatorių ir eksplanto tipo poveikį kvapiojo baziliko kaliaus formavimosi dažniui (%) ir masės prieaugiui (mg).

Tyrimo uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų eksplanto tipų (skilčialapių ir hipokotilių) gebą formuoti kalių;
2. Įvertinti augimo reguliatorių ir eksplanto tipo poveikį kaliaus masės augimui.

Tyrimų metodai ir sąlygos

Tyrimai atlikti Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademijos Agronomijos fakulteto Augalų biologijos ir maisto mokslų katedros Agrobiotechnologijų laboratorijoje 2020–2021 metais. Tirtas kvapiojo baziliko (*Ocimum basilicum* L.) veislės ‘Lemon’ kaliaus formavimosi dažnis (%) ir kaliaus masė (mg) izoliuotų hipokotilių ir skilčialapių kultūroje, naudojant skirtingas citokinino kinetino (KIN) ir auksino 1-naftilacto rūgšties (NAR) koncentracijas Murashige

ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) maitinamojoje terpėje. Eksperimento variantai: veiksnys A – eksplanto tipas, veiksnys B – augimo reguliatorių koncentracija.

Donoriniai augalai užauginti aseptinėmis sąlygomis iš sterilių sėklų ant MS maitinamosios terpės be augimo reguliatorių, papildytoje 10 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ agaru. Kvapiojo baziliko sėklos plautos 30 minučių tekančiu vandeniu, 1 minutę sterilintos 70 % etanolio vandeniniu tirpalu, 10 minučių sterilintos 12 % natrio hipochlorito tirpale, po to 3 kartus po 5 minutes perplautos steriliu distiliuotu vandeniu.

Kaliaus indukcijai tirti 15–20 dienų skilčialapiai ir hipokotiliai auginti MS maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1–0,8 mg l⁻¹ KIN ir 0,1–0,8 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniais. Terpės pH – 5,7 ± 0,1. Izoliuota skilčialapių bei hipokotilių kaliaus kultūra auginta 22 ± 2 °C temperatūroje, esant 50 μmol m⁻² s⁻¹ apšvietimui, 16/8 h (diena / naktis) fotoperiodui.

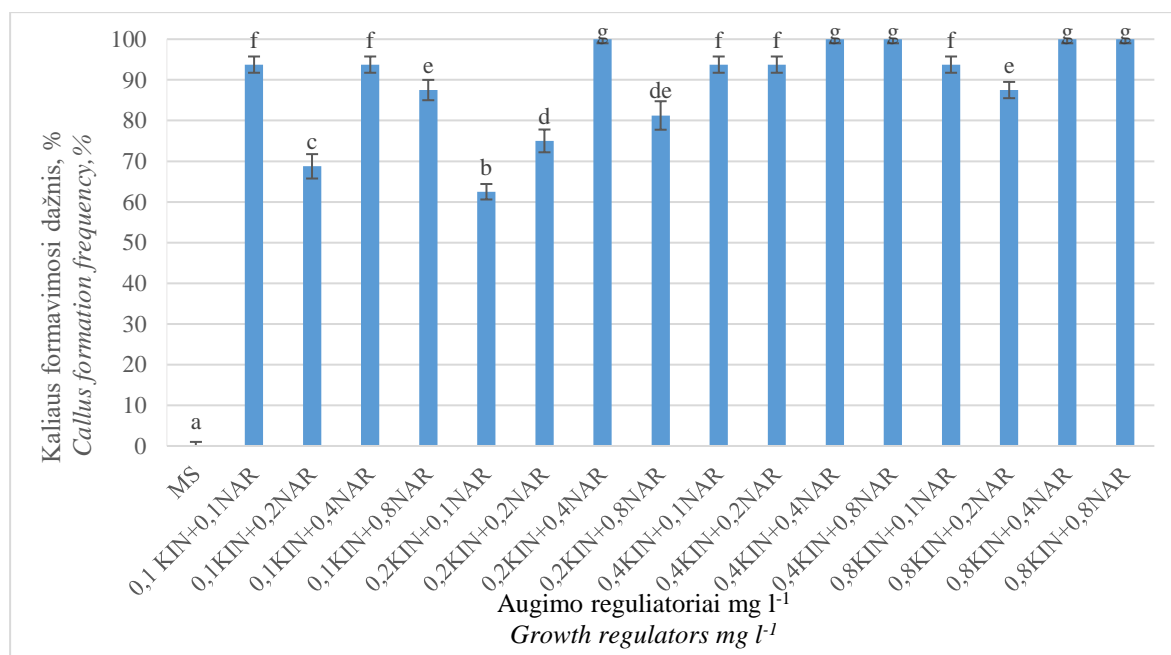
Tyrimas atliktas trimis pakartojimais įvertinant kaliaus formavimosi dažnį (%) [(eksplantų, formavusių kalių, skaičius / bendras eksplantų skaičius) x 100%] ir kaliaus masę (mg). Duomenys statistiškai apdoroti kompiuterinėmis programomis STAT 1,55 ir ANOVA iš programų paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT (Tarakanovas, Raudonius, 2003). Rezultatų patikimumas įvertintas dispersinės analizės metodu, esant 95 % (p < 0,05) pasikliauties tikimybės lygiui.

