

Julia Wilk^{1*}, Iga Kordeusz¹, Zuzanna Dudek¹, Klaudia Gilowska¹, Wiktoria Pacuła¹, Radosław Pudelko¹, Anna Szczotka¹, Sabina Gałka²

¹Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej,

²Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu,

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

*E- mail autora korespondencyjnego: s87177@365.sum.edu.pl

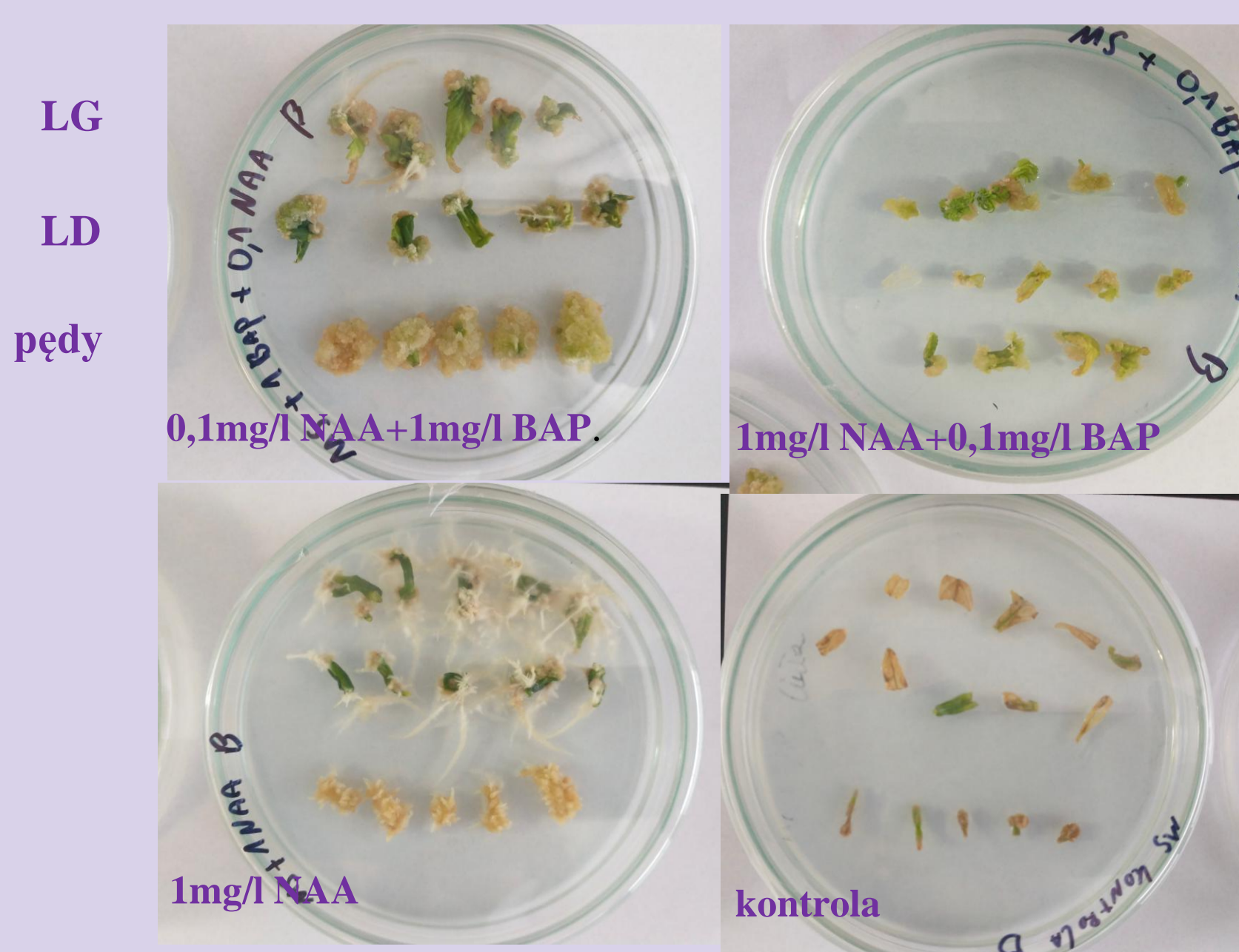
W ostatnich latach zaobserwowano dynamiczny wzrost zapotrzebowania na preparaty z Konopi siewnych (*Cannabis sativa* L.), co pociąga za sobą intensyfikację badań nad produkcją i izolacją ich bioaktywnych składników. Rosnące zainteresowanie tą rośliną wynika z jej szerokiego zastosowania m.in. w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym. Jednocześnie rośnie potrzeba opracowania skutecznych metod zwiększenia ilości oraz poprawy jakości biomasy roślinnej, między innymi poprzez prowadzenie organogenezy konopi w kulturach *in vitro* [1,2,3].

