

УДК 581.1:58.084.1:633.812:582.929.4:577.127.4:620.3

УПРАВЛЕНИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ И КАЛУСНЫХ КУЛЬТУР

Ocimum basilicum L. *in vitro*

© 2023 г. М. Ю. Чередниченко^{а, *}, О. Б. Поливанова^а, Д. А. Хлебникова^а, О. Ю. Словарева^б,
Р. Н. Киракосян^а, Е. А. Калашникова^а

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева”, Москва, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение “Всероссийский центр карантина растений”,
Московская область, г.о. Раменский, р.п. Быково, Россия

*e-mail: cherednichenko@rgau-msha.ru

Поступила в редакцию 17.09.2023 г.

После доработки 14.11.2023 г.

Принята к публикации 15.11.2023 г.

Получены калусные культуры и микроклоны *in vitro* базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) и исследованы их ростовые и биохимические особенности в зависимости от гормонального состава МС-среды, а также от добавления в питательную среду наночастиц (НЧ) феррата цинка. При клональном микроразмножении образцов отмечалось преимущество различных вариантов состава питательных сред: добавление в МС-среду НУК — для сортов Любимчик и Василиск; ИМК — для сорта Фиолетовый бархат и видового образца из Германии; ИУК — для видовых образцов из Польши и Италии. Необходимо отметить, что растения фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат предпочитали МС-среду, содержащую минеральные соли в концентрации $\frac{1}{2}$ нормы. Результаты исследования подтвердили выдвинутую разными авторами гипотезу о способности микрорастений и калусных клеток базилика накапливать вторичные метаболиты, а также возможность управления этим процессом с помощью биологических (минеральный и гормональный состав питательной среды) и физических (НЧ) элиситоров. Показано, что присутствие в составе МС-среды НЧ феррата цинка способствовало формированию калусной ткани разного типа плотности и цвета. Добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ существенно увеличивало сырую биомассу калусной ткани по сравнению с другими вариантами опыта. В этом варианте индекс роста калусной ткани был наибольшим и составил 3.55. При увеличении концентрации НЧ до 50 мкг/л отмечено снижение индекса роста, что свидетельствует об ингибирующем их действии на пролиферативную активность дедифференцированных клеток. В полученных клеточных культурах проведен комплексный анализ фенольных соединений. Выявлено отсутствие зависимости накопления суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов от концентрации НЧ в МС-среде.

Ключевые слова: *Ocimum basilicum*, *in vitro*, клональное микроразмножение, каллусогенез, вторичные метаболиты, фенольные соединения, флавоноиды, наночастицы, биологическая элиситация, физическая элиситация

DOI: 10.31857/S0015330323600778, **EDN:** ZQSCWE

ВВЕДЕНИЕ

Род базилик (*Ocimum* L.) включает 67 видов однолетних и многолетних травянистых растений и кустарников, относящихся к подсемейству Котовниковые (*Nepetoideae*) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*) [1]. В диком виде представители этого рода произрастают в Южной Америке, Иране, Китае, на юге Европейской части России, на Кав-

казе, в Средней Азии и на Дальнем Востоке. Многие виды рода базилик культивируют в Западной Европе, Азии, Африке и Америке [2]. Виды базилика различаются по характеру запаха, степени ароматичности, окраске и площади листовой пластинки, габитусу куста. У растений с мелким листом сбор эфирного масла на 10% больше, чем у растений с крупным листом.

Базилик душистый (*O. basilicum* L.) содержит огромный спектр биологически активных веществ (БАВ), например, эфирные масла (до 1.5%), фенольные соединения (включая флавоноиды и ан-

Сокращения: БАВ — биологически активные вещества; ССФС — суммарное содержание фенольных соединений; НЧ — наночастицы.

тоцианы), дубильные вещества (до 6%), гликозиды, сапонины, аскорбиновую кислоту, клетчатку, сахара, минеральные вещества [3]. Базилик душистый используют как источник рутина — витамина Р и каротина, а препараты на его основе применяют для стимуляции сердечной и дыхательной систем, что связано с наличием в эфирном масле камфоры.

Повысить содержание БАВ в растении можно путем выращивания культуры клеток и тканей *in vitro*. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными способами получения БАВ, таких как, возможность регуляции синтеза целевых продуктов с помощью контроля факторов роста, подбора оптимального режима культивирования для отдельных сортов и др. Метод культуры клеток и тканей *in vitro* можно использовать как альтернативу химическому производству БАВ.

Обоснованность проведения данного исследования связана с сортоспецифической реакцией растений на условия культивирования *in vitro*. Кроме того, метод культуры клеток и тканей позволяет получать генетически стабильный растительный материал, который может представлять большой научный интерес для дальнейших исследований по получению штаммов-суперпродукентов.

Цель работы — получение каллусной ткани и асептических микроклонов растений различных сортов и *ex vitro* популяций базилика душистого, а также изучение возможности управления биосинтетическим потенциалом, используя биологические (минеральный и гормональный состав питательной среды для культивирования) и физические (наночастицы) элиситоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения микроклонов и каллусной ткани базилика душистого (*Ocimum basilicum* L.) использовали семена следующих сортов: Любимчик (ООО “Агрофирма Аэлита”), Василиск (Компания “Гавриш”), Фиолетовый бархат (ООО “Биотехника-СПб”). В работе также использовали видовые семена *O. basilicum*, полученные из ботанических садов Европы: Ogród Botaniczny Uniwersytetu Wrocławskiego, Польша (далее по тексту образец обозначен как Poland), Plantentuin Meise, Бельгия (далее Belgium), Orto Botanico dell’Università di Siena, Италия (далее Italy), Botanischer Garten Tübingen, Германия (далее Germany).

Семена стерилизовали 5% раствором NaOCl или 0.1% раствором HgCl₂, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высевали в чашки Петри (диаметр 90 мм) на агаризованную МС-среду [4] без добавления регуляторов роста. pH МС-среды доводили до 5.6–5.8 перед автокла-

вированием. Чашки Петри с семенами помещали на стеллажи под белые линейно-люминесцентные лампы (OSRAM AG, Германия) с интенсивностью освещения 150 мкмоль/м² с, и проращивали при температуре 23 ± 1°C и 16-часовом световом дне.

