

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Diplomová práce

Olomouc 2024

Daniel Král

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI



Molekulární aspekty protoplastových kultur konopí setého
(*Cannabis sativa* L.)

Diplomová práce

Daniel Král

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniel KRÁL**
Osobní číslo: **R220031**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Molekulární aspekty protoplastových kultur konopí setého (*Cannabis sativa* L.)**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů
3. Izolace protoplastů z několika genotypů konopí, jejich kultivace a hodnocení
4. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů
5. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Anglické články z knihovny vedoucího.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.**
Katedra botaniky

Datum zadání diplomové práce: 31. října 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022

Bibliografické údaje

Autor: Daniel Král
Název práce: Molekulární aspekty protoplastových kultur konopí setého (*Cannabis sativa* L.)
Typ práce: diplomová práce
Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, prezenční forma
Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Rok obhajoby: 2024

Souhrn:

Tato práce se zabývá *in vitro* mikropropagací rostliny *Cannabis sativa* L., izolací a kultivací mezofylových protoplastů. Nejvhodnějším materiálem pro protoplastizaci byly 1–2týdenní listy *in vitro* pěstovaných semenáčků kultivaru 'USO 31'. Bylo zjištěno, že mírně modifikované médium, které je běžně používané pro *A. thaliana*, je vhodné i pro iniciační fázi kultivace konopných protoplastů. Jedná se celkově o druhý záznam úspěšného založení a regenerace protoplastových kultur konopí. Transkriptomická analýza vybraných markerů ukázala, že kultivované protoplasty zůstaly životaschopné, znovu vstoupily do buněčného cyklu a aktivně reagovaly na oxidační stres, přičemž vykazovaly nižší zatížení abiotickým stresem nežli donorový materiál.

Klíčová slova: *Cannabis sativa*; mikropropagace; izolace a kultivace protoplastů; RT-qPCR; *PCNA*; *IAA-2*; *PP2C-1*; *LEA34*; *APX*; *CAT*
Počet stran: 61
Jazyk práce: český

Bibliographic info

Author: Daniel Král
Title: Molecular aspects of protoplast cultures of *Cannabis sativa* L.
Thesis type: master thesis
Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Study field: Molecular and Cellular Biology, full-time form
Supervisor: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Year of defense: 2024

Summary:

This thesis focuses on the micropropagation of *Cannabis sativa* L. and the isolation and cultivation of mesophyll protoplasts. The optimal material for protoplast isolation was 1–2-week-old leaves of *in vitro* grown seedlings of the cultivar 'USO 31'. It was discovered that a slightly modified medium commonly used for *A. thaliana* is also suitable for the initiation phase of cannabis protoplast cultivation. This represents the second record of successful establishment and regeneration of cannabis protoplast cultures overall. Transcriptomic analysis of selected markers indicated that cultivated protoplasts remained viable, re-entered the cell cycle, and actively responded to oxidative stress while exhibiting a lower abiotic stress burden than donor material.

Keywords: *Cannabis sativa*; micropropagation; protoplasts isolation and cultivation; RT-qPCR; *PCNA*; *IAA-2*; *PP2C-1*; *LEA34*; *APX*; *CAT*

Page count: 61

Thesis language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Chtěl bych moc poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za lidský přístup, ochotu a odborné vedení mé diplomové práce. Poděkování za vstřícnou pomoc při práci v laboratoři patří také Ing. Josefu Baltazarovi Šenkyříkovi a ostatním členům Katedry botaniky, díky kterým jsem mohl být součástí příjemného prostředí.

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled	3
3.1	Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.)	3
3.1.1	Determinace pohlaví	6
3.1.2	Genomová charakterizace	6
3.2	Vybrané metody biotechnologie konopí	7
3.2.1	Somatická regenerace	8
3.2.2	Bioreaktory	9
3.2.3	Geneticky modifikované konopí	10
3.3	Protoplastové kultury konopí	11
3.3.1	Izolace a purifikace	12
3.3.2	Kultivace a regenerace	13
3.3.3	Využití protoplastových kultur	15
3.4	Molekulární charakteristika protoplastů	16
3.4.1	Změny ve struktuře chromatinu	16
3.4.2	Změny v epigenomu	17
3.4.3	Expresní profil protoplastů	17
3.4.3.1	Hormonální signalizace	17
3.4.3.2	<i>PCNA</i> : Proliferační gen	18
3.4.3.3	<i>PP2C</i> a <i>LEA</i> : Geny související s abiotickým stresem	19
3.4.3.4	<i>APX</i> a <i>CAT</i> : Ochrana před oxidativním stresem	19
4	Materiál a metody	21
4.1	Biologický materiál	21
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	21
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	25
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	26
4.4.1	Pěstování rostlin <i>ex vitro</i>	26
4.4.2	Převod a pěstování rostlin <i>in vitro</i>	26

4.4.3	Izolace protoplastů	27
4.4.4	Stanovení životnosti, koncentrace a výtěžnosti protoplastů	29
4.4.5	Kultivace protoplastů	30
4.4.6	Izolace mRNA	30
4.4.7	Gelová elektroforéza	30
4.4.8	Přečištění mRNA od DNA	30
4.4.9	Dvoustupňová RT-qPCR	31
4.4.10	Statistické hodnocení	33
5	Výsledky	34
5.1	<i>In vitro</i> kultivace	34
5.1.1	Sterilizace	34
5.1.2	Zdroj explantátu	34
5.1.3	Vliv prostředí kultivace	35
5.2	Protoplastizace	36
5.2.1	Volba rostlinného materiálu	36
5.2.2	Volba enzymatického roztoku	37
5.2.3	Optimalizace protoplastizace	37
5.2.4	Výtěžnost a viabilita	39
5.3	Kultivace protoplastů	41
5.3.1	Expres genů souvisejících s proliferací	42
5.3.2	Expres genů souvisejících s abiotickým stresem	44
5.3.3	Expres genů souvisejících s oxidativním stresem	46
6	Diskuse	48
7	Závěr	52
	Literatura	53

Seznam obrázků

1	Schématický nákres rodu <i>Cannabis</i> L.	5
2	Schéma izolace a kultivace protoplastů	27
3	Klíčení semen <i>Cannabis sativa in vitro</i>	34
4	Kultivace <i>Cannabis sativa in vitro</i> – vliv kultivačního média	35
5	Vizuální porovnání výtěžnosti protoplastů	37
6	Porovnání účinnosti purifikace protoplastů	38
7	Mikrofotografie protoplastů <i>Cannabis sativa</i> 'USO 31' z listů 1–2týdenních <i>in vitro</i> semenáčků	40
8	Mikrofotografie mikrokalusů <i>Cannabis sativa</i> 'USO 31'	41
9	Expresní profil genu <i>PCNA</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' . .	42
10	Expresní profil genu <i>IAA-2</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' . .	43
11	Expresní profil genu <i>PP2C-1</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' .	44
12	Expresní profil genu <i>LEA34</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' .	45
13	Expresní profil genu <i>APX</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' . . .	46
14	Expresní profil genu <i>CAT</i> protoplastových kultur <i>C. sativa</i> 'USO 31' . . .	47

Seznam tabulek

1	Klasifikace konopí	3
2	Studie izolace protoplastů u konopí	14
3	Specifické složky kultivačních médií	27
4	Přehled enzymatických roztoků	28
5	Přehled promývacích roztoků	29
6	Reakční podmínky syntézy cDNA	31
7	Reakční podmínky PCR	31
8	Reakční podmínky RT-qPCR	32
9	Přehled použitých primerů	33
10	Účinnost izolace protoplastů – vliv materiálu a enzymatických roztoků . .	36
11	Výtěžnost protoplastizace a viabilita protoplastů	39

1 Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je jednou z prvních domestikovaných rostlin a lidé si uvědomují její obrovský potenciál po více než 10 000 let. V současné době je konopí předmětem zájmu díky obsahu mnoha biologicky aktivních látek, pevných vláken a využití v bioekonomice. To z něj činí atraktivní objekt pro biotechnologie a genové inženýrství.

Rostlinné buňky mají unikátní schopnost udržet si svůj vývojový potenciál i po diferenciaci. Protoplasty, tedy buňky zbavené buněčné stěny, jsou schopny opětovně vstoupit do buněčného cyklu a změnit svůj původní buněčný statut (dediferenciace). Mohou tak dosáhnout pluripotentního nebo dokonce totipotentního stavu. Tato schopnost umožňuje vznik nových orgánů nebo dokonce celých rostlin. Protoplastové kultury tak poskytují jedinečnou možnost detailně sledovat dediferenční a regenerační mechanismy, což má důležité aplikace v oblasti vědeckého výzkumu.

Tato práce zkoumá biotechnologické perspektivy konopí s důrazem na přípravu a využití protoplastových kultur. Kromě toho se věnuje reorganizaci chromatinu během protoplastizace a popisuje některé molekulární mechanismy s tímto procesem spojené. V praktické části byla provedena *in vitro* kultivace různých genotypů konopí, izolace mezenchymatických protoplastů a jejich kultivace. Pro hodnocení jejich stavu a proliferačního potenciálu byla provedena transkriptomická analýza genů *PCNA*, *IAA-2*, *PP2C-1*, *LEA34*, *APX* a *CAT*, jejichž exprese byla stanovena metodou RT-qPCR.

2 Cíle práce

Teoretická část:

1. Vypracování rešerše na téma diplomové práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů
3. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě diplomové práce

Praktická část:

1. Izolace protoplastů z několika genotypů konopí, jejich kultivace a hodnocení
2. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů

3 Literární přehled

3.1 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

Konopí seté je řazeno mezi jednoleté dvouděložné rostliny. Převažuje u ní dvoudomost, výjimkou jsou ale někteří vzácně se vyskytující hermafroditní jedinci (nebo vyšlechtěné odrůdy) s květenstvími obou pohlaví. (Miller, 1970; Raman *et al.*, 2017).

Z taxonomického hlediska řadíme konopí do čeledi *Cannabaceae* (Chandra *et al.*, 2017). O tom, zda je konopí monotypickým druhem, se dodnes vedou spory. Převládá názor, který je podpořen samotnou definicí druhu, že by se měl rozlišovat pouze jeden druh, který sestává minimálně ze dvou poddruhů (Small, 2015). Jak shrnuje Lapierre *et al.* (2023), novodobé molekulární studie se také přiklánějí k existenci jediného, velice variabilního druhu konopí. Avšak někteří autoři dávají přednost vymezení více druhů na základě typologických a morfologických charakteristik, nebo podle obsahu terpenoidů (Hillig *et* Mahlberg, 2004).

Tabulka 1: Klasifikace konopí

Říše (Kingdom)	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše (Subkingdom)	Zelené rostliny (<i>Viridiplantae</i>)
Infrakingdom	Streptofyty (<i>Streptophyta</i>)
Superoddělení (Superdivision)	Vyšší rostliny (<i>Embryophyta</i>)
Oddělení (Division)	Cévnaté rostliny (<i>Tracheophyta</i>)
Pododdělení (Subdivision)	Semenné rostliny (<i>Spermatophytina</i>)
Třída (Class)	Dvouděložné rostliny (<i>Magnoliopsida</i>)
Nadřád (Superorder)	<i>Rosanae</i>
Řád (Order)	Růžotvaré (<i>Rosales</i>)
Čeleď (Family)	Konopovité (<i>Cannabaceae</i>)
Rod (Genus)	Konopí (<i>Cannabis</i> L.)
Druh (Species)	Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.)

Převzato a upraveno podle: [ITIS – *Cannabis sativa* L.](#)

Lodyha konopí je vzpřímená a její velikost se nejčastěji pohybuje mezi 1–3 m. Samčí rostliny jsou standardně vyšší a méně robustní než samičí (Miller, 1970; Raman *et al.*, 2017).

Listy jsou dlanitě zpeřené a ikonicky se zobrazují se 7 lístky (laloky). Tento počet však není striktně stanoven. První pár listů semenáčků je tvořen jedním lalokem, mladší listy jsou častěji trojlaločné a dospělé listy se mohou skládat ze 3–9 lístků (Potter, 2009; Hesami *et al.*, 2023a). Lístky mají úzce podlouhlý kopinatý tvar s pilovitými okraji. Svrchní povrch listu je tmavší a hladší než spodní (Potter, 2009; Raman *et al.*, 2017).

Samičí květenství se typicky vyskytuje v apikálních oblastech a tvoří hustě olistěné hrozny. Jednotlivé šedo zelené květy se skládají ze semeníku obklopeného kališními lístky (svrchní dvoupouzdrý semeník), přičemž pestík je vybaven dvěma nitkovitými bliznami k zachycení pylových zrn unášených větrem. Květy samčích rostlin mají světlezelenou barvu a mohou se objevit jednotlivě, ve hroznech nebo ve tříkvětvých latách, které rostou v paždí horních větví (tzv. úžlabní lata). Každý květ se skládá z pěti okvětních plátků, pěti tyčinek a je nesen na štíhlé stopce. Samčí květenství dozrává obvykle dříve než samičí, a to o 2–4 týdny. Samičí květenství je hustě pokryto žlaznatými trichomy, které jsou v menším množství přítomny také na listenech, spodní straně prašnickových váčků a na lodyze. Tyto trichomy sekretují pryskyřici, která je bohatá na terpenoidní látky včetně kannabinoidů. V důsledku toho jsou samičí květenství objektem zájmu pro ty, kteří je využívají pro rekreační nebo léčebné účely (Potter, 2009; Raman *et al.*, 2017; Hesami *et al.*, 2023a).

Plodem konopí je vejčitá, 4–6 mm dlouhá a 3–4 mm široká nažka. Její povrch je hladký, hnědošedý a lehce skvrnitý (Raman *et al.*, 2017).

Schématický náčrt typických morfologických znaků, které byly výše popisovány, je možno vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1: Schématický nákres rodu *Cannabis* L.
Převzato a upraveno dle Sturm *et al.*, (1905).

Samice produkuje velké množství semen, které lidstvo využívá již po několik tisíciletí. První archeologický nález semen v japonské keramice dokazuje minimálně jejich ornamentální význam v období 8 tis. let př. n. l. (Ren *et al.*, 2021).

Podle rozsáhlých studií fosilního pylu, které provedli McPartland *et al.* (2019), víme, že k oddělení tohoto rodu od sesterského rodu *Humulus* došlo v oblasti Tibetské náhorní plošiny před 27,8 miliony let. Podle četných archeologických nálezů je zřejmé, že lidé už v období raného neolitu konopí aktivně využívali (Russo *et al.*, 2008; Mitchell, 2014; Ren *et al.*, 2021).

V dnešní době tato rostlina přitahuje velký vědecký zájem. Široké uplatnění nalézá v průmyslu a zemědělství, v potravinářství a kosmetice, bioenergetice, stavebnictví a v textilním průmyslu (Schilling *et al.*, 2021; Ahmed *et al.*, 2022). Byla také shledána jako vhodná okrasná rostlina do měst (Hesami *et al.*, 2022). Pro svoji jedinečnou produkci

značného množství různých biologicky aktivních látek nabývá největšího významu ve farmaceutickém průmyslu a v léčebných aplikacích (Sharma *et al.*, 2022).

3.1.1 Determinace pohlaví

Genom konopí je diploidní a skládá se z deseti párů chromozomů ($2n = 20$; $x = 10$), z nichž je devět párů autozomů a jeden pár heteromorfních gonozomů X a Y. Pohlaví je stanoveno poměrem chromozomů X ku počtu autozomů (X/A systém). Samičí a hermafroditní rostliny jsou homogametické (XX) a samčí heterogametické (XY) (Ming *et al.*, 2011; Razumova *et al.*, 2016). Z hlediska konopného průmyslu je včasné určení pohlaví velice žádoucí. Zatímco samčí a samičí rostliny lze identifikovat v relativně raném věku, identifikace hermafroditní rostliny je komplikovanější. Nedávná práce přinesla řešení pomocí Ramanova spektrometru. Tato metoda umožnila identifikaci s přesností až 98,7 % (Goff *et al.*, 2022).

3.1.2 Genomová charakterizace

Sakamoto *et al.* (1998) pomocí průtokové cytometrie stanovili velikost haploidního genomu u samičích rostlin na 818 Mbp a 843 Mbp u samčích. Chromozom Y je tedy větší nežli chromozom X. O struktuře pohlavních i dalších chromozomů bylo více informací získáno v roce 2014. Divashuk *et al.* (2014) pomocí cytogenetického barvení a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) definovali velikost metafázních chromozomů v rozmezí 2,6–3,8 μm . 8 párů bylo metacentrických, jeden submetacentrický a poslední pár nesl satelitní oblast organizátoru jadérka (NOR).

První referenční genomovou sekvencí publikovali Bakel *et al.* (2011), což bylo pro genomiku konopí zásadním krokem. Toto nekompletní sestavení však obsahlo pouze 60 % (534 Mb) celkového genomu. Povedlo se tak ale navrhnout až 30 000 genů.