W odpowiedzi na te potrzeby przeprowadzono doświadczenie mające na celu ocenę wpływu rodzaju eksplantatu (liść, łodyga), orientacji wyłożenia blaszki liściowej (górną stroną blaszki liściowej do góry- LG lub górną stroną blaszki liściowej do dołu- LD) oraz regulatorów wzrostu takich jak: kwasu naftylooctowego (NAA), 6-benzylaminopuryny (BAP) oraz kinetyny na proces organogenezy u *Cannabis sativa* odmiany Białobrzaska.

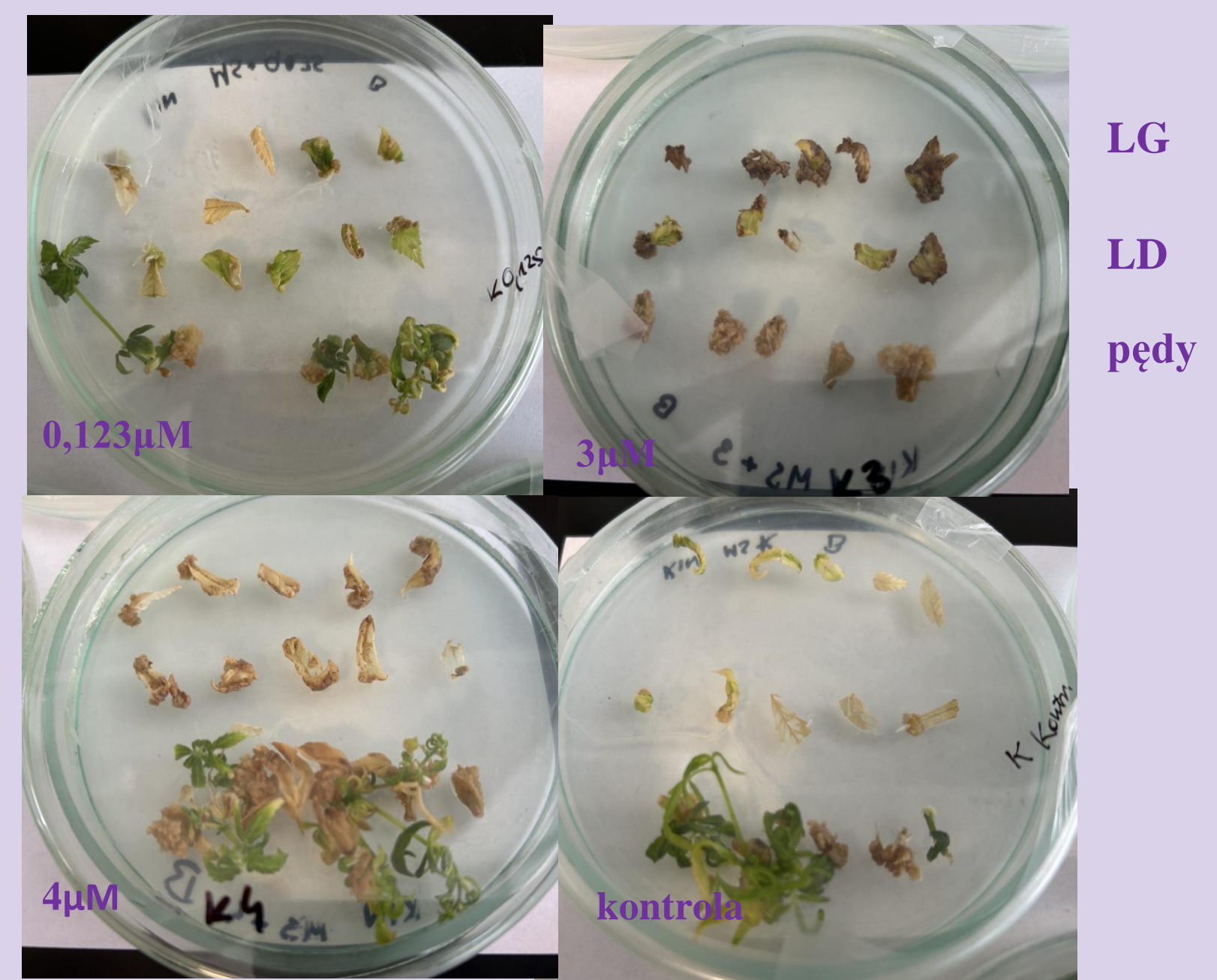
W pierwszym etapie eksperymentu wykonano sterylizację nasion, z zastosowaniem etanolu i podchlorynu sodu (inkubacja przez 2 minuty), które następnie wysiano na pożywkę ½ MS. Po kilku tygodniach uzyskano kilkunastocentymetrowe siewki, z których pobrano najwyższe pędy oraz liście. Około 0,5x0,5cm eksplantaty liściowe (5szt. LG - górny rząd i 5szt. LD - środkowy rząd) oraz pędowe (5 szt. - dolny rząd) (Ryc. 1,2) wyłożono na pożywki MS zawierające NAA, BAP (0,1 lub 1mg/l) (Ryc. 1) lub kinetynę (0,125-4μM) (Ryc. 2) oraz na pożywkę kontrolną bez hormonów (Ryc. 1,2). Hodowle prowadzono w temperaturze 25 stopni C. w fotoperiodzie 16h/8h. Po 32 lub 37 dniach hodowli oceniono liczbę eksplantatów, na których wyrosły organy przybyszowe oraz świeżą masę powstałego kalusa (Ryc.1,2).

