



Zuzanna Dudek<sup>1</sup>, Klaudia Gilowska<sup>1</sup>, Julia Wilk<sup>1</sup>, Iga Kordeusz<sup>1</sup>, Wiktoria Pacuła<sup>1</sup>, Anna Szczotka<sup>1</sup>, Radosław Pudełko<sup>1</sup>, Sabina Gałka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej,

<sup>2</sup>Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

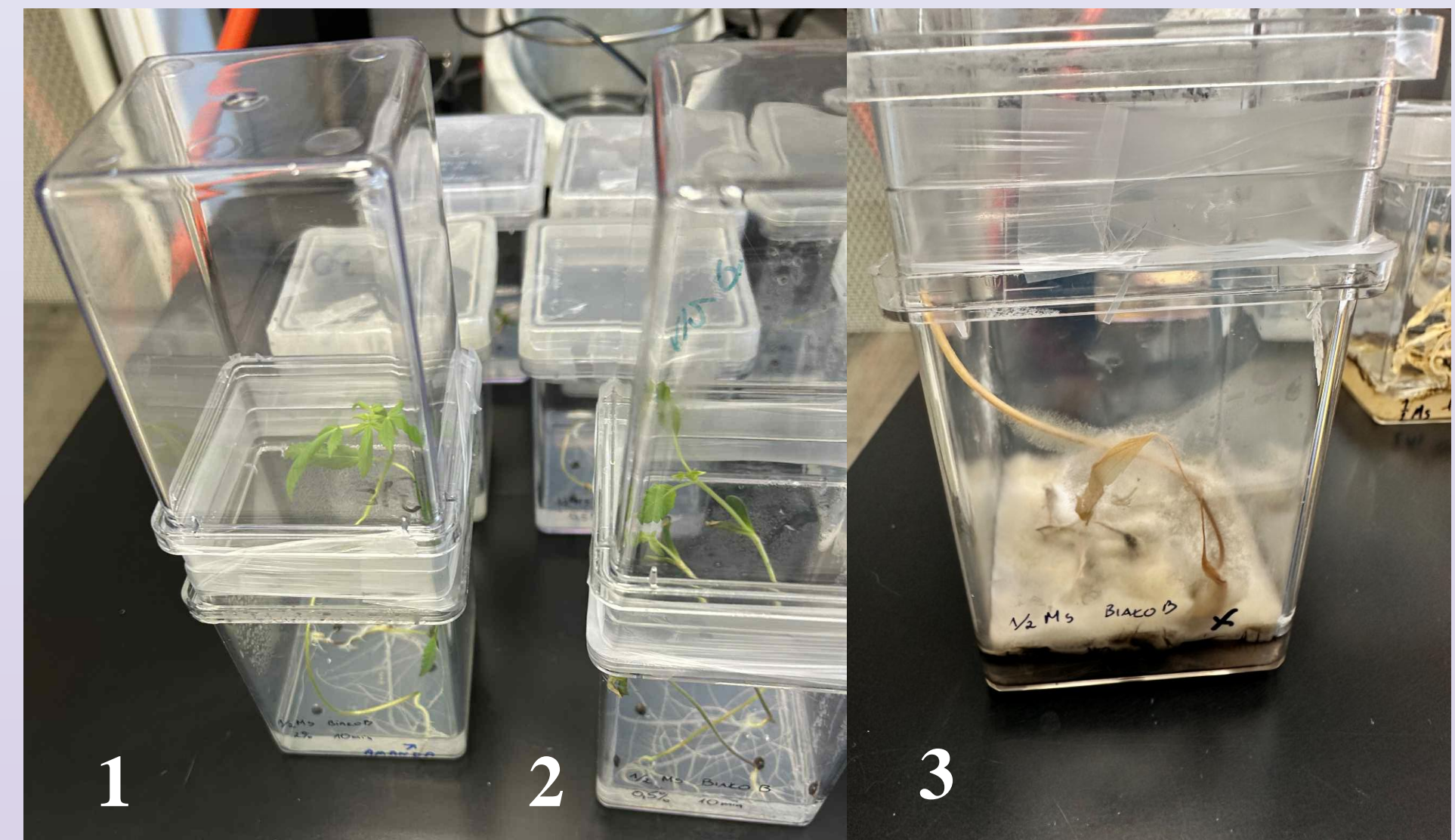
Mniej rygorystyczne wymagania prawne dotyczące uprawy i wykorzystania substancji izolowanych z konopi siewnych (*Cannabis sativa*) spowodowały duże zapotrzebowanie na preparaty konopne, a co za tym idzie nastąpił bardzo intensywny wzrost arealu upraw, liczby produkowanych leków, produktów spożywczych, kosmetycznych, odzieżowych, a także budowlanych z tych roślin.

