

EFEKAT FORMI I KONCENTRACIJA AZOTA NA RASTENJE I SADRŽAJ PIGMENATA *Ocimum basilicum* L. U KULTURI *IN VITRO*

Biljana Bojović, Dragana Jakovljević, Milan Stanković, Marina Topuzović

Izvod: Cilj istraživanja obuhvata utvrđivanje uticaja azota na rast i koncentraciju fotosintetičkih pigmenata bosiljaka (*Ocimum basilicum* L.) proizvedenog u kulturi *in vitro*. Za istraživanje je upotrebjeno šest hranljivih podloga, koje su se razlikovale po formi i koncentraciji azota. Prema dobijenim rezultatima, značajniji efekat na rast i koncentraciju hlorofila i karotenoida imala je nitratna forma azota u odnosu na kombinaciju nitratne i amonijačne forme. Utvrđeno je da je u procesu gajenja bosiljka kalijum-nitrat pogodan za oplemenjavanje zemljišta.

Ključne reči: kalijum-nitrat, amonijum-nitrat, izduživanje, hlorofili, karotenoidi

Uvod

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz familije Lamiaceae. Poreklom je iz Indije, ali je danas, zbog višestruke primene, veoma rasprostranjena gajena vrsta. Ubraja se među najeksploatisanije aromatične biljke, pre svega zbog značajne upotrebe listova (Puccinelli i sar., 2017.). Dodatno, značajna je i medonosna biljka jer dugo cveta, a cvet je bogat nektarom i polenom (Jevđović i sar., 2011.).

Gajenje ekonomski važnih sorti bosiljka globalno je intenzivirano, pre svega zbog njihovog farmaceutskog i nutritivnog značaja, kao i širokog opsega prilagodljivosti različitim tipovima zemljišta i klimatskim uslovima. Višedecenijska upotreba ovog taksona, zajedno sa širokom distribucijom i selekcijom, znatno je doprinela varijabilnosti među korišćenim sortama koje su jako brojne, a mogu se razlikovati na osnovu habitualnih karakteristika (Carović-Stanko i sar., 2011.).

Produktivnost ove biljne vrste zavisi u velikoj meri od fotosintetički aktivnih pigmenata (Matsumoto i sar., 2013.). Autori brojnih studija utvrdili su postojanje korelacije između sadržaja fotosintetičkih pigmenata i koncentracije azota primenjenog u obliku hraniva (Biczak i sar., 1998; Smith, 1999; Baghour i sar., 2000; Swiader i Moore, 2002.).

U današnje vreme je veoma zastupljena tehnika razmnožavanja i dobijanja novih genotipova biljaka u kulturi *in vitro*, koja dosadašnje znanje o rasteњу i razviću biljnog organizma ujedinjuje sa novim metodama i idejama (Greenway i sar., 2012.). Tehnike *in vitro* kulture postale su sastavni deo istraživanja poljoprivrednih, hortikulturnih i šumarskih vrsta, kao i važan deo biljne biotehnologije.

Cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja različitih formi i koncentracija azota na rasteње i koncentraciju fotosintetičkih pigmenata hloroplasta bosiljka gajenog u kulturi *in vitro*.

Materijal i metode rada

U eksperimentu su korišćena semena bosiljka vrste *Ocimum basilicum* L., (sorta Genovese) dobijena iz komercijalnih izvora (proizvođač „Semeseмена“, d.o.o. Beograd, godina proizvodnje 2016.). Semena su zasejana na 6hranljivih podloga, koje su sadržavale isti sastav i koncentracije makro- i mikroelemenata: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0.150 \text{ g l}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.250 \text{ g l}^{-1}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0.150 \text{ g l}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O} - 22.3 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 8.6 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 6.2 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{KJ} - 0.83 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} - 0.25 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0.025 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.025 \text{ mg l}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 27.8 \text{ mg l}^{-1}$ i $\text{Na}_2\text{EDTA} - 37.3 \text{ mg l}^{-1}$. Hranljive podloge su se jedino razlikovale po koncentraciji azota i formi u kojoj je bio primenjen (nitratna – KNO_3 i amonijačna – NH_4NO_3) (Tabela 1).