В дальнейшем 14-дневные проростки пересаживали в пластиковые контейнеры объемом 500 мл на безгормональную МС-среду для формирования асептических растений с правильной морфологией.

Все работы по стерилизации семян, введению в культуру *in vitro*, по изучению каллусогенеза и морфогенеза проводили в асептических условиях ламинарного бокса.

Клональное микроразмножение сортов *O. basilicum*. Асептические растения *O. basilicum* трех сортов в возрасте 10 нед. черенковали и помещали на МС-среды, содержащие минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы без добавления фитогормонов и регуляторов роста или с добавлением 0.5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), нафтилуксусной кислоты (НУК) или индолилмасляной кислоты (ИМК). Учет параметров (высота растений (см), количество листьев (шт.), частота корнеобразования (%)) проводили на 42 сут. культивирования.

Клональное микроразмножение видовых растений *O. basilicum* зарубежных *ex situ* популяций. Асептические видовые растения, полученные из 4 европейских ботанических садов (Польша, Бельгия, Италия, Германия), в возрасте 1 мес. разделяли на черенки и помещали на МС-среду без добавления фитогормонов (контроль) и с добавлением 1 мг/л ИУК или ИМК. Учет параметров (высота растений (см), количество листьев (шт.), частота корнеобразования (%)) проводили на 42 сут. культивирования.

Индукция каллусогенеза и органогенеза. Каллусную ткань получали из различных типов экспланта (сегменты семядольных листьев, гипокотили, сегменты листовой пластинки, сегменты междоузлий, узлы) на МС-среде, дополненной регуляторами роста: ИУК (0.5 мг/л) в сочетании с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) (2 мг/л); БАП (1 мг/л); БАП (3 мг/л) в сочетании с ИУК (0.3 мг/л). Контролем служила безгормональная МС-среда. Повторность опыта 5-кратная, по 10 эксплантов каждого типа на повторность.

Выращивание каллусной культуры осуществляли в чашках Петри (диаметр 90 мм) при освещении белыми линейно-люминесцентными лампами (OSRAM, Германия) — интенсивность освещения 150 мкмоль/м² с и 16-часовым световым днем.

Первичный фитохимический скрининг асептических растений. На растениях *O. basilicum* сортов Любимчик, Василиск (зеленолистные) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный), культивируе-

мых на МС-средах, содержащих минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы, был проведен первичный фитохимический скрининг по таким показателям как: танины [5], флавоноиды (с 10% NaOH и с 10% ацетатом свинца) [6], сапонины [5], алкалоиды (тест Майера, тест Драгендорфа) [6, 7], терпеноиды и стеролы (реакция Сальковского) [8], восстанавливающие сахара [9], протеины (биуретовая проба) [9], гликозиды (реакция Келлера–Килиани) [6].

Определение суммарного содержания фенольных соединений (ССФС) в микроклонах и каллусной культуре. Количественный анализ ССФС в микроклонах и каллусных культурах проводили на свежесобранном материале (сорта Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат). Свежую растительную массу или каллус измельчали в фарфоровой ступке с добавлением этилового спирта. После измельчения экстракт переливали в стеклянные пробирки и ставили на роторный шейкер на 1 ч. По прошествии этого времени экстракт фильтровали с помощью бумажных фильтров. К полученному отфильтрованному экстракту объемом 0.25 мл добавляли 3 мл дистиллированной воды, 0.25 мл реактива Фолина–Дениса. После чего ждали 3 мин, затем добавляли 0.5 мл насыщенного раствора гидрокарбонат натрия (8%) и 1 мл дистиллированной воды. ССФС определяли спектрофотометрически спустя 1 ч при длине волны 765 нм [10, 11]. Эксперимент осуществляли в 3 повторностях. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Определение суммарного содержания флавоноидов в растениях и каллусе *O. basilicum*. Свежую растительную массу или каллус (сорта Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат) измельчали в фарфоровой ступке с добавлением спирта. После измельчения экстракт переливали в стеклянные пробирки и ставили на роторный шейкер на 1 ч. По истечению этого времени экстракт фильтровали с помощью бумажных фильтров. В пробирку наливали 1.5 мл полученного экстракта, добавляли 75 мкл 10% $AlCl_3$ (спиртовой) и 75 мкл 1М CH_3COOK (водный), после этого приливали 2.1 мл дистиллированной воды. Через 30 мин на спектрофотометре производили измерение оптической плотности при длине волны 415 нм. Эксперимент осуществляли в 3 повторностях. Калибровочный график строили по кверцетину.

Суммарное содержание флавоноидов (C , мг/г) в пересчете на кверцетин определяли по формуле [12, 13]:

$$C = \frac{RV \times 0.001}{m}, \quad (1)$$

где R — значение, полученное согласно калибровочной кривой, мкг/мл; V — объем экстракта, мл;

m — масса растительного образца, используемого при экстракции, г.

Влияние наночастиц (НЧ) феррата цинка на накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре. Каллус, полученный из растительных эксплантов (сорт Фиолетовый бархат), выращивали на МС-среде с добавлением различных концентраций НЧ феррата цинка, полученных ранее методом “зеленого” синтеза на основе экстракта петрушки. НЧ предварительно обрабатывали ультразвуком в течение 4 ч и добавляли в состав МС-среды перед автоклавированием в концентрациях 12.5, 25 и 50 мкг/л. После автоклавирования и перед разливом МС-среды по чашкам Петри проводили ее обработку ультразвуком в течение 2 ч. Контролем служила питательная среда без добавления НЧ. Базовая МС-среда содержала 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. Эксперимент проводился в 3-кратной повторности.

В конце цикла выращивания (30 сут.) определяли сухую и сырую биомассу, жизнеспособность (окрашивание клеток синькой Эванса в камере Горяева, подсчет мертвых и живых клеток), а также индекс роста (I), который рассчитывали по следующей формуле:

$$I = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad (2)$$

где W_0 — начальная масса каллуса, г; W_t — масса каллуса в конце цикла выращивания, г.

Определение фенольных соединений по вариантам проводили также в конце цикла выращивания (30 сут.) по методикам, описанным выше.

