

МІЩЕНКО С. В.

Глухівський національний педагогічний університет імені Олександра Довженка,
Україна, 41400, Сумська обл., м. Глухів, вул. Київська, 24, ORCID: 0000-0002-1979-4002, serhiimishchenko@ukr.net

МЕТОДИЧНІ АСПЕКТИ КУЛЬТИВУВАННЯ КОНОПЕЛЬ ПОСІВНИХ *IN VITRO*: ОГЛЯД

В оглядовій статті описано подолання проблем контамінації, ефективні методи регенерації та розмноження, особливості оптимізації умов росту через модифікацію складу живильних середовищ та використання фітогормонів, встановлення певних режимів освітленості та температури, сучасні напрями досліджень конопель посівних (*Cannabis sativa* L.) *in vitro*. Культивування даного виду *in vitro* дещо утруднено. У ролі експлантів оптимальним є використання частин пагонів, отриманих із стерилізованого NaOCl і пророщеного насіння *in vitro*. Експланти можуть рости на різних типах живильних середовищ, зокрема MS, DKW із сахарозою як джерелом вуглеводів, та модифікованих середовищах, здебільшого у бік збільшення іонів Нітрогену, окремих мезо- та мікроелементів, добре відгукуються на застосування різних типів фітогормонів – ауксинів та цитокінінів. Проблемним залишається подолання гіпергідратичності пагонів. Останнім часом розробляються методики отримання поліпідів конопель посівних та культури бічних коренів.

Ключові слова: коноплі, *in vitro*, оптимізація умов росту, розмноження.

Останнім часом спостерігається тенденція до збільшення посівних площ конопель посівних (промислових), розширення сфери їх виробничого використання, залучення до програм з біоенергетики, активізації селекційних і біотехнологічних досліджень, зокрема й *in vitro*. Останні охоплюють кілька основних напрямів, важливих для агропромислового виробництва, фармацевтики, біотехнологій і генної інженерії. Основні напрями досліджень включають: мікроклональне розмноження, генетичну трансформацію рослин, біотехнологічне виробництво флавоноїдів, терпеноїдів та інших біологічно активних сполук з потенційним медичним застосуванням, стресову толерантність та адаптацію, розробку способів кріоконсервації та збереження генофо-

нду цінних зразків, створення нових конкурентоздатних сортів через соматоклональну мінливість тощо. Слід зазначити, що введення промислових конопель у культуру *in vitro* є складним процесом, оскільки даний вид потребує особливого підходу до культивування. Основна мета – подолання проблем контамінації (оптимізація стерилізації та асептичних умов, дослідження впливу антибіотиків фунгіцидів та наноматеріалів), розробка ефективних методів регенерації та розмноження (використання різних типів експлантів, індукція калюсогенезу і самотинного ембріогенезу), оптимізація умов росту через модифікацію складу живильних середовищ та використання фітогормонів, дослідження абіотичних стресових факторів (світло, температура, осмотичний стрес) на розвиток тканинних культур, підтримка генетичної стабільності, дослідження впливу повторних пасажів на епігенетичні зміни, чи навпаки – індукція мутацій і генетичної варіабельності.

Узагальнення особливостей методик роботи з промисловими коноплями в культурі *in vitro* залишається досить актуальною через певну розрізненість даних у наукових джерелах, чому ми і присвятили дану оглядову статтю.

Матеріали і методи

Теоретичне дослідження ґрунтується на загальнонаукових принципах, що забезпечують цілісне охоплення проблем культивування промислових конопель в культурі *in vitro*. Використано метод аналізу наукової літератури, загальнонаукові (узагальнення, аналіз, синтез, порівняння, систематизація) і міждисциплінарні методи.

Результати та обговорення

Як вихідний матеріал для цілеспрямованих маніпуляцій з коноплями в культурі *in vitro* можна використовувати різноманітні експланти, однак, як свідчить практика, досить складно

отримати стерильні живі об'єкти. Найліпшим варіантом є експланти (сегментів гіпокотилу, меристем, листків, пиляків тощо) з пагонів, отриманих з пророщеного насіння на живильному середовищі в асептичних умовах.

