

УДК 633.522 : 58.085

ІНДУКЦІЯ КАЛУСОГЕНЕЗУ В ТЕХНІЧНИХ (ПРОМИСЛОВИХ) КОНОПЕЛЬ В УМОВАХ IN VITRO

Міщенко С.В., кандидат сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник

ІНСТИТУТ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР НААН

Розроблено окремі елементи методики введення конопель в культуру in vitro. Найкращим варіантом для індукції калусогенезу у технічних (промислових) конопель серед досліджуваних генотипів в умовах in vitro є середовище Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 або 0,3 мг/л 2,4-D, 0,3 мг/л KIN, 0,5 мг/л GA3, вітамінів B1, B6, C і 30 г/л сахарози. У даному варіанті частота калусогенезу становила 88,5–100,0%, утворення калусів зеленого кольору з меристематичними зонами спостерігали у 73,1–76,5% гіпокотильних сегментів, а в поодиноких випадках відбувався й органогенез (утворення пагонів).

У селекційно-генетичній роботі з технічними (промисловими) коноплями (*Cannabis sativa* L.) все більш затребуваним стає застосування біотехнологічних методів для отримання принципово нового вихідного матеріалу. Отримання калусних тканин (культур) з подальшою регенерацією пагонів, що будуть характеризуватись соматклональною мінливістю, та мікроклональним розмноженням є альтернативою традиційним методам селекції конопель з відсутністю психотропних властивостей. Рослини однодомних конопель селекційних сортів середньоросійського еколого-географічного типу є недостатньо чутливими до культури ізольованих тканин *in vitro*, тому актуальність розробки способів отримання первинного калусу конопель, здатного до новоутворень, не викликає сумнівів.

Для росту і диференціації будь-яких рослинних тканин і клітин при культивуванні їх на штучних живильних середовищах необхідна наявність екзогенних стимуляторів росту. Без додавання до живильного середовища стимулюючих речовин в культурі здатні рости тільки пухлинні і камбіальні тканини обмеженої кількості видів рослин, однак, при тривалому культивуванні вони також потребують додавання до живильного середовища стимуляторів росту. До таких речовин, які стимулюють ріст ізольованих тканин, належать фітогормони: ауксини, цитокініни та гібереліни. Найчастіше необхідні ауксини і цитокініни. Оскільки різні клітини і тканини в культурі *in vitro* відрізняються за здатністю до автономного синтезу і метаболізму окремих груп фітогормонів, то у зв'язку з цим їхній

ріст у різній мірі й залежить від забезпечення екзогенними регуляторами росту певної концентрації та співвідношення [1].

У науковій літературі описана проста, ефективна і одностадійна схема швидкої проліферації пагонів і вкорінення *in vitro* вузлових експлантів конопель з використанням мета-тополіна (mT), який належить до групи цитокінінів. Максимальну кількість пагонів з найбільшою довжиною було отримано у варіанті з використанням середовища Мурасіге і Скуга, доповненого 2 мкМ. За 4–6 тижнів коренева система нормально розвивалась, і окреме середовище для індукції ризогенезу, яке містило б ауксин, було не потрібним. При цьому генетична ідентичність мікроклонів відносно вихідного матеріалу була перевірена і підтверджена шляхом використання молекулярних маркерів [2].

Також висока частота регенерації пагонів конопель *in vitro* з вузлових сегментів з бічними меристемами була досягнута при використанні середовища Мурасіге і Скуга, що містило 0,05–5,0 мкМ тидіазурона (TDZ). Кількість і якість регенерантів були кращі у варіанті з 0,5 мкМ TDZ, порівняно з бензиладеніном (BA) чи кінетином (KIN). У той же час додавання у зазначений варіант середовища 7,0 мкМ гіберелової кислоти (GA_3) невеликою мірою збільшувало ріст пагонів. Високу частоту утворення коренів (у 95 % експлантів) отримано при використанні середовища Мурасіге і Скуга з половинною дозою елементів, доповненого 5,0 г/л активованого вугілля і 2,5 мкМ індол-3-масляної кислоти (IBA). Укорінені таким способом рослини успішно акліматизували *in vivo* [3].

