

**Marcelina KRUPA-MAŁKIEWICZ, Krzysztof ZIELIŃSKI*

WPLYW ROŚLINNYCH REGULATORÓW WZROSTU (2,4-D, BAP, GA₃) NA NAMNAŻANIE PĘDÓW I TWORZENIE TKANKI KALUSOWEJ BAZYLI POSPOLITEJ (*OCIMUM BASILICUM* L.)

THE INFLUENCE OF PLANT GROWTH REGULATORS (2,4-D, BAP, GA₃) ON THE SHOOTS PROPAGATION AND CALLUS TISSUE INDUCTION OF SWEET BASIL (*OCIMUM BASILICUM* L.)

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Abstract. The aim of this study was an attempt to determine the influence of PGRs – auxins, cytokinins and gibberelic acid – on the propagation and callus tissue of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). The best result at the propagation stage were obtained on MS medium supplemented with 1.0 mg · dm⁻³ BAP with 0.1 mg · dm⁻³ GA₃. The basilicum plants propagated under these conditions developed high main shoots and large number of shoots in comparison to control. The leaves with the best callus weight were regenerated on MS medium supplemented with 1.0 mg · dm⁻³ 2,4-D and 0.5 mg · dm⁻³ BAP.

Słowa kluczowe: bazylia, mikrorozmnażanie, roślinne regulatory wzrostu.

Key words: basilicum, micropropagation, plant growth regulators.

WSTĘP

Bazylia pospolita (*Ocimum basilicum* L.) należy do rodziny *Lamiaceae* liczącej blisko 150 gatunków roślin. Jest ceniona ze względu na zawartość olejków eterycznych, pozyskiwanych z liści i kwiatów, które wykazują działanie antybiotyczne i antyoksydacyjne (Sahoo i in. 1997, Kintzios i in. 2003). Gatunek ten rozmnażany jest głównie przez nasiona. Jednakże niska zdolność kiełkowania nasion poważnie ogranicza uprawę bazylii na większą skalę. Stąd też, kultury *in vitro* stanowią alternatywną metodę pozwalającą uzyskać dużą liczbę wyrównanego genotypowo i fenotypowo materiału. Ponadto, za pomocą kultur tkankowych można również otrzymywać pośrednio metabolity wtórne bez konieczności regeneracji całej rośliny. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu roślinnych regulatorów wzrostu na namnażanie pędów i tworzenie tkanki kalusowej bazylii pospolitej (*O. basilicum* L.).

* Adres do korespondencji – Corresponding author: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Juliusza Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: marcelina.krupa-malkiewicz@zut.edu.pl.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły nasiona bazylii pospolitej (*Ocimum basilicum* L.). Przed wyłożeniem nasion na pożywkę, przeprowadzono ich wstępną dezynfekcję poprzez moczenie w 70% roztworze alkoholu, a następnie przez 10 min w 7% roztworze NaOCl. Tak przygotowane nasiona trzykrotnie płukano sterylną wodą i wykładano do kolbek Erlenmayerek. Do każdej kolbki wlewano po 20 ml pożywki MS. Zastosowane pożywki zawierały ponadto $8,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ agaru i $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy. pH 5,7 ustalono przed autoklawowaniem w temperaturze 121°C ($0,1 \text{ MPa}$). Kiełkowanie nasion i wzrost roślin donorowych trwał trzy tygodnie.

Z otrzymanych roślin donorowych pobierano 1–2 cm fragmenty pędów zawierające komórki merystemów wierzchołkowych i bocznych. Następnie eksplantaty wykładano na pożywkę MS, uzupełnioną regulatorami wzrostu w 6 kombinacjach: 6-benzylaminopuryną (BAP) w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i kwasem giberelinowym (GA_3) w stężeniach 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 i $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jako kontrolę zastosowano podłoże MS bez dodatku regulatorów wzrostu. Na każdą pożywkę wykładano po 100 eksplantatów (5 eksplantatów w jednym powtórzeniu).

W celu zainicjowania tkanki kalusowej pobierano fragmenty liści o wielkości 1 cm^2 i wykładano na pożywkę MS uzupełnioną regulatorami wzrostu w 6 kombinacjach: kwasem dichlorofenoksyoctowym (2,4-D) w stężeniach 0,5 i $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i BAP w stężeniach 0,5, 1,0 i $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na każdym etapie badań kultury umieszczano w fitotronie na okres 4 tygodni, w temperaturze 25°C i wilgotności względnej 70–80%. Stosowano 16 godzinny dzień, a natężenie światła wynosiło $40 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie określając średnią dla rośliny: długości pędów i korzeni, liczbę liści i pędów oraz masę kalusa. Istotność różnic określono przy pomocy analizy wariancji i testu Tukeya, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Przynależność do grup jednorodnych określono w tabelach kolejnymi literami alfabetu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek do pożywki zastosowanych w doświadczeniu roślinnych regulatorów wzrostu wpływał pozytywnie na morfo- i kalogenezę bazylii (*O. basilicum* L.). Na rozwój części nadziemnych rośliny istotny wpływ miał dodatek do podłoża MS gibereliny GA_3 w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w połączeniu z $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP (tab. 1).