Od té doby bylo vytvořeno a zveřejněno několik dalších referenčních genomů (Lavery *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2020; Grassa *et al.*, 2021). V současné době je na stránkách National Center for Biotechnology Information (NCBI) k dispozici minimálně 15 složených genomů. Hurgobin *et al.* (2021) poskytli komplexní přehled různých referenčních genomů konopí a uvedli, že Mezinárodní konsorcium pro výzkum genomu konopí (ICGRC) doporučilo používat jako referenci sekvenci cs10 (GCA_900626175.2). Velikost tohoto referenčního haploidního genomu byla 875,7 Mb, celkem bylo anotováno

31 170 genů, z nichž 25 296 kódovalo proteiny. Velikost autozomů se zaokrouhleně pohybovala mezi 62–101 Mbp. Sekvence chromozomu X měla 105 Mbp (NCBI, 2019). V roce 2023 došlo ke změně a nyní jako referenční sestavení genomu slouží sekvence ASM2916894v1 (GCF_029168945.1) o velikosti 770,3 Mbp. Kódujících genů bylo uvedeno 35 195, z nichž 28 747 bylo protein-kódujících. Velikost autozomů se pohybovala v rozmezí 51–92 Mbp a 86 Mbp bylo přiřazeno chromozomu X (NCBI, 2023).

3.2 Vybrané metody biotechnologie konopí

Techniky tkáňových kultur představují možnosti *in vitro* pěstování rostlin v živném médiu za kontrolovaných a sterilních podmínek. Mikropropagace, jako jedna z významných technik tkáňových kultur, nám umožňuje efektivní namnožení rostlinného materiálu. Jedná se tedy o tvorbu klonů donorové rostliny ve sterilním prostředí (Davey *et* Anthony, 2010).

Mikropropagace se skládá z pěti hlavních fází. První fáze zahrnuje výběr a pěstování mateřských rostlin pro získání explantátů před samotným procesem dezinfekce a založením kultur. Druhá fáze spočívá ve zřízení aseptických kultur, obvykle použitím dezinfekčních látek pro povrchovou sterilizaci explantátů. Třetí fáze představuje období růstu a množení rostlinného materiálu. Čtvrtá fáze je obdobím, kdy dochází k indukci kořenů, a pátá fáze zahrnuje aklimatizaci rostlin a převod do *ex vitro* (Debergh *et* Maene, 1981).

Různé druhy rostlin vykazují odlišné a často specifické požadavky pro efektivní a úspěšnou mikropropagaci. Při práci s novými rostlinami je nutno optimalizovat mnoho faktorů (dezinfekce, složení médií, podmínky kultivace, teplota, vlhkost, osvětlení) (Davey *et* Anthony, 2010). V současné době právě toto probíhá u konopí. Nedostatek dobře definovaných a zavedených protokolů pro stabilní *in vitro* kultivaci konopí je zatím stále limitujícím faktorem.

Stephen *et al.* (2023) komplexně zkoumali jednotlivé faktory ovlivňující celý proces mikropropagace u konopí. Uvádějí, že klíčové je zavedení explantátů do *in vitro* kultury s minimem kontaminací. Doporučují proto jako donorové rostliny používat ty, které byly pěstované v růstových komorách, protože rostliny pocházející z venkovního prostředí mají větší výskyt endofytních mikrobů. Výsledky ukázaly, že koncentrace desinfekčního činidla Savo (20–60 %) je dostatečná ke sterilizaci a neovlivňuje vitalitu explantátu. Autoři uvedli, že teplota 28 °C je pro kultivaci a mikropropagaci optimální. Prokázali, že

nodální a vrcholové explantáty jsou jakožto zdroje pro mikropropagaci podobně vhodné.

Pro kultivaci konopí je využíváno více médií (1/2 MS, MS, LS, DKW). Účinnost však může být závislá na konkrétním kultivaru. Přednostně se doporučuje používat médium DKW, neboť bylo prokázáno, že snižuje výskyt morfologických defektů pozorovaných u rostlin rostoucích na MS médiu (Page *et al.*, 2021). Optimální koncentrace sacharózy se pohybuje mezi 1,5–3,0 % a pH média by mělo být 5,8 nebo mírně vyšší. Výrazný vliv želírovacího činidla nebyl zaznamenán. Cytokininy 2iP a BA v koncentracích 1–5 μM jsou doporučeny pro urychlení množení kultur konopí se současným udržením kvality. Autoři upozorňují, že použití syntetického růstového regulátoru thidiazuronu (TDZ) a cytokininů ve vyšších koncentracích je spojeno se snižováním kvality a větším výskytem růstu kalusu. Pro čtvrtou fázi je doporučeno kořenění *in vitro* pomocí 2,5 μM IBA, ale také kořenění *ex vitro* může být účinné (Stephen *et al.*, 2023).

Vliv pozice explantátu na mateřské rostlině na růst a vývoj *in vitro* kultur zkoumali Hesami *et al.* (2023b). Zjistilo se, že explantáty z apikální a střední části rostliny měly sníženou schopnost tvorby uzlin (nodů). Naopak tomu však bylo u explantátů z bazální části, které vykazovaly i známky omlazení. To naznačuje jejich vhodnost pro *in vitro* množení konopí. Autoři také uvedli, že tyto rozdíly by mohly být způsobeny rozdílem v distribuci endogenních fytohormonů, cukrů a kvůli odlišnostem v epigenetice. S tím by mohlo souviset i předchozí zjištění, že v apikálních částech mateřské rostliny se více akumuluje somatické mutace (Adamek *et al.*, 2021).

3.2.1 Somatická regenerace

Schopnost regenerace rostlinných buněk je spojena s jejich buněčnou flexibilitou a schopností vrátit se z diferencovaného stavu zpět do stavu s větší plasticitou, známé jako totipotence. Totipotentní buňky mají schopnost diferencovat se do různých specializovaných buněk a přispět k tvorbě celého organismu. V rostlinách si některé buňky udržují totipotentní potenciál i po diferenciaci. Tyto buňky lze aktivovat a reprogramovat (dediferenciace), což je klíčovým prvkem v procesu somatické regenerace (Bidabadi *et al.*, 2020).

Regenerace rostlin *in vitro* může být provedena prostřednictvím somatické embryogeneze nebo organogeneze. Při somatické embryogenezi se nejprve vytvoří buňka podobná zygotickým embryím, ze které regeneruje celá rostlina. Organogeneze je proces,

při kterém se obvykle tvoří nové orgány, ze kterých pak následně i celé rostliny. Tyto procesy mohou probíhat přímo (regenerace z diferencovaného pletiva), nebo nepřímo, pokud k tomu dochází přes kalus (Bidabadi *et Jain*, 2020).

Je známo, že co se týče regenerace, konopí je poměrně vzdorovitou rostlinou. Starší práce byly obvykle zaměřeny na nepřímou regeneraci. Tvorba kalusu není tolik problematická, avšak regenerovat nový výhonek, který by dal vzniknout celé rostlině, je velice obtížné (Lata *et al.*, 2017). Z dosavadních pokusů vyčnívají dvě práce. V první autoři použili Daria médium a 14 % kalusů úspěšně regenerovalo nové rostliny (Wielgus *et al.*, 2008). Ve druhé bylo zjištěno, že lepší regenerace je možno dosáhnout na MS médiu obohateném o syntetický růstový regulátor TDZ. Téměř každý kalus produkoval průměrně 12 výhonků, které byly vitální a schopny zakořenit (Lata *et al.*, 2010a). Jak ale ukázala replikační studie, nelze s jistotou předpokládat, že nepřímá regenerace u konopí je tímto zajištěna. Monthony *et al.* (2021) pozitivní vliv TDZ nepotvrdili ani u jednoho z deseti genotypů konopí a dokonce zaznamenali zvýšení nekrotizace kalusů.

Galán-Ávila *et al.* (2020) studovali možnosti přímé somatické regenerace, a to z explantátů hypokotylů, děložních a pravých listů naklíčených rostlin. Výsledky ukázaly silnou závislost rostlin na genotypu, typu explantátu a hormonálních stimulech. Nejlepší odezvy bylo dosaženo u hypokotylů odrůdy 'USO 31', kdy na médiích (1/2MS) s obsahem ZEA^{RIB} a ZEA^{RIB} + NAA (syntetický hormon auxin) došlo k úspěšné somatické regeneraci ze 66,7 %. Dobré výsledky (61,5 %) přineslo i použití 1/2MS média bez podpory růstových regulátorů, kdy výhonky dokonce spontánně kořenily. Tato práce přinesla i další zajímavý poznatek. Regenerovaným výhonkům dávají základ pericyklické buňky sousedící se xylémovými póly, které jsou vysoce pluripotentní. K regeneraci tudíž došlo i bez předchozí potřeby dediferenciace.

3.2.2 Bioreaktory

Kultivace jednotlivých buněk či orgánů rostlin v tekutém médiu představuje atraktivní alternativu k pěstování celých rostlin, protože řeší časté problémy spojené s tradičními postupy. Bioreaktory mohou sloužit k efektivní mikropropagaci rostlin nebo jako zdroj sekundárních metabolitů (Murthy *et al.*, 2023). Jak uvádí Adhikary *et al.* (2021), fotoautotrofní bioreaktorové systémy mohou být účinně aplikovány při vývoji plně automatizovaných systémů pro průmyslové nízkonákladové *in vitro* množení konopí. První práci

o úspěšném využití bioreaktorů v rámci multiplikace konopí přinesli Lata *et al.* (2010b) a tato metoda byla později plně optimalizována (Rico *et al.*, 2022).

3.2.3 Geneticky modifikované konopí

Kvůli nepříznivým regeneračním schopnostem konopí a vzdorovitosti vůči technologiím genového inženýrství byly dveře ke vzniku stabilně geneticky upraveného konopí dlouhou dobu zavřeny. První záznam pochází z roku 2000, kdy byly prostřednictvím bakterie *A. tumefaciens* transfekovány apikální meristémy, které daly vzniknout prvním geneticky modifikovaným rostlinám konopí. Přidány byly geny *PGIP*, díky kterým rostliny získaly resistenci k plísni *B. cinerea* (MacKinnon *et al.*, 2000). O tři roky později Feeney *et Punja* (2003) opět pomocí *A. tumefaciens* transfekovali suspenzní konopné kultury, ale pokus o regeneraci prostřednictvím kalusu byl neúspěšný. Po těchto dvou zprávách se vývoj v tomto směru zastavil na poměrně dlouhou dobu.

Poznatky, že *A. tumefaciens* mohou být vhodné pro přenos genů do genomu konopí, vedly k potřebě co nejúčinnější infekce, kterou nabídli až Deguchi *et al.* (2020) pomocí vakuové agroinfiltrace. Úspěšnost transgenozy byla hodnocena pomocí vizualizace exprimovaného reportérového genu *GUS* a také snížením exprese genu pro fytoen desaturázu pomocí RNA interference. Autoři se však regeneraci geneticky modifikovaného konopí nevěnovali.

Podstatná byla práce Galán-Ávila *et al.* (2021). Přímou regenerací se podařilo získat celkem 9 stabilně transgenních rostlin. Autoři pomocí *A. tumefaciens* transfekovali hypokotylu, děložní listy a apikální meristémy. Největšího úspěchu bylo dosaženo u hypokotylů, kdy na selektivním médiu proběhla regenerace s úspěšností 23,1 %, z nichž 5 % (6 rostlin) bylo stabilně transformováno. Děložní listy vykazovaly 1% regenerační schopnost (2 rostliny) a z meristémů se podařilo získat pouze 1 transgenní rostlinu.

Velkého úspěchu dosáhli Zhang *et al.*, (2021), kteří jako první u konopí použili cílelou editaci genomu metodou CRISPR/Cas9. Experiment byl založen na zvýšení exprese genů regulujících vývoj společně s komponenty pro editaci genomu. Transfekovány byly hypokotylu a z nich byly odvozeny kalusy. Největší regenerační schopnost byla dosažena s chimérickými geny *CsWUS4* a *CsGRF3–CsGIF1* a oproti kontrole byla až 1,7x větší. Byly tak poprvé regenerovány rostliny konopí s editovaným genomem a s vyřazeným markerovým genem pro fytoen desaturázu. Účinnost regenerace však i tak byla pod 0,2 %.

První záznam o úspěšné regeneraci celých rostlin medicijního konopí se stabilně integrovaným konstruktem pro úpravu farmaceuticky významných genů přinesl Matchett-Oates (2022). Autor vycházel ze zjištění, že geny pro biosyntézu léčebně významných kanabinoidů lze ovlivnit pomocí RNA interference prostřednictvím agroinfiltrace (Matchett-Oates *et al.*, 2021a). Nepřímá regenerace nebyla úspěšná u kalusů odvozených z transformovaných děložních listů. 5% úspěch byl zaznamenán pouze u netransformovaných kontrolních vzorků. Přímou regenerací z transformovaných hypokotylů byly získány 3 výhonky (1,1 %), z nichž pouze jeden zakořnil. Překvapením bylo, že nedošlo k očekávanému snížení exprese genů zapojených do syntézy kanabinoidů, ale naopak k průkazné up-regulaci (Matchett-Oates, 2022).

Kanabinoidy jsou syntetizovány a kvůli své toxicitě také výhradně skladovány v zásobní dutině glandulárních trichomů (Tanney *et al.*, 2021). Další možností, jak ovlivnit výtěžnost kanabinoidů, je zvýšit tvorbu trichomů. Potenciálním terčem genového inženýrství může být rodina transkripčních faktorů MYB (Yin *et al.*, 2022). Tato technologie byla dokonce patentována, ale o tom, zda již vedla k úspěchu, jsem informace bohužel nenašel (Sayre *et al.*, 2022).

Je tu však jeden patent společnosti Canopy Growth Corporation z roku 2019, kterému by mělo patřit prvenství jak v použití vakuové agroinfiltrace u konopí, tak v produkci medicijního konopí s upraveným genomem. Autor se zaměřil na zvýšení exprese genů zapojených do vývoje trichomů a pomocí RNA interference na snížení množství transkriptů represorů indukce jejich růstu. V některých případech až 100 % povrchu nadzemní části transgenních rostlin bylo pokryto trichomy a produkce THC byla tak zvýšena desetinásobně (Roscow, 2019).

3.3 Protoplastové kultury konopí

Protoplasty jsou rostlinné buňky, z nichž byla buď mechanicky, nebo nejčastěji enzymaticky odstraněna buněčná stěna. Tato modifikace otevírá dveře studiím rostlinné buňky, které by jinak nebyly možné. V současné době se využívání protoplastových kultur stále více vrací na biotechnologickou scénu. Protoplasty představují efektivní nástroj pro studium dediferenciace, genetické transformace, editaci genomu a pro vyhodnocení expresních systémů (Jiang *et al.*, 2013; Hesami *et al.*, 2021a). Unikátní je jejich schopnost regenerace, kdy za optimálních podmínek je možno z jediné buňky získat celou novou rostlinu.

Toho se využívá například při klonování, regeneraci nechimerních geneticky modifikovaných rostlin a při somatické hybridizaci. Tato technika umožňuje fúzi protoplastů ze dvou rostlin, přičemž vzniklý fúzní produkt je následně regenerován jako hybridní rostlina. Tím je umožněno vytvářet hybridy v rámci stejného druhu, modifikovat ploidii a dokonce překonávat reprodukční bariéry mezi nekompatibilními druhy (Jiang *et al.*, 2013; Adhikary *et al.*, 2021; Hesami *et al.*, 2021a).

V posledních letech zažívají protoplastové kultury konopí počátek expanze. Vědecká společnost se snaží o optimalizaci podmínek izolace a vycházejí první zprávy o využití protoplastů pro studium přechodné exprese a editaci genomu (Hesami *et al.*, 2021a).

3.3.1 Izolace a purifikace

Úspěšná izolace protoplastů je ovlivněna mnoha faktory, které mohou být jak druhově, tak genotypově odlišné. Mezi nejdůležitější patří výběr zdrojového materiálu (stáří a typ), podmínky enzymatického ošetření (složení a koncentrace enzymů, teplota a čas inkubace) a způsob přečištění (např. vhodné nastavení centrifugačních podmínek). Výťažnost a životaschopnost se také odvíjí dle vlastností použitých roztoků, jako je vhodná osmolarita, pH a teplota (Evans *et Bravo*, 2013).