Для успішної стерилізації насіння конопель (агрономічна назва плодів) використовують лише не пошкоджені горішки (ботанічна назва плодів), без тріщин і подряпин, інакше – забезпечити високу частку стерильних експлантів не вдасться. Описано дослід [1], в якому одним із варіантів підготовки насіння для експлантації є триразова поверхнева стерилізація C_2H_5OH (концентрація – 70 %, експозиція – 3 хв) з наступним зануренням у розчин $HgCl_2$ (концентрація – 0,10 %, експозиція – 10 хв), триразовим промиванням по 5 хв кожен для видалення слідів стерилізуючих агентів і гідропраймування протягом 24, 48 і 72 год [1]. У іншому варіанті поверхнево стерилізоване насіння було піддано впливу 2,0 % та 3,0 % H_2O_2 протягом цього ж часу. Насіння культивували на середовищі Murashige & Skoog (MS) з 30 г/л сахарози, 6,5 % агару, а також збагаченому 1,0 мг/л 6-бензиламінопурину і з додаванням 200 мг/л антибіотиків (ампіцилін і сульфактам) для подолання ендогенних бактерій. У результаті встановлено, що вплив H_2O_2 на насіння був кращим і спостерігалось його 100 % проростання (3,0 % H_2O_2 , 72 год), у той час, як гідропраймування призвело до 30–52,5 % проростання з максимальним часом праймування 48 год [1]. Таким чином, концентрація і експозиція H_2O_2 мають істотний вплив на передбачуваний результат, а додавання антибіотиків сприяють виходу стерильних пагонів.

В іншому досліді [2] був використаний широкий спектр стерилізуючих агентів для насіння конопель, зокрема етанол 70 % (C_2H_5OH); хлоргексидин біглюконат 0,02 % ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$); гідроген перекис 3 % (H_2O_2); гідроген перекису 3 % (H_2O_2) + калій перманганат слабкий рожевий розчин ($KMnO_4$); натрій гіпохлорит від 1 до 6 % ($NaOCl$), за експозиції від 1 до 30 хв. Було встановлено, що розчин етанолу 70 % вже за 1–1,5 хв спричиняв загибель зародка всіх насінин, тому виявився непридатним для стерилізації насіння конопель; $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, H_2O_2 , H_2O_2 + $KMnO_4$ виявили досить слабку стерилізуючу дію, H_2O_2 міг викликати розтріскування оболонки насінин. $NaOCl$ концентрацією 1,5 % за експозиції 12,5–15 хв виявився найбільш придатним для застосування. За таких умов можна отримати 93,0–100,0 % стерильних експлантів (а також 97,5–

100,0 % стерильних пиляків навіть за меншої експозиції) [2]. Задля стерилізації меристем був використаний побутовий відбілювач на основі натрій гіпохлориту ($NaOCl$) різної концентрації: 20 %, 40 % і 60 % відбілювача (з приблизною концентрацією 7,5 % гіпохлориту натрію) [3]. Стерилізацію здійснювали протягом 10 хв. Відмічено, що розчини усіх зазначених концентрацій були здатні однаковою мірою очистити експланти, при цьому не спостерігалось їх пошкодження [3].

Проростання насіння конопель *in vitro* як перша фізіологічна стадія онтогенезу рослини є важливим не лише для вивчення факторів, що впливають на умови культивування, але й має вирішальне значення для отримання ювенільних тканин як потенційного експланта для різних процедур *in vitro*. З іншого боку, проростання насіння *in vitro* є багатоваріантним біологічним процесом, на який можуть впливати генетичні (генотип) і абіотичні фактори (хімічний склад, фізичні властивості середовища та умови культивування). Висловлено думку, що штучні нейронні мережі, добре підходять для аналізу даних і оптимізації умов цієї складної системи [4]. Було зроблено оцінку впливу різних типів і концентрацій джерел вуглеводів (сахарози та глюкози), а також різної концентрації середовищ Driver & Kuniyaki Walnut (DKW) і Murashige & Skoog Medium Van der Salm modification (mMS) на індекси схожості насіння конопель (швидкість проростання та середня тривалість проростання), а також морфологічні особливості проростків, отриманих *in vitro*. Згідно з процесом оптимізації, помірною концентрацією солей, наявних у культуральному середовищі mMS (0,43 %), доповнена помірним рівнем сахарози (2,3 %), може покращити проростання насіння конопель *in vitro* [4].