У інших дослідженнях мікроклони конопель (отримані з апікальних меристем) мали найдовші стебла за умови культивування на середовищі з TDZ (0,1 мг/л) і GA_3 (2,5 мг/л); найбільшу біомасу на середовищі з 0,1 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти (NAA) і 0,1 мг/л TDZ або 0,1 мг/л NAA і 0,4 мг/л 6-бензиламінопурину (BAP); найбільшу кількість вузлів на безгормональному середовищі; найвищу життєздатність пагонів і найбільшу кількість коренів на безгормональному середовищі або з mT (0,5 мг/л) [4].

Вважається, що подальших досліджень потребує питання мікроклонального розмноження конопель *in vitro* саме волокнистого (безнаркотичного) типу, оскільки під час його здійснення виникають певні складнощі [5]. Примітно, що калусні тканини і культура суспензії клітин канабіноїдів не утворюють [5].

Щодо залежності інтенсивності калусогенезу і подальшого органогенезу від типу експланта і генотипу конопель існують протиріччя. За результатами одних досліджень значних відмінностей в індукції калусоутворення між досліджуваними сортами і експлантами (частинами сім'ядолів, стебла, коренів) не було виявлено, однак, калус, отриманий з різних генотипів конопель, мав різну здатність до органогенезу і регенерації рослин [6]; за результатами інших досліджень встановлено залежність частоти калусоутворення від генотипу сорту та типу експланта, зокрема найбільша кількість пагонів утворилась із калусної тканини черешків на середовищі з 3,6–дихлор–2–метоксибензойною кислотою (DICAMBA) [7].

Визначено, що для індукції утворення калуса найбільш ефективним співвідношенням «ауксин:цитокінін» на прикладі 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти (2,4-D) і KIN є 2:1, 2:2, 2:3 і 3:2 мкМ [8]. TDZ у середовищі Мурасіге і

Скуга виявився більш ефективним *in vitro* при індукції утворення пагонів із сім'ядолей, порівняно з ВА і зеатином (ZT). Найкращий варіант (частота органогенезу 51,7 %, кількість пагонів на один експлант 3,0 шт.) був зафіксований під час культивування на середовищі, яке містило 0,04 мг/л TDZ і 0,02 мг/л NAA. В умовах *in vitro* пагони досягли висоти 1,5–2,0 см через 3–4 тижні від початку культивування. Близько 80 % пагонів добре укорінилися у середовищі Мурасіге і Скуга з половинною дозою елементів і включенням 0,05–0,2 мг/л IBA. Більш високу частоту регенерації давали молоді сім'ядолі, порівняно з більш старими, а ефективність регенерації залежала від генотипу вихідного матеріалу [9].

У цілому, технології культури тканин конопель дуже різноманітні, вони активно розвиваються і мають широкий спектр застосування [10].

Матеріал і методи дослідження. У дослідженнях використано сучасні сорти технічних (промислових) конопель Гляна, Глесія, Артеміда і Глухівські 51 з відсутністю психотропних властивостей. Досліджено придатність вирощування конопель *in vitro* на середовищах [11–13]. Простерилізоване насіння культивували на середовищі Мурасіге і Скуга при фотоперіоді 16 год, відносній вологості повітря 60–80% і температурі 23–25°C. З молодих пагонів брали сегменти різних органів для індукції калусогенезу під впливом екзогенних регуляторів росту. Досліджено вплив на активність утворення первинного калусу і подальшу його регенерацію різні концентрації та співвідношення наступних фітогормонів: NAA, IAA, 2,4-D, KIN, BAP, GA₃. Частина методики була, власне, предметом наукового пошуку, тому буде описана в результатах досліджень.