Rośliny bazylii otrzymane na tych pożywkach charakteryzowały się średnio najdłuższymi w porównaniu do kontroli pędami (odpowiednio: 2,25 i 2,18 cm). W przypadku liczby pędów i długości korzeni najlepsza okazała się pożywka MS uzupełniona $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP w połączeniu z $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ GA_3 . Rośliny z tej kombinacji miały średnio o 30% więcej pędów (1,63) i o 65% dłuższe korzenie (6,80 cm), niż kontrola (tab. 1). Podobne stężenia gibereliny w połączeniu z $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ KIN zastosowali do namnażania tymianku (*Thymus vulgaris*) Ozudogru i in. (2011). Przy czym najwyższy procent zregenerowanych roślin (96,7%) uzyskano po dodaniu do pożywki MS kwasu giberelinowego w stężeniu $0,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Istotny wpływ BAP na rozwój części nadziemnych roślin rozmnażanych w kulturach *in vitro*, zaobserwowali również Saha i in. (2010) u *Ocimum kilimandscharicum* Guerke.

Tabela 1. Wpływ regulatorów wzrostu na wybrane cechy morfologiczne pędów zregenerowanych w kulturach eksplantatów pędowych bazylii (*O. basilicum* L.)
 Table 1. Effect of growth regulators on selected morphological traits of shoots regenerated in shoots explant cultures of basil (*O. basilicum* L.)

Pożywka MS MS medium	Wysokość roślin (cm) Plant height (cm)		Liczba pędów/eksplantat Shoot number/eksplant		Liczba liści Leaves number		Długość korzeni (cm) Root lenght (cm)	
1,0 mg · dm ⁻³ BAP + 0,1 mg · dm ⁻³ GA ₃	2,25	a	2,0	a	12,88	a	4,60	a
1,0 mg · dm ⁻³ BAP + 0,2 mg · dm ⁻³ GA ₃	0,56	ab	0,88	b	9,63	b	5,08	a
1,0 mg · dm ⁻³ BAP + 0,4 mg · dm ⁻³ GA ₃	0,50	ab	0,63	a	10,38	a	4,20	a
1,0 mg · dm ⁻³ BAP + 0,6 mg · dm ⁻³ GA ₃	0,73	ab	1,13	a	11,75	a	3,92	b
1,0 mg · dm ⁻³ BAP + 0,8 mg · dm ⁻³ GA ₃	2,18	a	1,63	a	14,25	a	6,80	a
Kontrola Control	1,47	ab	1,25	a	10,88	a	4,11	a
NIR _{0,05}	1,11		0,86		4,37		2,87	

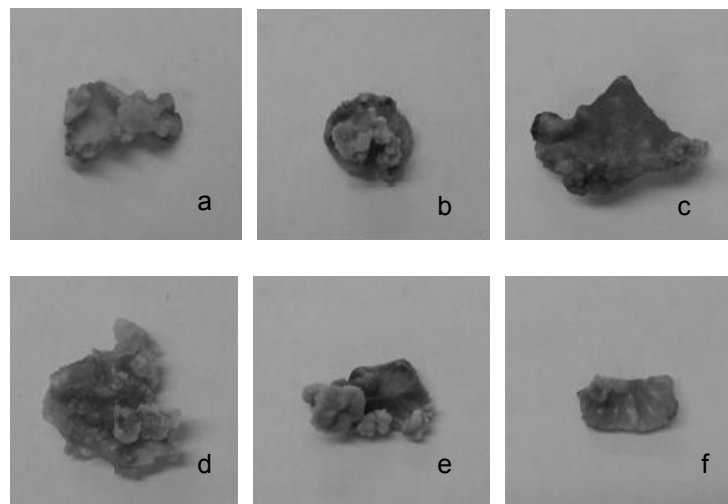
W tym przypadku dodatek do pożywki BAP w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wyraźnie wpływał na długość i liczbę pędów bazylii w porównaniu do grupy kontrolnej. Również badania Arora i Bhojwani (1989) nad byliną *Saussurea lappa* potwierdzają znaczący wpływ zastosowania kombinacji BAP i GA_3 na wytwarzanie pędów u tej grupy roślin. Zdaniem wielu autorów (Sahoo i in. 1997, Begum i in. 2002, Siddique i Anis 2007, 2008) dodatek do pożywki MS cytokininy BAP dodatnio wpływa na długość i liczbę pędów bazylii.