NAA jest syntetycznym analogiem auksyn, które odpowiadają głównie za elongację komórek, podziały komórkowe oraz inicjację korzeni. Stosowanie NAA sprzyja zatem tworzeniu kalusa i ukorzenieniu eksplantatów, a w niektórych przypadkach również wydłużeniu pędów. Z kolei **BAP** należy do grupy cytokinin, hormonów stymulujących tworzenie pędów, różnicowania tkanek oraz rozwój pąków bocznych. W wyższych stężeniach BAP może ograniczać wydłużanie pędów, przez co rośliny stają się coraz niższe i bardziej zwarte [1].

Kinetyna (N-6-furfuryladenina) była pierwszą odkrytą cytokininą, jako produkt degradacji DNA, który promował podział komórek u roślin. Ten naturalny hormon wzrostu u roślin nasila tempo podziałów komórkowych, indukuje redyferencjację kalusa w pąki przybyszowe, spowalnia starzenie się roślin. Kinetyna u ludzi pełni rolę obronną, np. w walce ze stresem oksydacyjnym i procesami starzenia się [2,3].



Ryc. 1. Organogeneza *Cannabis sativa* po 32 dniach hodowli *in vitro* na pożywkach MS z NAA i BAP oraz na pożywce kontrolnej



Ryc. 2. Organogeneza *Cannabis sativa* po 37 dniach hodowli *in vitro* na pożywkach MS z kinetyną oraz na pożywce kontrolnej

- Najintensywniejszy wzrost pędów przybyszowych zaobserwowano na 60% eksplantatów pędowych wyłożonych na pożywce MS z 1mg/l NAA+0,1mg/l BAP.
- Najczęstszą ryzogenezę uzyskano z eksplantatów liściowych (100%), niezależnie od ich orientacji wyłożenia, na pożywce MS z 1mg/l NAA oraz na wszystkich eksplantatach liściowych, jak i pędowych, na pożywce MS z 0,1mg/l NAA
- Kaulogeneza wystąpiła prawie we wszystkich przypadkach, a największe przyrosty, tj. średnio 0,7g z 1 eksplantatu pędowego i 0,38g z 1 eksplantatu liściowego LG uzyskano na pożywce zawierającej 0,1mg/l NAA+1mg/l BAP

- Najintensywniejszy wzrost pędów przybyszowych zaobserwowano na 80% eksplantatów pędowych wyłożonych na pożywce MS z 4μM kinetyny.
- Najczęstszą ryzogenezę zaobserwowano na eksplantatach pędowych (40%) i liściowych LG (40%) na pożywce MS z 0,125μM kinetyny.
- Kaulogeneza wystąpiła na wszystkich eksplantatach inkubowanych na pożywce MS z 3μM kinetyny ale jej najintensywniejszy wzrost (0,145g z 1 eksplantatu) uzyskano na LG na pożywce MS z 0,125μM tej cytokininy.

Podsumowując uzyskane wyniki wykazano, że rodzaj i stężenie zastosowanych regulatorów wzrostu, typ eksplantatu oraz orientacja wyłożenia blaszki liściowej w istotny sposób determinują kierunek organogenezy *Cannabis sativa*. Auksyna (NAA) sprzyjała indukcji wzrostu korzeni i kalusa, natomiast cytokininowe hormony (BAP i kinetyna) stymulowały rozwój pędów. Ostatecznie można stwierdzić, że drogą organogenezy w sterylnych kulturach *in vitro* można uzyskać liczne i wolne od patogenów organy przybyszowe i tkankę kalusową, które mogą być źródłem surowca konopnego do produkcji substancji farmaceutycznych, kosmetycznych, czy spożywczych.

[1] L. Burgel, J. Hartung, D. Schibano, i S. Graeff-Hönniger, „Impact of Different Phytohormones on Morphology, Yield and Cannabinoid Content of Cannabis sativa L.” *Plants* 2020, t. 9, nr 6, s. 725, doi: 10.3390/plants9060725

[2] J. Barciszewski, F. Massino, i B. F. C. Clark, „Kinetin—A multiactive molecule”, *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, t. 40, nr 3, s. 182–192, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.024

[3] Z. Bozsó, B. Barna, „Diverse Effect of Two Cytokinins, Kinetin and Benzyladenine, on Plant Development, Biotic Stress Tolerance, and Gene Expression”, *Life*, 2021 t. 11, nr 12, s. 1404, doi: 10.3390/life11121404.