Статистическая обработка данных. Средние значения всех данных были рассчитаны с использованием Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США). В таблицах представлены средние арифметические значения и доверительные интервалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом работ было получение хорошо растущей стерильной культуры *O. basilicum*. В качестве стерилизующего агента применяли NaOCl в концентрации 5.0% и $HgCl_2$ в концентрации 0.1%. Семена *O. basilicum* проращивали на безгормональной МС-среде в чашках Петри в условиях световой комнаты. Контролем служил вариант нестерильного прорастания семян на фильтровальной бумаге в чашках Петри. Экспериментально установлено, что прорастание семян начиналось на 5 сут., а на 14 сут. формировались полноценные проростки. Данные по всхожести семян приведены в табл. 1. Последующее культивирование проростков на МС-среде в пластиковых контейнерах объемом 500 мл приводило к появлению первых настоящих листьев и формированию растений правильной морфологии.

Таблица 1. Всхожесть семян *Ocimum basilicum* при различных режимах стерилизации

Сорт	Режим стерилизации				Контроль
	NaOCl 10 мин	NaOCl 15 мин	HgCl ₂ 5 мин	HgCl ₂ 10 мин	
Любимчик	80.0 ± 6.2	80.0 ± 11.3	80.0 ± 16.0	80.0 ± 11.3	84.7...96.0
Василиск	88.0 ± 11.4	100.0	82.0 ± 13.0	86.0 ± 10.0	83.8...94.0
Фиолетовый бархат	77.5 ± 4.9	82.0...94.0	78.7...96.0	91.2...99.0	80.0 ± 8.8

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.

Как следует из табл. 1, различий между всхожестью у всех трех сортов в нестерильных условиях не обнаружено. При этом для сорта Василиск предпочтительной была стерилизация 5% раствором гипохлорита натрия в течение 15 мин, для сорта Фиолетовый бархат — 0.1% раствором хлорида ртути(II) в течение 10 мин, для сорта Любимчик предпочтений нет.

Клональное микроразмножение сортов *O. basilicum*. Асептические растения *O. basilicum* различных сортов в возрасте 10 нед. черенковали и помещали на питательные МС-среды, содержащие минеральные соли в концентрации 1 нормы или ½ нормы без добавления фитогормонов и регуляторов роста или с добавлением 0.5 мг/л ИУК, НУК или ИМК. Экспериментально установлено, что минеральный и гормональный состав питательной среды оказывал существенное влияние на морфометрические показатели исследуемых сортов базилика (табл. 2).

Установлено, что наибольшая высота была у растений сортов Любимчик и Василиск, которые формировались на МС-среде с добавлением 0.5 мг/л НУК, тогда как у сорта Фиолетовый бархат достоверные различия между вариантами отсутствовали. В случае с сортом Любимчик данные по высоте растений, сформировавшихся на МС-среде с добавлением 0.5 мг/л ИУК не были получены из-за развившегося со 2-й недели культивирования некроза и последующей гибели растений. Культивирование сорта Василиск на ½ МС-средах с добавлением 0.5 мг/л ИМК, ИУК или НУК, а также МС-среде с 0.5 мг/л ИУК также приводило со 2-й недели культивирования к некрозам, что вызывало гибель растений. Эксперименты по клональному микроразмножению растений сорта Фиолетовый бархат на МС-средах с добавлением НУК не проводились, так как во время предварительного опыта было установлено, что НУК индуцировал у данного сорта базилика сильный каллусогенез без увеличения высоты побега и количества листьев.

Относительно количества образовавшихся настоящих листьев также были отмечены сортовые различия (табл. 2). У сорта Любимчик наибольшее количество листьев формировалось на МС-средах с

0.5 мг/л НУК и ½ МС с 0.5 мг/л ИУК; у сорта Василиск растения на МС-средах с 0.5 мг/л ИМК (НУК) превосходили контроль 2 (вариант с ½ нормы солей МС-среды), однако полноценные результаты не были получены из-за некрозов при культивировании на большинстве вариантов питательных сред.

Частота корнеобразования была высокой у всех изучаемых сортов на большинстве вариантов питательных сред (табл. 2). В 100% случаев растения сорта Фиолетовый бархат образовывали корни (за исключением вариантов ½ нормы солей МС-среды с 0.5 мг/л НУК, которые приводили к каллусогенезу, а также МС-среды с 0.5 мг/л ИМК, когда частота корнеобразования снижалась до 79%). У сорта Василиск наибольшую частоту корнеобразования отмечали на МС-среде с НУК, а у сорта Любимчик на половине вариантов частота корнеобразования превышала 90%.

Клональное микроразмножение видовых растений *O. basilicum* зарубежных *ex situ* популяций. Асептические видовые растения, полученные из 4 европейских ботанических садов (Польша, Бельгия, Италия, Германия), в возрасте 1 месяца разделяли на черенки и помещали на МС-среду без добавления фитогормонов (контроль) и с добавлением веществ ауксиновой природы — 1 мг/л ИУК или ИМК. На 42 сут. учитывали три морфологических показателя: высоту растений, количество листьев, частоту корнеобразования (табл. 3). Установлено, что по высоте растений существенных различий между вариантами сред и между образцами зафиксировано не было. Различия по количеству листьев между образцами в пределах одной питательной среды были незначительны. По количеству листьев в пределах каждого образца на разных питательных средах различия были незначительны, за исключением образца Poland, где достоверно большее количество листьев было отмечено на МС-среде с 1 мг/л ИУК. Наибольшая эффективность корнеобразования у всех образцов была отмечена на МС-среде с 1 мг/л ИМК.