У літературних джерелах наводять різні залежності інтенсивності калюсогенезу і подальшого органогенезу від типу експланта і сорту (генотипу) конопель: за результатами одних досліджень істотних відмінностей в індукції калюсоутворення між досліджуваними сортами й експлантами, якими слугували сегменти сім'ядолів, стебел і коренів) не встановлено, однак калюсні культури, отримані з різних генотипів, мали неоднакову різну здатність до регенерації рослин [5]; швидкість росту та коефіцієнт розмноження матеріалу не залежав від походження меристем – верхівкові чи бічні [3]; за результатами інших спостережень встановлено чітку залеж-

ність частоти калюсогенезу від сорту та типу експланта, зокрема найбільша кількість пагонів утворилась із калюсів, отриманих на черешках листків (за культивування на середовищі з 3,6-дихлор-2-метоксибензойною кислотою) [6]. Також найкращий ріст пагонів відмічено із бічних меристем живців конопель (кількість життєздатних мікроклонів становила 98,4 %, у середньому можна отримати 5 регенерантів з одного експланта), а верхівкові меристеми досить часто мали менш активний ріст, іноді швидко спостерігався початок цвітіння [2].

Вважається, що коноплі є надзвичайно міниливим видом, зазвичай у культурі поширені сорти-популяції, які є перехреснозапиленими і, як наслідок, – високогетерозиготними за низкою біологічних і селекційних ознак. Навіть у межах одного сорту рослини можуть суттєво відрізнятися за вмістом і профілем канабіноїдів, тому одним із дієвих способів отримання однорідних рослин і стандартизованої сировини є вегетативне розмноження за допомогою мікроклонів в культурі *in vitro* з наступною адаптацією *in vivo*, зокрема окремі клонально розмножені рослини дали відтворюваний конопляний матеріал як потенційне джерело канабідіолу [7]. Зважаючи на це, проводиться пошук оптимальних умов культивування мікроклонів.

Для культивування конопель (мікроклональне розмноження та отримання соматиклонів) використовують різні живильні середовища: MS, Gamborg & Eveleigh, White [2] та ін. Живильні середовища MS, Linsmaier & Skoog і DKW для культивування конопель були більш придатними, ніж середовище Lloyd & McCown Woody Plant Medium [3]. Успішність використання саме середовища DKW підтверджено й іншими авторами [8]. При цьому не спостерігали відмінностей росту і розвитку експлантів від гелеутворювача – агару чи геланової камеді [3]. рН середовища (4,0, 5,0, 5,8, 6,0 і 7,0) не значною мірою впливав на загальну масу пагонів, їх довжину, рейтинг якості та інші характеристики, однак за рН 5,8, 6,0 і 7,0 експланти формували більшу кількість бічних вузлів [3]. Найбільш оптимальною була концентрація сахарози (мас./об.) 1,5 і 3,0 % (досліджувалися варіанти від 0 до 6,0 % з кроком 1,5 %) [3].

Істотною проблемою у процесі культивування конопель *in vitro* є явище гіпергідратичності пагонів – фізіологічна вада розвитку, яка веде до надмірної гідратації, низького рівня лігніфікації, порушенні функції продихів; спричинюється

вона зазвичай синергетичною дією декількох факторів таких, як фізичні (концентрація гелеутворювача, температура середовища, відсутність циркуляції повітря) і хімічних (мінеральний і фітогормональний склад середовища); найбільш відчутними її негативними наслідками можуть бути соматиклональні варіації і втрата тотипотентності, внаслідок чого нівелюється здатність до органогенезу та ін.