Dostupné práce, kterým se budu věnovat níže, se shodují v tom, že izolace konopných protoplastů je proveditelná, ale poměrně problematická záležitost. Kvůli genotypovým odlišnostem a rozdílům v donorových materiálech dosud nebyl vyvinut žádný univerzální postup. Dosavadní metodiku lze shrnout, že jako zdroj pro izolaci mohou být použity mladé a staré listy, jak z rostlin pěstovaných ve skleníku, tak *in vitro*, kalusy, děložní listy a hypokotyle. Rostlinný materiál je obvykle nařezán na malé kousky, nebo listy, pokud jsou zbaveny epidermis, mohou být ponechány v celku. Protoplasty jsou dále izolovány enzymatickou metodou, obvykle pomocí celulázy, macerozymu a pektolyázy. K přečištění se využívá diferenciální centrifugace na sacharózovém gradientu (Lazič, 2020; Kim *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022).

Dříve existovaly pouze dva zdroje, které popisovaly metodu izolace konopných protoplastů, avšak informace byly v mnohém nejasné nebo málo podrobné. První práce zkoumala účinek kombinací různých enzymů, vliv osmolarity roztoků a výchozího materiálu. Autor provedl úspěšnou izolaci z mladých i starých listů rostlin pěstovaných ve skleníku a z kalusů. Bohužel není uvedeno, z jakého množství materiálu byly protoplasty izolovány

a jaká byla životnost (Jones, 1979). Téměř 30 let se konopnými protoplasty nikdo neza-
býval. Až Morimoto *et al.* (2007) pro studium buněčné smrti použili protoplasty z listů
a popsali složení používaných roztoků. Údaje o koncentraci a životaschopnosti však ne-
byly uvedeny.

Více jak deset let se v této problematice nijak nepokročilo. Izolací konopných pro-
toplastů se pak věnovali až Flaishman *et al.* (2019). Jelikož se však jednalo o patent,
tak konkrétní data nebyla zveřejněna. Lazič (2020) se ve své práci snažil o optimalizaci
izolace protoplastů z kalusů, mladých listů a hypokotylů *in vitro* vyklíčeného konopí.
Nejlepších výsledků bylo dosaženo u etiolovaných hypokotylů.

V roce 2021 byly publikovány 2 zásadní práce, kde byly rozsáhle optimalizovány pod-
mínky izolace konopných protoplastů. Matchett-Oates *et al.* (2021b) se zaměřili na mladé
listy *in vitro* pěstovaných apikálních explantátů. Beard *et al.* (2021) zvolili stejný typ rost-
linného materiálu a k izolaci protoplastů použili enzymatický roztok, který je zaveden pro
A. thaliana obohacený o enzym pektolýázu.

Rok 2022 přinesl další další 2 zprávy o izolaci protoplastů z konopí. Kim *et al.* (2022)
optimalizovali podmínky enzymatického ošetření pro izolaci protoplastů z plně vyvinu-
tých dospělých listů rostlin konopí pěstovaných ve skleníku. Bylo tak dosaženo kvalitního
výtěžku, ale informace o viabilitě nebyla uvedena. Zhu *et al.* (2022) se věnovali izolaci
z hypokotylů a především z děložních listů. Právě děložní listy poskytly protoplasty se za-
tím největší výtěžností i viabilitou.

V roce 2024 byla publikována práce o izolaci protoplastů z konopných kalusů od-
vozených z hypokotylů. Ke zvýšení výtěžnosti bylo použito médium s 2-aminoindan-2-
fosfonovou kyselinou (AIP). AIP je kompetitivním inhibitorem enzymu pro syntézu lig-
ninu, což je složka sekundární buněčné stěny. Buňky kalusu s takto oslabenou buněčnou
stěnou podléhaly protoplastizaci s mnohem větší efektivitou (Monthony *et Jones*, 2024).

Celkový přehled dostupných publikací, které se věnovaly izolaci konopných proto-
plastů, společně s detailnějšími informacemi podmínek izolace shrnuje Tabulka 2.

3.3.2 Kultivace a regenerace

De novo regenerace je důležitou schopností protoplastů, která se u jiných rostlin vyu-
žívá v oblasti genetického inženýrství a vývoje nových kultivarů. Zdá se, že u konopí
dosavadní výzkum ještě nedosáhl svého plného potenciálu, neboť pozornost vědecké ko-

Tabulka 2: Studie izolace protoplastů u konopí

Odrůda	Zdrojový materiál	Podmínky izolace	Výtěžnost Viabilita [%]	Literatura
Afghánská	Mladý a staré listy (pěstováno ve skleníku) a kalusy	1% pektináza; 1% driseláza; 10% sorbitol; 1% MgCl ₂ ; 1% KH ₂ PO ₄ ; 4–16 h	10^5 buněk·ml ⁻¹ -	Jones (1979)
Mexická	Listové buňky	1% celulóza; 0,2% macerozým; 0,4M manitol; 0,1% pektolyáza; 88mM sacharóza; 30 °C; 4 h; jemné míchání	- -	Morimoto <i>et al.</i> (2007)
Finola	Kalusy, mladé listy, hypokotily <i>in vitro</i> semenáčků	1,5% celulóza; 0,4% macerozým (listy); 1% celulóza; 0,1% macerozým (hypokotily); 3–14 h; 25 °C; jemné míchání	$1,8 \cdot 10^5$ buněk·ml ⁻¹ 25,7	Lazič (2020)
Cannbio-2; bohaté na THC/CBD	Mladé listy <i>in vitro</i> apikálních explantátů	2,5% celulóza; 0,3% macerozým; 0,7M manitol; 20mM MES; 10mM CaCl ₂ ; 20mM KCl; 16 h; 28 °C; bez míchání	$7,8 \cdot 10^6$ buněk·g ⁻¹ 72	Matchett-Oates <i>et al.</i> (2021b)
Cherry x Otto II: Sweetened a další	Mladé listy <i>in vitro</i> apikálních explantátů	1,25% celulóza; 0,3% macerozým; 0,4M manitol; 0,075% pektolyáza; 20mM MES; 0,1% BSA; 10mM CaCl ₂ ; 20mM KCl; 16 h; pokojová teplota; jemné míchání	$2,27 \cdot 10^6$ buněk·g ⁻¹ 82	Beard <i>et al.</i> (2021)
Abacus	Plně vyvinuté dospělé listy (pěstováno ve skleníku)	1,5% celulóza; 0,4% macerozým; 1% pektolyáza; 0,4M manitol; 0,5M MES; 0,1% BSA; 8mM CaCl ₂ ; 15 h; 23 °C; jemné míchání	$9,7 \cdot 10^6$ buněk·g ⁻¹ -	Kim <i>et al.</i> (2022)
3 bohaté na THC; 2 bohaté na CBD; 3 přechodné	Hypokotily a děložní listy	2,5% celulóza; 0,5% macerozým; 0,4M manitol; 0,03% 2-Merkaptoethanol; 20mM MES; 0,1% BSA; 10mM CaCl ₂ ; 20mM KCl; 6 h; 22 °C; jemné míchání	$1,15 \cdot 10^7$ buněk·g ⁻¹ 98,5	Zhu <i>et al.</i> (2022)
Finola	Kalusy	1,25% celulóza; 0,3% macerozým; 0,4M manitol; 0,075% pektolyáza; 20mM MES; 0,1% BSA; 10mM CaCl ₂ ; 20mM KCl; 16 h; 25 °C; jemné míchání	$8,8 \cdot 10^4$ buněk·g ⁻¹ 92,1	Monthony <i>et Jones</i> (2024)

munity se tomuto aspektu věnovala dosud jen minimálně.

Existují pouze dvě zprávy alespoň o prvních pokusech o regeneraci. První je patent, který uvádí, že pouze asi 4 % konopných protoplastů přežilo 48 hodin v kapalně kultuře a další kultivací k *de novo* regeneraci rostlin nedošlo (Flaishman *et al.*, 2019). Detailnější informace a první popis buněčného dělení konopných protoplastů nedávno přinesli až Monthony *et Jones* (2024). V jejich již zmíněné práci se autoři nevěnovali pouze izolaci protoplastů, ale provedli i zatím nejdelší kultivaci. Do 3 týdnů, kdy životaschopnost začala prudce klesat, zaznamenali částečnou regeneraci. Potvrzena byla i závislost viability na hustotě protoplastových kultur.

3.3.3 Využití protoplastových kultur

První práce, která se věnovala izolaci konopných protoplastů, je snad i jedinou, ve které byla provedena mezidruhová somatická hybridizace fúzí protoplastů konopí a rajčete. Následná kultivace a regenerace hybridní rostliny nebyla provedena (Jones, 1979).

První zprávy o úspěšné přechodné transformaci konopných protoplastů přinesli Matchett-Oates *et al.* (2021b) a o měsíc později Beard *et al.* (2021). Protoplasty byly přechodně transformovány plasmidovou DNA nesoucí expresní kazetu s fluorescenčním markerem. K přenosu chimerních genů byla použita chemická metoda pomocí polyethylenglykolu. V první práci byla dosažena 23% a ve druhé až 31% efektivita transformace. O rok později vyšel článek, který uvedl, že dosáhl přechodné transformace protoplastů s efektivitou 55,3 %. Použity byly fúzní, fluorescenčně značené geny pro biosyntézu kabinoidů (Kim *et al.*, 2022). V stejném roce byla publikována ještě jedna práce, kde byla provedena transfekce konopných protoplastů s účinností až 75,4 % (Zhu *et al.*, 2022).

Přechodná transformace protoplastů je také užitečnou metodou pro ověření účinnosti navrženého konstruktů gRNA pro následnou editaci genomu pomocí technologie cílené mutagenese CRISPR/Cas9. Zhang *et al.* (2021) vytvořili detekční systém pro úpravu specifity gRNA v konopných protoplastech a umožnili tak vyhodnocení efektivitu mutagenese na cílových oblastech genů.

Prostřednictvím kultur protoplastů lze nejen účinně posoudit nástroje pro úpravu genů, ale také je teoreticky možné přímo regenerovat transgenní rostliny konopí (Li *et al.*, 2022). Jak ale uvedli Hesami *et al.* (2021a), do dnešního data stále platí, že neexistuje žádná zpráva o kompletní regeneraci rostlin konopí z protoplastů.

3.4 Molekulární charakteristika protoplastů

Procesem protoplastizace buňky mění svůj jaderný program a ztrácí svůj diferencovaný stav. Při následné kultivaci dochází k částečné či úplné dediferenciaci, která se odráží ve změněné expresi genů. Právě proto jsou rostlinné protoplasty jedinečným nástrojem pro studium molekulárních mechanismů souvisejících s organizací chromatinu v jádře, stejně jako pro sledování specifické genové exprese (Cápal *et al.*, 2014).

3.4.1 Změny ve struktuře chromatinu

Chromatin je komplexní struktura obsažená v jádře eukaryotických buněk, která se skládá z DNA, bílkovin a RNA. Podle těsnosti vazeb, prostorového uspořádání a přístupnosti k transkripčnímu aparátu můžeme rozlišovat jeho dvě základní podoby, a to euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je volnější struktura, která je aktivnější a umožňuje přepis genů. Naopak heterochromatin je kompaktnější strukturou a v genové expresi může být částečně či kompletně neaktivní. Chromatin je tedy klíčovým hráčem v organizaci genetické informace a jeho struktura může odpovídat genové aktivitě (Wolffe, 1998).

Známým jevem protoplastizace je velice rychlá dekondezace heterochromatinu a zánik chromocenter. Jedná se o přechodnou fázi, která je nezbytná pro aktivaci genů, jejichž produkty jsou nutné pro vytvoření kompetence pro změnu buněčné identity. Jedná se tedy o první krok vedoucí k dediferenciaci. Dlouhou dobu nebylo známo, jak k tomuto fenoménu dochází. Bylo prokázáno, že na redukcii heterochromatinu samotné řezání materiálu před použitím enzymatického roztoku vliv nemá. Nejspíše k tomu tedy dochází vlivem stresových podmínek samotné enzymolýzy, přičemž velká role je přikládána volným kyslíkovým radikálům (Zhao *et al.*, 2001; Tessadori *et al.*, 2007; Ondřej *et al.*, 2010; Grafi *et al.*, 2011).

Druhým krokem je vstup do buněčného cyklu a získání nové buněčné identity. Kompetentní buňky při kultivaci prodělávají další změny v organizaci chromatinu. Dochází ke druhé dekondezaci, která byla přímo spojena s auxinem indukovanou aktivitou ubiquitinového proteolytického systému (Jamet *et al.*, 1990; Genschik *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2001). Dále se opětovně formují chromocentra a celkově se ustanovuje nová rovnováha mezi euchromatinem a heterochromatinem. Tyto změny jsou přímo závislé na podmínkách kultivace a zejména na použití fytohormonů. Ne každá buňka získá při kultivaci schopnost regenerace. Rekonstituce chromocenter může však sloužit jako marker regene-

rační schopnosti protoplastů (Ondřej *et al.*, 2008).

Bylo prokázáno, že rychlost a míra rekondenzace chromatinu je závislá na množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Po přidání antioxidantů do kultivačního média dochází k restrukturalizaci chromatinu rychleji a zároveň i ke spuštění antioxidačních mechanismů (Ondřej *et al.*, 2010).

3.4.2 Změny v epigenomu

Úroveň kondenzace chromatinu a exprese genů souvisí s epigenetickými značkami, a to jak na DNA, tak i na histonech. Je intuitivní předpokládat, že za změnami ve struktuře chromatinu u protoplastových kultur by mohla stát právě epigenetika. Tessadori *et al.*, (2007) však prokázali, že redukce heterochromatinu se neodráží ve snížení výskytu represivních značek (methylace DNA, H3K4me2 a H3K9me2). Celkový výskyt těchto značek byl stálý od izolace po kultivaci a změny v kondenzaci chromatinu tedy musí být způsobeny jiným mechanismem. S tím by mohla souviset předchozí zpráva o změnách v redistribuci heterochromatinového proteinu 1 (HP1). V rozporu však autoři detekovali i změny v modifikaci histonu H3 (Williams *et al.*, 2003).

Cápal *et Ondřej* (2014) také nedetekovali významné rozdíly v methylaci DNA ihned po izolaci protoplastů. Zaznamenali však klesající tendenci v období rané kultivace s největším poklesem v období rekonstituce chromocenter.

3.4.3 Expresní profil protoplastů

Protoplastizací zvýšená dostupnost chromatinu podporuje stochastickou aktivaci genové exprese, která je spojována se získáním regeneračního potenciálu. Až dále v průběhu buněčné dediferenciace procházejí protoplasty pozoruhodnými změnami ve svém vzoru genové exprese. Opouští program, který řídil specificitu dané somatické buňky, a zavádí se nový, který umožňuje dělení a vznik buněk s odlišným buněčným osudem (Zhao *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2021). Výzkumy se tedy nejčastěji zaměřují na geny zapojené do regenerace, buněčného dělení a dediferenciace. Podstatné je věnovat pozornost i genům souvisejícím se stresem, zejména oxidačním (Eeckhaut *et al.*, 2013).

3.4.3.1 Hormonální signalizace

Cytokininy (Ctk) jsou esenciální rostlinné hormony, které se podílejí na vývoji, regulují růst (tvorba meristémů a listů, dělení buněk) a účastní se stresové reakce na abiotické

faktory. Signální dráha Ctk vede k aktivaci transkripčních faktorů, čímž dochází k expresi cílových genů, mezi které patří i transkripční represory, které zprostředkovávají negativní zpětnovazebnou smyčku (Hwang *et Sheen*, 2001; Li *et al.*, 2021).

Fytohormon auxin (Aux) je klíčovým regulátorem růstu a vývoje rostlin, který přenáší signály jak na dlouhé, tak na krátké vzdálenosti. Krátká a přitom všestranná Aux signální dráha se skládá z proteinů tří genových rodin (TIR1/AFB, Aux/IAA a ARF). TIR1/AFB patří mezi F-boxové proteiny, které jsou součástí enzymu E3. Tento enzym je znám také jako ubikvitin-protein ligáza typu SCF, která přenáší molekuly proteinu ubikvitinu na jiné proteiny, čímž je předurčuje k proteazomové degradaci. V přítomnosti Aux jsou touto cestou odstraňovány transkripční represory Aux/IAA a prostřednictvím transkripčního faktoru ARF pak mohou být exprimovány geny Aux odpovědi (Leyser, 2018). Jako marker spuštěné Aux signální dráhy může sloužit gen *IAA-2*, který kóduje protein ARG7 (Yang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Král *et al.*, 2022)

Kombinace fytohormonů Aux a Ctk je nezbytná k vyvolání buněčného dělení protoplastů. V nepřítomnosti fytohormonů protoplasty zanikají. Pokud je aplikován pouze Aux, dochází k reverzi původního stavu (rediferenciace). Pouze pod vlivem společného působení dochází ke druhé dekondukcii chromatinu, protoplasty mohou vstoupit do buněčného cyklu a projít dediferenciací (Vissenberg *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

3.4.3.2 PCNA: Proliferační gen

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) je evolučně konzervovaný protein, který se nachází u všech eukaryot a archeí. Má klíčovou úlohu při řízení mnoha jaderných procesů spojených s replikací DNA. Jeho hlavní funkcí je koordinovat nábor mnoha proteinů do míst replikace DNA a zajišťovat tak její plynulý průběh. Podílí se také na syntéze translezní DNA, excizních opravách bází a nukleotidů, opravuje chybné párování, účastní se rekombinace a remodelace chromatinu, koheze sesterských chromatid a kontroly buněčného cyklu. PCNA dokonce inhibuje replikaci některých virů, takže je i součástí rostlinného imunitního systému (Strzalka *et Ziemienowicz*, 2011; Lee *et al.*, 2019).