Индукция каллусогенеза и органогенеза *O. basilicum*. Изучение влияния гормонального состава питательной среды на эффективность каллусогенеза и органогенеза проводили на различных ти-

Таблица 2. Морфометрические показатели асептических сортов растений *Ocimum basilicum* в зависимости от состава питательной среды

Состав питательной среды	Сорт		
	Любимчик	Василиск	Фиолетовый бархат
Высота растения, см			
МС (контроль 1)	1.90 ± 0.46	Некроз	4.93 ± 1.33
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	4.65 ± 0.68
МС + 0.5 мг/л ИМК	3.80 ± 0.69	2.10 ± 0.31	3.58 ± 0.71
МС + 0.5 мг/л НУК	6.45 ± 0.83	3.23 ± 0.22	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	4.44 ± 0.67	2.47 ± 0.35	4.56 ± 0.70
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	3.06 ± 0.72	Некроз	4.56 ± 0.75
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	3.58 ± 0.51	Некроз	3.99 ± 0.11
½ МС + 0.5 мг/л НУК	5.50 ± 0.94	Некроз	Каллусогенез
Количество листьев, шт.			
МС (контроль 1)	9.82 ± 2.51	Некроз	6.43 ± 0.73
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	5.90 ± 0.83
МС + 0.5 мг/л ИМК	11.00 ± 1.54	16.00 ± 3.92	7.47 ± 1.42
МС + 0.5 мг/л НУК	19.55 ± 3.48	22.00 ± 2.35	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	10.56 ± 2.19	9.68 ± 1.84	9.00 ± 0.74
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	15.89 ± 5.91	Некроз	5.75 ± 0.79
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	8.56 ± 0.89	Некроз	11.13 ± 1.95
½ МС + 0.5 мг/л НУК	9.10 ± 0.97	Некроз	Каллусогенез
Частота корнеобразования, %			
МС (контроль 1)	35	Некроз	100
МС + 0.5 мг/л ИУК	Некроз	Некроз	100
МС + 0.5 мг/л ИМК	85	73	79
МС + 0.5 мг/л НУК	100	95	Каллусогенез
½ МС (контроль 2)	89	32	100
½ МС + 0.5 мг/л ИУК	22	Некроз	100
½ МС + 0.5 мг/л ИМК	94	Некроз	100
½ МС + 0.5 мг/л НУК	95	Некроз	Каллусогенез

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы по 30 растениям.

пах экспланта (сегменты семядольных листьев, гипокотили, сегменты листовой пластинки, сегменты междоузлий, узлы) на МС-средах без добавления фитогормонов и регуляторов роста (контроль), а также с добавлением только ауксинов (0.5 мг/л ИУК, 2 мг/л 2,4-Д), только цитокининов (1 мг/л БАП) или сочетания ауксинового и цитокининового компонентов (3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК).

Экспериментально установлено, что у зеленолистных сортов Любимчик и Василиск на питательных средах, содержащих БАП, не удалось получить каллусной ткани (табл. 4). На МС-среде с 0.5 мг/л ИУК каллус образовывался на всех типах экспланта, однако наибольшую частоту каллусогенеза отмечали на листовых эксплантах — 33 и

44% соответственно, а на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д — 88 и 100% соответственно. При измерении содержания сухого вещества в каллусе значения у обоих сортов находилось в диапазоне от 4.6 до 7.0%.

У фиолетоволиственного сорта Фиолетовый бархат каллусную ткань удалось получить на всех типах экспланта на различных питательных средах (табл. 4). В частности, 100% частота каллусогенеза была отмечена на листовых эксплантах на МС-среде с добавлением 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК, на сегментах междоузлий и узлах — на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д и МС-среде с 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК, на семядольных листьях и гипокотилеях — на МС-среде с 2 мг/л 2,4-Д. Содержание сухого вещества находилось в диапазоне от 3.8 до 4.6%.

Таблица 3. Морфометрические показатели асептических видовых растений *Ocimum basilicum* на питательных средах различного гормонального состава

Вариант среды	Образец <i>O. basilicum</i>			
	Poland	Italy	Belgium	Germany
Высота растений, см				
МС (контроль)	4.5 ± 0.5	2.9 ± 1.5	3.0 ± 0.7	4.1 ± 0.7
МС + 1 мг/л ИУК	4.9 ± 2.9	3.1 ± 1.5	2.7 ± 0.3	4.8 ± 1.0
МС + 1 мг/л ИМК	4.3 ± 2.0	2.6 ± 0.9	2.7 ± 0.9	5.2 ± 1.2
Количество листьев, шт.				
МС (контроль)	6.5 ± 0.5	7.0 ± 2.6	8.8 ± 0.2	7.2 ± 0.7
МС + 1 мг/л ИУК	9.9 ± 1.9	9.2 ± 1.2	9.1 ± 3.9	6.8 ± 1.0
МС + 1 мг/л ИМК	5.4 ± 2.0	7.9 ± 1.8	7.1 ± 1.4	7.7 ± 0.9
Частота корнеобразования, %				
МС (контроль)	31	37	33	22
МС + 1 мг/л ИУК	27	36	25	25
МС + 1 мг/л ИМК	98	73	84	88

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы по 30 растениям.

Данные по корневому органогенезу представлены в табл. 5. Для сорта Любимчик удалось получить 100% корневой органогенез на узловых эксплантах при выращивании на МС-среде с 1 мг/л БАП, на гипокотильных эксплантах — на МС-среде с 0.5 мг/л ИУК. Частота корневого органогенеза у сорта Василиск была значительно ниже — максимальная частота была получена на листовых эксплантах на МС-среде с 0.5 мг/л ИУК, тогда как у сорта Фиолетовый бархат корневой органогенез проходил с достаточно высокой частотой (выше 70%) на всех типах экспланта.

Первичный фитохимический скрининг асептических растений. На растениях *O. basilicum* сортов Любимчик, Василиск (зеленолистные) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный) был проведен первичный фитохимический скрининг по стандартным методикам. Как следует из табл. 6, между двумя вариантами минерального состава питательной среды (МС, ½ МС), как и между сортами не наблюдалось различий по выявленным группам метаболитов.

Определение суммарного содержания фенольных соединений (ССФС) в микроклонах и каллусной культуре. Количественный анализ ССФС проводили на асептических растениях трех сортов базилика — Любимчик, Василиск и Фиолетовый бархат (табл. 7). Установлено, что минеральный состав питательной среды не оказывал достоверного влияния на ССФС в растениях, однако были выявлены различия между сортами. Так, в зеленолистных сортах Любимчик и Василиск ССФС было достоверно меньше, по сравнению с фиолетоволиственным сортом Фиолетовый бархат.