W odpowiedzi na to rosnące zainteresowanie członkowie naszego Studenckiego Koła Naukowego przy Zakładzie Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej ŚUM zainicjowali i prowadzili hodowlę *in vitro* konopi siewnych (odmiana Białobrzaska), przy zastosowaniu różnych hormonów wzrostu, jako alternatywne źródło pozyskiwania biomasy roślinnej i związków konopnych (głównie kannabinoidów). Hodowla roślin w warunkach *in vitro* zapewnia kontrolowany i sterylny wzrost roślin, zarówno w skali laboratoryjnej, jak i na poziomie przemysłowym, a zastosowanie fitohormonów umożliwia intensyfikację przyrostu biomasy i metabolitów wtórnych.

W początkowym etapie hodowli konopi w warunkach *in vitro* przeprowadzono sterylizację nasion z zastosowaniem podchlorynu sodu w różnych jego stężeniach i czasach inkubacji (Tab. I). Wysterylizowane nasiona wysiano na pożywkę ½ MS w szczelnie zamkniętych pojemnikach (Ryc. 1) i przez 37 dni hodowlę prowadzono w fotoperiodzie, co kilka dni obserwując sterylność i siłę kiełkowania nasion (Tab. I, Ryc. 1).

Tab.I. Wpływ sterylizacji na sterylność i siłę kiełkowania nasion *Cannabis sativa*

| Dzień hodowli                 |                      | 7              |                 | 22             |                 | 37             |                 |
|-------------------------------|----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Stężenie podchlorynu sodu [%] | Czas inkubacji [min] | Sterylnosc [%] | Kiełkowanie [%] | Sterylnosc [%] | Kiełkowanie [%] | Sterylnosc [%] | Kiełkowanie [%] |
| 0,5                           | 1                    |                | 17              |                | 67              |                | 67              |
|                               | 10                   |                | 17              |                | 50              |                | 50              |
|                               | 20                   |                | 17              |                | 17              |                | 50              |
| 1                             | 1                    |                | 0               |                | 0               |                | 17              |
|                               | 10                   | 100            | 0               | 100            | 17              | 100            | 17              |
|                               | 20                   |                | 0               |                | 0               |                | 33              |
| 2                             | 1                    |                | 17              |                | 33              |                | 50              |
|                               | 10                   |                | 17              |                | 33              |                | 33              |
|                               | 20                   |                | 0               |                | 33              |                | 33              |
| 0                             | 20                   | 67             | 50              | 67             | -               | 67             | -               |