PCNA je cílovým genem transkripčního faktoru pRb/E2F. Faktor E2F řídí přechod z klidové fáze G₀ do S a tedy iniciaci vstupu do buněčného cyklu. *E2F* je běžně exprimován v buňkách mezenchymu, ale také i v protoplastech postupujících do S fáze. V diferencovaných buňkách je inhibován vazbou s hypofosforylovanou formou proteinu

retinoblastomu (pRb). Bylo zjištěno, že pRb má schopnost asociace s proteinem HP1, který je převážně distribuován v heterochromatických oblastech. Tímto procesem může být rekrutován do promotorových oblastí euchromatických genů. To naznačuje, že tyto proteiny mohou spolupracovat při umlčování cílových genů E2F procesem heterochromatizace. Tato suprese se ruší procesem protoplastizace (nejspíše přesun HP1). K transkripci E2F cílených genů dochází ale až těsně před vstupem do S fáze, čemuž odpovídá fosforylace pRB a následné uvolnění E2F (Williams *et al.*, 2003).

Zvýšená exprese *PCNA* genu může sloužit jako marker buněčného dělení. K tomuto účelu byla použita například u protoplastových kultur hrachu, okurky a květáku (Korhoňová, 2011; Trusinová, 2012; Cápál *et Ondřej*, 2014). Jak ale poukázali van Diest *et al.* (1998), vzhledem k více funkcím může být *PCNA* exprimován i u neproliferujících se buněk.

3.4.3.3 PP2C a LEA: Geny související s abiotickým stresem

Kyselina abscisová (ABA) je klíčový fytohormon, který hraje mnoho rolí ve fyziologii rostlin, zejména v jejich odpovědi na abiotické stresy a ve vývojových procesech. Její vliv se projevuje od embryogeneze až po senescenci. Pomocí ABA jsou významně regulovány rodiny genů proteinfosfatáz 2C (*PP2C*), které zprostředkovávají negativní regulaci ABA signalizace, a rodiny late embryogenesis abundant (*LEA*) genů. LEA proteiny chrání buňky před dehydratací a poškozením způsobeným extrémními teplotami a salinitou, zatímco *PP2C* regulují citlivost odezvy na ABA a zajišťují tak adekvátnost adaptivních reakcí (Park *et al.*, 2009; Zhu, 2016; Liu *et al.*, 2019).

3.4.3.4 APX a CAT: Ochrana před oxidativním stresem

Životaschopnost protoplastů je silně ovlivněna oxidačním stresem, který vzniká kvůli hromadění reaktivních forem kyslíku (ROS). V organismech ROS vznikají pravidelně. Při stresových podmínkách se však jejich produkce zvyšuje, k čemuž právě dochází při enzymatické digesci buněčné stěny. Při větším množství narušují integritu plazmatické membrány a mnohými molekulárními mechanismy působí na buňky toxicky (Cassells *et Curry*, 2001). Rostliny mají k dispozici antioxidační mechanismy, díky kterým dochází k neutralizaci ROS. Hlavním detoxikačním systémem v rostlinných buňkách je askorbát-glutathionový cyklus, v němž hrají klíčovou roli enzymy askorbátperoxidázy (APX). Katalyzují přeměnu peroxidu vodíku na vodu za použití askorbátu jakožto specifického do-

nora elektronů. Dalšími enzymy jsou katalázy (CAT), které rovněž přeměňují peroxid vodíku na vodu, ale produkuje se tak i kyslík (Caverzan *et al.*, 2012; Ratanasanobon *et Seaton*, 2013).

Experimentálně bylo zjištěno, že u čerstvě izolovaných protoplastů je exprese genů pro antioxidantní enzymy nižší nežli v donorovém materiálu. S následnou kultivací se antioxidantní systém aktivuje a vrcholu obvykle dosahuje do tří dnů. S tím inverzně koreluje množství ROS. Pokud ke spuštění nedojde, protoplasty rychle ztrácejí viabilitu. Zásadní vliv těchto enzymů podporuje i nárůst životaschopnosti po jejich přidání do enzymatického roztoku (Kapur *et al.*, 1993; Siminis *et al.*, 1994; Ondřej *et al.*, 2010; Ratanasanobon *et Seaton*, 2013; Cápál *et Ondřej*, 2014; Zhang *et al.*, 2022).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Konopí technické s nízkým i vysokým obsahem CBD: semena *Cannabis sativa* 'USO 31', 'Fédora 17', 'Finola', 'Futura 75', 'Fibror 79', 'Santhica 27' a 'Santhica 70' (poskytnuto firmou Agritec s.r.o., Šumperk) a *in vitro* kultury kultivarů odvozených z 'ELETTA CAMPANA' (z kolekce Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci). Konopí medicínální: *in vitro* kultury kultivarů odvozených z 'Tangerine Dream' (z kolekce Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci).

Rostliny byly pěstovány ve skleníku a ve sterilním *in vitro* prostředí.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Ampicilin (Duchefa, kat. č. A0104)
- Agaróza (Serva, kat. č. 11404)
- Celulóza R-10 (Duchefa, kat. č. C8001)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, kat. č. D4540)
- DNase/RNase free voda
- Ethanol 96%
- Fluorescein diacetát (FDA) (Serva, kat. č. 21575)
- Gel Loading Dye, Purple (6X) (BioLabs, kat. č. B7024S)
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Biotium, kat. č. 41003)
- Glukóza (Duchefa, kat. č. G0802)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, kat. č. A2153)
- HyperLadder™ 50bp (Bioline, kat. č. BIO-33054)
- HyperLadder™ 100bp (Bioline, kat. č. BIO-33056)
- Chloramfenikol (Duchefa, kat. č. C0113)
- Chlorid draselný (KCl) (Chemapol)
- Chlorid sodný (NaCl) (Chemapol)
- Chlorid vápenatý (CaCl₂) (Penta, kat. č. 16770-31000)
- Jar (Procter & Gamble)
- Kyselina askorbová (Sigma-Aldrich, kat. č. A5960)
- Kyselina indol-3-octová (IAA) (Sigma-Aldrich, kat. č. I5386)

- Kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová (MES) (Duchefa, kat. č. M1503)
- Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (Sigma-Aldrich, kat. č. 47896)
- Kyselina 3-indolylmáselná (IBA) (Duchefa, kat. č. I0902)
- Macerozym R-10 (Duchefa, kat. č. M8002)
- Mannitol (Duchefa, kat. č. M0803)
- Médium DKW (Duchefa, kat. č. D0247)
- Médium Murashige a Skoog (MS) (Duchefa, kat. č. M0222)
- Médium ViVi 6 (Duchefa, kat. č. DU1552)
- Meta-topolin (mT) (Duchefa, kat. č. T0941)
- Pektolyáza Y-23 (Duchefa, kat. č. P8004)
- Plant Preservative Mixture (PPM™) (Plant Cell Technology, kat. č. 1000 PPM)
- Primery (Macrogen; Generi Biotech)
- RNA Gel Loading Dye (2X) (ThermoScientific, kat. č. R0641)
- Sacharóza (Duchefa, kat. č. S0809)
- SAVO Originál (Unilever)
- Thidiazuron (TDZ) (Sigma-Aldrich, kat. č. P6186)
- 6-benzylaminopurin (BAP) (Sigma-Aldrich, kat. č. B3408)
- 6-(Y,Y-dimethylallylamino)purin (2iP) (Duchefa, kat. č. D0934)

Použité soupravy

- DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich, kat. č. AMPD1)
- GoTaq® DNA Polymeras (Promega, kat. č. M3005)
- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, kat. č. BIO-65054)
- SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, kat. č. BIO-98005)
- Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, kat. č. STRN50)

Použité roztoky a jejich příprava

- **0,5M EDTA:** 186,1 g $N_2EDTA \cdot 2H_2O$ rozmíchat v 800 ml dH_2O , upravit pH (8), doplnit do 1 000 ml, sterilizovat filtrací.
- **10x TBE pufr:** 108 g Tris base a 55 g kyseliny borité rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH_2O a přidat 40 ml 0,5M EDTA, upravit pH (5,8), doplnit do 1 000 ml, sterilizovat filtrací.
- **0,5x TBE pufr:** 250 ml 10x TBE doplnit do 5 000 ml dH_2O .
- **20% SAVO:** 100 ml komerčního přípravku SAVO Originál doplnit do 500 ml dH_2O , přidat kapku smáčedla Jaru.
- **70% Ethanol:** 365 ml 96% ethanolu doplnit do 500 ml dH_2O .
- **Enzymatický roztok 1a (ER1a):** V 80 ml dH_2O (55 °C) rozpustit 2,5 g celulózy a 0,3 g macerozemu, přidat 12,75 g mannitolu, 0,39 g MES, 0,15 g KCl a 0,11 g $CaCl_2$. Doplnit dH_2O do 100 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **Enzymatický roztok 1b (ER1b):** V 80 ml dH_2O (55 °C) rozpustit 2,5 g celulózy, 0,3 g macerozemu a 0,075 g pektolyázy, přidat 12,75 g mannitolu, 0,39 g MES, 0,15 g KCl a 0,11 g $CaCl_2$. Doplnit dH_2O do 100 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **Enzymatický roztok 1c (ER1c):** V 80 ml dH_2O (55 °C) rozpustit 2,5 g celulózy, 0,3 g macerozemu a 1 g pektolyázy, přidat 12,75 g mannitolu, 0,39 g MES, 0,15 g KCl a 0,11 g $CaCl_2$. Doplnit dH_2O do 100 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **Enzymatický roztok 1d (ER1d):** V 80 ml dH_2O (55 °C) rozpustit 2,5 g celulózy a 0,3 g macerozemu, přidat 0,09 g glukózy, 0,2 g MES, 0,037 g KCl, 1,39 g $CaCl_2$ a 0,89 g NaCl. Doplnit dH_2O do 100 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **Enzymatický roztok 2 (ER2):** V 80 ml dH_2O (55 °C) rozpustit 1,25 g celulózy, 0,4 g macerozemu a 0,075 g pektolyázy, přidat 7,29 g mannitolu, 0,39 g MES, 0,15 g KCl, 0,11 g $CaCl_2$ a 0,1 g BSA. Doplnit dH_2O do 100 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **1/2 MS médium:** 2,2 g MS média, 20 mg kys. askorbové a 30 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH_2O . 8 g agaru rozpustit v 500 ml dH_2O a doplnit dH_2O do 1 000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí přidat 30 ml roztoku antibiotik a 420 μ l PPM.

- **Kultivační médium č. 1 (KM1):** 6,17 g ViVi 6 média, 20 mg kys. askorbové a 22 g sacharózy rozpustit v 200 ml dH₂O. 7 g agaru rozpustit v 600 ml dH₂O. Po smíchání doplnit dH₂O do 1 000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí přidat 420 µl PPM a 30 ml roztoku antibiotik s 0,3 mg TDZ, sterilizovat filtrací.
- **Kultivační médium č. 2 (KM2):** 6,17 g ViVi 6 média, 20 mg kys. askorbové a 22 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH₂O. 7 g agaru rozpustit v 500 ml dH₂O. Po smíchání doplnit dH₂O do 1 000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí přidat 420 µl PPM a 30 ml roztoku antibiotik s 0,1 mg mT a 0,1 mg IBA, sterilizovat filtrací.
- **Kultivační médium č. 3 (KM3):** 5,58 DKW média, 20 mg kys. askorbové a 22 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH₂O. 7 g agaru rozpustit v 500 ml dH₂O. Po smíchání doplnit dH₂O do 1000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí 420 µl PPM a přidat 30 ml roztoku antibiotik s 0,1 mg mT a 0,1 mg IBA, sterilizovat filtrací.
- **Kultivační médium č. 4 (KM4):** 6,17 g ViVi 6 média, 20 mg kys. askorbové a 22 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH₂O. 7 g agaru rozpustit v 500 ml dH₂O. Po smíchání doplnit dH₂O do 1 000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí přidat 420 µl PPM a 30 ml roztoku antibiotik s 0,1 mg 2iP, sterilizovat filtrací.
- **Kultivační médium č. 5 (KM5):** 5,58 DKW média, 20 mg kys. askorbové a 22 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH₂O. 7 g agaru rozpustit v 500 ml dH₂O. Po smíchání doplnit dH₂O do 1 000 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním. Po zchladnutí přidat 420 µl PPM a 30 ml roztoku antibiotik s 0,1 mg 2iP, sterilizovat filtrací.
- **Promývací roztok W5 (W5):** Ve 300 ml dH₂O rozpustit 0,45 g glukózy, 0,98 g MES, 0,19 g KCl, 6,94 g CaCl₂ a 4,5 g NaCl. Doplnit dH₂O do 500 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním.
- **Promývací roztok 1 (W1):** Ve 300 ml dH₂O rozpustit 63,77 g mannitolu, 1,95 g MES, 0,75 g KCl a 0,56 g CaCl₂. Doplnit dH₂O do 500 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním.
- **Promývací roztok 2 (W2):** Ve 300 ml dH₂O rozpustit 36,44 g mannitolu, 1,95 g MES, 0,75 g KCl, 0,56 g CaCl₂ a 0,5 g BSA. Doplnit dH₂O do 500 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat autoklávováním.

- **Regenerační médium (RM):** Ve 400 ml dH₂O rozpustit 1,1 g MS média a 77,02 g sacharózy, přidat 1 mg IAA, 0,25 mg 2,4-D a 0,25 mg BAP. Doplnit dH₂O do 500 ml, upravit pH (5,8), sterilizovat filtrací.
- **Roztok antibiotik:** V 1 ml DMSO rozpustit 133 mg ampicilinu a 66 mg chloramfenikolu, doplnit dH₂O do 30 ml, sterilizovat filtrací.
- **Zásobní a pracovní roztok FDA:** 5 mg FDA rozpustit v 1 ml acetonu (uchováváno při -20°C); 20 µl zásobního roztoku FDA přidat do do 1 ml 4% roztoku sacharózy.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytické váhy AE 240 (Mettler Toledo)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga ROTOFIX 32 (Hettich)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- Digestoř (Merci®)
- Digitální předvážky (KERN)
- Dokumentační systém (UVITEC Cambridge)
- Elektroforetický systém Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- Fytotron (PSI)
- Homogenizátor FastPrep®-24 (MP Biomedicals)
- Inkubátor BF 115 (Binder)
- Laminární box Helios 48 (Steril)
- Magnetická míchačka MR 3001 (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR)
- Mikrovlnná trouba MS023 (Hitachi)
- pH metr FE20-KIT (Mettler Toledo)
- Real-Time PCR detekční systém CFX Connect (Bio-Rad)
- Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific)
- Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)
- Termocyklér PTC-200 (MJ Research)
- Třepačka KS 130 basic (IKA)
- UV transiluminátor (Herolab)
- Vortex TTS 2 Yellowline (IKA)
- Zdroj stejnosměrného napětí EPS-601 (Amersham Biosciences)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Pěstování rostlin *ex vitro*

Konopí bylo pěstováno ve skleníku ve standardní směsi rašeliny a perlitu. Dospělé rostliny byly využity přímo pro izolaci protoplastů a jakožto zdroj explantátů pro převod do *in vitro*.

4.4.2 Převod a pěstování rostlin *in vitro*

V rámci nutnosti velkého množství sterilního rostlinného materiálu potřebného pro izolaci protoplastů byly založeny, mikropropagovány a dlouhodobě udržovány rozsáhlé *in vitro* kultury konopí. Ve sterilním prostředí byly pěstovány rostliny přímo ze semen, ale také rostliny převedené z *ex vitro*.

Prvním krokem povrchové sterilizace semen bylo použití 96% ethanolu (2 min při třepání), poté následovalo opláchnutí dH₂O (sterilizováno autoklávováním). V dalším kroku byl aplikován roztok 20% Savo se smáčedlem (20 min při třepání) a na závěr byla semena 3x promyta sterilní dH₂O. Sterilizovaná semena byla vložena do kultivačních nádob s 1/2 MS médiem a klíčení probíhalo ve fytotronu až po dobu 1 měsíce. Každý týden byly nově vyklíčené rostliny převáděny do kultivačních médií (KM1–5), ve kterých po dobu 6 měsíců probíhala mikropropagace s frekvencí pasáže ve dvoutýdenních intervalech.