Саме гіпергідратичність пагонів, створених *in vitro*, їх погане витягування, нездатність культур пагонів підтримувати гарний ріст і розвиток протягом тривалого часу та невдале укорінення *ex vitro* обмежили розвиток системи мікророзмноження конопель в комерційних масштабах. Для подолання зазначених негативних явищ було запропоновано спосіб культивування [9], який запобігає підвищеній гіпергідратичності пагонів, зокрема завдяки використанню культуральних посудин з вентильованою кришкою з порами 0,2 мкм і агаризованим середовищем MS, що містить 0,8–1 % агару, 3 % сахарози (мас./об.), а також 0,5 мг $\times$ л⁻¹ метаполіну, 0,1 мг $\times$ л⁻¹ гіберелової кислоти при рН 5,7 [9]. Найкращою модифікацією середовища MS для мікроклонального розмноження (через 6 тижнів після початкової субкультивуації) було збільшення дози вітамінів та солей, які містять іони Ca²⁺, Mg²⁺ і K⁺. Пагони, вирощені на цьому середовищі, продемонстрували оптимальне розширення та розвиток листової пластинки, однак вони демонстрували легкий хлороз через 12 тижнів. В окремому експерименті дане модифіковане середовище було додатково доповнено NH₄NO₃ з концентрацією 0, 500, 1000 або 1500 мг $\times$ л⁻¹. Найкращий результат при цьому дали рослини, вирощені з 500 мг $\times$ л⁻¹, бо мали найбільшу кількість мікроклонів і найкращу комбінацію витягування пагонів і розвитку пластинки листа [9].

Описано й інший дослід оптимізації середовища MS з метою підвищення ефективності мікророзмноження конопель. За змінні фактори у досліді було обрано діапазон концентрацій макроелементів (NH₄NO₃, KNO₃) та окремі мезоеlementів (CaCl₂ $\times$ 2H₂O, KH₂PO₄, MgSO₄ $\times$ 7H₂O) [10]. Встановлено, що усі сорти позитивно відреагували на збільшення вмісту Нітрогену та мезоеlementів, порівняно з базовим середовищем MS (контрольний варіант). Окрім того, додавання калій силікату (4,86 мМ) до середовища зменшувало симптоми гіпергідратації у всіх трьох досліджуваних генотипів конопель.

Покращена індукція ризогенезу спостерігалася на безгормональних середовищах та мінеральній ваті, та $0,5 \times MS$, що містить 2,4 мкМ індол-3-масляної кислоти та $1 \times MS$, що містить 2 мкМ м-тополіну, які зазвичай використовуються як середовища для укорінення конопель. Експланти, вирощені в мінеральній ваті, дали здорові пагони та високу масу коренів через 4–6 тижнів з розчином мінеральних поживних речовин, тоді як саджанці, вирощені на стандартних культуральних середовищах, не дали коренів протягом цього періоду [10].

Промислові коноплі середньоевропейського еколого-географічного типу характеризуються сильним апікальним домінуванням і досить слабо реагують на вплив фотоперіоду (тривалість фенофаз лише незначним чином змінюється), вони здатні до цвітіння за значного розмаху тривалості світлового дня, а тому швидко закінчують онтогенез і відмирають, що унеможливило їх подальше використання *in vitro*. Відтак живильне середовище доцільно модифікувати таким чином, щоб воно поліпшило результативність процесу культивування завдяки інтенсифікації росту пагонів, покращення їх життєздатності, подовженню тривалості вегетативної стадії розвитку і онтогенезу загалом, слугувало інгібітором настання генеративної стадії тощо. Було запропоновано модифікацію середовища MS, основний сенс якої полягав у збільшенні концентрації іонів NH_4^+ та NO_3^- і Fe^{2+} , окремих мікроелементів, зменшенні іонів K^+ і PO_4^{3-} та ін. [11]. Включення у живильне середовище аскорбінової кислоти з концентрацією 5–30 мг/л сприяли зменшенню накопичення фенольних сполук та інтенсивному росту і розвитку, позитивним змінам окремих цінних ознак [12].

