

Veiksniai, lemiantys sėjamosios kanapės (*Canabis sativa* L.) kaliosogenezę somatinių audinių kultūroje

Ernestas Maumevičius¹,

Natalija Burbulis¹,

Aušra Blinstrubienė¹,

Irina Laiko²,

Ramunė Masienė¹

¹ Aleksandro Stulginskio universitetas,
Studentų g. 11,
53361 Akademija,
Kauno r., Lietuva
El. paštas natalija.burbulis@asu.lt

² Pluoštinių augalų institutas,
Tereshchenko g. 45,
Hlukhiv, Sumy apskritis,
41400 Ukraina

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Agronomijos fakulteto Biologijos ir augalų biotechnologijos institute ir Jungtinio tyrimų centro Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Tirtas augimo reguliatorių poveikis sėjamosios kanapės kaliaus indukcijai izoliuotų hipokotilių, skilčialapių ir lapų kultūrose. Izoliuoti hipokotilių, skilčialapių ir lapų segmentai auginti Murashige ir Skoog (MS) maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių bei papildytoje skirtingais zeatino (ZT) ir α -naftilacto rūgšties (NAR) arba indolilacto rūgšties (IAR) deriniais bei skirtingais tidiazurono (TDZ) ir α -naftilacto rūgšties (NAR) arba indolilacto rūgšties (IAR) deriniais. Genotipų 'KAN-30' ir 'KAN-38' didžiausias kaliaus susiformavimo dažnis izoliuotų hipokotilių kultūroje nustatytas auginant eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR, o genotipo 'KAN-34' – maitinamojoje terpėje, papildytoje 1,0 mg l⁻¹ ZT + 0,5 mg l⁻¹ NAR. Izoliuotų skilčialapių kultūroje ląstelių dediferenciacijos procesą labiausiai stimuliuo 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ NAR derinys. Optimalus augimo reguliatorių derinys kaliaus indukcijai izoliuotų lapų kultūroje turi būti parenkamas konkrečiam genotipui. Izoliuotų lapų kultūroje vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis buvo 4,8–5,6 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų hipokotilių kultūroje, bei 2,7–3,1 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų skilčialapių kultūroje.

Raktažodžiai: augimo reguliatoriai, *Canabis sativa*, *in vitro*, kaliosogenežė

ĮVADAS

Kanapės (*Cannabis sativa* L., 2n = 20) – vieni seniausių vienmečių augalų, tradiciškai auginamų dėl savo ilgo, tvirto pluošto ir sėklų. Kanapių pluoštas naudojamas tekstilės, popieriaus, statybinių ir izoliacinių medžiagų gamyboje. Kanapių spalvai – sumedėję ir lignifikavęsi stiebų šerdies audiniai – naudojami arklių guoliams, popieriaus masei ir betonui gaminti (Karus, Vogt, 2004; Elfordy et al., 2008; Papadopoulou et al., 2015). Greta tradicinių pa-

naudojimo būdų, populiarėja inovatyvūs pluoštinių kanapių (pluošto ir biomasės) pritaikymo būdai (Fike, 2016). Dėl didelio celiuliozės kiekio kanapių ląstelių sienelėse bei gana aukšto produktyvumo kanapių biomasė naudojama kaip pramoninė žaliava energijos gamybai (Prade et al., 2012; Ragit et al., 2012), antros kartos bioetanolio gamybai (Gonzalez-Garcia et al., 2012; Kuglarz et al., 2016) ir „žaliųjų kompozitų“ (Khalil et al., 2012; Shahzad, 2012) bei betono sutvirtinimui (Elfordy et al., 2008). Manoma, kad neįtraus sunkiesiems metalams

kanapės genotipai gali būti naudojami fitoremediacijai, siekiant pašalinti sunkiųjų metalų taršą iš dirvožemio (Linger et al., 2005; Zeng et al., 2013). Teigiama, kad pasaulinėje rinkoje yra daugiau nei 25 000 produktų, pagamintų iš kanapių (Salentijn et al., 2015).