Nodální segmenty z různých částí rostlin byly nejprve proplachovány dH₂O po dobu 20 min. Povrchová sterilizace byla provedena v obdobném schématu jako u semen, ale při mírnějších podmínkách. Byl použit 70% nebo 96% roztok ethanolu (20–60 s při třepání) a 20% Savo se smáčedlem (10–20 min při třepání). Explantáty byly dále udržovány a mikropropagovány v kultivačních médiích (KM1–5) s frekvencí pasáže 2 týdnů.

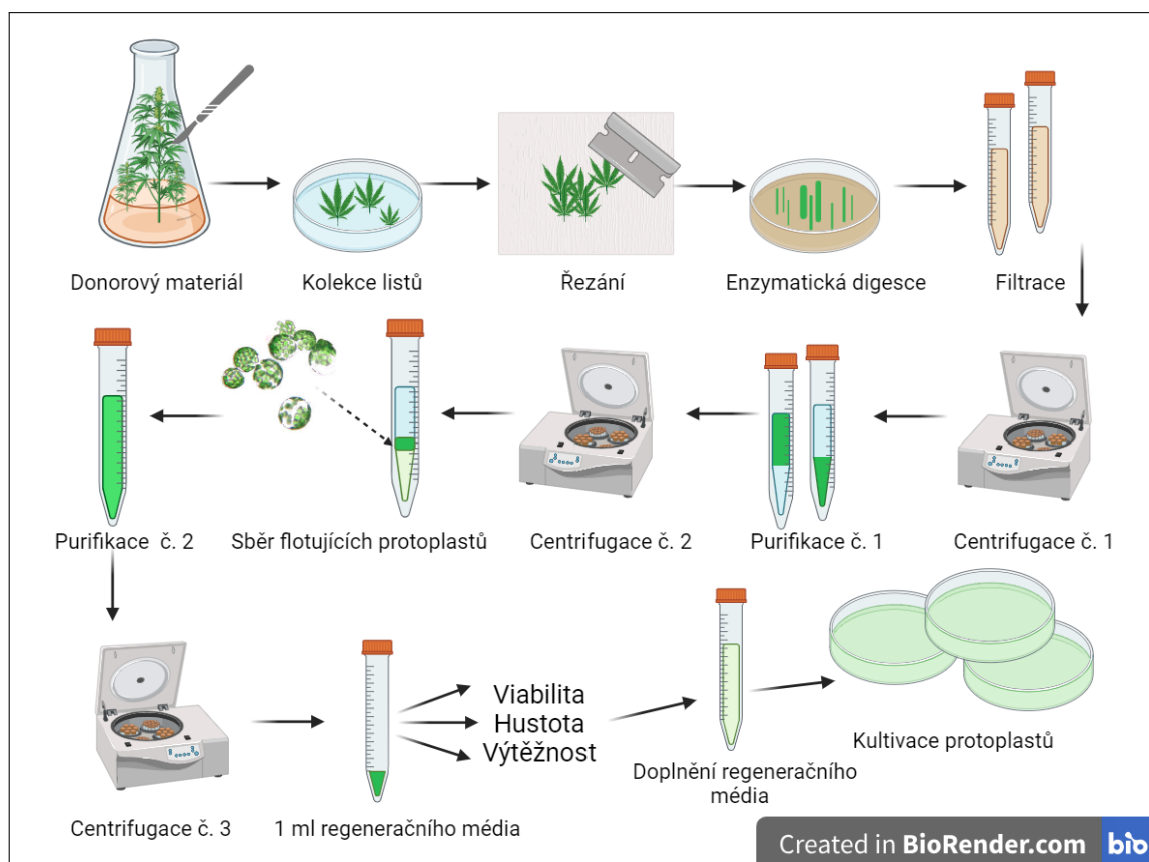
Fyzikální podmínky fytotronu byly jednotné pro všechny kultivace, a to teplota 22 °C, relativní vlhkost 40 % a fotoperioda 16 h světlo/8 h tma. Kultivačních nádob bylo vícero typů (Erlenmayerovy baňky, plastové nádoby). Ve snaze nastavit ideální růstové podmínky byla zkoumána různá růstová média společně s odlišnými fytohormony (Tab. 3). Pozorován byl také vliv různých systémů výměny plynů, a to izolované uzavření alobalem, nebo prodyšné pomocí chirurgické pásky (Ševčíková *et al.*, 2016 – modifikováno).

Tabulka 3: Specifické složky kultivačních médií

Kultivační médium (1 l)	Médium [g]	Růstové regulátory [mg]
KM1	ViVi 6 (6,17)	TDZ (0,3)
KM2	ViVi 6 (6,17)	mT (0,1); IBA (0,1)
KM3	DKW (5,48)	mT (0,1); IBA (0,1)
KM4	ViVi 6 (6,17)	2iP (0,1)
KM5	DKW (5,48)	2iP (0,1)

4.4.3 Izolace protoplastů

Protoplasty byly izolovány z listů různého stáří rostlin konopí pěstovaných ve sterilním prostředí *in vitro* a po sterilizaci také z listů rostlin *ex vitro*. Ta byla provedena 70% ethanolem (20 s při třepání), po následném opláchnutí sterilní dH₂O bylo použito 20% Savo (20 min při třepání) a na závěr byly listy 3x propláchnuty sterilní dH₂O. Schématický postup izolace a purifikace protoplastů je znázorněn na Obrázku 2. Centrifugační podmínky byly optimalizovány v rozmezí 700–1200 rpm a 5–12 min.



Obrázek 2: Schéma izolace a kultivace protoplastů

Z rostlin pěstovaných *in vitro* byly ve sterilním prostředí odebrány reprezentativní listy a vloženy do Petriho misky se sterilní dH₂O. Po odstranění stonkové a apikální části byly listy rychle nařezány na proužky o přibližné šířce 0,5–1 mm a přeneseny do Petriho misek s 6 ml enzymatického roztoku. Testováno bylo celkem 5 enzymatických roztoků (ER1a–d; ER2). Pro přehlednost uvádím jejich složení v Tabulce 4 níže.

Tabulka 4: Přehled enzymatických roztoků

Složení	ER1a	ER1b	ER1c	ER1d	ER2
Celuláza	2,5 %	2,5 %	2,5 %	2,5 %	1,25 %
Macerozym	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,4 %
Pektolyáza	–	0,075 %	1 %	–	0,075 %
Mannitol	0,7 M	0,7 M	0,7 M	–	0,4 M
Glukóza	–	–	–	5 mM	–
MES	20 mM	20 mM	20 mM	10 mM	20 mM
KCl	20 mM	20 mM	20 mM	5 mM	20 mM
CaCl₂	10 mM	10 mM	10 mM	125 mM	10 mM
NaCl	–	–	–	154 mM	–
BSA	–	–	–	–	0,1 %

(**ER1a**) Enzymatický roztok 1a připraven podle Matchett-Oates *et al.* (2021b). Složení enzymatických roztoků 1b–d (**ER1b–d**) částečně převzato od Matchett-Oates *et al.* (2021b), Beard *et al.* (2021) a Kim *et al.* (2022). (**ER2**) Enzymatický roztok 2 připraven podle Beard *et al.* (2021).

Enzymolýza probíhala při teplotě 25 °C ve tmě bez třepání po dobu 2–16 hod. Digescce byla po inkubaci zastavena přidáním promývacího roztoku. Testovány byly celkem 3 promývací roztoky (W5; W1–2), jejichž složení je zobrazeno v Tabulce 5. Sledován byl i vliv množství přidaného promývacího roztoku. Protoplastová suspenze byla následně přefiltrována přes 72 µm uheltonové sítko a zbylý rostlinný materiál byl nakonec ještě promyt promývacím roztokem.

Tabulka 5: Přehled promývacích roztoků

Složení	W5	W1	W2
Glukóza	5 mM	–	–
Mannitol	–	0,7 M	0,4 M
MES	10 mM	20 mM	20 mM
KCl	5 mM	20 mM	20 mM
CaCl ₂	125 mM	10 mM	10 mM
NaCl	154 mM	–	–
BSA	–	–	0,1 %

(W5) Převezato od Matchett-Oates *et al.* (2021b). (W1) Převezato a upraveno dle Matchett-Oates *et al.* (2021b). (W2) Převezato od Beard *et al.* (2021).

Filtrát byl převeden do 10ml skleněné centrifugační zkumavky, zcentrifugován a pouze sediment byl zachován. Pro následnou purifikaci byla použita centrifugace s diskontinuálním hustotním gradientem sacharózy. Testovány byly 2 přístupy. Sediment byl resuspendován ve 4 ml promývacího roztoku a poté podvrstven 2 ml 20% sacharózy, nebo resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy a převrstven 2 ml promývacího roztoku. Po následné centrifugaci byly protoplasty flotující na rozhraní převedeny do nové centrifugační zkumavky, promývacím roztokem byl objem doplněn podle potřeby a následovala centrifugace. Sediment byl resuspendován v 1 ml regeneračního média (RM).

4.4.4 Stanovení životnosti, koncentrace a výtěžnosti protoplastů

Životnost protoplastů byla zjištěna pomocí vitálního barvení fluorescein diacetátem (FDA). Ke kapce protoplastové suspenze bylo přidáno 10 µl pracovního roztoku FDA a po 5 min byla pod fluorescenčním mikroskopem stanovena životnost, jakožto procentuální zastoupení buněk s aktivním metabolismem (živých) z celkového počtu.

Koncentrace vyizolovaných protoplastů byla stanovena pomocí Bürkerovy komůrky. Pod světelným inverzním mikroskopem byly spočítány buňky v 10 zorných polích a na základě vzorce $P = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot z \cdot 10^3}{y}$ byl výsledek vztažen na 1 ml protoplastové suspenze. Podílem této hodnoty s hmotností použitého rostlinného materiálu byla získána informace o výtěžnosti izolace na 1 g čerstvé hmoty.

4.4.5 Kultivace protoplastů

Izolované protoplasty s viabilitou $> 60\%$ i $< 15\%$ byly doplněny požadovaným objemem RM média (Mathur *et* Koncz, 1998 – modifikováno) tak, aby výsledná koncentrace byla $1 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹. Získaná suspenze byla rozdělena po 2 ml do kultivačních nádob. Kultivace probíhala ve tmě při 25 °C. Ve 24hod intervalech po dobu 3 dnů byly vzorky odebírány a po centrifugaci byly protoplasty přeneseny do mikrozkušavky a uskladněny při -70 °C.

4.4.6 Izolace mRNA

K izolaci RNA byla použita souprava Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich). Postupovalo se podle pokynů výrobce s drobnými úpravami. Pro nízkou koncentraci se k eluci použilo jen poloviční množství elučního roztoku. Druhá eluce nebyla nutná. Izolace RNA z listů proběhla obdobně, předcházela jí pouze 30s homogenizace v homogenizátoru FastPrep®-24.

Koncentrace vyizolované RNA byla stanovena spektrofotometrem NanoDrop. Vzorky byly uskladněny při -70 °C.

4.4.7 Gelová elektroforéza

Kvalita izolované RNA a případná kontaminace DNA byla vyhodnocena metodou elektroforetické separace v agarózovém gelu. Vzorky s nedenaturovanou RNA byly smíchány s denaturačním nanášecím pufrům a následně byly analyzovány v 1,5% nedenaturačním agarózovém gelu (150 V, 40 min). Nukleové kyseliny byly vizualizovány barvivem GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water (Biotium) a jako standard molekulové váhy byl použit HyperLadder™ 50bp (Bioline).

4.4.8 Přečištění mRNA od DNA

K očištění vzorků RNA bylo použito ošetření Dnázou I Amplification Grade (Sigma-Aldrich). Vzorky RNA z listů byly přečištěny podle pokynů výrobce. U vzorků protoplastové RNA byl kvůli nízké koncentraci postup upraven. Použito bylo poloviční množství enzymu a na polovinu byl zkrácen i čas inkubace.

Koncentrace ošetřené RNA byla ověřena spektrofotometricky. Kvalita RNA a účinn-

nost reakce byla zkontrolována elektroforetickou separací. Před dalším použitím byly vzorky uloženy v $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.9 Dvoustupňová RT-qPCR

Prvním krokem této reakce bylo přepsání RNA do cDNA. K tomuto účelu byla využita souprava SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) a postupovalo se v souladu s pokyny výrobce. Reverzní transkripce proběhla při podmínkách uvedených v Tabulce 6.

Tabulka 6: Reakční podmínky syntézy cDNA

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [min]
Nasednutí primerů	25	10
Reverzní transkripce	42	15
Inaktivace reverzní transkriptázy	85	5

Před druhým krokem RT-qPCR byla pro ověření správného navržení primerů a jejich specifity provedena PCR reakce s end-point analýzou. Jako templát byla zvolena cDNA z listů a vybraných protoplastových kultur. Pro amplifikaci byla použita souprava GoTaq® DNA Polymerase (Promega) a teplotní profil reakce je uveden v Tabulce 7. PCR produkty byly separovány a detekovány v agarózovém gelu (příprava viz Gelová elektroforéza), ale jako marker molekulové hmotnosti byl použit HyperLadder™ 100bp (Bioline).

Tabulka 7: Reakční podmínky PCR

Proces	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [min]	Počet cyklů
Predenaturace	95	2	1
PCR amplifikace	95	1	40
	60	1	
	72	1	
Extenze	72	5	1

Ve druhém kroku RT-qPCR byla cDNA vybraných genů amplifikována metodou kvantitativní PCR (qPCR). Použita byla souprava SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bio-line). Pokyny výrobce byly dodrženy a reakce proběhla za doporučených podmínek (Tab. 8).

Tabulka 8: Reakční podmínky RT-qPCR

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Predenaturace	95	2 min	1
PCR amplifikace	95	5 s	40
	62	10 s	
	72	20 s	
Analýza teploty tání	65→95 (0,1 °C·s ⁻¹)	1 min	1

Pro vyhodnocení dat byl použit program CFX Maestro™. K ověření specifity PCR produktů byla provedena disociační analýza křivek tání. Relativní exprese genů byla stanovena pomocí metody podle Pfaffla, ve které je pro zpřesnění výsledku započítána i efektivita nasedání primerů.

Výsledné hodnoty exprese byly relativně vztaženy vzhledem ke kontrolnímu vzorku (List) – mladé listy *in vitro* pěstovaných semenáčků odrůdy 'USO 31'. Pokud se daný gen v listu neexprimoval, byla data vztažena ke vzorku čerstvě izolovaných protoplastů (0 h). Normalizace byla provedena podle doporučeného referenčního genu – *EF-1* pro elongační faktor 1. Přehled vybraných genů se sekvencemi použitých primerů je zobrazen v Tabulce 9.

