

## Utilizzo di tecniche di micropropagazione in slow growth nel processo di produzione di cloni di *Cannabis sativa* ad uso farmaceutico

Graziella Paglia\*, Ilaria Alberti, Gianpaolo Grassi

CREA-CI, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca per la cerealicoltura e colture industriali, Rovigo

### Micropropagation and slow growth conservation during cloning *Cannabis sativa* L. for pharmaceutical uses

**Abstract.** The endocannabinoid system discovery for serious or highly disabling diseases treatment with *Cannabis sativa* L., requires the protection of germoplasm preserved in the Research Center of CREA-CI in Rovigo. To evaluate the resistance of *C. sativa* to long term in-vitro conservation, shoots of the variety CINRO were cultured on Murashige & Skoog medium included Gamborg B5 vitamins supplemented with different concentration of sucrose and mannitol and placed at different temperatures and light periods (5°C dark; 15°C dark; 15°C 18h light/ 6h dark; 25°C 18h light/ 6h dark). Best results were achieved with storage temperatures of 5°C in the dark and 15°C with 18h light/ 6h dark.

**Key words:** endocannabinoid, germoplasm, in-vitro, temperature, storage.

### Introduzione

Per lunghi anni, la coltivazione della *Cannabis sativa* L. è stata abbandonata, portando ad un depauperamento della ricchezza varietale: tuttavia in questi ultimi 20 anni, la *C. sativa* è stata oggetto di nuove ricerche, sia nel settore delle produzioni da fibra sia nel settore medico dove, grazie alla scoperta del sistema endocannabinoide, sono stati formulati preparati per la cura di malattie gravi o altamente invalidanti.

Presso la sede del CREA-CI di Rovigo sono state conservate negli anni, varietà e linee di *C. sativa* che hanno permesso di riprendere in Italia la coltivazione

della canapa industriale, ma soprattutto di introdurre questa pianta per usi terapeutici. Attualmente sono una decina le varietà di canapa industriale detenute e registrate dal CREA-CI e altrettante potrebbero essere registrate e destinate all'uso medico.

Il ciclo di produzione di piante di *C. sativa* ad uso terapeutico ha inizio presso la sede del CREA-CI di Rovigo, che prepara talee radicate allevate indoor. Successivamente le talee vengono trasferite presso l'Istituto Chimico Farmaceutico Militare di Firenze, dove si conclude il ciclo di produzione con l'ottenimento di fiori maturi, senza semi.

Le tecniche di micropropagazione vengono ampiamente utilizzate, presso il CREA-CI di Rovigo, per migliorare la qualità del germoplasma selezionato per usi terapeutici e per mantenere elevato il livello di sanità del materiale vegetale selezionato e prodotto. Il ciclo di allevamento *in vitro* della *C. sativa*, in condizioni di rapida crescita, prevede un rinnovo degli espianti ogni 20-25 giorni, richiedendo un notevole impiego di tempo e materiale. L'esigenza di mantenere in purezza e sanità numerose accessioni di canapa medicinale ha richiesto la ricerca di soluzioni alternative al continuo rinnovo delle colture.

Data l'importanza di garantire nel tempo, la produzione di numerose varietà e linee con costi limitati e in spazi ridotti, è stata avviata quindi una sperimentazione per valutare la capacità del germoplasma di *C. sativa* di resistere a lunghi periodi di mantenimento in vitro: a tale scopo sono stati valutati diversi protocolli di conservazione in condizioni di "slow growth".