Tyrimų rezultatai ir jų analizė

Sterilių kvapiojo baziliko izoliuotų ląstelių dediferenciacijos procesas *in vitro* prasidėjo praėjus 15–20 dienų po izoliavimo. Kvapiojo baziliko kaliaus indukcijos intensyvumas priklausė nuo augimo reguliatorių priedo maitinamojoje terpėje ir eksplanto tipo.

Vertinant augimo reguliatorių derinių poveikį kaliaus indukcijai kvapiojo baziliko hipokotilių kultūroje nustatyta, kad maitinamosiose terpėse, kurios buvo papildytos augimo reguliatorių KIN ir NAR deriniu, kaliaus formavimosi dažnis svyravo nuo 62,5 iki 100 % (1 pav.). MS maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių izoliuoti kvapiojo baziliko hipokotilių eksplantai kaliaus neformavo. Didžiausias kaliaus formavimosi dažnis nustatytas MS maitinamosiose terpėse, papildytose 0,2 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR bei 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais – 100 %.

Esmingai mažiausias kaliaus formavimosi dažnis nustatytas maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,2 mg l⁻¹ KIN + 0,1 mg l⁻¹ NAR deriniu (62,5%), 1,6 karto mažiau negu maksimaliai kalių formavusiose terpėse.



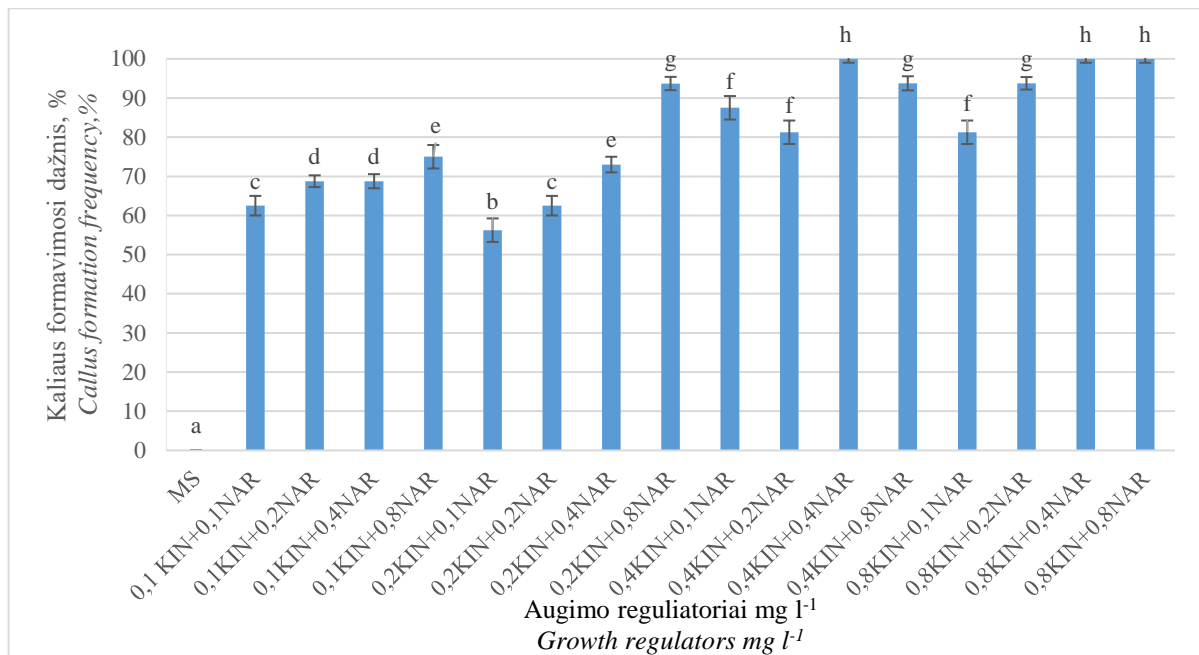
Pastaba: tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b,...), skirtumai yra esminiai (P < 0,05)