Серед регуляторів росту рослин (фітогормонів), які додають до живильного середовища для одностадійної проліферації пагонів, виокремлюють наступні: 2 мкМ мета-тополіна [13]; 0,05–5,0 мкМ тидіазурана, при чому кількість і якість регенерантів найкращі у варіанті з 0,5 мкМ даної речовини, порівняно з бензиладеніном чи кінетином [14]; 0,04 мг/л тидіазурана і 0,02 мг/л 1-нафтилоцтової кислоти [15]; 1,0 мкМ 6-бензиламінопурина або 5,0 мкМ 6-(γ,γ -диметилаліламіно)пурина (2iP) [3] та багато інших регуляторів росту рослин. Визначено, що для індукції утворення калюсів найбільш ефективним співвідношенням «ауксин: цитокінін» на прикладі 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти і кінетину є 2:1,

2:2, 2:3 і 3:2 мкМ [16]. Для укорінення найчастіше рекомендують використовувати індол-3-масляну кислоту та 1-нафтилоцтову кислоту [3].

Для успішного культивування генетично однорідних конопель важливе значення має інтенсивність освітлення та його спектр, оскільки вони мають істотний вплив на процеси синтезу біологічно активних речовин загалом і профілю канабіноїдів зокрема. Так, оцінювалося культивування конопель *in vitro* за різних спектрів світла (білого та червоного/синього) у поєднанні з регулятором росту 6-бензиламінопурином, за критерій оцінки взявши кількість листків, бічних меристем і коренів [17]. Результати показали, що біле світло без 6-бензиламінопурина стимулювало ріст листків, тоді як червоне/синє світло сприяло утворенню бічних меристем, а на утворення коренів спектр світлового потоку істотного впливу не мав. Відсутність вказаного фітогормону призвела до більшої індукції формування листків та меристем, підкреслюючи ефективність спектрів світла у стимулюванні росту рослин. Біле світло позитивно корелювало з кількістю листків та коренів, тоді як збільшення синього світла негативно корелювало з розміром рослини та діаметром стебла, але позитивно з квітковою біомасою [17]. Загалом, використання світлодіодного освітлення у культивуванні конопель *in vitro* довело енергоефективність і зменшило потребу в регуляторах росту, підтримуючи вкорінення та акліматизацію, мінімізуючи соматоклональні варіації [17]. Важливе значення має і температура культивування, зокрема за 28 і 26°C отримано більшу масу свіжих пагонів, їх довжину, кількість вузлів і рейтинги якості, ніж за температури 22 і 24°C в лабораторії [3].

Поряд з культивуванням калюсних культур після обробки хімічними мутагенами з метою отримання надалі соматоклонів з наявністю позитивних мутацій, індукція поліплоїдії в культурі *in vitro* має відносно великий потенціал. Так, з метою отримання тетраплоїдів використовували обробку живців 0,05 % і 0,2 % розчином колхіцину за експозиції 12 год, а також розчином оризаліну з концентрацією 50 мкМ за експозиції 12 і 36 год [18]. За іншими даними пагони культивували протягом 72 год на середовищі, що містить 0,125 мг/л колхіцину (безгормональному) [19]. Слід зазначити, що складність культивування конопель *in vitro* з селекційною метою полягає у тому, що не спостерігається жодної прямої кореляції між параметрами росту і розви-

тку *in vitro* та *in vivo*, що вказує на те, що продуктивність рослин конопель *in vitro* не є передбачуваною для *in vivo* [8].