Namnożone rośliny bazylii *O. basilicum* posłużyły jako eksplantaty wyjściowe do założenia kultur kalusowych. Po trzech tygodniach prowadzenia kultury stwierdzono, że na pożywce MS uzupełnionej 2,4-D w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kombinacji z BAP w stężeniu $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ masa kalusa była najwyższa (487,65 g) (tab. 2). Kalus otrzymany na tej pożywce charakteryzował się szybkim wzrostem, zwartą strukturą oraz zielonym zabarwieniem (rys. 1d).

Tabela 2. Indukcja tkanki kalusowej w obecności 2,4-D i BAP w kulturach eksplantatów liściowych bazylii (*O. basilicum* L.)

Table 2. Induction of callus tissue in the presence of 2,4-D and BAP in cultures of basil (*O. basilicum* L.) leaf explants

Regulatory wzrostu Growth regulators	Masa kalusa (g) Callus weight (g)	
$0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	74,18	d
$0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	174,85	bc
$0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	145,48	cd
$1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	487,65	a
$1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	258,03	b
$1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP	58,99	d
NIR	86,93	



Rys. 1. Kalus wytworzony na pożywce MS dodatkiem a – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; b – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; c – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; d – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; e – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; f – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP

Fig. 1. Callus induced on MS medium supplemented with: a – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; b – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; c – $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; d – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; e – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; f – $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 2,4-D + $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP

Natomiast po zwiększeniu stężenia BAP w podłożu przyrost masy tkanki kalusowej był najniższy (58,99 g). Wyniki otrzymane w badaniach własnych są zgodne z wynikami otrzymanymi przez Singh i Sehgal (1999) oraz Gopi i Ponmurugan (2006), którzy zastosowali podobną kombinację regulatorów wzrostu w kulturach kalusa *Ocimum basilicum* L. Yasmin i in. (2001) również stwierdzili, że zastosowanie w pożywce kombinacji 2,4-D i BAP pozwala uzyskać zwarty i zielony kalus, wykorzystywany następnie do indukowania somatycznej embriogenezy *Triticum aestivum* L. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że procent zainicjowanego kalusa był wyższy na pożywkach MS uzupełnionych 2,4-D i BAP w stosunku 1 : 2. Natomiast Dode i in. (2003) najszybszy i największy przyrost masy tkanki kalusowej *O. basilicum* uzyskali stosując wyższe stężenia BAP w pożywce MS ($2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP + $0,02 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA).

WNIOSKI

1. Do namnażania roślin bazylii (*O. basilicum* L.) najlepsza jest pożywka MS uzupełniona cytokiną BAP w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kombinacji z kwasem giberelinowym (GA_3) w stężeniu $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

2. Dodatek do pożywki MS auksyny 2,4-D w stężeniu $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w połączeniu z cytokiną BAP w stężeniu $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ pozwolił uzyskać najlepiej wykształconą tkankę kalusową. Przyrost masy tkanki kalusowej bazylii na tej pożywce był najwyższy.

PIŚMIENNICTWO

- Arora R., Bhojwani S.S. 1989. *In vitro* propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke - An endangered, medicinal plant. Plant Cell Rep 8, 44–47.
- Begum F., Amin M.N., Azad M.A.K. 2002. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. Plant. Tiss. Org. Cult. 61, 199–203.
- Dode L.C., Bobrowski V.L., Braga E.J.B., Seixas F.K., Schunch W. 2003. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. Maringa 25, 435–437.
- Gopi C., Ponmurugan P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L., J. Biot. 126, 260–264.
- Kintzions S., Makri O., Panagiotopoulos E., Scapeti M. 2003. *In vitro* rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Biotechnol. Lett. 25, 405–408.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium, for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473–479.
- Ozudogru E.A., Kaya E., Kirdok E., Issever-Ozturk S. 2011. *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 47, 309–320.
- Saha S., Dey T., Ghosh P. 2010. Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (labiatae). Acta Biol. Cracoviensia 52 (2), 50–58.
- Sahoo Y., Pattnaik S.K., Chand P.K. 1997. *In vitro* propagation of an aromatic medicinal herb *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by axillary shoot proliferation. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant 33, 293–296.
- Siddique I., Anis M. 2007. Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. Biol. Plant. 51 (4), 787–790.
- Siddique I., Anis M. 2008. An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. Acta Physiol. Plant. 30. 493–499.

- Singh N.K., Sehgal C.B.** 1999. Micropropagation of 'Holy Basil' (*Ocimum sanctum* Linn.) from young inflorescences of mature plants. *Plant Growth Reg* 29, 161–166.
- Yasmin R., Javed F., Arfan M.** 2001. Somatic embryogenesis in callus culture of wheat *Triticum aestivum* L. *Int. J. Agric. Biol.* 3, 163–166.