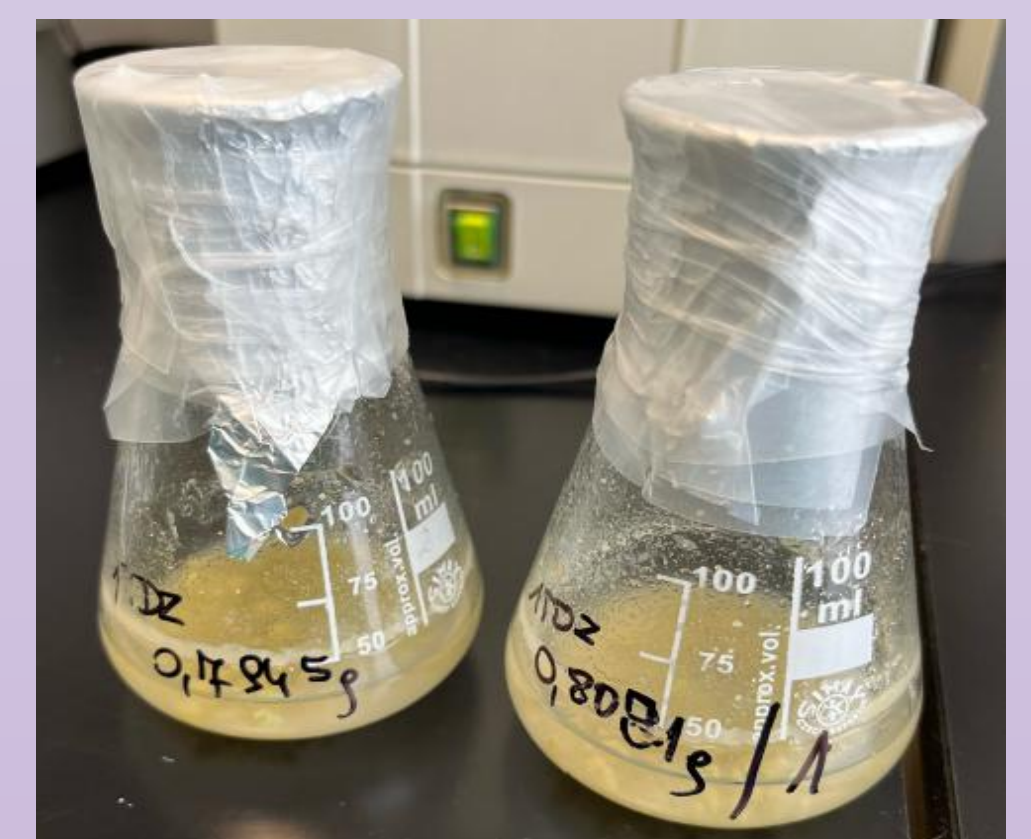
Ryc.1. *Cannabis sativa*: 1- sterylizacja 2% podchlorynu sodu, 10 minut, 2- sterylizacja 0,5% podchlorynu sodu, 10 minut, 3- infekcja nasion niesterylizowanych

Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że

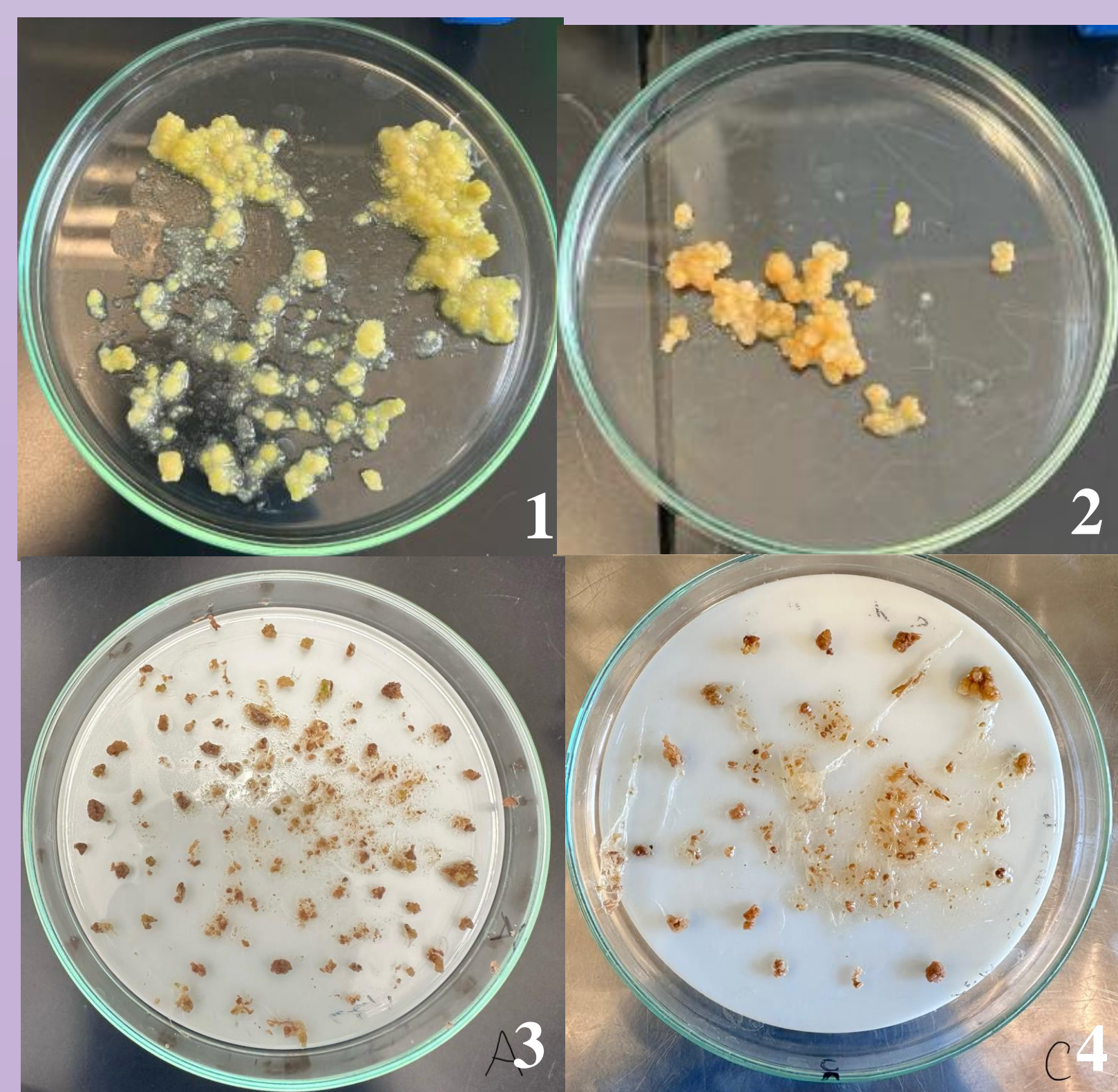
- Sterylizacja jest niezbędnym etapem inicjacji hodowli *in vitro*, ponieważ ponad połowa nasion nie poddanych sterylizacji uległa infekcji.
- Niezależnie od stężenia podchlorynu sodu i czasu inkubacji, wszystkie nasiona poddane sterylizacji nie uległy infekcji.
- Z drugiej strony sterylizacja obniża siłę i wydłuża czas kiełkowania nasion konopi.
- Najszybciej i najliczniej wykiełkowały nasiona sterylizowane w 0,5% roztworze podchlorynu sodu zarówno w czasie 1 i 10 minut.

Na pozyskanych w powyższy sposób sterylnych liściach i pędach konopi zainicjowano wzrost kalusa (inokulum z hodowli na pożywkę stałą, Tab. II), z którego w kolejnym etapie założono hodowle zawieszinowe w pożywkach MS wzbogaconych o fitohormony: tidiazuron (TDZ) (Ryc. 2) i kinetynę (KIN). Tidiazuron to syntetyczny hormon roślinny, który jest szeroko wykorzystywany do indukcji organogenezy pędów, wzrostu kalusa u wielu gatunków roślin oraz w procesach regeneracji i embriogenezy somatycznej [1]. Kinetyna jest fitohormonem odpowiadającym za stymulację podziału komórek u roślin, co promuje wzrost i rozwój roślin. Ma działanie antyoksydacyjne, spowalniając starzenie się roślin [2].