Зважаючи на те, що тетрагідроканабінол у листках та суцвіттях конопель може бути використаний як психотропний засіб, вирощування конопель завжди було суперечливим юридичним питанням у деяких країнах, що обмежує прямий спосіб отримання екстрактів. Як альтернатива можливе отримання цінних метаболітів у культурі адвентивних (додаткових) коренів *in vitro* [20]. Слід зазначити, що поряд із використанням різних продуктів з конопель, все більшого поширення набуває саме застосування різноманітних екстрактів із коренів конопель, які не містять психотропних сполук. Було запропоновано метод отримання адвентивних коренів в біореакторі (HBARs), оптимізовано умови культивування та розроблено схему біореактора, а потім оцінено його ефективність, замінність та здійсненність [20]. Результати показали, що накопичення сапонінів ($48,75 \pm 0,03$ мг/г), полісахаридів ($420,94 \pm 0,01$ мг/г) і канабідіолу ($0,43 \pm 0,01$ мг/г сухої маси) збільшилося до максимуму в середовищі з $0,75 \times MS$, з додаванням 2 мг/л індол-3-масляної кислоти та 30 г/л сахарози. Їх вміст у HBAR збільшився в 1,99, 12,78 і 2,19 рази, порівняно з контрольним варіантом (корені, вирощені у природних умовах). Окрім того, HBARs мали більшу продуктивність, порівняно з культивуванням у чашках Петрі чи конічних колбах.

Даний метод показав високу ефективність, низьку вартість і практичне значення, HBAR з високим виходом біологічно активних сполук неканабіноїдної природи і канабідіолу, який володіє лікувальними властивостями, можуть замінити традиційні методи посадки для отримання фітохімічних речовин конопель шляхом великомасштабного промислового біотехнологічного вирощування [20].

Висновки

Культивування конопель посівних *in vitro* дещо утруднено порівняно з іншими видами рослин. У ролі експлантів оптимальним є використання частин пагонів, отриманих зі стерилізованого і пророщеного насіння *in vitro*. Для стерилізації насіння доцільно використовувати розчин NaOCl. Експланти конопель можуть рости на різних типах живильних середовищ, зокрема MS, DKW із сахарозою як джерелом вуглеводів, та модифікованих середовищах, здебільшого у бік збільшення іонів Нітрогену, окремих мезо- та мікроелементів, добре відгукуються на застосування різних типів фітогормонів – ауксинів та цитокінінів, температурних режимів та освітленості. Проблемним залишається подолання гіпергідратичності пагонів. Останнім часом розробляються методики отримання поліпоїдів конопель посівних та культури бічних коренів.

References

1. Yıldırım B., Aasim M., Aytac S. Optimizing *in vitro* germination of primed industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Anatolian Journal of Botany*. 2023. Vol. 7 (2). P. 112–116. <https://doi.org/10.30616/ajb.1286625>.
2. Mishchenko S. V. Induction of callusogenesis in technical (industrial) hemp under *in vitro* conditions. *Bast and Technical Crops*. 2018. Vol. 6 (11). P. 21–28. doi: 10.48096/btc.2018.6(11).21-28. [in Ukrainian]
3. Stephen C., Zayas V. A., Galic A., Bridgen M. P. Micropropagation of Hemp (*Cannabis sativa* L.). *HortScience*. 2023. Vol. 58 (3). P. 307–316. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16969-22>.
4. Hesami M., Pepe M., Monthony A. S., Baiton A., Jones A. M. P. Modeling and optimizing *in vitro* seed germination of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. 2021. Vol. 170. 113753. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113753>.
5. Wielgus K., Luwanska A., Lassocinski W., Kaczmarek Z. Estimation of *Cannabis sativa* L. tissue culture conditions essential for callus induction and plant regeneration. *Journal of Natural Fibers*. 2008. Vol. 5 (3). P. 199–207. <https://doi.org/10.1080/15440470801976045>.
6. 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 (2). P. 145–151.
7. Dreger M., Szalata M., Górka-Paukszta M., Mańkowska G., Oleszak G., Kwiatkowska E., Ożarowski, M. Content of cannabinoids in clonally propagated industrial hemp. *Journal of Natural Fibers*. 2023. Vol. 20 (2). 2245968. <https://doi.org/10.1080/15440478.2023.2245968>.
8. Halstead M. A., Garfinkel A. R., Marcus T. C., Hayes P. M., Carrijo D. R. Hemp growth *in vitro* and *in vivo*: A comparison of growing media and growing environments across 10 accessions. *HortScience*. 2022. Vol. 57 (9). P. 1041–1047. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16651-22>.
9. Lubell-Brand J. D., Kurtz L. E., Brand M. H. An *in vitro* – *ex vitro* micropropagation system for hemp. *HortTechnology*. 2021. Vol. 31 (2). P. 199–207. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04779-20>.