Tabela 1. Forma i koncentracija azota u ispitivanim hranljivim podlogama
Table 1. Form and concentration of nitrogen in investigated media

Hranljiva podloga <i>Medium</i>	Forma azota <i>Form of nitrogen</i>	Koncentracija (g) <i>Concentration (g)</i>
M1	KNO_3	2,50
M2	KNO_3	1,25
M3	KNO_3	0,63
M4	$\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$	1,90+1,65
M5	$\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$	0,95+0,83
M6	$\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$	0,50+0,40

Semena bosiljka su pre početka eksperimenta površinski sterilisana 70% etanolom (30 sekundi) i 4% rastvorom natrijum hipohlorita (NaOCl , 15 minuta) i isprana 2 do 3 puta sterilnom destilovanom vodom. Nakon sterilizacije, semena su aseptično zasejana u epruvete, na 20 ml sterilne hranljive podloge. Kulture su gajene četiri nedelje u komori za isključivanje, na temperaturi $23 \pm 2^\circ\text{C}$, pri vlažnosti vazduha od 60%, sa fotoperiodom od 16 h svetlosti i 8 h mraka, pri svetlosti fluorescentnih belih cevi i gustinom fotonskog fluksa od $50 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$. Na svaku od hranljivih podloga zasejano je najmanje 100 semena. Merenja su vršena u tri serije, pri čemu je dužina korena i izdanakameraena pomoću digitalnog kalipera, dok je određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenta vršeno spektrofotometrijskom metodom (Bojović i Stojanović, 2005).

Rezultati istraživanja i diskusija

Efekat azota na dužinu korenova i *in vitro* izdanaka bosiljka

Efekat različitih formi i koncentracija azota na rastenje utvrđivan je merenjem dužine korena i dužine izdanaka bosiljka gajenog u kulturi *in vitro*. Dobijeni rezultati su pokazali da se dužina korena razlikovala u različitim hranljivim podlogama (Tabela 2). Najveća dužina (43,60 mm) zabeležena je u podlozi koja je sadržavala nitratnu formu azota primenjenu u najmanjoj koncentraciji (M3), dok je najmanja dužina (32,83 mm) bila u podlozi sa najvećom koncentracijom nitratne forme azota (M1). U ostalim hranljivim podlogama dužina korenova je bila između 37,45 i 42,19 mm.

Dužina izdanaka bosiljka u hranljivim podlogama sa različitom formom i koncentracijom azota varirala je u zavisnosti od korišćene podloge. Dobijene vrednosti bile su u opsegu od 22,51 mm do 26,96 mm, pri čemu je najveća vrednost zabeležena u hranljivoj podlozi koja je sadržavala kombinaciju najmanje koncentracije nitratne i amonijačne forme azota (M6).

Dobijeni rezultati ukazuju da različita koncentracija azota ispoljavaznačajniji efekat na izduživanje korenova nego izdanaka, pri čemu je evidentniji stimulatorni efekat imala nitratna forma azota (KNO_3) u odnosu na kombinaciju nitratne i amonijačne forme ($KNO_3+NH_4NO_3$). Ranijim istraživanjima je potvrđeno da i forma i koncentracija azota utiču na prinos bosiljka (Golcz i sar., 2006; Biesiada i Kus, 2010).

Tabela 2. Efekat različitih koncentracija i formi azota na dužinu korena i izdankabosiljka (prosečne vrednosti \pm standardna greška)

Table2. Effect of different concentrations and forms of nitrogen on the root and shoot length of basil (means \pm standard error)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Dužina korena(mm) <i>Root length(mm)</i>	32,83 \pm 0,65	39,81 \pm 0,57	43,60 \pm 0,89	37,45 \pm 0,72	39,57 \pm 1,13	42,19 \pm 1,62
Dužina stabla(mm) <i>Shoot length (mm)</i>	22,82 \pm 0,46	23,11 \pm 0,51	22,51 \pm 0,60	22,91 \pm 0,45	23,23 \pm 1,11	26,96 \pm 0,48

Efekat azota na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata *in vitro* izdanaka bosiljka