Nuo 2001 m. Europos Sąjungoje leidžiama auginti tik tas kanapių veisles, kuriose delta-9-tetrahidrokanabinolio (THC) koncentracija neviršija 0,2 %. Įvairių šalių mokslininkai vykdo pluoštinių kanapių selekcinę programą, kurių pagrindinis tikslas – palaikant neviršijančią leistinos normos THC koncentraciją padidinti augalų derlingumą, aukštos kokybės pluošto išėigą, atsparumą ligoms ir kenkėjams (Salentijn et al., 2015). Taip pat vykdoma selekcija kuriant veisles konkreitiems galutinio panaudojimo tikslams. Gaminant funkcinį maistą svarbiausi selekcijos siekiai – sėklų derlius, maistinė sudėtis ir vertė. Kuriant aliejui skirtas veisles didžiausias dėmesys skiriamas dideliame sėklų derliui bei sočiųjų rūgščių kiekiui ir sudėčiai. Popieriaus gamybai gali būti naudojamas ir plaušinis pluoštas, ir medinga šerdis, tačiau iš plaušinio pluošto pagaminamas geresnės kokybės popierius. Dėl šios priežasties popieriaus gamybai skirtų veislių selekcinis darbas labiausiai orientuotas į plaušinio pluošto produkcijos didinimą (Ranalli, 2004). Augalų selekciijoje vis plačiau taikomi biotechnologiniai metodai, kurie leidžia tikslingai keisti augalų genomą ir kurti augalus, turinčius pageidaujamų savybių. Pluoštinių augalų, iš jų ir kanapių, selekciijoje yra aktualu biotechnologiniais metodais sukurti genetinę įvairovę bei atrinkti linijas, pasižyminčias didesniu produktyvumu, atsparumu biotiniams ir abiotiniams veiksniams. Galimybės panaudoti ląstelines technologijas daugeliui objektų lieka neišnaudotos dėl fundamentinių žinių stokos indukuojant atskirų augalų rūšių somatinių ląstelių dediferenciacijos ir antrinės diferenciacijos procesus. Mokslinėje literatūroje stinga duomenų apie veiksnis, lemiančius kanapės kaliosogenezę *in vitro*.

Tyrimų tikslas – nustatyti augimo reguliatorių, genotipo ir eksplanto tipo poveikį sėjamosios kanapės (*Canabis sativus* L.) somatinių ląstelių dediferenciacijos procesui.

METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Agronomijos fakulteto Biologijos ir augalų

biotechnologijos institute bei JTC Agrobiotechnologijos laboratorijoje 2017–2018 metais. Sėjamosios kanapės selekcinų numerių 'KAN-30', 'KAN-34' ir 'KAN-38' sėklos nuplautos tekančiu vandeniu, 5 min. sterilizuotos 70 % etanolio vandeniniame tirpale, 10 min. 10 % natrio hipochlorito vandeniniame tirpale ir tris kartus perplautos steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilios sėklos daigintos Murashige ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių, papildytoje 10,0 g l⁻¹ sacharozės ir 8,0 g l⁻¹ agaru. Terpės pH lygus 5,5. Sėklos daigintos esant 25/18 °C (dieną / naktį) temperatūrai, 16/8 val. (dieną / naktį) fotoperiodui ir 50 μmol m⁻² s⁻¹ apšviestumui. Hipokotiliai ir skilčialapiai buvo izoliuoti kanapės augalams esant 08–09 augimo tarpsnyje (Mishchenko et al., 2017), lapai – 11–12 augimo tarpsnyje. Izoliuoti hipokotilių, skilčialapių ir lapų eksplantai perkelti ant MS maitinamosios terpės be augimo reguliatorių bei papildytos skirtingais (1,0–2,0 mg l⁻¹) zeatino (ZT) ir (0,5–0,1 mg l⁻¹) α-naftilacto rūgšties (NAR) arba indolilacto rūgšties (IAR) deriniais bei skirtingais (1,0–2,0 mg l⁻¹) tidiazurono (TDZ) ir (0,05–0,1 mg l⁻¹) α-naftilacto rūgšties (NAR) arba indolilacto rūgšties (IAR) deriniais. Maitinamoji terpė papildyta 30 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ Difco Bacto agaru. Terpės pH – 5,7 ± 0,1. Sterili kultūra auginta kontroliuojamomis sąlygomis: šviesos intensyvumas – 50 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperiodas – 16/8 val. (dieną / naktį), aplinkos temperatūra 22 ± 2 °C.