Результати досліджень. Досліджено ефективність використання доступних нам різних хімічних речовин – стерилізуючих агентів для насіння конопель: етанолу 70% (C₂H₅OH); хлоргексидин біглюконату 0,02% (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀); гідроген перекису 3% (H₂O₂); гідроген перекису 3% (H₂O₂) + калій перманганату слабкий рожевий розчин (KMnO₄); натрій гіпохлориту від 1 до 6% (NaOCl). Експозиція варіювала від 1 до 30 хв. Промивання проводили 3-х разове стерильною дистильованою водою. Установлено, що розчин етанолу 70% вже за 1–1,5 хв спричиняв загибель зародка у 100 % насінин, тому виявився непридатним для стерилізації насіння конопель. Хлоргексидин біглюконат, гідроген перекис та калій перманганат виявили слабку стерилізуючу дію, бактеріальна інфекція зазвичай була відсутня, але здебільшого спостерігався розвиток у пробірках грибкових організмів. Гідроген перекис викликав розтріскування оболонки насінин. Натрій гіпохлорит концентрацією 1,5% за експозиції 12,5–15 хв виявився найбільш придатним для застосування. За таких умов можна отримати 93,0–100,0% стерильних насінин (проростків) і 97,5–100,0% стерильних бутонів чоловічих квіток чи пиляків (у останньому випадку експозиція становить 7,5–10 хв). Вищі концентрації і експозиції зазначеної хімічної сполуки є інгібіторами розвитку зародка насінини, пригнічують ріст проростка та викликають шкідливі мутації.

Найкращим середовищем для мікроклонального розмноження безнаркотичних однодомних конопель в умовах *in vitro* (на прикладі сорту Гляна) є середовище Мурасіге і Скуга або Гамборга і Евелєга, що містить сахарозу або глюкозу у концентрації 10 г/л (може бути збільшена до 15 г/л).

Не обов'язковим є додавання нікотинової кислоти (вітаміну РР). Середовище Уайта та подвоєні дози вітамінів і мікроелементів пригнічували ріст і розвиток регенерантів. Введення у живильне середовище аскорбінової кислоти (вітаміну С), як антиоксиданта, з концентрацією 5–30 мг/л в умовах *in vitro* сприяло зменшенню накопичення канабіноїдних сполук та тенденції до інтенсивного росту і розвитку, зміни окремих ознак.

Найкращий ріст пагонів відмічено із латеральних меристем живців конопель (рис. 1). Із пазух сім'ядольних листків росту пагонів здебільшого не було, а апікальні меристеми часто давали менш активний ріст, порівняно з латеральними, іноді вели до початку цвітіння. Кількість життєздатних клонів становила 98,4% (у середньому можна отримати 5 регенерантів з одного проростка за 1 пасаж). Через 1 місяць після живцювання кількість рослин з добре розвинутою кореневою системою становила 68,4 %, їх довжина складала у середньому 9,44–9,87 см, кількість міжвузлів – 4,5–5,6 шт. Через 1,5 місяці довжина рослин і кількість міжвузлів стали відповідно 12,50–13,11 см і 6,3–7,5 шт. Показники морфологічних ознак рослин з відсутністю коренів були приблизно вдвічі меншими. Можливість мікроклонального розмноження конопель в культурі *in vitro* досліджено до 3-го пасажу. Відмічено, що у певної частини регенерантів з відсутністю коренів при наступних пасажах все ж таки може проходити ризогенез, у деяких генотипів цьому сприяє додавання до середовища IAA у низьких концентраціях. Успішного розмноження при 3-му пасажі не отримано, оскільки пагони характеризувались слабким ростом і майже у всіх відмічали цвітіння (при 2-му пасажі цвітіння рослин було лише в окремих пробірках). У подальшому доцільним є дослідження зміни фотоперіоду на ріст і розвиток конопель в умовах *in vitro*. Мікроклони задовільно проходять адаптацію *in vivo*.