Uticaoj različitih formi i koncentracija azota na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata ispitivan je kroz merenje sadržaja hlorofila *a*, hlorofila *b*, ukupnog hlorofila(*a+b*), odnosa hlorofila *a/b*, kao i kroz sadržaj karotenoida. Dobijeni rezultati, prikazani u Tabeli 3, ukazuju da sadržaj fotosintetičkih pigmenata zavisi od forme i koncentracije azota. Azot je ispoljio veći efekat na koncentraciju hlorofila *a*, nego na hlorofil *b*. Najveća koncentracija hlorofila *a* (2,95 mgg^{-1}) izmerena je u hranljivoj podlozi sa nitratnom formom azota primenjenoj u najvećoj koncentraciji (M1), dok je najmanja koncentracija ovog pigmenata (1,96 mgg^{-1}) zabeležena u hranljivoj podlozi sa kombinacijom najvećih koncentracija nitratne i amonijačne forme azota(M4). Količina hlorofila *b* je u manjoj meri zavisila od koncentracije i forme azota, a izmerene vrednosti su bile u opsegu od 1,06 do 1,60 mgg^{-1} . Shodno dobijenim rezultatima, najveći sadržaj ukupnog hlorofila je izmeren u medijumu M1, a najmanji u medijumu M4. Na odnos hlorofil *a/b* nis u bitno uticale forme i koncentracije azota. Ovaj odnos je bio prilično ujednačen u svim medijumima i iznosio je približno 2:1.

Koncentracija karotenoida je, takođe, varirala u hranljivim podlogama kojima se bosiljak razvijao, ali su ustanovljene razlike bile manje u odnosu na sadržaj hlorofila (Tabela 3). Veće koncentracije karotenoida izmerene su u hranljivim podlogama koje su sadržavale nitratne forme azota, nezavisno od primenjene koncentracije, nego u hranljivim podlogama sa kombinacijom nitratne i amonijačne forme. Fotosintetički

pigmenti imaju ključnu ulogu u procesu fotosinteze i potvrđeno je da nedostatak mineralnih elemenata direktno utiče na fotosintetički aparat, pre svega kroz biosintezu i funkcionisanje ključnih komponenti procesa (Kalaji i sar., 2014; Gengmao i sar., 2015). Niža koncentracija fotosintetičkih pigmenata u listovima bosiljka ukazuje na redukciju fotosintetičkog procesa usled neadekvatne koncentracije mineralnih elemenata. Negativni efekti amonijačne ishrane potvrđeni su i u slučaju sitnoslisne sorte bosiljka (Jakovljević i sar., 2017).

Tabela 3. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata bosiljka (mg/g) u zavisnosti od forme i koncentracije azota (prosečne vrednosti ± standardna greška)

Tabela 3. Contents of photosynthetic pigments of basil (mg/g) depending on nitrogen form and concentration (means ± standard error)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Hlorofil a <i>Chlorophyll a</i>	2,95 ± 0,15	2,21 ± 0,05	2,51 ± 0,06	1,96 ± 0,08	2,14 ± 0,08	2,14 ± 0,08
Hlorofil b <i>Chlorophyll b</i>	1,60 ± 0,15	1,39 ± 0,07	1,36 ± 0,06	1,06 ± 0,08	1,12 ± 0,09	1,09 ± 0,04
Ukupni hlorofil (a+b) <i>Total chlorophyll (a+b)</i>	4,55 ± 0,23	3,60 ± 0,15	3,87 ± 0,13	3,02 ± 0,08	3,26 ± 0,10	3,23 ± 0,11
Hlorofil a/b <i>Chlorophyll a/b</i>	1,84 ± 0,03	1,59 ± 0,01	1,85 ± 0,02	1,85 ± 0,02	1,91 ± 0,05	1,96 ± 0,06
Karotenoidi <i>Carotenoids</i>	0,31 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,29 ± 0,07	0,23 ± 0,06	0,23 ± 0,08	0,26 ± 0,01

Zaključak

Azot je makrometabolički mineralni element koji ima veliki uticaj na rastenje biljka i sadržaj fotosintetičkih pigmenata. Ovaj efekat azota se ispoljio i u izduživanju korena i izdanaka bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) koji je gajen u kulturi *in vitro*, kao i sadržaju hlorofila i karotenoida, pri čemu su se evidentne razlike pojavile u zavisnosti od forme i koncentracije azota. Veći efekat na dužinu korena i izdanaka, kao i sadržaj fotosintetičkih pigmenata imala je nitratna forma azota u odnosu na amonijačnu, pri čemu su za izduživanje izdanaka povoljnije bile niže koncentracije, a za sadržaj hlorofila i karotenoida više koncentracije ove forme.