Note: Between the averages of treatments marked with different letters differences are significant (P < 0.05).

1 pav. Augimo reguliatorių poveikis kvapiojo baziliko kaliaus formavimosi dažniui hipokotilių kultūroje

Fig. 1. The growth regulator effect of callus formation frequency to sweet basil hypocotyls culture

Vertinant augimo reguliatorių derinių poveikį kaliaus indukcijai kvapiojo baziliko skilčialapių kultūroje nustatyta, kad maitinamosiose terpėse, kurios buvo papildytos augimo reguliatorių KIN ir NAR deriniu, kaliaus formavimosi dažnis svyravo nuo 56,3 iki 100 % (2 pav.). MS maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių izoliuoti kvapiojo baziliko skilčialapių eksplantai kaliaus neformavo. Esmingai didžiausias kaliaus formavimosi dažnis nustatytas MS maitinamosiose terpėse, papildytose 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais – 100 %.



Pastaba: tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b,...), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$)

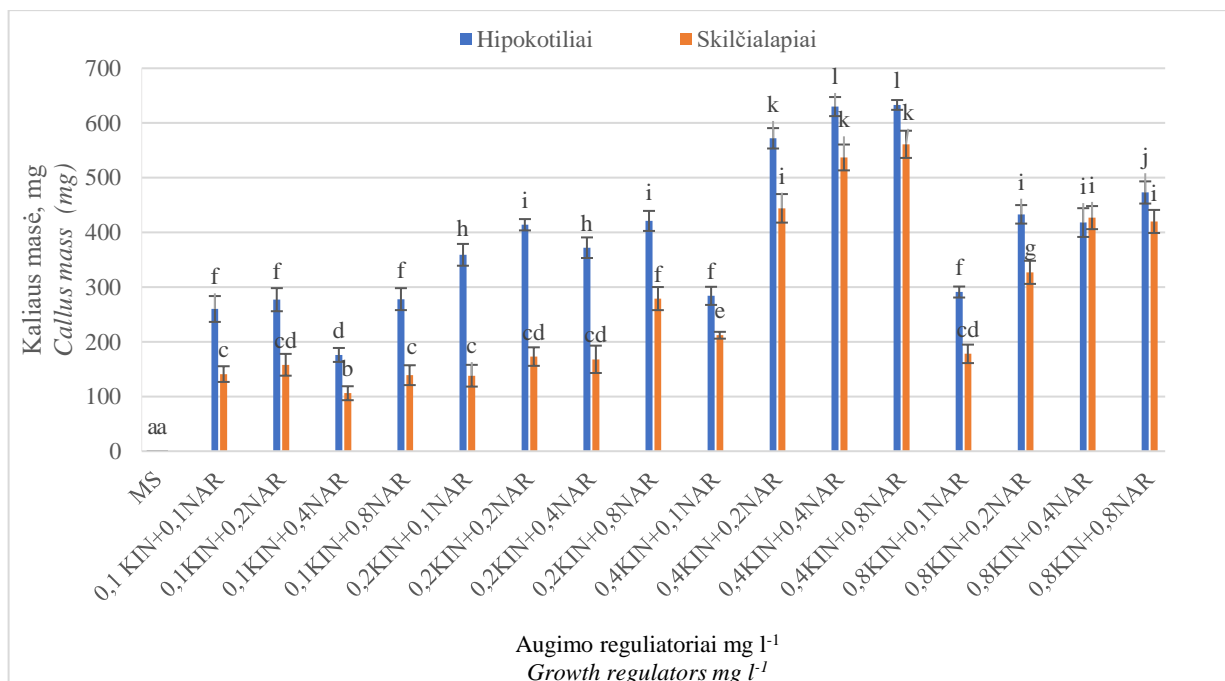
Note: Between the averages of treatments marked with different letters differences are significant ($P < 0,05$).