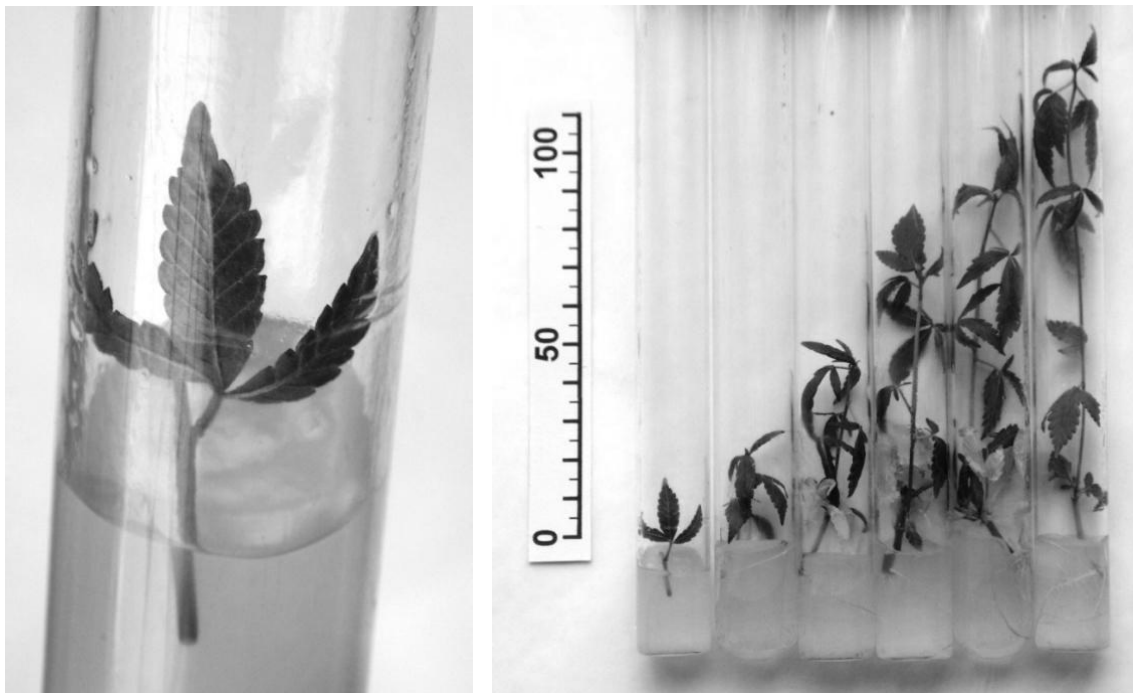


Рис. 1 – Ріст мікроклонів конопель *in vitro*

Для індукції калусогенезу також придатним є середовище Мурасіге і Скуга з додаванням сахарози чи глюкози у концентрації 30 г/л. У ролі експлантів для індукції калусогенезу використовували різні частини пагонів: сегменти гіпокотилія, епикотилія, стебла, черешків, листків, пиляків тощо. Найбільш інтенсивне формування калусної тканини відмічено на частинах гіпокотилія (рис. 2). На пиляках частота й інтенсивність калусогенезу була значно нижчою, порівняно з гіпокотильними сегментами, але окремі експланти утворювали продуктивну зелену щільну калусну масу зернистої структури з меристематичними зонами. Спостереження показують чітку залежність інтенсивності калусогенезу від генотипу (сорту) конопель. Досліджувані 4 сорти за інтенсивністю вказаного явища можна ранжувати у порядку спадання наступним чином: 1) Гляна; 2) Артеміда; 3) Глесія; 4) Глухівські 51.