Visuose eksperimentuose naudota visiška randomizacija. Auginta po 50 kiekvieno varianto eksplantų, tyrimas atliktas keturiais pakartojimais. Kas keturias savaites eksplantai perkelti į šviežią tos pačios sudėties maitinamąją terpę. Kaliaus susiformavimo dažnis vertintas po dviejų subkultivavimų.

Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis kompiuterinėmis programomis iš programų paketo SELEKCIJA (Tarakanovas, Raudonius, 2003). Vidurkiai ir standartinė paklaida apskaičiuoti STAT_ENG programa.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Izoliuotų eksplantų ląstelių dediferenciacija *in vitro* prasidėjo praėjus 18–21 dienai po izoliavimo. Tirtų genotipų izoliuoti eksplantai maitinamojoje

terpėje be augimo reguliatorių kalių formavo nuo 2,4 iki 8,4 % dažniu (duomenys nepateikiami).

Kaliaus susiformavimo dažnis izoliuotų hipokotilių kultūroje kito nuo 10,3 iki 26,2 %, priklausomai nuo genotipo ir augimo reguliatorių derinio sąveikos (1 lentelė).

Auksinas IAR derinyje su citokininu ZT skatino genotipo 'KAN-30' kaliosogenezę, tačiau slopino genotipo 'KAN-34' ląstelių dediferenciaciją bei neturėjo esminės įtakos genotipo 'KAN-38' kaliaus formavimosi dažniui, palyginti su auksinu NAR derinyje ir citokininu ZT. Tuo tarpu derinyje su citokininu TDZ didesnę teigiamą poveikį somatinių ląstelių dediferenciacijai daugeliu atvejų turėjo auksinas NAR nei auksinas IAR. Nepriklausomai nuo auksino tipo, citokininas ZT efektyviau skatino kaliosogenezę, palyginti su citokininu TDZ. Genotipų 'KAN-30' ir 'KAN-38' didžiausias kaliaus susiformavimo dažnis (atitinkamai 26,2 ir 24,8 %) izoliuotų hipokotilių kultūroje nustatytas auginant eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR, o genotipo 'KAN-34' (25,4 %) – maitinamojoje terpėje, papildytoje 1,0 mg l⁻¹ ZT + 0,5 mg l⁻¹ NAR. Genotipų 'KAN-34' ir 'KAN-38' vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis izoliuotų hipokotilių kultūroje (atitinkamai 19,05 ir 18,55 %) buvo statistiškai patikimai didesnis, palyginti su genotipo 'KAN-30' vidutiniu kaliaus susiformavimo

dažniu (16,18 %). Iš aštuonių tirtų augimo reguliatorių derinių statistiškai patikimai didžiausias kaliaus susiformavimo dažnis nustatytas dėl 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR (24,57 %) ir 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ NAR (22,87 %) poveikio. Tarp šių dviejų variantų skirtumai neesminiai ir statistiškai nepatikimi.

Tirtų genotipų izoliuoti skilčialapių eksplantai kalių formavo nuo 21,7 iki 44,3 % dažniu (2 lentelė). Skirtingai nei izoliuotų hipokotilių kultūroje, skilčialapių somatinių ląstelių dediferenciacijos procesas intensyviau vyko maitinamojoje terpėje, papildytoje auksinu NAR, nei auksinu IAR, nepriklausomai nuo citokinino tipo.