Tabulka 9: Přehled použitých primerů

Sledovaný gen GenBank acc. no.	Sekvence primerů (5' - 3')	Velikost produktu	Literatura
<i>EF-1</i> JP480592	F: GCCCTGTCTTTGAGAGCAAC R: CAATCCACTGCTCAATGTGG	111	Deguchi <i>et al.</i> (2021)
<i>PCNA</i> XM_030647968.2	F: TCCAGACCTTAACCGAACCG R: TAGCGAACCCCTGAACCAACC	141	navrhuto
<i>LEA34</i> XM_030629974.1	F: CCAGAAGAACGGTGAAGCCT R: TCTCCGCATTTGCTATCGCT	416	Král <i>et al.</i> , (2022)
<i>PP2C-1</i> JP474397	F: GGGTTGATCTTGCTGCTC R: AACGCTAATGTTGTCCTTGC	83	Král <i>et al.</i> , (2022)
<i>IAA-2</i> JP461329	F: GACACTTGGTGGTTTGCG R: TGCCCGAGTTACCTGAAT	213	Král <i>et al.</i> , (2022)
<i>CAT</i> XM_030642267.2	F: GTGCTTACAACGCACCGTTT R: CGTTCTGGCATCCTTTCCCT	157	navrhuto
<i>APX</i> XM_030637583.2	F: GGGTTTTCCAGAAGCCACAT R: GGGTGCCTTATCGTCCAAA	517	navrhuto

4.4.10 Statistické hodnocení

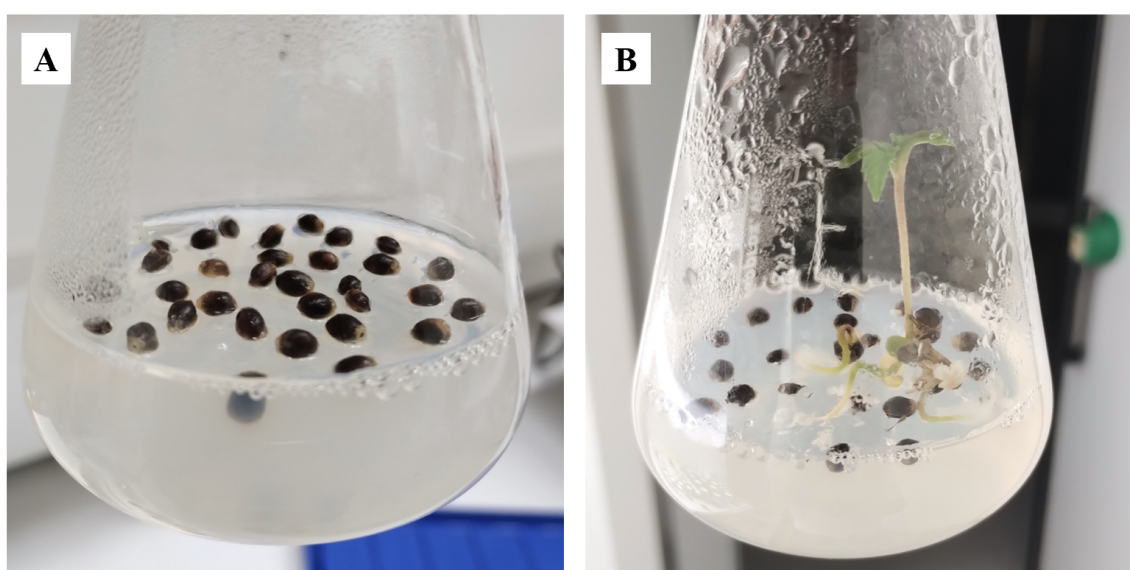
Získané výsledky relativní exprese byly statisticky zpracovány pomocí softwaru SPSS Statistics. Data byla nejprve podrobena analýze rozptylu (one-way ANOVA) a poté byly průměry porovnány pomocí dvou post-hoc testů. Dunnettův test byl použit pro hodnocení průkaznosti rozdílné exprese oproti kontrole a Tukeyho HSD test pro prokázání odlišnosti mezi jednotlivými kultivačními vzorky protoplastů. Významné rozdíly podle Dunnettova testu jsou v grafech znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a podle Tukeyho HSD testu kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o"). Hodnoty relativní exprese jsou v grafech uvedeny jako průměry (\pm směrodatná odchylka) stanovené ze čtyř technických a dvou až tří biologických opakování.

5 Výsledky

5.1 *In vitro* kultivace

5.1.1 Sterilizace

Povrchová sterilizace semen byla dostatečná. Četnost kontaminací se pohybovala kolem 1 %. Semena klíčila asynchronně (Obr. 3). Do 1 měsíce, kdy již klíčivost byla téměř nulová, byla schopna vyklíčit přibližně třetina semen.



Obrázek 3: Klíčení semen *Cannabis sativa in vitro*
(A) Semena 'USO 31', 0. den kultivace. (B) Semena 'USO 31', 7. den kultivace.

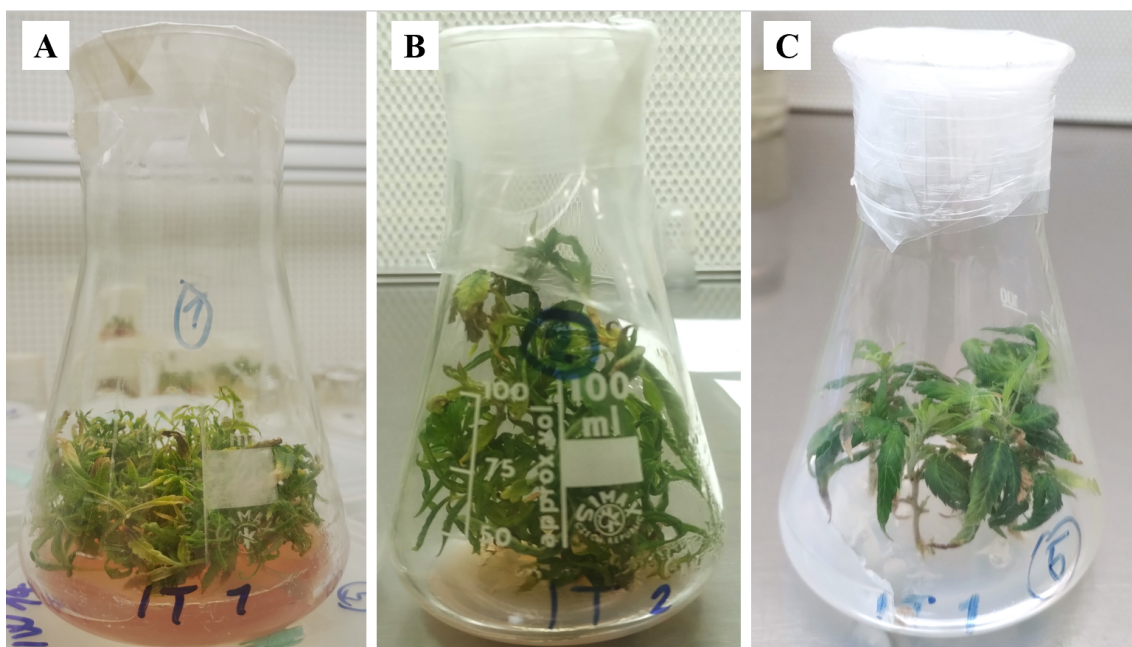
Nejvhodnější sterilizace nodálních explantátů bylo dosaženo při použití 70% ethanolu po dobu 20 s a 20% Sava po dobu 20 min. Při použití 96% ethanolu, nebo delší době působení, explantáty vykazovaly menší životnost a schopnost regenerace při podobné míře výskytu kontaminací. Zkrácením doby expozice roztoku Sava se účinnost sterilizace snižovala. Dále bylo zjištěno, že apikální, svěží a rychle rostoucí segmenty byly výrazně náchylnější na postup sterilizace a jejich vitalita byla tak více narušena.

5.1.2 Zdroj explantátu

Kvalita explantátů byla hodnocena pouze vizuálně. Zásadní rozdíl v kulturách založených z apikálních, středových či bazálních částí nebyl pozorován.

5.1.3 Vliv prostředí kultivace

Na vícero genotypech konopí bylo zkoumáno, jak složení kultivačního média ovlivňuje růst a celkovou vitalitu v průběhu času. Bylo zjištěno, že žádné ze zkoumaných médií nebylo ideální pro všechny odrůdy. Přesto jako nejuniverzálnější působilo kultivační médium KM5. Rostliny na KM1 již po prvních pasážích začaly rychle vykazovat trpasličí fenotyp a později i fasciace a rozsáhlou vitrifikaci (Obr. 4). V místech kontaktu rostlin s tímto médiem docházelo k růstu kalusu, ze kterého hojně vyrůstaly nové prýty. Média KM2–4 nezpůsobovala zásadní abnormality a u některých odrůd byla i vhodnější nežli KM5. Z pouhého vizuálního hodnocení nebylo možné určit, které bazální médium je ke kultivaci konopí vhodnější. Média DKW i Vivi6 podporovala růst vitálního konopí.



Obrázek 4: Kultivace *Cannabis sativa* *in vitro* – vliv kultivačního média
4týdenní kultury 'ELETTA CAMPANA' odvozené z nodálních explantátů. (A) Kultivační médium KM1. (B) Kultivační médium KM2. (C) Kultivační médium KM5.

Vitalita konopí vykazovala silnou závislost na délce kultivace a počtu pasáží. Růst explantátů z *ex vitro* byl dočasně omezen a nově vyrostlé listy byly často vitrifikované. S další kultivací se tyto jevy vytrácely. Dlouhodobá kultivace se u většiny odrůd projevila snížením růstu, schopností regenerace a nárůstem projevů hyperhydricity. To vše bylo sledováno, pokud byly kultivační nádoby neprodyšně uzavřeny alobalem. K zabránění či oddálení těchto nepříznivých jevů výrazně pomohlo propustnější uzavření pomocí chirurgické pásky.

5.2 Protoplastizace

5.2.1 Volba rostlinného materiálu

Pokusy o izolaci protoplastů byly prováděny na mladých, dospělých a plně vyvinutých listech a také na listech starších. Prokázalo se, že úspěšnost protoplastizace byla silně závislá na stáří použitého rostlinného materiálu (Tab. 10).

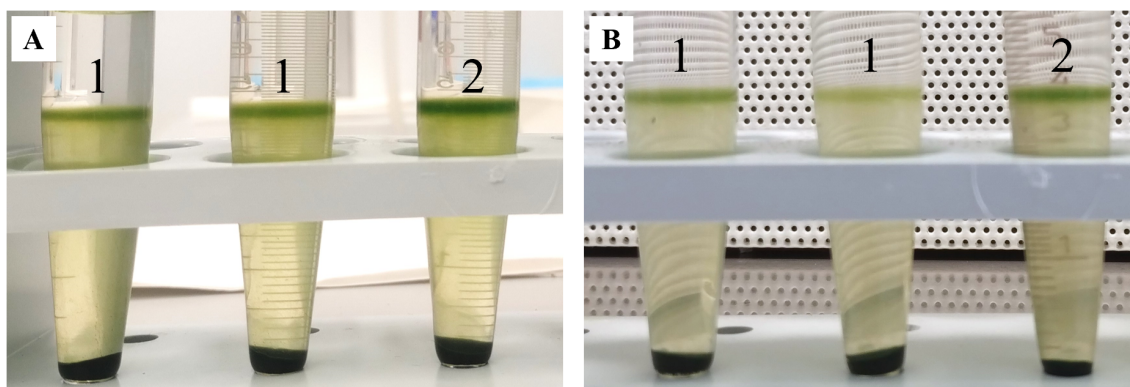
Tabulka 10: Účinnost izolace protoplastů – vliv materiálu a enzymatických roztoků

Listy	ER1a	ER1b	ER1c	ER1d	ER2
<i>Ex vitro</i> pěstované rostliny	–	–	–	N	–
Rostliny převedené do <i>in vitro</i>	–	–	–	N	–
'Finola' – dlouhodobé <i>in vitro</i> kultury	+	–	N	N	N
'USO 31' dlouhodobé <i>in vitro</i> kultury	+	–	N	N	N
Dlouhodobé <i>in vitro</i> kultury dalších kultivarů	–	–	–	N	N
1–2 týdny staré <i>in vitro</i> semenáčky 'USO 31'	+++	++	–	–	–
3–4 týdny staré <i>in vitro</i> semenáčky 'USO 31'	++	+	–	–	–

(N) Neprovedeno.

1–2týdenní semenáčky vyklíčené *in vitro* se ukázaly jako nejvhodnější zdroj pro izolaci mezenchymatických protoplastů, neboť poskytovaly protoplasty s největší výtěžností. Ze starších semenáčků (3–4týdenní) bylo možné protoplasty také vyizolovat, avšak výtěžnost byla viditelně nižší (Obr. 5). Z dlouhodobých *in vitro* kultur většiny kultivarů se protoplasty nepodařilo získat. Výjimkou byly kultivary 'Finola' a 'USO 31', ze kterých se malé množství protoplastů vyizolovat podařilo. U rostlin pěstovaných *ex vitro* a z explantátů převedených do *in vitro* protoplastizace selhala ve všech opakováních.

Jakožto výchozí materiál pro další postup byly zvoleny mladé listy 1–2týdenních semenáčků vyklíčených *in vitro*.



Obrázek 5: Vizuální porovnání výtěžnosti protoplastů
 (1) Vzorky protoplastů izolované z listů 3–4týdenních *in vitro* semenáčků 'USO 31'.
 (2) Vzorky izolované ze 1–2týdenních semenáčků. (A) Pokus č. 1. (B) Pokus č. 2.

5.2.2 Volba enzymatického roztoku

Protoplasty bylo možno získat pouze pomocí dvou enzymatických roztoků z pěti testovaných (Tab. 10). Lepší výsledky přinesl roztok ER1a. Protoplasty byly tak úspěšně získány z mladých listů 6měsíčních *in vitro* kultur 'Finola' a 'USO 31' a z mladých listů čerstvě vyklíčených *in vitro* rostlin. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití listů 1–2týdenních semenáčků 'USO 31'. Ze stejného materiálu byla izolace protoplastů úspěšná také pomocí ER1b, ale s menší účinností. Všechny testované enzymatické roztoky neposkytly protoplasty z *ex vitro* pěstovaných rostlin, z rostlin převedených do *in vitro* a z dlouhodobých *in vitro* kultur většiny kultivarů. Užitím ER1c, ER1d a ER2 se nepodařilo získat protoplasty z žádných vzorků.

V následujícím postupu byl dále využíván jen enzymatický roztok ER1a.

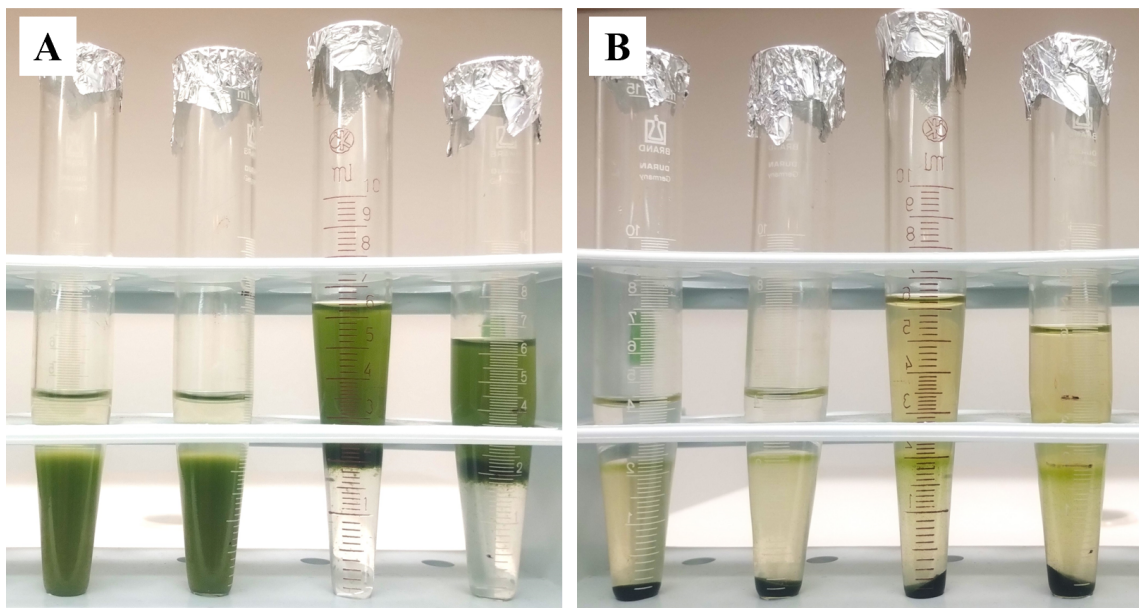
5.2.3 Optimalizace protoplastizace

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při době enzymolýzy 16 hod a tento čas byl používán jakožto výchozí. U vybraných vzorků, ze kterých se při tomto postupu protoplasty vyizolovat nepodařilo, byla zkrácena doba digesce na 2, 4 a 14 hod. Pozitivnější výsledky však tyto pokusy nepřinesly, stejně jako nebyl zaznamenán žádný vliv, pokud byly vzorky po ukončení inkubace třepány při 60 rpm (30 min) na třepačce.

Bylo odhaleno, že přidání promývacího roztoku k protoplastové suspenzi (před a po filtraci) je zásadním krokem pro úspěšnou izolaci konopných protoplastů. Pokud byl vynechán, či bylo přidáno pouze malé množství, protoplasty mezi sebou agregovaly a vytvářely shluky s dalším přefiltrovaným rostlinným materiálem, čímž bylo zabráněno jejich

separaci při centrifugaci v sacharózovém gradientu. Pro odstranění tohoto jevu byly testovány celkem 3 promývací roztoky (W5, W1 a W2). Pozitivní vliv byl zaznamenán pouze při použití W5 v minimálním poměru k enzymatickému roztoku 2:3.

Pro purifikaci protoplastů se více osvědčila metoda resuspenzace protoplastového sedimentu v roztoku sacharózy při následném převrstvení promývacím roztokem. Oproti druhé metodě došlo k účinnějšímu odstranění kontaminujících reziduí enzymatického roztoku (Obr. 6). Vliv tohoto kroku na výtěžnost či viabilitu však nebyl zaznamenán.



Obrázek 6: Porovnání účinnosti purifikace protoplastů

(A) Protoplastové suspenze před centrifugací v sacharózovém gradientu. (B) Odlišná míra purifikace po centrifugaci (hnědé zabarvení roztoku nad flotujícímy protoplasty).