В следующей серии экспериментов представляло интерес определить фенольные соединения в хорошо пролиферирующей каллусной ткани, культивируемой на МС-среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 1, 2 и 3 мг/л, а также на МС-среде с 3 мг/л БАП и 0.3 мг/л ИУК. Для этого были выбраны сорта Любимчик (зеленолиственный) и Фиолетовый бархат (фиолетоволиственный), для которых была получена хорошо пролиферирующая каллусная ткань. В табл. 8 представлено ССФС в каллусе *O. basilicum*, культивируемом на МС-среде с различным гормональным составом. Для изучаемых сортов были установлены некоторые закономерности по ССФС в каллусной ткани, полученной из стеблевых и листовых эксплантов: наибольшее количество ССФС отмечено в каллусной ткани, полученной из листовых эксплантов; концентрация 2,4-Д не оказывает существенного влияния на ССФС; накопление фенольных соединений у фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат было в 2 раза выше, чем у зеленолистного сорта Любимчик; при использовании МС-среды, содержащей БАП (3 мг/л) и ИУК (0.3 мг/л) ССФС у сорта Фиолетовый бархат превышало показатели на МС-средах с добавлением 2,4-Д.

В табл. 9 приведены результаты по содержанию флавоноидов в каллусных культурах *O. basilicum*, культивируемых на МС-среде с различным гормональным составом. Установленные закономерности по содержанию флавоноидов были аналогичны закономерностям по ССФС.

Таким образом, ССФС в каллусной ткани снизилось по сравнению с микроклонами у обоих

Таблица 4. Частота каллусогенеза сортов *Ocimum basilicum* на различных типах экспланта при варьировании гормонального состава питательных сред

Гормональный состав МС-среды	Частота каллусогенеза, %		
	сорт Любимчик	сорт Василиск	сорт Фиолетовый бархат
Листья			
2 мг/л 2,4-Д	76.8...99.2	100.0	76.0...96.0
0.5 мг/л ИУК	33.0 ± 4.6	44.0 ± 9.0	0
1 мг/л БАП	0	0	74.0 ± 10.0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Междоузлия			
2 мг/л 2,4-Д	76.4 ± 6.4	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	8.1...15.9
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Узлы			
2 мг/л 2,4-Д	80.0 ± 6.8	70.0 ± 9.6	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	0
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	100.0
Семядольные листья			
2 мг/л 2,4-Д	40.6 ± 13.8	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	48.4 ± 10.0	0
1 мг/л БАП	0	0	0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	0
Гипокотили			
2 мг/л 2,4-Д	0	0	100.0
0.5 мг/л ИУК	0	0	0
1 мг/л БАП	0	0	7.0...27.0
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0	0	0

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.**Таблица 5.** Эффективность корневого органогенеза *Ocimum basilicum* на различных питательных средах на разных типах экспланта

Сорт	Тип экспланта	Состав питательной среды	Частота корневого органогенеза, %
Любимчик	Узлы	МС + 1 мг/л БАП	100.0
	Гипокотили	МС + 0.5 мг/л ИУК	100.0
	Семядольные листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	73.0 ± 3.8
Василиск	Узлы	МС + 0.5 мг/л ИУК	20.0 ± 4.6
	Листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	53.0 ± 13.6
Фиолетовый бархат	Междоузлия	МС + 0.5 мг/л ИУК	70.0 ± 9.4
	Семядольные листья	МС + 0.5 мг/л ИУК	85.0...95.0
	Гипокотили	МС + 0.5 мг/л ИУК	100.0
	Семядольные листья	МС + 3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	80.0 ± 11.2
	Гипокотили	МС + 3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	100.0

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 50$.

Таблица 6. Результаты фитохимического скрининга асептических растений сортов *Ocimum basilicum*

Среда	Сорт	Танины	Флавоноиды (с 10% NaOH)	Флавоноиды (с 10% ацетатом свинца)	Сапонины	Алкалоиды (тест Майера)	Алкалоиды (тест Драгендорфа)	Терпеноиды и стеролы (реакция Сальковского)	Восстанавливающие сахара	Протеины (Биуретовая проба)	Гликозиды (Реакция Келлера–Килиани)
МС	Любимчик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Василиск	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Фиолетовый бархат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
½ МС	Любимчик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Василиск	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Фиолетовый бархат	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 7. Общее содержание фенольных соединений в растениях сортов *Ocimum basilicum* на питательных средах различного минерального состава

Минеральный состав питательной среды	Сорт	мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту
МС	Любимчик	5.3 ± 0.2
	Василиск	5.9 ± 0.4
	Фиолетовый бархат	7.1 ± 0.4
½ МС	Любимчик	5.5 ± 0.4
	Василиск	6.1 ± 0.3
	Фиолетовый бархат	7.3 ± 0.5

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

Таблица 8. Общее содержание фенольных соединений в каллусной ткани *Ocimum basilicum*, культивируемой на МС-среде с различным гормональным составом

Гормональный состав питательной среды	мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту			
	сорт Любимчик		сорт Фиолетовый бархат	
	листья	стебли	листья	стебли
1 мг/л 2,4-Д	1.23 ± 0.94	0.68 ± 0.29	2.49 ± 0.35	1.26 ± 0.12
2 мг/л 2,4-Д	1.44 ± 0.36	0.74 ± 0.08	2.51 ± 0.18	1.32 ± 0.06
3 мг/л 2,4-Д	1.40 ± 0.56	0.72 ± 0.43	2.26 ± 0.29	1.29 ± 0.28
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	1.62 ± 0.46	1.09 ± 0.28	2.87 ± 0.32	1.48 ± 0.12

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

Таблица 9. Суммарное содержание флавоноидов в каллусах *Ocimum basilicum*, культивируемых на МС-среде с различным гормональным составом

Гормональный состав питательной среды	мг/г сырой массы в пересчете на кверцетин			
	сорт Любимчик		сорт Фиолетовый бархат	
	листья	стебли	листья	стебли
1 мг/л 2,4-Д	0.31 ± 0.18	0.14 ± 0.09	0.35 ± 0.21	0.15 ± 0.08
2 мг/л 2,4-Д	0.26 ± 0.18	0.17 ± 0.06	0.36 ± 0.24	0.19 ± 0.09
3 мг/л 2,4-Д	0.28 ± 0.19	0.15 ± 0.10	0.25 ± 0.18	0.17 ± 0.11
3 мг/л БАП + 0.3 мг/л ИУК	0.38 ± 0.12	0.18 ± 0.07	0.58 ± 0.18	0.29 ± 0.08