### Materiali e metodi

Germogli apicali della varietà CINRO, che da ripetute osservazioni (dati non pubblicati) presenta una buona adattabilità alla coltura in vitro, sono stati espantati da piante madri di *C. sativa* allevate in serra

\*graziella.paglia@crea.gov.it

e posti su mezzo di coltura contenente macro e microelementi secondo Murashige e Skoog (1962) con complesso vitaminico Gamborg B5 addizionato con 30 gr/L di saccarosio e 8 gr/L di agar a pH 5.7 (temperatura di crescita: 25°C, fotoperiodo alternanza luce/buio 18h/6h ad intensità luminosa di 60  $\mu\text{mol}/\text{sec}$  o buio) (Schibuola *et al.*, 2011). Al fine di ottenere un quantitativo di espunti idoneo alla sperimentazione sono state eseguite 3 subcolture. Il piano sperimentale di questa sperimentazione comprendeva l'interazione di diversi fattori di crescita, temperatura e luce (intensità luminosa di 60  $\mu\text{mol}/\text{sec}$ ) con differenti gradienti osmotici ottenuti addizionando al substrato di crescita menzionato, mannitolo e saccarosio a diverse concentrazioni (tab. 1), (Nesgash *et al.*, 2001, Marino *et al.*, 2010). Il numero di ripetizioni sono stati di 4 vasi con 3 espunti ciascuno per le 16 tesi.

Dopo 4 mesi di coltura alle diverse combinazioni di temperatura e luce veniva valutata la vitalità dei germogli (fig.1). In questa prima fase, metà dei germogli sopravvissuti sono stati riportati alle condizioni ottimali di crescita e dopo 20 giorni è stata misurata

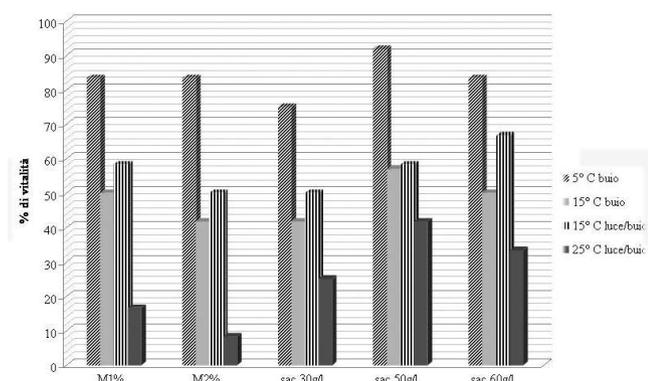


Fig. 1 - Vitalità dei germogli dopo 4 mesi di conservazione in relazione alle condizioni colturali applicate  
Fig. 1 - Percent of life shoots after 4 months of storage.

l'altezza dell'espunto. La restante parte dei germogli ha proseguito la conservazione per la valutazione finale dopo 12 mesi.

## Risultati

I primi risultati ottenuti dalla sperimentazione in atto, hanno fornito spunti interessanti: gli espunti mantenuti a temperatura di  $5\pm 1$  °C al buio hanno arrestato/limitato la crescita e si sono mantenuti vitali nei 4 mesi di conservazione, con una percentuale di sopravvivenza superiore all'80% (fig.1). Anche le tesi a  $15\pm 1$  °C (sia al buio che con alternanza di luce) sono rimasti vitali con una percentuale  $\geq$  del 50%. Le perdite di espunti sono risultate molto alte per le tesi a  $25\pm 1$  °C; soprattutto in presenza di mannitolo è stato osservato un diffuso imbrunimento a partire dai tessuti esterni fino ad arrivare alla morte del germoglio.

Gli espunti vivi trasferiti su mezzo standard di crescita alle condizioni ottimali hanno ripreso la normale crescita con eccezione per le tesi a 25°C (fig. 2).

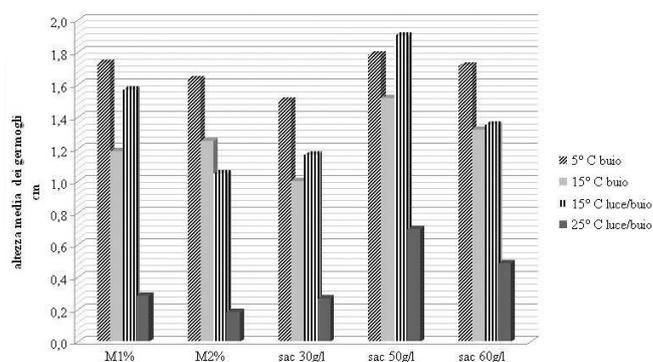


Fig. 2 - Altezza dei germogli valutata dopo 30 giorni di crescita alle condizioni standard in relazione alle precedenti condizioni di conservazione applicate per 4 mesi.  
Fig. 2 - Length of shoots after storage reported to standard conditions.