2 pav. Augimo reguliatorių poveikis kvapiojo baziliko kaliaus formavimosi dažniui skilčialapių kultūroje

Fig. 2. The growth regulator effect of callus formation frequency to sweet basil cotyledon culture

MS maitinamąją terpę papildžius augimo reguliatorių deriniu 0,2 mg l⁻¹ KIN + 0,1 mg l⁻¹ NAR, nustatytas 1,8 karto mažesnis kaliaus formavimosi dažnis (56,3 %) negu terpėse, papildytose 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais.

Įvertinus augimo reguliatorių poveikį kvapiojo baziliko 'Lemon' kaliaus masei izoliuotų hipokotilių ir skilčialapių kultūroje, nustatyta, kad citokinino KIN ir auksino NAR derinys maitinamojoje terpėje skatino esmingai intensyvesnę kaliaus masės augimą, lyginant su kontroliniu variantu (be augimo reguliatorių), kuriame kalius nebuvo formuotas (3 pav.).



Pastaba: tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b,...), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$)

Note: Between the averages of treatments marked with different letters differences are significant ($P < 0,05$).

3 pav. Augimo reguliatorių poveikis kvapiojo baziliko kaliaus masei hipokotilių ir skilčialapių kultūroje

Fig. 3. The growth regulator effect of callus mass to sweet basil hypocotyls culture and cotyledon culture

Nustatyta, kad hipokotilių ir skilčialapių kultūrose statistiškai patikimai didžiausia (atitinkamai vidutiniškai 633 mg ir 561 mg) kaliaus masė gauta eksplantus auginant maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniu, ir maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniu (atitinkamai vidutiniškai 630 mg ir 537 mg). Tarp šių variantų esminių skirtumų nenustatyta.

Esmingai mažiausia vidutinė kaliaus masė hipokotilių ir skilčialapių kultūrose (atitinkamai vidutiniškai 176 mg ir 106 mg) nustatyta eksplantus auginant maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,1 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniu. Šioje maitinamojoje terpėje eksplantai kalių užaugino 3,6–5,3 karto mažesnę negu terpėje su vidutiniškai didžiausią kaliaus masę išauginusių augimo reguliatorių priedu.

Apibendrinant galima teigti, kad kaliaus masei auginti tikslinga naudoti hipokotilių eksplantus, nes beveik visais variantais, išskyrus 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR, hipokotiliai užaugino esmingai didesnę kaliaus masę negu skilčialapių eksplantai.

Išvados

1. Intensyviausiai hipokotilių kultūroje kaliumi formavosi maitinamosiose terpėse, papildytose 0,2 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR ir 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais.

2. Intensyviausiai skilčialapių kultūroje kaliaus genezė vyko maitinamosiose terpėse, papildytose 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR; 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR ir 0,8 mg l⁻¹ KIN + 0,8 mg l⁻¹ NAR deriniais.

3. Kad kvapiojo baziliko kaliaus masė efektyviai augintų, tikslingiausia naudoti hipokotilių eksplantus, auginamus maitinamojoje terpėje, papildytoje 0,4 mg l⁻¹ KIN + 0,4 mg l⁻¹ NAR augimo reguliatorių deriniu.