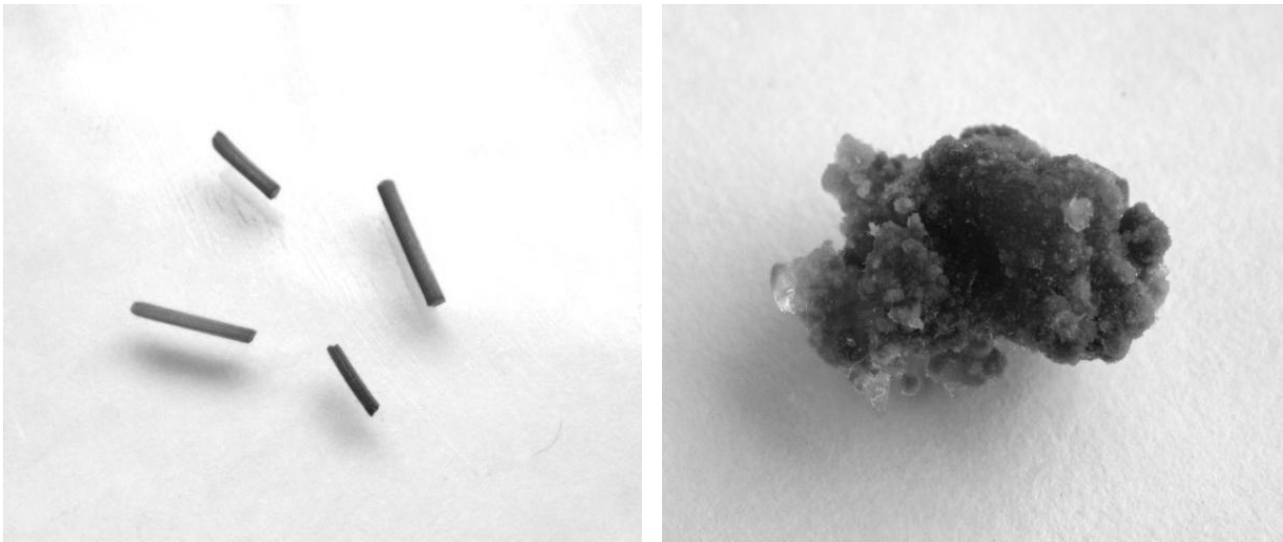


Рис. 2 – Гіпокотильні сегменти конопель та калус, утворений на них

Установлено, що найкраще поєднуються ауксини NAA або IAA з цитокініном BAP, ауксин 2,4-D з цитокініном KIN. У середовищах, що містили IAA (від 0,3 мг/л і вище) або NAA (від 0,5 мг/л і вище), на частинах гіпокотилія спостерігається значний ризогенез, а калус утворюється слабо. У середовищах з BAP має місце надзвичайно інтенсивний калусогенез, але калус характеризується блідо-жовтим і світло-коричневим забарвленням без меристематичних зон. Гранично високою концентрацією KIN є 0,75 мг/л, а BAP – 2,0 мг/л. GA₃ у цілому сприяє інтенсивному росту калусних клітин. Регенерувати калус при наступних пасажах можна при зменшеній концентрації фітогормонів у 10 разів, або лише при наявності в складі середовища BAP чи KIN без ауксинів (табл.).

Таблиця – Вплив фітогормонів на калусоутворення у технічних (промислових) конопель