Didžiausias tirtų genotipų kaliaus susiformavimo dažnis nustatytas auginant izoliuotus skilčialapių eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 1,0 mg l⁻¹ ZT + 0,5 mg l⁻¹ NAR deriniu. Analogiškai izoliuotų hipokotilių kultūrai, genotipų 'KAN-34' ir 'KAN-38' vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis (atitinkamai 34,58 ir 33,44 %) izoliuotų skilčialapių kultūroje buvo statistiškai patikimai didesnis, palyginti su genotipo 'KAN-30' vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu (29,75 %). Iš tirtų augimo reguliatorių derinių ląstelių dediferenciacijos procesą labiausiai stimuliuo augimo reguliatorių 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ NAR derinys. Šiame variante kalių formavo vidutiniškai 42,20 % izoliuotų

1 lentelė. Augimo reguliatorių poveikis kanapės kaliaus susiformavimo dažniui (%) izoliuotų hipokotilių kultūroje (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (mažosiomis raidėmis – augimo reguliatorių derinys, didžiosiomis – genotipas), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Table 1. Effect of growth regulators on hemp callus formation frequency (%) from hypocotyl explants (means not sharing a common letter (lower case letters mean a combination of growth regulators, capital letters show a genotype) are significantly different ($P < 0.05$))

Augimo reguliatorių derinys mg l ⁻¹ A combination of growth regulators, mg l ⁻¹	Genotipas Genotype			Vidurkis Mean
	'KAN-30'	'KAN-34'	'KAN-38'	
1,0 ZT + 0,5 IAR	14,6cdB	21,8bA	18,3bAB	18,23b
1,0 ZT + 0,5 NAR	13,9dC	25,4aA	20,7bB	20,00ab
2,0 ZT + 1,0 IAR	26,2aA	22,7abB	24,8aAB	24,57a
2,0 ZT + 1,0 NAR	21,4bB	24,3aA	22,9abAB	22,87a
1,0 TDZ + 0,5 IAR	10,3dB	12,6dAB	15,7cA	12,87d
1,0 TDZ + 0,5 NAR	14,5cdB	16,2cB	19,1bA	16,60bc
2,0 TDZ + 1,0 IAR	12,4dB	15,5cA	14,3cA	14,07c
2,0 TDZ + 1,0 NAR	16,1cA	13,9dB	12,6cB	14,20c
Vidurkis / Mean	16,18B	19,05A	18,55A	17,93

2 lentelė. Augimo reguliatorių poveikis kanapės kaliaus susiformavimo dažniui (%) izoliuotų skilčialapių kultūroje (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (mažosiomis raidėmis – augimo reguliatorių derinys, didžiosiomis – genotipas), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Table 2. Effect of growth regulators on hemp callus formation frequency (%) from cotyledon explants (means not sharing a common letter (lower case letters mean a combination of growth regulators, capital letters show a genotype) are significantly different ($P < 0.05$))

Augimo reguliatorių derinys mg l ⁻¹ A combination of growth regulators, mg l ⁻¹	Genotipas Genotype			Vidurkis Mean
	'KAN-30'	'KAN-34'	'KAN-38'	
1,0 ZT + 0,5 IAR	26,3cA	27,8cA	28,9bcA	27,67c
1,0 ZT + 0,5 NAR	33,1bAB	35,4bcA	32,5bB	33,67b
2,0 ZT + 1,0 IAR	26,8cB	31,6cA	29,4bcA	29,27bc
2,0 ZT + 1,0 NAR	41,4aAB	44,3aA	40,9aB	42,20a
1,0 TDZ + 0,5 IAR	21,7dB	28,6cA	30,4bcA	26,90c
1,0 TDZ + 0,5 NAR	34,5bAB	36,2bcA	31,7bB	34,13b
2,0 TDZ + 1,0 IAR	26,9cC	33,6cB	34,5bB	33,63b
2,0 TDZ + 1,0 NAR	27,3cC	39,1bA	39,2aA	33,23b
Vidurkis / Mean	29,75B	34,58A	33,44A	32,59

skilčialapių eksplantų, tačiau, palyginti su kitais deriniais, skirtumai esminiai ir statistiškai patikimi.