Optimální centrifugační podmínky s ohledem na výtěžnost a viabilitu protoplastů byly shledány následující: 1. centrifugace při 1000 rpm (10 min); 2. centrifugace při 1200 rpm (10 min) a 3. centrifugace při 1000 rpm (5 min). Při nižší centrifugační síle docházelo k snížení výtěžnosti bez prokázání pozitivního vlivu na životaschopnost. U vzorků, ze kterých při tomto postupu nebylo možné protoplasty vyizolovat, mírnější centrifugační podmínky lepší výsledek nepřinesly.

5.2.4 Výtěžnost a viabilita

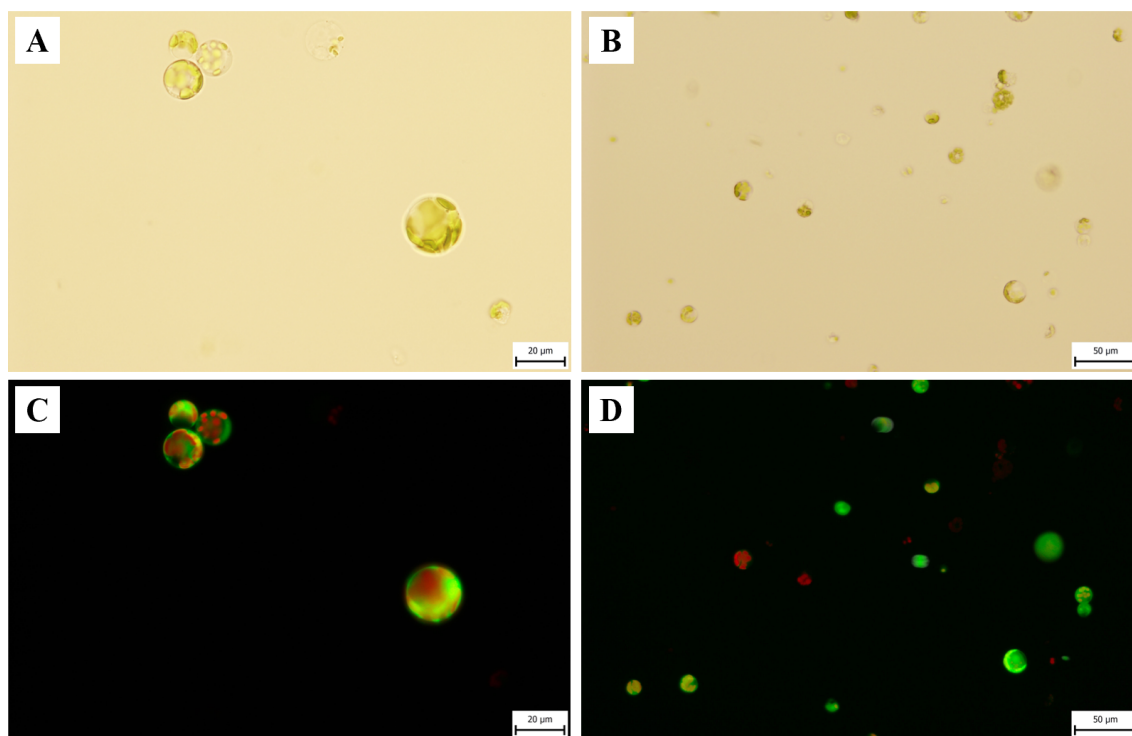
Hodnoty výtěžnosti protoplastizace a životaschopnosti protoplastů byly silně závislé na zdroji rostlinného materiálu (Tab. 11).

Tabulka 11: Výtěžnost protoplastizace a viabilita protoplastů

Materiál	Výtěžnost [buněk · g ⁻¹]	Průměrná výtěžnost [buněk · g ⁻¹]	Viabilita [%]	Průměrná viabilita [%]
'Finola' dlouhodobé <i>in vitro</i> kultury	4,0 · 10 ⁵	5,3 ± 1,8 · 10 ⁵	7	~6
	6,5 · 10 ⁵		~5	
'USO 31' dlouhodobé <i>in vitro</i> kultury	7,3 · 10 ⁵	7,5 ± 0,3 · 10 ⁵	~10	~10
	7,7 · 10 ⁵		~10	
'USO 31' 3–4týdenní <i>in vitro</i> semenáčky	2,6 · 10 ⁶	5,1 ± 2,9 · 10 ⁶	~10	~18 ± 11,5
	1,7 · 10 ⁶		35	
	5,5 · 10 ⁶		25	
	7,1 · 10 ⁶		~10	
'USO 31' 1–2týdenní <i>in vitro</i> semenáčky	8,4 · 10 ⁶	5,7 ± 2,4 · 10 ⁶	~10	66,8 ± 10,5
	4,2 · 10 ⁶		83,2	
	5,7 · 10 ⁶		70,7	
	4,8 · 10 ⁶		57,5	
	4,1 · 10 ⁶		59,2	
	9,9 · 10 ⁶		63,6	

Průměrná výtěžnost protoplastizace listových buněk 6měsíčních *in vitro* kultur kornopí 'Finola' byla 5,3 · 10⁵ buněk · g⁻¹. Tato hodnota byla v porovnání celkově nejnižší, stejně jako přibližná 6% viabilita. U stejně starých *in vitro* kultur 'USO 31' byla výtěžnost vyšší, a to 7,5 · 10⁵ buněk · g⁻¹. Životnost takto získaných protoplastů se pohybovala kolem 10 %. Z listů semenáčků 'USO 31' starých 3–4 týdny bylo možno vyizolovat téměř sedminásobné množství protoplastů (průměrná výtěžnost 5,1 · 10⁶ buněk · g⁻¹) a viabilita se pohybovala v rozmezí ~10–35 %. Celkově nejlepších výsledků bylo dosaženo u 1–2týdenních *in vitro* semenáčků 'USO 31'. Nejnižší výtěžnost byla 4,1 · 10⁶ buněk · g⁻¹,

nejvyšší $9,9 \cdot 10^6$ buněk \cdot g⁻¹ a průměrná $5,7 \cdot 10^6$ buněk \cdot g⁻¹. U těchto protoplastů byla průměrná životnost 66,8 % a všeobecně byla zaznamenána i nejvyšší hodnota, a to 83,2 % (Obr. 7).



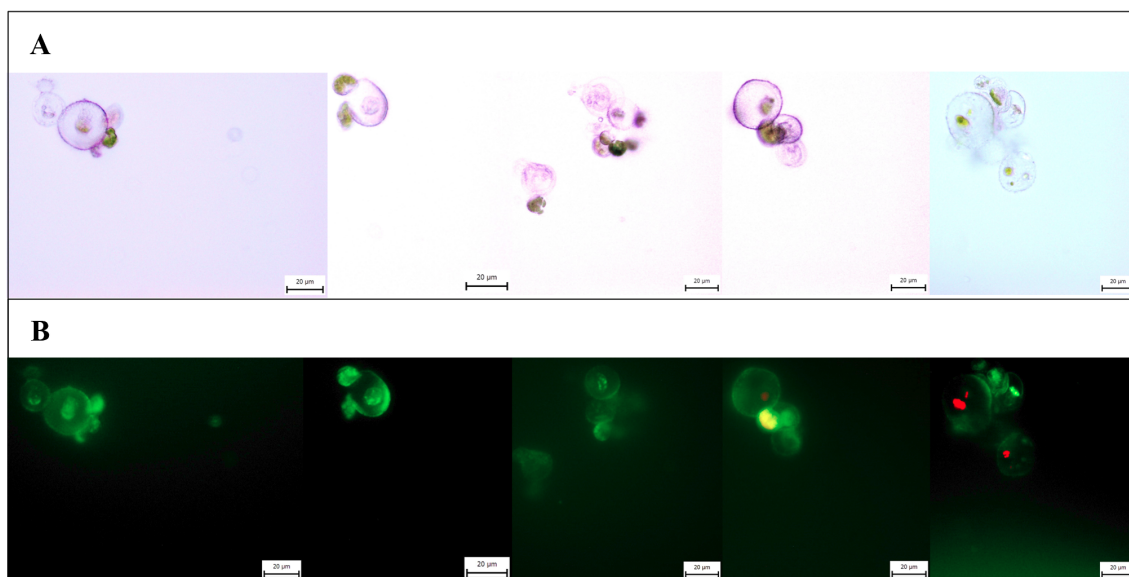
Obrázek 7: Mikrofotografie protoplastů *Cannabis sativa* 'USO 31' z listů 1–2týdenních *in vitro* semenáčků

Čerstvě vyzolované protoplasty, barvení FDA, viabilita 83,2 %. (A–B) Pozorování v procházejícím světle, zvětšení 40x a 20x. (C–D) Pozorování v širokém ultrafialovém spektru, zvětšení 40x a 20x.

5.3 Kultivace protoplastů

Kultivace protoplastů proběhla úspěšně u kultur odvozených z protoplastů s viabilitou $> 60 \%$ i $< 15 \%$. Bylo zjištěno, že použitá hustota protoplastů a částečně modifikované regenerační médium pro kultivaci protoplastů *A. thaliana*, jsou pro konopí vhodné. Po ukončení inkubace byly kultury stále živé a pod mikroskopickým pohledem bylo možno nalézt buňky, které již prošly minimálně jedním buněčným cyklem. Při kultivaci protoplastů s nižší viabilitou bylo možno sledovat také sedimentaci mrtvých buněk a zároveň změnu zbarvení roztoku ze světle zelena do žluta.

Experimentálně byla provedena prodloužená kultivace po dobu 14 dnů bez výměny regeneračního média. Následně bylo možné pozorovat mikrokalusy, jejichž buňky byly stále životaschopné (Obr. 8).

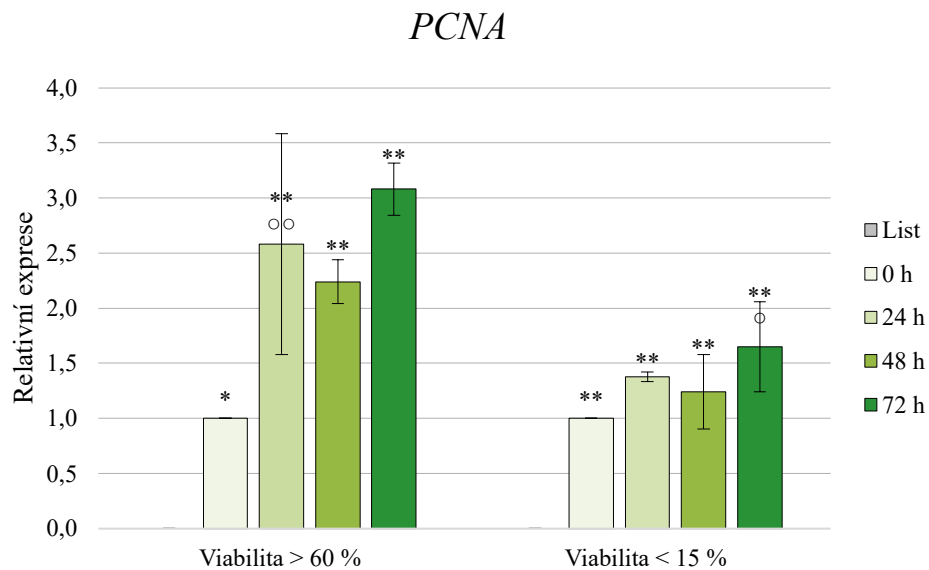


Obrázek 8: Mikrofotografie mikrokalusů *Cannabis sativa* 'USO 31' Kultivace 14 dnů, barvení FDA, zvětšení 40x. (A) Pozorování v procházejícím světle. (B) Pozorování v širokém ultrafialovém spektru.

5.3.1 Expresse genů souvisejících s proliferací

Prvním studovaným genem této skupiny byl proliferační marker *PCNA*. U obou testovaných skupin protoplastových kultur s odlišnou viabilitou byla zaznamenána shodná tendence, která s délkou kultivace stoupala (Obr. 9). V kontrolním vzorku List exprese *PCNA* nebyla detekována, a proto byla data relativně vztažena ke vzorku 0 h.

K signifikantnímu nárůstu exprese došlo ihned po protoplastizaci. Po 24 h bylo dosaženo prvního vrcholu, ale celkově největší exprese byla sledována po 72 h kultivace, kdy byla oproti kontrole až trojnásobná. Z porovnání mezi skupinami s odlišnou viabilitou je zřejmé, že kultury odvozené z protoplastů s větší životaschopností exprimovaly *PCNA* až ve dvojnásobném množství.

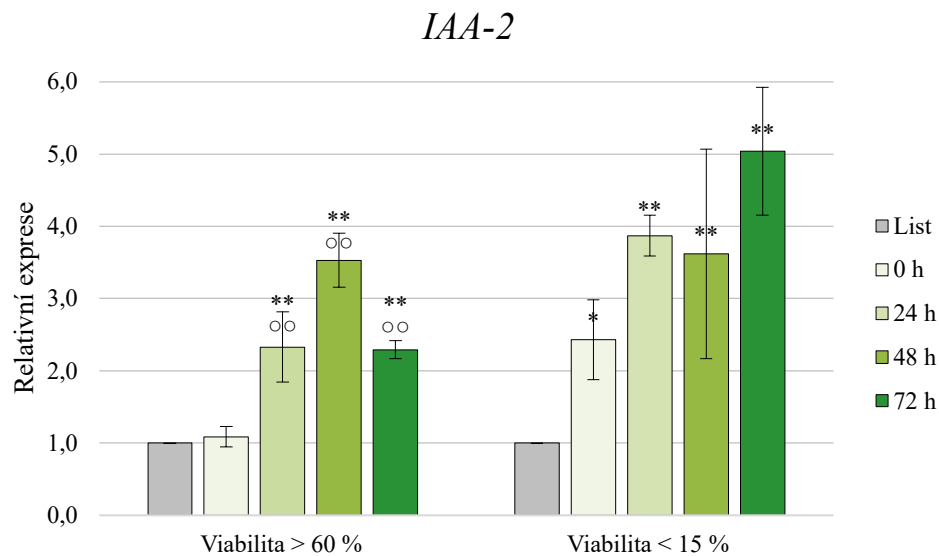


Obrázek 9: Expresní profil genu *PCNA* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31' Kultury s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kultury s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke vzorku 0 h. Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole (List) jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "°°"; $p \leq 0,05$ "°").

Druhý gen této skupiny *IAA-2* (marker auxinové signální dráhy) se téměř u všech vzorků oproti kontrole exprimoval se statisticky průkaznou odlišností (Obr. 10). Celkově lze tak zhodnotit, že jak protoplastizace, tak následná kultivace indukovala expresi *IAA-2*.

U kultur odvozených z protoplastů s životaschopností > 60 % téměř nedošlo k nárůstu exprese v návaznosti na protoplastizaci. Exprese dále s kultivací stoupala a po 48 h dosáhla vrcholu, kdy byla téměř 3,5x vyšší oproti počátku kultivace. Třetím dnem se snížila na úroveň prvního dnu.

Druhá skupina protoplastů s nižší viabilitou dosáhla ihned po izolaci exprese shodné s první skupinou po 24h kultivaci. Dalším rozdílem byla nejvyšší naměřená exprese u vzorků 72h kultivace, která byla oproti kontrole až pětinasobná.

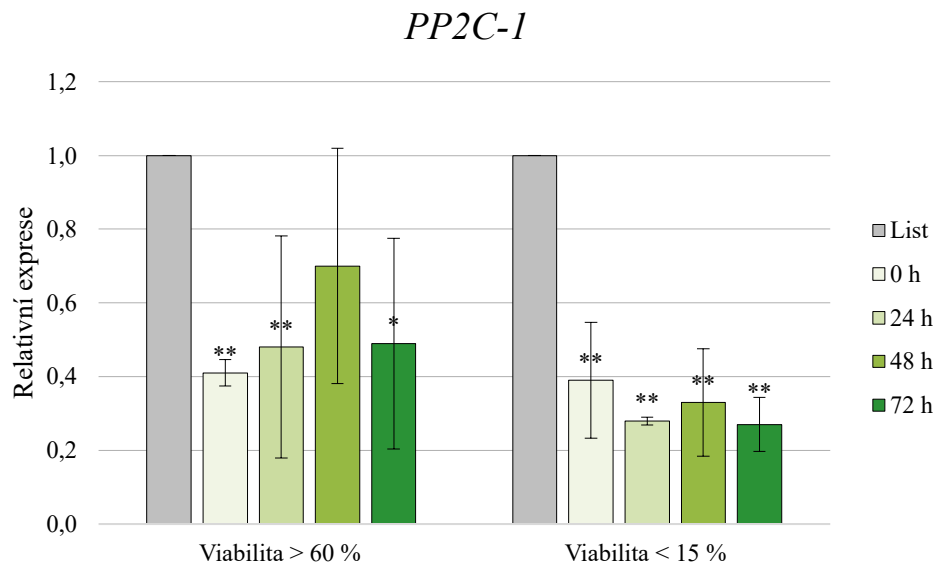


Obrázek 10: Expresní profil genu *IAA-2* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31'. Kultury s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kultury s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke kontrole (List). Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o").