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

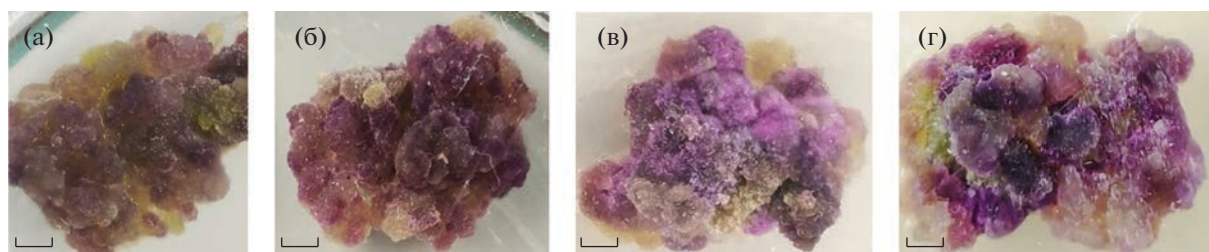


Рис. 1. Каллусная ткань *Ocimum basilicum* на МС-среде, содержащей наночастицы феррата цинка (мкг/л): а – 0 (контроль), б – 12.5, в – 25, г – 50. Бар – 0.3 см.

сортов, однако тенденция к превышению данного показателя у фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат над сортом Любимчик сохранилась. При этом культивирование каллуса на МС-среде с добавлением БАП и ИУК приводило к повышенным показателям ССФС и суммарного содержания флавоноидов по сравнению с МС-средой с добавлением 2,4-Д.

Влияние наночастиц (НЧ) феррата цинка на накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре. Исследования проводили на каллусной культуре, полученной из стеблевых эксплантов сорта Фиолетовый бархат на МС-среде с добавлением БАП (3 мг/л) и ИУК (0.3 мг/л), а также различных концентраций НЧ феррата цинка (12.5, 25 и 50 мкг/л). Контролем служила МС-среда без добавления НЧ. Для характеристики каллусной ткани использовали такой показатель, как индекс роста, рассчитанный по биомассе каллусной ткани в начале и конце цикла выращивания. Первоначальный вес каллусной ткани во всех вариантах составлял 0.35 г. Полученные данные представлены в табл. 10. В результате проведенных исследований установлено, что добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ приводило к существенному увеличению сырой биомассы каллусной ткани, по сравнению с концентрациями 12.5 и 50 мкг/л. В варианте с 25 мкг/л НЧ индекс роста каллусной ткани был наибольшим и составил 3.55. При увеличении концентрации НЧ до 50 мкг/л отмечено снижение индекса роста, что свидетельствует об ингибирующем действии НЧ на пролиферативную активность дедифференцированных клеток.

Визуальные наблюдения, а также изучение каллусной ткани на временных препаратах пока-

зали, что наличие в составе питательной среды НЧ приводило к формированию каллусной ткани разной плотности и имеющей фиолетовый цвет, при этом оттенок зависел от концентрации НЧ (рис. 1). В контрольном варианте каллусная ткань была средней плотности, имела темно-фиолетовый цвет, состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток, как правило, вытянутой формы с крупной вакуолью. В опытных вариантах, с увеличением концентрации НЧ феррата цинка в МС-среде, плотность каллусной ткани возрастала, а цвет изменялся от темно-фиолетового до светло-фиолетового (рис. 1). В этих вариантах каллусная ткань состояла из гетерогенных по форме и размеру паренхимоподобных клеток с крупной вакуолью. Каллусные клетки на МС-средах, дополненных НЧ феррата цинка, имели больший размер по сравнению с контрольным вариантом.

Изучение влияния НЧ феррата цинка на накопление фенольных соединений в каллусных клетках базилика (сорт Фиолетовый бархат) выявило зависимость накопления ССФС и флавоноидов от концентрации НЧ в МС-среде. Установлено, что увеличение концентрации НЧ приводило к снижению величины этих показателей (табл. 11). Однако достоверных различий не было обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

История культуры тканей и клеток лекарственных растений насчитывает не одно десятилетие [14–19]. Эксперименты в этой области имеют как фундаментальное, так и прикладное значе-

Таблица 10. Показатели каллусной культуры при культивировании на МС-среде, содержащей БАП (3 мг/л), ИУК (0.3 мг/л) и различные концентрации наночастиц (НЧ) феррата цинка

НЧ, мкг/л	Сырая биомасса, г	Сухая биомасса, г	Индекс роста
0 (контроль)	1.27 ± 0.02	0.08 ± 0.02	2.85
12.5	1.30 ± 0.03	0.07 ± 0.04	2.94
25	1.50 ± 0.06	0.08 ± 0.02	3.55
50	1.02 ± 0.09	0.05 ± 0.03	2.09

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 20$.

Таблица 11. Суммарное содержание фенольных соединений (ССФС) и флавоноидов в каллусах *Ocimum basilicum*, культивируемых на МС-среде с добавлением различных концентраций наночастиц (НЧ) феррата цинка

НЧ, мкг/л	ССФС, мг/г сырой массы в пересчете на галловую кислоту	Суммарное содержание флавоноидов, мг/г сырой массы в пересчете на кверцетин
0 (контроль)	2.87 ± 0.32	0.58 ± 0.18
12.5	2.72 ± 0.28	0.51 ± 0.11
25	2.48 ± 0.19	0.50 ± 0.14
50	2.44 ± 0.16	0.52 ± 0.13

Примечание. Приведены средние значения и доверительные интервалы, $n = 15$.

ние. К фундаментальному значению можно отнести изучение биологии и физиологии изолированных тканей и клеток растений как модельных систем. Возможность строго контролировать все аспекты проведения экспериментов *in vitro* в отличие от полевых условий (*in vivo*), произрастания природных популяций в естественных (*in situ*) или новых (в ботанических садах, *ex situ*) условиях позволяет, варьируя определенные параметры, устанавливать четкие зависимости между изменениями внешних факторов и ответной реакцией тканей, клеток или микрорастений, определять механизмы регуляции физиологических процессов на уровне организма, ткани или клетки. К прикладному значению клеточной инженерии можно отнести сохранение редких и исчезающих видов растений, получение и размножение ценных генотипов (получение гаплоидов и диплоидов, преодоление про- и постгамной несовместимости, клональное микроразмножение, соматическая гибридизация, криосохранение), проведение клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды абиотической или биотической природы, получение ценных вторичных метаболитов, среди которых особое внимание заслуживают БАВ, в том числе активные фармацевтические ингредиенты. Изучение морфогенеза для понимания процессов химической регуляции роста и дифференциации растительных клеток раскрывает механизмы основных процессов, опираясь на теоретические положения цитологии, генетики, физиологии растений, биохимии, молекулярной биологии, морфологии, анатомии, эмбриологии и др., обогащая их, в свою очередь, новыми сведениями [20].