Hodowle zawieszinowe kalusa prowadzono w warunkach wytrząsania, w pożywkach z 1 μM TDZ oraz 0,25 μM KIN zarówno w fotoperiodzie, jak i w ciemności (Ryc. 2). Po 3 tygodniach hodowli wykonano pomiary (świeża masa komórek, średni współczynnik przyrostu biomasy- Gi, rozmiar agregatów komórkowych) i prowadzono dalszy ciąg hodowli (inokulum z hodowli zawieszinowej, Tab. II) w takich samych warunkach jak poprzednie (Ryc. 3, Tab. II).



Ryc.2. Hodowla zawieszinowa *Cannabis sativa* +1 μM TDZ



Ryc.3. Agregaty komórkowe z hodowli zawieszinowej *Cannabis sativa*: 1- KIN fotoperiod, 2- KIN ciemność, 3- TDZ fotoperiod, 4- TDZ ciemność

Tab.II. Wpływ kinetyny i tidiazuronu na przyrost biomasy i rozmiar agregatów komórkowych w 21 dniowej hodowli zawieszinowej *Cannabis sativa*

| Hormon [μM]     | Warunki hodowli [fotoperiod/ciemność] | Średni współczynnik przyrostu biomasy Gi [%] |                                  | Średni rozmiar agregatów [mm] |
|-----------------|---------------------------------------|--|----------------------------------|-------------------------------|
|                 |                                       | Inokulum z hodowli stałej                    | Inokulum z hodowli zawieszinowej |                               |
| Kinetyna (0,25) | Fotoperiod                            | 92,6   | 65,6                             | 3,68                          |
|                 | Ciemność                              | 118,0  | 161,3                            | 3,92                          |
| Tidiazuron (1)  | Fotoperiod                            | 1585,1                                       | 721,5                            | 2,76                          |
|                 | Ciemność                              | 1140,0                                       | 329,0                            | 4,20                          |

Na podstawie powyższych wyników można sformułować następujące wnioski:

- Najwyższy średni przyrost biomasy uzyskano w hodowli prowadzonej w fotoperiodzie w pożywkę zawierającej TDZ o stężeniu 1 μM.
- Najniższy średni przyrost biomasy uzyskano w hodowli prowadzonej w ciemności w pożywkę z 0,25 μM KIN.
- Najbardziej optymalny rozmiar agregatów otrzymano w hodowli MS+1 μM TDZ prowadzonej w fotoperiodzie.

Podsumowując przeprowadzone badania, na zastosowane procedury sterylizacji, a także różne warunki hodowli (fotoperiod, ciemność, fitohormony), konopie „odpowiedziały” w bardzo satysfakcjonujący nas sposób. W warunkach *in vitro* pozyskano sterylny materiał roślinny (siewki i kalus), z którego w kolejnym etapie hodowli zawieszinowej uzyskano znaczący przyrost biomasy (nawet o 1585% w pożywkę z 1 μM tidiazuronem), o małych rozmiarach agregatów (2,76 mm), co jest niezwykle korzystne w bioreaktorowych hodowlach komórek roślinnych.

Uzyskany materiał biologiczny może być wykorzystany do badań nad wpływem licznych (jeszcze wielu nie w pełni przebadanych) metabolitów tej rośliny na wzrost m.in. chorobotwórczych mikroorganizmów, czy ludzkich nowotworowych linii komórkowych.

Piśmiennictwo:

[1] ERLAND L.A.E., GIEBELHAUS R.T, VICTOR J.M.R., MURCH S.J., SAXENA P.K. 2020. The Morphoregulatory Role of Thidiazuron: Metabolomics- Guided Hypothesis Generation for Mechanisms of Activity. International Journal of Molecular Sciences 21(117): 6335.

[2] BOZSÓ Z., BARNA B. 2021. Diverse Effect of Two Cytokinins, Kinetin and Benzyladenine, on Plant Development, Biotic Stress Tolerance, and Gene Expression. Life 11(12): 1404.

Pracę sfinansowano ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach BNP-2-067/N/5/I