№ середовища	Фітогормональний склад середовища			Інтенсивність калусогенезу	Кількість калусів зеленого кольору з меристематичними зонами, %	Наявність органогенезу
	ауксини	цитокініни	гібереліни			
1.	0,05 мг/л 2,4-D	0,30 мг/л KIN	0,50 г/л GA ₃	3	70,0	–
2.	0,05 мг/л 2,4-D	0,30 KIN, 1,00 мг/л BAP		2	63,3	–
3.	0,10 мг/л 2,4-D	0,50 мг/л KIN		3	70,0	–
4.	0,10 мг/л 2,4-D	1,00 мг/л KIN		2	26,7	–
5.	0,10 мг/л 2,4-D	0,75 мг/л BAP		2	53,1	–
6.	0,25 мг/л 2,4-D	1,00 мг/л BAP		2	53,1	–
7.	0,30 мг/л 2,4-D	0,30 мг/л KIN	0,30 г/л GA ₃	3	73,1	+
8.	0,50 мг/л 2,4-D	0,30 мг/л KIN	0,50 г/л GA ₃	3	76,5	+
9.	0,50 мг/л 2,4-D	0,75 мг/л KIN	0,50 г/л GA ₃	3	66,7	–
10.	0,60 мг/л 2,4-D	0,60 мг/л BAP		1	30,0	–
11.	0,75 мг/л 2,4-D	1,00 мг/л KIN	0,75 г/л GA ₃	1	25,0	–
12.	1,00 мг/л 2,4-D	0,30 мг/л KIN	0,50 г/л GA ₃	1	20,0	–
13.	0,05 мг/л NAA	0,50 мг/л BAP		2	68,8	–
14.	0,05 мг/л NAA	1,00 мг/л BAP		3	71,9	–
15.	0,05 мг/л NAA	1,50 мг/л BAP		3	71,9	–
16.	0,05 мг/л NAA	2,00 мг/л BAP		2	68,8	–
17.	0,05 мг/л NAA	1,00 мг/л KIN		1	34,4	–
18.	0,50 мг/л NAA	1,00 мг/л BAP		2	69,2	–
19.	0,25 NAA, 0,20 мг/л IAA	2,00 мг/л BAP		2	73,3	–
20.	0,20 NAA, 0,25 мг/л IAA	1,50 мг/л BAP		2	73,3	–
21.	0,25 NAA, 0,50 мг/л IAA	1,00 мг/л KIN		1	40,0	–
22.	0,50 NAA, 0,30 мг/л IAA	0,50 мг/л BAP		2	55,6	–
23.	0,50 NAA, 0,30 мг/л IAA	1,00 мг/л BAP		2	66,7	–
24.	0,30 мг/л IAA	0,30 мг/л KIN		2	46,9	–
25.	0,30 мг/л IAA	1,50 мг/л BAP		2	46,7	–
26.	0,50 мг/л IAA	1,00 мг/л BAP		2	41,7	–
27.	1,50 мг/л IAA	0,50 мг/л KIN		1	16,7	–
28.	2,00 мг/л IAA	1,00 мг/л BAP		1	10,0	–
29.		0,50 мг/л KIN		2	53,1	–
30.		0,75 мг/л KIN		1	46,9	–
31.		0,50 мг/л BAP		1	46,9	–
32.		1,00 мг/л BAP		2	66,7	–
33.		1,50 мг/л BAP		2	66,7	–
34.		2,00 мг/л BAP		2	53,1	–
35.		2,50 мг/л BAP		1	10,0	–

Примітка. Інтенсивність калусоутворення: 3 – сильне, 2 – середнє, 1 – слабке; наявність органогенезу: + – наявний, – – відсутній.

На середовищах з включенням 0,05 мг/л NAA і 1,0 або 1,5 мг/л ВАР утворення калусу проходило досить інтенсивно, але пагони не утворювались. Найкращим варіантом для індукції калусогенезу за нашими даними виявилось середовище Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 або 0,3 мг/л 2,4-D, 0,3 мг/л KIN, 0,5 мг/л GA₃, вітамінів B₁, B₆, C і 30 г/л сахарози. У даному варіанті частота калусогенезу становила 88,5–100,0%, утворення калусів зеленого кольору з меристематичними зонами спостерігали у 73,1–76,5% гіпокотильних сегментів, а в поодиноких випадках відбувався й органогенез (утворення пагонів). У цілому, утворення пагонів з калусних тканин безнаркотичних сортів технічних (промислових) конопель в умовах *in vitro* ускладнене.

Висновки. Для індукції калусогенезу у технічних (промислових) конопель серед досліджуваних генотипів в умовах *in vitro* найкращим варіантом є середовище Мурасіге і Скуга з додаванням 0,5 або 0,3 мг/л 2,4-D, 0,3 мг/л KIN, 0,5 мг/л GA₃, вітамінів B₁, B₆, C і 30 г/л сахарози. У даному варіанті частота калусогенезу становила 88,5–100,0%, утворення калусів зеленого кольору з меристематичними зонами спостерігали у 73,1–76,5% гіпокотильних сегментів, а в поодиноких випадках відбувався й органогенез (утворення пагонів).