Представители рода *Ocimum* L. неоднократно становились объектами биотехнологии, прежде всего, это касается двух видов — базилик священный (*O. tenuiflorum*) и базилик душистый (*O. basilicum*). Нами были рассмотрены отечественные сорта базилика душистого — Любимчик, Василиск, Фиолетовый бархат.

В исследованиях по клональному микроразмножению *O. basilicum* ранее уже использовали варьирование минерального (МС или ½ МС) и гормонального (прежде всего, содержания ауксинов — ИУК, НУК, ИМК) состава питательной

среды [21–23]. В соответствии с полученными нами данными по трем отечественным сортам можно дать следующие рекомендации: сорта Любимчик и Василиск (оба зеленолистные) предпочтительно выращивать на МС-среде с 0.5 мг/л НУК, поскольку в этом варианте обеспечивается наибольшая высота растения и количество листьев, наблюдается высокая укореняемость (более 95%). Для фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат можно рекомендовать питательные среды, включающие ½ нормы солей МС-среды с/без добавления 0.5 мг/л ИМК. Среда такого состава обеспечивают наибольшее количество листьев при 100% укореняемости и формирование относительно высоких побегов. А для образцов *O. basilicum* из ботанических садов Польши и Италии предпочтительной являлась МС-среда с 1 мг/л ИУК, для образца из Бельгии — МС-среда без добавления фитогормонов и регуляторов роста, а для образца из Германии — МС-среда с 1 мг/л ИМК. Для индукции каллусогенеза часто используют добавление в состав питательной среды цитокининового и ауксинового компонента, например, БАП и ИУК [24–27]. В наших исследованиях этот вариант гормонального состава МС-среды был оптимальным для фиолетоволистного сорта Фиолетовый бархат. Для зеленолистных сортов Любимчик и Василиск оптимальным было добавление в МС-среду 2,4-Д. Листовые экспланты продемонстрировали больший потенциал к формированию каллуса, чем стеблевые, что также подтверждает результаты других авторов [26]. Добавление в МС-среду ИУК способствовало корневному органогенезу как в наших исследованиях, так и в исследованиях других ученых [28]. Отсутствие единых рекомендаций по режимам индукции каллусогенеза и органогенеза *Ocimum* spp. отражено и в специализированной литературе [21, 25, 26, 28].

Накопление фенольных соединений видов-тканеспецифично, что подтверждается более ранними исследованиями [29]. Показано, что в культуре *in vitro*, используя косвенную регуляцию с помощью варьирования минерального и гормонального состава питательной среды, можно добиться значительного повышения ССФС и индивидуальных фенольных соединений по сравне-

нию с растениями, выращенными в полевых условиях [30]. Наши ранние данные подтверждают результаты других исследований по положительному влиянию добавления в МС-среду БАП и ИУК на накопление фенольных соединений, в частности, флавоноидов [31].

Содержание той или иной группы первичных и вторичных метаболитов варьирует как *in vivo* и *in vitro*, так и между популяциями *in situ*. Так, Sanni с соавт. (2008) отмечают, что накопление сапонинов и алкалоидов в листьях растений базилика, собранных в ботаническом саду, высокое, тогда как флавоноидов, терпенов, стероидов среднее, а танины и сахара присутствуют в следовых количествах [32]. Во время первичного фитохимического скрининга во всех опытных вариантах нами было доказано присутствие всех искомым групп веществ (танинов, флавоноидов, сапонинов, гликозидов, алкалоидов, полифенолов), что подтверждает данные других авторов [33–40].

В нашей работе впервые было изучено влияние НЧ феррата цинка на рост биомассы каллуса различных сортов *O. basilicum*. Основываясь на полученных данных, для увеличения сырой биомассы и получения наибольшего индекса роста можно рекомендовать добавление в МС-среду 25 мкг/л НЧ феррата цинка. При этом увеличение концентрации НЧ приводило к снижению основных морфометрических показателей каллусной культуры. Механизм подобного действия НЧ феррата цинка еще нуждается в дополнительном изучении.

Результаты исследования подтверждают выдвинутую разными авторами гипотезу о способности микрорастений и каллусных клеток базилика накапливать основные первичные и вторичные метаболиты, а также возможность управления этим процессом с помощью биологических (минеральный и гормональный состав питательной среды) и физических (наночастицы) элиситоров.

Работа выполнена в рамках тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева” по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета в 2023 г., а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-746 от 13 мая 2022 г. (внутренний номер МК-3084.2022.1.4) о предоставлении гранта в виде субсидии из федерального бюджета Российской Федерации в рамках гранта Президента Российской Федерации на государственную поддержку молодых российских ученых — кандидатов наук, докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Flora Online (WFO). <http://www.worldfloraonline.org> (дата обращения 29.08.2023).
2. Севрук И.А., Писарев Д.И., Новиков О.О., Алексеева К.А., Малютина А.Ю. Исследование состава эфирного масла базилика обыкновенного — *Ocimum basilicum* L. флоры Белгородской области // Научные результаты биомедицинских исследований. 2015. Т. 1. № 3. С. 97. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2015-1-3-97-103>
3. Писарев Д.И., Алексеева К.А., Новиков О.О., Корниенко И.В., Севрук И.А. Химическое изучение состава антоцианов травы *Ocimum basilicum* L. // Научные результаты биомедицинских исследований. 2015. Т. 1. № 4. С. 119. <https://doi.org/10.18413/2313-8955-2015-1-4-119-124>
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
5. Aiyegoro O.A., Okoh A.I. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC // *BMC Complemen. Altern. Med.* 2010. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-21>
6. Baghel P.S., Ray S. Preliminary phytochemical screening of certain aphrodisiac plants used in traditional system of medicine // *Int. J. Botany Stud.* 2017. V. 2. P. 33.
7. Sreevidya N., Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials // *J. AOAC Int.* 2003. V. 86. P. 1124. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.6.1124>
8. Obianime A.W., Uche F.I. The phytochemical screening and effects of methanolic extract of *Phyllanthus amarus* leaf on the biochemical parameters of male guinea pigs // *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 2008. V. 12. P. 73. <https://doi.org/10.4314/jasem.v11i4.55199>
9. Ruthiran P., Selvaraj C.I. Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of *Parkia timoriana* (DC.) Merr. // *Res. J. Biotech.* 2017. V. 12. P. 47.
10. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // *Am. J. Enol. Vitic.* 1965. V. 16. P. 144. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
11. Запроматов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. М.: Наука, 1971. С. 185.
12. Chang C., Yang M., Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods // *J. Food Drug Anal.* 2002. V. 10. P. 178. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
13. Stanojević L., Stanković M., Nikolić V., Nikolić L., Ristić D., Čanadanovic-Brunet J., Tumbas V. Antioxidant activity