Tirtų kanapės genotipų izoliuoti lapų eksplantai kalijų formavo nuo 83,8 iki 96,3 % dažniu (3 lentelė).

Nustatyta, kad efektyviausias augimo reguliatorių derinys kanapės lapų ląstelių dediferenciacijos indukcijai didžiaja dalimi lemiamas genotipo.

Genotipo 'KAN-30' didžiausias (96,2 %) kaliaus susiformavimo dažnis nustatytas auginant izoliuotus lapų eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR deriniu, o genotipo 'KAN-34' izoliuotų lapų ląstelių dediferenciacijos procesas tokiu pat dažniu vyko maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ TDZ + 1,0 mg l⁻¹ IAR deriniu. Genotipo 'KAN-38'

3 lentelė. Augimo reguliatorių poveikis kanapės kaliaus susiformavimo dažniui (%) izoliuotų lapų kultūroje (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (mažosiomis raidėmis – augimo reguliatorių derinys, didžiosiomis – genotipas), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Table 3. Effect of growth regulators on hemp callus formation frequency (%) from leaf explants (means not sharing a common letter (lower case letters mean a combination of growth regulators, capital letters show a genotype) are significantly different ($P < 0.05$))

Augimo reguliatorių derinys mg l ⁻¹ A combination of growth regulators, mg l ⁻¹	Genotipas Genotype			Vidurkis Mean
	'KAN-30'	'KAN-34'	'KAN-38'	
1,0 ZT + 0,5 IAR	94,1abAB	90,5bB	96,3aA	93,63a
1,0 ZT + 0,5 NAR	89,9bcA	93,7abA	91,8abA	91,80ab
2,0 ZT + 1,0 IAR	96,2aA	85,6cC	92,7abB	91,50ab
2,0 ZT + 1,0 NAR	95,3aA	91,4abB	92,4abAB	93,03a
1,0 TDZ + 0,5 IAR	83,8cB	93,7abA	95,9aA	91,13ab
1,0 TDZ + 0,5 NAR	85,5cB	92,3abA	87,1bAB	88,30b
2,0 TDZ + 1,0 IAR	91,4bB	96,2aA	95,3aA	94,30a
2,0 TDZ + 1,0 NAR	93,7abA	94,7aA	91,6abA	93,33a
Vidurkis / Mean	91,24A	92,26A	92,89A	92,13

didžiausias (96,3 %) kaliaus susiformavimo dažnis nustatytas auginant izoliuotus lapų eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 1,0 mg l⁻¹ ZT + 0,5 mg l⁻¹ IAR deriniu. Skirtingai nei izoliuotų hipokotilių ir izoliuotų skilčialapių kultūrose, esminio skirtumo tarp genotipų vidutiniam kaliaus susiformavimo dažniui nenustatyta. Įvertinus augimo reguliatorių derinių poveikį paaiškėjo, kad statistiškai mažiausias vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis (88,30 %) buvo maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR deriniu. Skirtumai tarp kitų tirtų derinių neesminiai ir statistiškai nepatikimi.

A. Slusarkiewicz-Jarzina su bendraautorais (2005) nustatė, kad izoliuoti kanapės lapų eksplantai kelių formavo didesniu dažniu, palyginti su skilčialapių ir tarpubamblių eksplantais. Tuo tarpu K. Wielgus su bendraautorais (2008) paskelbė, kad eksplantų tipas neturėjo esminės įtakos kanapės kaliosogenezei izoliuotų skilčialapių, stiebo segmentų ir šaknų segmentų kultūrose. Mūsų tyrimais nustatyta, kad tirtų genotipų vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis izoliuotų lapų kultūroje buvo atitinkamai 5,6; 4,8 ir 5,0 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų hipokotilių kultūroje, bei 3,1; 2,7 ir 2,8 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų skilčialapių kultūroje.