10. Zarei A., Davis B., Feyissa B. A., Dinani E. T., Simons B. Improvement of mineral nutrition and rooting efficiency of *Cannabis sativa* L. for *in vitro* large-scale propagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2023. Vol. 59. P. 95–105. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10320-6>.
11. Mishchenko S. V. Modification of nutrient medium for cultivation of non-psychotropic hemp (*Cannabis sativa* L.) of the Central European ecological-geographical type *in vitro*. *Bast and Technical Crops*. 2019. Vol. 7 (12). P. 15–23. [https://doi.org/10.48096/btc.2019.7\(12\).15-23](https://doi.org/10.48096/btc.2019.7(12).15-23). [in Ukrainian]
12. Mishchenko S. V. Effect of exogenous ascorbic acid on *Cannabis sativa* L. *in vitro* and *in vivo*. *Bulletin of the Center for Science Provision of Agribusiness in the Kharkiv region*. 2019. Vol. 26. P. 67–74. [in Ukrainian]
13. Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I. A., ElSohly M. A. *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 (1). P. 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.001>.
14. Lata H., Chandra S., Khan I., ElSohly M. A. Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2009. Vol. 45 (1). P. 12–19. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9167-5>.
15. Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z., Chunsheng G., Qing T., Jianhua C., Xinbo G., Dingxiang P., Jianguang S. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. 2016. Vol. 83. P. 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.035>.
16. Thacker X., Thomas K., Fuller M., Smith S., DuBois J. 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 (10). P. 1250–1268. <https://doi.org/10.4236/as.2018.910088>.
17. Valadares T. C., Pádua M. S., Alves B. C., Sousa B. J. M., Almeida J. M. D. Evaluation of wavelength light effects on *in vitro* cultivation of hemp: an exploration of LED lights. *Contribuciones a las ciencias sociales*. 2025. Vol. 18 (2). 15507. <https://doi.org/10.55905/revconv.18n.2-206>.
18. McLeod A., Contreras R., Halstead M., Vining K. *In vivo* and *in vitro* chromosome doubling of ‘I3’ hemp. *HortScience*. 2023. Vol. 58 (9). P. 1018–1022. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17169-23>.
19. Mishchenko S. V. Artificially induced polyploidy of industrial hemp. In: *Modern Aspects of Natural Science Research in the Context of Sustainable Development of Society*. Riga : Baltija Publishing, 2023. P. 2–27. <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-395-8-1>.
20. An X., Yang H., Xu J., Jiao J., Yang J., Fu Y. *In vitro* adventitious roots of hemp in bioreactor culture to efficiently produce non-cannabinoids and cannabidiol phytochemicals. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2024. Vol. 159. 69. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02922-2>.

MISHCHENKO S. V.

Oleksandr Dovzhenko Hlukhiv National Pedagogical University,
Ukraine, 41400, Sumska obl., Hlukhiv, Kyivska str., 24

METHODOLOGICAL ASPECTS OF *IN VITRO* CULTIVATION OF HEMP: A REVIEW

The review article describes overcoming contamination issues, effective regeneration and propagation methods, optimization of growth conditions through modification of nutrient media composition and the use of phytohormones, as well as the establishment of specific light and temperature regimes, and modern research directions for *in vitro* cultivation of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). The *in vitro* cultivation of this species is somewhat challenging. The optimal explants are shoot segments obtained from NaOCl-sterilized and *in vitro* germinated seeds. Explants can grow on various types of nutrient media, including MS and DKW with sucrose as a carbohydrate source, as well as modified media, mainly with increased nitrogen ions and selected macro- and microelements. They respond well to the application of different types of phytohormones, such as auxins and cytokinins. However, overcoming shoot hyperhydricity remains a challenge. Recently, methodologies for obtaining polyploid industrial hemp and lateral root cultures have been developed.

Keywords: hemp, *in vitro*, growth condition optimization, propagation.