- and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts // *Sensors*. 2009. V. 9. P. 5702. <https://doi.org/10.3390/s90705702>
14. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 350 с.
 15. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. Пушино: Пушкинский НЦ, 1994. С. 7.
 16. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
 17. Носов А.М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. С. 873.
 18. Носов А.М. Культура клеток высших растений — уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 837.
 19. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. V. 48. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
 20. Kumar D.R., Kumar S.A. Plant biotechnology: importance of plant tissue culture, applications and advantages // *Eur. Academic Res.* 2015. V. III. Iss. 6. P. 6134.
 21. Siddique I., Anis M. An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. // *Acta Physiol. Plant.* 2008. V. 30. P. 493. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0146-6>
 22. Shahzad A., Faisal M., Ahmad N., Anis M., Alatar A., Hend A.A. An efficient system for *in vitro* multiplication of *Ocimum basilicum* through node culture // *Afr. J. Biotechnol.* 2012. V. 11. P. 6055. <https://doi.org/10.5897/AJB12.154>
 23. Verma S.K., Sahin G., Das A.K., Gurel E. *In vitro* plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. P. 20. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9739-0>
 24. Dode L.B., Bobrowski V.L., Bolacel Braga E.J., Kömmling Seixas F., Wulff Schuch M. *In vitro* propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) // *Acta Sci. Biol. Sci.* 2003. V. 25. P. 435.
 25. Begum F., Amin M.N., Azad M.A.K. *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. // *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 2002. V. 12. P. 27.
 26. González-Sánchez M.I., Lee P.T., Guy R.H., Compton R.G. *In situ* detection of salicylate in *Ocimum basilicum* plant leaves via reverse iontophoresis // *Chem. Commun.* 2015. V. 51. P. 16534. <https://doi.org/10.1039/C5CC06909B>
 27. Тужикова М.О. Оценка роста каллусной культуры базилика обыкновенного // Актуальные проблемы биомедицины — 2021: Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. Санкт-Петербург, 2021. С. 287.
 28. Bhuvaneshwari K., Sathya B., Gokulanathan A., Jayanthi M., Girija S. Induction of *in vitro* roots from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. and *O. tenuiflorum* L. // *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 2012. V. 13. P. 15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.136>
 29. Jiang X., Liu Y., Li W., Zhao L., Meng F., Wang Y., Tan H., Yang H., Wei C., Wan X., Gao L. Tissue-specific, development-dependent phenolic compounds accumulation profile and gene expression pattern in tea plant [*Camellia sinensis*] // *PLoS ONE*. 2013. V. 8: e62315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062315>
 30. Bhuvaneshwari K., Gokulanathan A., Jayanthi M., Govindasamy V., Milella L., Lee S., Yang D.C., Girija S. Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites? // *Food Chem.* 2016. V. 194. P. 55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.136>
 31. Nazir M., Tungmunthum D., Bose S., Drouet S., Garros L., Giglioli-Guivarc'h N., Abbasi B.H., Hano C. Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct *in vitro* antioxidant activities and *in vivo* protective effects against UV stress // *J. Agric Food Chem.* 2019. V. 67. P. 1847. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05647>
 32. Sanni S., Onyeyili P.A., Sanni F.S. Phytochemical analysis, elemental determination and some *in vitro* antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. leaf extracts // *Res. J. Phytochem.* 2008. V. 2. P. 77.
 33. Khair-ul-Bariyah S., Ahmed D., Ikram M. *Ocimum basilicum*: a review on phytochemical and pharmacological studies // *Pak. J. Chem.* 2012. V. 2. P. 78. <https://doi.org/10.15228/2012.v02.i02.p05>
 34. El-Beshbishy H.A., Bahashwan S.A. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an *in vitro* study // *Toxicol. Ind. Health.* 2012. V. 28. P. 42. <https://doi.org/10.1177/0748233711403193>
 35. Akoto C.O., Acheampong A., Boakye Y.D., Naazo A.A., Adomah D.H. Anti-inflammatory, antioxidant, and anthelmintic activities of *Ocimum basilicum* (Sweet Basil) fruits // *J. Chem.* 2020. V. 2020: 2153534. <https://doi.org/10.1155/2020/2153534>
 36. Marwat S.K., Khan M.S., Ghulam S., Anwar N., Mustafa G., Usman K. Phytochemical constituents and pharmacological activities of sweet Basil-*Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) // *Asian J. Chem.* 2011. V. 23. P. 3773.
 37. Rubab S., Hussain I., Khan B.A., Unar A.A., Abbas K.A., Khichi Z.H., Khan M., Khan M., Rehman K.U., Khan H. Biomedical description of *Ocimum basilicum* L. // *J. Islamic Int. Med. Coll.* 2017. V. 12. P. 59.
 38. Shahrajabian M.H., Sun W., Cheng Q. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review // *Int. J. Food Prop.* 2020. V. 23. P. 1961. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
 39. Lang E., Amelunxen F., Friedrich H., Horster H. Morphometrische Untersuchungen zur Bildung und Akkumulation von Laminaceengerbstoffen in *Ocimum basilicum* Zellkulturen // *Planta-Med.* 1978. V. 33. P. 281.
 40. Ambreen M., Mirza S.A. Evaluation of anti-inflammatory and wound healing potential of tannins isolated from leaf callus cultures of *Achyranthes aspera* and *Ocimum basilicum* // *Pak. J. Pharm. Sci.* 2020. V. 33. P. 361. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1524828>