Mokslinėje literatūroje pateikiami prieštaringi duomenys apie genotipo poveikį kanapės somatinių ląstelių dediferenciacijai. Vieni mokslininkai nustatė esminius skirtumus tarp kanapės veislių pagal kaliaus susiformavimo dažnį (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005; Lata et al., 2010), kiti teigia, kad genotipas neturėjo esminės įtakos kaliaus indukcijai kanapės somatinių audinių kultūroje (Wielgus et al., 2008). Mūsų tyrimais nustatyti esminiai skirtumai tarp tirtų genotipų pagal vidutinį kaliaus susiformavimo dažnį izoliuotų hipokotilių ir skilčialapių kultūrose, tačiau izoliuotų lapų kultūroje šie skirtumai nepasireiškia.

C. Chaohua su bendraautorais (2016) nustatė, kad kanapės izoliuotų skilčialapių ląstelių dediferenciacijos procesas intensyviausiai vyko maitinamojoje terpėje, papildytoje TDZ ir NAR deriniu, o mūsų tirtų genotipų kaliaus susiformavimo dažnį izoliuotų skilčialapių kultūroje labiau stimuliavo 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ NAR derinys.

IŠVADOS

1. Genotipų 'KAN-30' ir 'KAN-38' didžiausias kaliaus susiformavimo dažnis izoliuotų hipokotilių kultūroje nustatytas auginant eksplantus maitinamojoje terpėje, papildytoje 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ IAR, o genotipo 'KAN-34' – maitinamojoje terpėje, papildytoje 1,0 mg l⁻¹ ZT + 0,5 mg l⁻¹ NAR.
2. Izoliuotų skilčialapių kultūroje ląstelių dediferenciacijos procesą labiausiai stimuliavo augimo reguliatorių 2,0 mg l⁻¹ ZT + 1,0 mg l⁻¹ NAR derinys.
3. Optimalus augimo reguliatorių derinys kanapės kaliaus indukcijai izoliuotų lapų kultūroje turi būti parenkamas konkrečiam genotipui.
4. Izoliuotų lapų kultūroje vidutinis kaliaus susiformavimo dažnis buvo 4,8–5,6 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų hipokotilių kultūroje, bei 2,7–3,1 karto didesnis, palyginti su vidutiniu kaliaus susiformavimo dažniu izoliuotų skilčialapių kultūroje.

Gauta 2018 11 15
Priimta 2018 12 12

LITERATŪRA

1. Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z., Chunsheng G., Qing T., Jianhua C., Xinbo G., Dingxiang P., Jianguang S. 2016. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. Vol. 83. P. 61–65.
2. Elfordy S., Lucas F., Tancret F., Scudeller Y., Goudet L. 2008. Mechanical and thermal properties of lime and hemp concrete (hempcrete) manufactured by a projection process. *Construction and Building Materials*. Vol. 22. P. 2116–2123.
3. Feeney M., Punja Z. K. 2003. Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Vol. 39. P. 578–585.
4. Fike J. 2016. Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol. 35. P. 406–424.
5. Gonzalez-Garcia S., Luo L., Moreira M. T., Feijoo G., Huppes G. 2012. Life cycle assessment of hemp hurds use in second generation ethanol production. *Biomass Bioenergy*. Vol. 36. P. 268–279.
6. Karus M., Vogt D. 2004. European hemp industry: cultivation, processing and product lines. *Euphytica*. Vol. 140. P. 7–12.