Literatūra

1. Ahmed, A. F., Attia, F. A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. 2019. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, Vol. 8(3), p. 299–305.
2. Altay, K.; Hayaloglu, A. A.; Dirim, S. N. 2019. Determination of the drying kinetics and energy efficiency of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves using different drying methods. *Heat and Mass Transfer*, Vol. 55, pp. 2173–2184.
3. Dhama, K.; Sharun, K.; Gugjoo, M. B.; Tiwari, R.; Alagawany, M.; Yattoo, M. I.; Thakur, P.; Iqbal, H. M. N.; Chaicumpa, W.; Michalak, I.; Elnesr, S. S.; Farag, M. R. 2021 A Comprehensive review on chemical profile and pharmacological activities of *Ocimum basilicum*. *Food Reviews International*, pp.1–29.
4. Majdi, C.; Peteira, C.; Dias, M. I.; Calhelha, R. C.; Alves, M. J.; Rhourri-Frih, B.; Charrouf, Z.; Barros, L.; Amaral, J. S.; Ferreira, I. 2020. Phytochemical characterization and bioactive properties of cinnamon basil (*Ocimum basilicum* cv. 'Cinnamon') and lemon basil (*Ocimum × citriodorum*). *Antioxidants*, Vol. 9.5, 369.
5. Maročkienė, N.; Radzevičius, A.; Karklelienė, R.; Juškevičienė, D. 2012 b. Kvapiojo baziliko (*Ocimum basilicum* L.) veislių tinkamumas šviežios žolės derliui išauginti lauko sąlygomis. *Sodininkystė ir daržininkystė*, Vol. 31(3–4), pp. 67–75.
6. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Vol. 15, p. 473–497.
7. Nahak, G.; Mishra, R. C.; Sahu, R. K. 2011. Taxonomic distribution, medicinal properties and drug development potentiality of *Ocimum* (Tulsi). *Drug Invention Today*, Vol. 3, p. 95–113.
8. Santhi, K. 2019. In vitro micropropagation of *Ocimum citriodorum* and standardization of growth hormone. *Annals of Plant and Soil Research*, Vol. 21, pp. 386–9.
9. Sliesaravičius, A.; Stanys, V. 2005. Žemės ūkio augalų biotechnologija. Vilnius, 236 p.
10. Tarakanovas, P.; Raudonius, S. 2003. Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT–PLOT iš paketo „Selekcija“ ir „Irristat“. Akademija, Kėdainių r., p. 57.
11. Wongsan, W.; Bodhipadma, K.; Noichinda, S.; Leung, D. W. M. 2015. Influence of different 2,4–D concentrations on antioxidant contents and activities in sweet basil leaf-derived callus during proliferation. *International Food Research Journal*, Vol. 22, p. 638–643.

INFLUENCE OF GROWTH REGULATORS AND EXPLANT TYPE ON THE SOMATIC CELLS OF SWEET BAZILS DEDIFFERENTIATION INDUCTION

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of growth regulators and explant type of callus formation frequency (%) and weight (mg) of sweet basil. To achieve this goal, the following goals have been set: 1. To determine the ability of explant types (cotyledons and hypocotyls) to form callus; 2. To evaluate the effect of growth regulators and explant-type on callus mass growth. The research was carried out in the Laboratory of Agrobiotechnologies of the Department of Plant Biology and Food Sciences, Faculty of Agronomy, Agriculture Academy, Vytautas Magnus University in 2020–2021. Studies have shown that isolated explants of sweet basil hypocotyls and cotyledons could not form a callus in the culture medium without growth regulators. The most intense (100%) callus formation frequency has been obtained on the medium supplemented with 0.4 mg l⁻¹ KIN + 0.4 mg l⁻¹ NAA, 0.8 mg l⁻¹ KIN + 0.4 mg l⁻¹ NAA and 0.8 mg l⁻¹ KIN + 0.8

mg l⁻¹ NAA. It was found that for effective growth callus mass of basil, it is most appropriate to supplement the culture medium with a combination of 0.4 mg l⁻¹ KIN + 0.4 mg l⁻¹ NAA growth regulators, which resulted in the highest average callus weight of 633 mg hypocotyls and 561 mg from cotyledon cells.

Keywords: sweet basil, callus formation frequency, growth regulators, *in vitro*.