Napomena

Istraživanja sprovedena u ovom radu deo su projekta III41010 (Preklinička testiranja bioaktivnih supstanci) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Baghour M., Ruiz J.M., Romero L. (2000). Metabolism and efficiency in nitrogen utilization during senescence in pepper plants: Response to nitrogenous fertilization. *Journal of Plant Nutrition*, 23(1): 91-101.
- Biczak R., Gurgul E., Herman B. (1998). The effect of NPK fertilization on yield and content of chlorophyll, sugars and ascorbic acid in celery. *Folia Horticulturae*, 10(2): 23-34.
- Biesiada A., Kus A. (2010). The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum*, 9: 3-12.
- Bojović B., Stojanović J. (2005). Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. *Archives of Biological Sciences*, 57:283-290.
- Carović-Stanko K., Šalinović A., Grdiša M., Liber Z., Kolak I., Satovic Z. (2011). Efficiency of morphological trait descriptors in discrimination of *Ocimum basilicum* L. accessions. *Plant Biosystematics*, 145: 298-305.
- Greenway M. B., Phillips I.C., Lloyd M.N., Hubstenberger J.F., Phillips G.C. (2012). A nutrient medium for diverse applications and tissue growth of plant species *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 48(4): 403-410.
- Gengmao Z., Yu H., Xing S., Shihui L., Quanmei S., Changhai W. (2015) Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64:175-181.
- Golcz A., Polytycka B., Seidler-Lozykowska K. (2006). The effect of nitrogen fertilization and stage of plant development on the mass and quality of sweet basil leaves (*Ocimum basilicum* L.). *Herba Polonica*, 52: 22-30.
- Jakovljević D., Stanković M., Bojović B., Topuzović M. (2017). Regulation of early growth and antioxidant defense mechanism of sweet basil seedlings in response to nutrition. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11): 243.
- Jevdović R., Todorović G., Kostić M. (2011). Efekti primene biostimulatora na prinos nadzemne biomase bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) na različitim tipovima zemljišta. *Lekovite sirovine*, 31: 33-38.
- Kalaji H.M., Oukarroum A., Alexandrov V., Kouzmanova M., Brestic M., Zivcak M., Samborska I., Cetner M., Allakhverdiev I., Goltsev V. (2014) Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiology and Biochemistry*, 81:16-25.
- Matsumoto S.N., Araujo G., Viana A.E. (2013). Growth of sweet basil depending on nitrogen and potassium doses, horticultura Brasileira. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362013000300024>
- Puccinelli M., Malorgio F., Rosellini I., Pezzarossa B. (2017). Uptake and partitioning of selenium in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants grown in hydroponics. *Scientia Horticulturae*, 225: 271-276.
- Smith D.L. (1999). Field evaluation of the chlorophyll meter to predict yield and nitrogen concentration of switchgrass. *Journal of Plant Nutrition*, 22(6): 1001-1010.

Swiader J.M., Moore A. (2002). SPAD-chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins Journal of Plant Nutrition, 25(5): 1089-1100.

EFFECT OF NITROGEN FORMS AND CONCENTRATIONS ON GROWTH AND THE PIGMENTS CONTENT OF *Ocimum basilicum* L. CULTURED *IN VITRO*

Biljana Bojović, Dragana Jakovljević, Milan Stanković, Marina Topuzović

Abstract

The aim of this study was to examine the effect of nitrogen on the growth and concentration of photosynthetic pigments of *Ocimum basilicum* L. cultured *in vitro*. Six media were used for research, which differed in form and concentration of nitrogen. According to the obtained results, a significant effect on the roots and shoots length, as well as the concentration of chlorophyll and carotenoids had a nitrate form of nitrogen in contrast to the combination of nitric and ammonium forms. Based on obtained results, it is recommended cultivation basil plants in media with potassium nitrate.

Key words: potassium nitrate, ammonium nitrate, growth, chlorophyll, carotenoids.