Список використаної літератури

1. **Мусієнко М. М., Панюта О. О.** Біотехнологія рослин. Київ, 2005. 114 с.
2. **Lata H., Chandra S., Techen N. et al.** *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2016. Vol. 3, Iss. 1. P. 18–26. DOI: 10.1016/j.jarmap.2015.12.001
3. **Lata H., Chandra S., Khan I. et al.** Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2009. Vol. 45, Iss. 1. P. 12–19. DOI: 10.1007/s11627-008-9167-5
4. **Grulichova M., Mendel P., Lalge A. B. et al.** Effect of different phytohormones on growth and development of micropropagated *Cannabis sativa* L. *MendelNet 2017: Proceedings of 24th International PhD Students Conference (November 8 and 9, 2017, Brno, Czech Republic)*. P. 618–623.
5. **Wróbel T., Dreger M., Wielgus K. et al.** The application of plant *in vitro* cultures in cannabinoid production. *Biotechnology Letters*. 2018. Vol. 40, Iss. 3. P. 445–454. DOI: 10.1007/s10529-017-2492-1
6. **Wielgus K., Luwanska A., Lassocinski W. et al.** Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*. 2008. Vol. 5, Iss. 3. P. 199–207. DOI: 10.1080/15440470801976045
7. **Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z.** Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*. 2005. Vol. 47, Iss. 2. P. 145–151.
8. **Thacker X., Thomas K., Fuller M. et al.** Determination of optimal hormone and mineral salts levels in tissue culture media for callus induction and growth of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Agricultural Sciences*. 2018. Vol. 09, Iss. 10. P. 1250–1268.

DOI: 10.4236/as.2018.910088

9. **Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z. et al.** *A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (Cannabis sativa L.). Industrial Crops and Products.* 2016. Vol. 83. P. 61–65. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.035

10. **Zwenger S. R.** *The biotechnology of Cannabis sativa.* New York, 2014. 249 p.

11. **Murashige T., Skoog F.** *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.* *Physiologia Plantarum.* 1962. Vol. 15, Iss. 3. P. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

12. **Gamborg O. L., Eveleigh D. E.** *Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley.* *Canadian Journal of Biochemistry.* 1968. Vol. 46, Iss. 5. P. 417–421.

13. **White P. R.** *A handbook of plant tissue culture.* New York, 1943. 277 p.

INDUCTION OF CALUSOGENESIS IN A TECHNICAL (INDUSTRIAL) HEMP IN *IN VITRO*

Mishchenko S.V.

Separate elements of a technique for introducing hemp into an in vitro culture have been developed. The best option for inducing calusogenesis in technical (industrial) hemp among the studied genotypes in vitro is Murashige and Skoog medium with the addition of 0,5 or 0,3 mg/l 2,4-D, 0,3 mg/l KIN, 0,5 mg/l GA₃, vitamins B₁, B₆, C and 30 g/l sucrose. In this embodiment, the frequency of calusogenesis was 88,5–100%, the formation of green callus with meristematic zones was observed in 73,1–76,5% of the hypocotyl segments, and in some cases organogenesis (shoot formation) also occurred.

ИНДУКЦИЯ КАЛУСОГЕНЕЗА У ТЕХНИЧЕСКОЙ (ПРОМЫШЛЕННОЙ) КОНОПЛИ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Мищенко С.В.

Разработаны отдельные элементы методики введения конопли в культуру in vitro. Лучшим вариантом для индукции калусогенеза в технической (промышленной) конопли среди исследуемых генотипов в условиях in vitro является среда Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 или 0,3 мг/л 2,4-D, 0,3 мг/л KIN, 0,5 мг/л GA₃, витаминов B₁, B₆, C и 30 г/л сахарозы. В данном варианте частота калусогенез составила 88,5–100%, образование каллуса зеленого цвета с меристематическими зонами наблюдали в 73,1–76,5% гипокотильных сегментов, а в отдельных случаях происходил и органогенез (образование побегов).