Tab. 1- Schema dell'esperimento di conservazione, indicazioni del contenuto di carboidrati, condizioni di luce e temperatura e numero degli espunti trattati per ogni combinazione.

Tab. 1 - Interactions of growth factors, temperature and light, with different media.

Sigla		Buio		Luce/Buio (18h/6h)		N. Germogli totali
		5 $\pm$ 1°C	15 $\pm$ 1°C	15 $\pm$ 1°C	25 $\pm$ 1°C	
M1	MSc*+ Mannitolo 1%	12	12	12	12	48
M2	MSc*+ Mannitolo 2%	12	12	12	12	48
SAC 30	MSc*	12	12	12	12	48
SAC 50	MSc*+ Saccarosio 20 g/L	12	12	12	12	48
SAC 60	MSc*+ Saccarosio 30 g/l	12	12	12	12	48

\* Murashige e Skoog con complesso vitaminico Gamborg addizionato con 30 gr/L di saccarosio e 8 gr/L di agar a pH 5,7

## Discussione e conclusioni

Questi primi dati raccolti mettono in evidenza che, nonostante la *C. sativa* abbia esigenze termiche elevate, la varietà CINRO sembra adattarsi alla conservazione in vitro anche a basse temperature: se questo aspetto si estendesse anche a tutte le altre varietà, risulterebbe determinante per la sicurezza fitopatologica nella loro conservazione e per la possibilità di limitare i costi di mantenimento delle numerose linee e varietà conservate presso il CREA-CI di Rovigo.

La sperimentazione in atto prevede di verificare lo stato del materiale vegetale al termine dei 12 mesi e di ottimizzare le combinazioni di substrati e temperature approfondendo l'intervallo compreso tra 5 e 15°C per le varietà di interesse.

## Riassunto

La scoperta del sistema endocannabinoide e la conseguente cura di malattie gravi o altamente invalidanti con la *Cannabis sativa* L., ha reso imprescindibile la salvaguardia del germoplasma presente presso il CREA-CI di Rovigo. Per valutare la capacità della *C. sativa* di resistere a lunghi periodi di conservazione in vitro, germogli della varietà CINRO sono stati allevati su terreno di Murashige e Skoog con complesso vitaminico di Gamborg B5, addizionato con saccaro-

sio e mannitolo a diverse concentrazioni e posti a diverse combinazioni di temperatura e illuminazione. Dai primi risultati si evidenzia che nonostante le alte esigenze termiche della specie, ottimi risultati si sono ottenuti dalla conservazione a 5°C in assenza di luce e a 15°C con alternanza luce e buio.

**Parole chiave:** endocannabinoide, germoplasma, vitro, temperatura, conservazione

## Bibliografia

- GAMBORG O.L., MOLLER R.A., OJINA K., 1968. *Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells*. Exp. Cell Res., 50: 151-158.
- LATA H., CHANDRA S., TECHEN N., KHAN A., ELSOHLY M.A., 2016. *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, 3: 18-26.
- MARINO G., NEGRI P., CELLINI A., MASIA A., 2010. *Effect of carbohydrates on in vitro low-temperature storage of shoot cultures of apricot*. Scientia Horticulturae, 126: 434-440.
- NESGAH A., KRENS F., SCHAART J., VISSER B., 2001. *In vitro conservation of enset under slow-growth conditions*. Plant Cell. Tissue and Organ Culture, 66:107-111.
- SCHIBUOLA G., ARDUINI M.G., D'INCÁ E., GERGELY J.E., GRASSI G., 2011. *Coltura in vitro di cannabis sativa L. per la conservazione del germoplasma ed il suo risanamento*. 2° Convegno Nazionale sulla Micropropagazione - Sanremo 7-9 novembre 2011.