7. Khalil H. P. S. A., Bhat A. H., Yusra A. F. I. 2012. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: a review. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 87. P. 963–979.
8. Kuglarz M., Alvarado-Morales M., Karakashev D., Angelidaki I. 2016. Integrated production of cellulosic bioethanol and succinic acid from industrial hemp in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. Vol. 200. P. 639–647.
9. Lata H., Chandra S., Khan I. A., Elsohly M. A. 2010. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high delta9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Medica*. Vol. 76(14). P. 1629–1633.
10. Linger P., Ostwald A., Haensler J. 2005. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biology Plantarum*. Vol. 49. P. 567–576.
11. Mishchenko S., Mokher J., Laiko I., Burbulis N., Kyrychenko H., Dudukova S. 2017. Phenological growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.): codification and description according to the BBCH scale. *Žemės ūkio mokslai*. Vol. 24. P. 31–36.
12. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Vol. 15. P. 473–497.
13. Papadopoulou E., Bikiaris D., Chrysafis K., Wladyka-Przybylak M., Wesolek D., Mankowski J., Kolodziej J., Baraniecki P., Bujnowicz K., Gronberg V. 2015. Value-added industrial products from bast fiber crops. *Industrial Crops and Products*. Vol. 68. P. 116–125.
14. Prade T., Svensson S. E., Mattsson J. E. 2012. Energy balances for biogas and solid biofuel production from industrial hemp. *Biomass Bioenergy*. Vol. 40. P. 36–52.
15. Ragit S. S., Mohapatra S. K., Gill P., Kundu K. 2012. Brown hemp methyl ester: transesterification process and evaluation of fuel properties. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 41. P. 14–20.
16. Ranalli P. 2004. Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*. Vol. 140. P. 121–131.
17. Salentijn E. M. J., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L. M. 2014. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. Vol. 68. P. 32–41.
18. Shahzad A. 2012. Hemp fiber and its composites: a review. *Journal of Composite Materials*. Vol. 46. P. 973–986.
19. Sliusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. 2005. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Biologica Cracoviensis Series Botanica*. Vol. 47(2). P. 145–151.
20. Tarakanovas P., Raudonius S. 2003. *Agronominių tyrimų duomenų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, SPLIT-PLOT iš paketo SELEKCIJA ir IRRISTAT*. Akademija, Kėdainių r. 57 p.
21. Wielgus K., Luwanska A., Lassocinski W., Kaczmarek Z. 2008. Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*. Vol. 5. P. 199–207.
22. Zeng M., Guo H. Y., Guo R., Yang M., Mao K. M. 2013. A study on phytoremediation of *Cannabis sativa* L. in heavy metals polluted soil. *Chinese Journal of Soil Science*. Vol. 44. P. 472–476.

Ernestas Maumevičius, Natalija Burbulis,
Aušra Blinstrubienė, Irina Laiko, Ramunė Masienė

FACTORS AFFECTING HEMP (*CANABIS SATIVA* L.) CALLUS GENESIS IN SOMATIC TISSUE CULTURE

Summary

Research was carried out at the Institute of Biology and Plant Biotechnology of Aleksandras Stulginskis University and at the Laboratory of Agrobiotechnology of the Joint Research Centre. The effect of growth regulators on the callus induction from hypocotyl, cotyledon and leaf explants was evaluated. The isolated explants were cultivated in the MS medium without growth regulators and supplemented with different zeatine (ZT) and α -naftilacetic acid (NAA) or indoleacetic acid (IAA) combinations and thidiazuron (TDZ) and α -naftilacetic acid (NAA) or indoleacetic acid (IAA) combinations. The highest callus formation frequency from hypocotyl explants was obtained in the medium supplemented with 2.0 mg l⁻¹ ZT + 1.0 mg l⁻¹ IAA ('KAN-30' and 'KAN-38') and - 1.0 mg l⁻¹ ZT + 0.5 mg l⁻¹ NAR ('KAN-34'). The combination of 2.0 mg l⁻¹ ZT with 1.0 mg l⁻¹ NAA was most appropriate for the callus induction from cotyledon explants. The optimal combination of growth regulators for callus induction from leaf explants should be selected for a specific genotype. The mean rate of callus formation frequency from leaf explants was 4.8–5.6 times higher in comparison with the mean frequency from hypocotyl explants and 2.7–3.1 times higher as compared to the mean frequency from cotyledon explants.

Keywords: *Canabis sativa*, callus formation, growth regulators, *in vitro*