5.3.2 Expresse genů souvisejících s abiotickým stresem

Prvním zkoumaným genem v této skupině byl *PP2C-1*, jehož transkripce je spouštěna různými abiotickými stresovými faktory. Oproti listu byl téměř ve všech vzorkách zaznamenán signifikantní pokles exprese (Obr. 11).

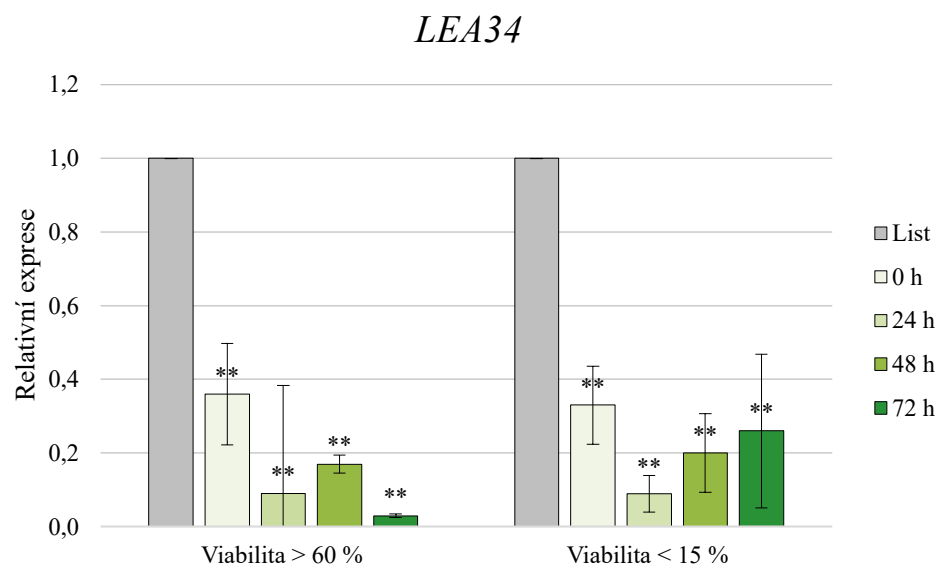
Mezi jednotlivými kultivačními stadii nebyla u obou skupin pozorována statisticky průkazná změna exprese. U kultur založených z protoplastů s větší životaschopností se exprese pohybovala mírně nad poloviční hodnotou exprese v listu s minimem v 0 h kultivace. U druhé skupiny se tento gen transkriboval v menší míře a nejnižší exprese byla detekována po 72 h kultivace.



Obrázek 11: Expresní profil genu *PP2C-1* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31' Kulture s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kulture s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke kontrole (List). Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o").

Druhým genem byl *LEA34*, který je rovněž exprimován v návaznosti na mnohé stresové podmínky. Na Obrázku 12 je vidět, že u *LEA34* genu byla zaznamenána podobná situace jako u genu předchozího. Všechny vzorky vykazovaly průkazně sníženou expresi, která byla oproti kontrole nižší než čtvrtinová.

Mezi kultivačními stadii nebyla statisticky prokázána rozdílná exprese. Nelze tedy s jistotou nalézt trend v závislosti exprese na době kultivace. Mezi zkoumanými skupinami protoplastových kultur s odlišnou viabilitou byl zaznamenán pouze jeden výrazný rozdíl. U protoplastových kultur s větší životností byla po 72h kultivaci detekována nejvyšší průměrná exprese, zatímco u druhé skupiny byla naopak zaznamenána téměř až 9x větší.



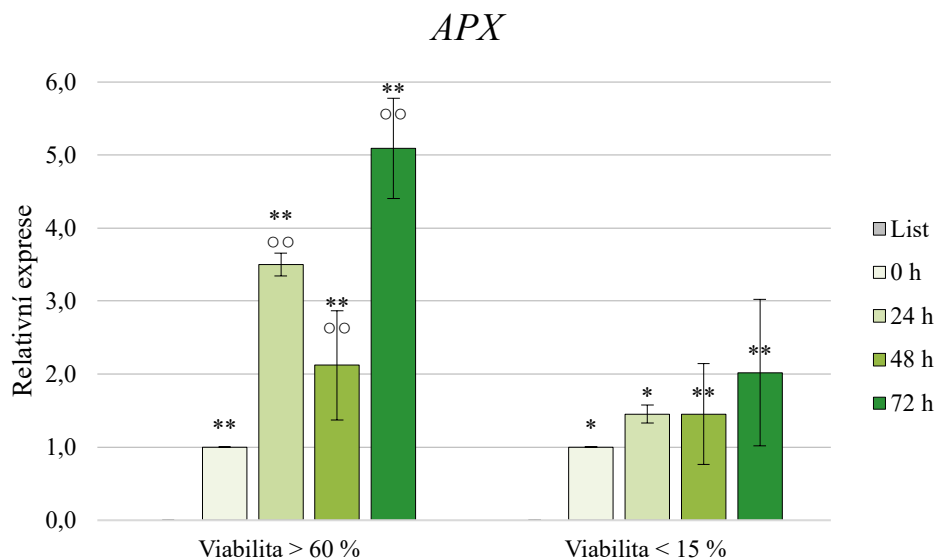
Obrázek 12: Expresní profil genu *LEA34* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31' Kultury s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kultury s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke kontrole (List). Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o").

5.3.3 Expresse genů souvisejících s oxidativním stresem

Expresní profil *APX* genu je v mnohém shodný s profilem *PCNA*, avšak tento gen má odlišnou úlohu. Hraje hlavní roli v antioxidační obraně buněk. U obou zkoumaných skupin protoplastových kultur byla pozorována stejná tendence, která se zvyšovala s délkou kultivace (Obr. 13). *APX* nebyl zjištěn v listech, a proto byla data relativně vztažena ke vzorku 0 h.

Mezi všemi vzorky protoplastů s vyšší viabilitou byla statisticky prokázána nejen průkazná změna exprese oproti kontrole, ale také mezi jednotlivými kultivačními stadii. Ihned po protoplastizaci došlo k indukci exprese, která se po 24 h kultivace zvýšila až 3,5x. Následující kultivací došlo nejprve ke snížení a následně k opětovnému nárůstu exprese až do celkového maxima (5x vyšší oproti 0 h).

Zkoumané vzorky odvozené z protoplastů s nižší viabilitou vykazovaly shodný trend, avšak s menšími rozdíly mezi kultivačními stadii. Oproti první skupině byl zde *APX* exprimován přibližně v polovičním množství.

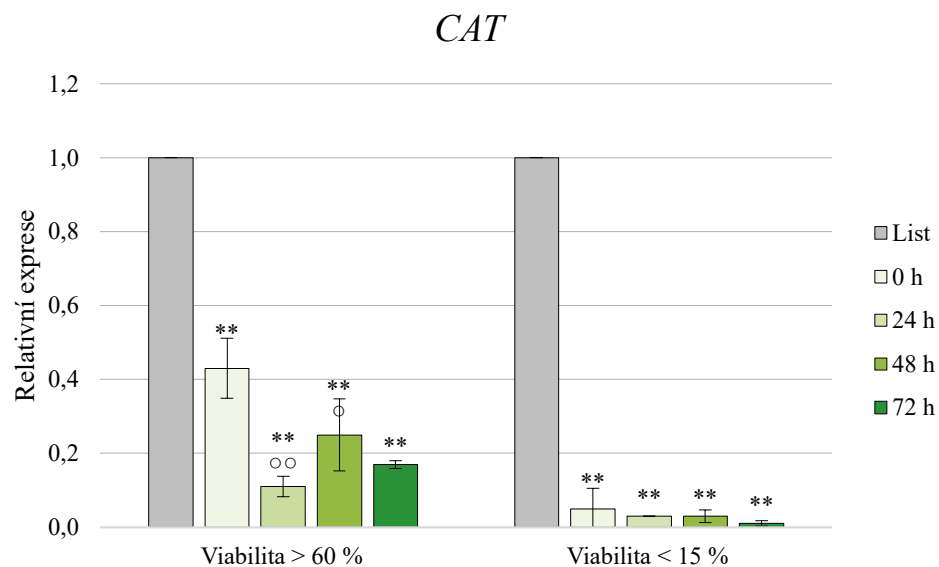


Obrázek 13: Expresní profil genu *APX* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31'

Kultury s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kultury s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke vzorku 0 h. Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole (List) jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o").

Druhým genem, který je rovněž součástí antioxidantních buněčných mechanismů, byl *CAT*. Oproti předchozímu *APX*, se tento gen nejvíce transkriboval v kontrolním vzorku. Expresní profil obou testovaných skupin vypovídá o snížení exprese (oproti kontrole) v návaznosti na izolaci i kultivaci protoplastů (Obr. 14).

U kultur s viabilitou > 60 % bylo zaznamenáno signifikantní snížení exprese po 24 h kultivace. Po 48 h kultivace došlo k jedinému průkaznému navýšení. Kultury s nižší viabilitou tento gen téměř neexprimovaly a v průběhu kultivace byl detekován stále v menší míře.



Obrázek 14: Expresní profil genu *CAT* protoplastových kultur *C. sativa* 'USO 31'. Kultury s viabilitou > 60 % odvozeny z 1–2týdenních listů *in vitro* semenáčků. Kultury s viabilitou < 15 % odvozeny z 3–4týdenních listů *in vitro* semenáčků. Relativně vztaženo ke kontrole (List). Statisticky průkazné rozdíly oproti kontrole jsou znázorněny hvězdičkami ($p \leq 0,01$ "**"; $p \leq 0,05$ "*") a mezi kultivačními stadii kroužky ($p \leq 0,01$ "oo"; $p \leq 0,05$ "o").

6 Diskuse

Výsledky *in vitro* kultivace a mikropropagace konopí vícero genotypů jsou v souladu s uváděným pozitivním vlivem DKW média na kvalitu rostlinného materiálu a celkovou vitalitu konopných rostlin (Page *et al.*, 2021). Z pozorování vlivu růstových regulátorů cytokininového typu (TDZ, mT a 2iP) a auxinu IBA byla nejhorší odezva zaznamenána u TDZ. Stejný negativní efekt popsali také Stephen *et al.* (2023). S výsledky výše zmíněné práce dále souhlasí i nejlepší zaznamenaný vliv 2iP.

Snížení kvality rostlinného materiálu dlouhodobých *in vitro* kultur při neprodyšném uzavření kultivačních nádob by mohla souviset s více faktory. Omezením výměny plynů se snižuje účinnost fotosyntézy, což vede k větší závislosti na příjmu látek z kultivačního média. Dále se kvůli zvyšující se vzdušné vlhkosti mění stomatální aktivita, roste koncentrace genotoxického H_2O_2 a celkově tak narůstá stresový potenciál kultivace. Tyto změněné parametry mohou zásadně ovlivnit expresi genů souvisejících se stresem a výživou, což se při kultivaci může negativně projevit a vést k projevům vitifikace (Ševčíková *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2019; Abdalla *et al.*, 2022; Král *et al.*, 2022). Pozitivní efekt účinnější výměny plynů na kvalitu *in vitro* kultur, který byl v této práci zaznamenán, byl pozorován i u dalších rostlin (Majada *et al.*, 1997; Tsay *et al.*, 2006).

Jak uvádí Evans *et Bravo* (2013), neexistuje žádný univerzální postup zajišťující úspěšnou izolaci a kultivaci protoplastů napříč rostlinnými druhy. Důvodů neúspěšné izolace protoplastů může být několik a je tedy obtížné odhalit, čím přesně byla způsobena.

Jedním z důležitých faktorů je věk a vývojová fáze donorového materiálu. Obecně platí, že mladší listy jsou vhodnější (Evans *et Bravo*, 2013), s čímž souhlasí i výsledky této práce. Lazič (2020) ve své práci došel ke stejnému závěru a popisuje i shodné komplikace, např. nízkou a asynchronní klíčivost semen. Ta je spojována s neadekvátně nastaveným postupem sterilizace, se složením kultivačního média, s fyzikálními podmínkami klíčení a s genetickým pozadím (Hesami *et al.*, 2021b; Pepe *et al.*, 2021). V tomto experimentu byl problém překonán vysetím velkého množství semen. Nabízejí se však i účinnější alternativy, jako je šetrnější postup dezinfekce, klíčení ve tmě (Lazič, 2020), skarifikace (Pepe *et al.*, 2021), aktivace semen (Yildirim *et al.*, 2023) nebo disekce a kultivace embryí (Král *et al.*, 2022).

Neúspěšná izolace protoplastů z listů do *in vitro* převedených rostlin a z listů dlouhodobě udržovaných kultur by mohla být způsobena změnou fyziologie a morfologie v ná-

vaznosti na stresovou odpověď na převod do *in vitro* a neoptimálními podmínkami kultivace (Evans *et Bravo*, 2013). Mnohé vzorky vykazovaly známky senescence či vitrifikace a takový materiál se ukázal jako nevhodný pro protoplastizaci. Tato ztráta kompetence by mohla být způsobena změněným vývojem buněčné stěny a omezením vzniku ochranných vrstev pokožky (Rasco *et Patena*, 1997; Kemat *et al.*, 2021). Z těchto důvodů bylo testováno zkrácení doby enzymolýzy, avšak ke zlepšení výsledku nedošlo. Nenašel jsem žádné zprávy o úspěšné izolaci protoplastů z vitrifikovaného materiálu. Problém by mohl být způsoben až několikanásobným nárůstem velikosti vitrifikovaných buněk, při kterém by mohly být ztraceny v procesu filtrace (Pâques *et Boxus*, 1987; Rasco *et Patena*, 1997).

Zásadním faktorem je také genetické pozadí a vliv genotypu. Dokonce i v rámci populace rostlin téhož kultivaru lze nalézt některé rostliny, které vzdorují protoplastizaci (Evans *et Bravo*, 2013). Z kultivaru 'Finola' již byla přinejmenším 2x provedena úspěšná izolace protoplastů (Lazič, 2020; Monthony *et Jones*, 2024). V tomto experimentu bylo lepších výsledků dosaženo u 'USO 31'. Toto je první záznam o úspěšné izolaci protoplastů z listů tohoto kultivaru.

Enzymatický roztok ER1a, jehož složení uvedli Matchett-Oates *et al.* (2021b), se prokázal jako nejvhodnější. Průměrná výtěžnost byla téměř o 27 % nižší nežli uváděná v článku. Největší výtěžnost však publikované výsledky překonala. Průměrná viabilita byla oproti uváděné autory mírně nižší. Přidání pektolýázy by mělo pozitivně ovlivňovat protoplastizaci (Morimoto *et al.*, 2007; Beard *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022; Monthony *et Jones*, 2024). Výsledky použití roztoků ER1b a ER1c to však nemohou jistě potvrdit. Při nízkém množství pektolýázy došlo ke snížení výtěžnosti a při vyšší míře protoplastizace kompletně selhala. To by mohlo být způsobeno až přílišnou digestivní silou enzymatického roztoku, která vedla k nárůstu oxidačního stresu, poškození a degradaci protoplastů (Ishii, 1987; 1988). Co může za neúspěch izolace při použití ER2, není zcela zřejmé, neboť byl použit shodný donorový materiál jako ve výchozí publikaci.

Pozorována byla silná závislost protoplastizace na ročním období. S koncem léta a příchodem podzimu se snižovala výtěžnost i viabilita. Nejhorších výsledků bylo dosaženo koncem podzimu a v zimě, kdy nebylo možno získat žádné, nebo kompletně mrtvé protoplasty. S koncem zimy se výtěžnost a životaschopnost znovu začaly zvyšovat. Kolem popisu tohoto jevu se zatím postupuje velice opatrně. Choury *et al.* (2017) zaznamenali podobné výsledky u volně rostoucích rostlin. Poprvé Keskitalo (2001) naznačila, že

in vitro kultury si mohou zachovávat "sezónní hodiny", což se odráží na úspěšnosti protoplastizace. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v zimě a na jaře (Finsko). Druhou zprávu přinesli Maćkowska *et al.* (2014), kdy nejúspěšnější izolace protoplastů z *in vitro* pěstovaného materiálu proběhly na jaře a v létě (Polsko). O sezónní variaci úspěšnosti izolace protoplastů z *in vitro* pěstovaného materiálu se také zmínili Cui *et al.* (2019).

Monthony *et Jones* (2024) pozorovali mikrokalusy po třech týdnech kultivace, avšak v tomto období začala viabilita prudce klesat a další kultivace nebyla možná. V tomto experimentu byly mikrokalusy sledovány už o týden dříve. Delší kultivace nabyla provedena, protože cílem bylo pouze zjistit, zda zvolené regenerační médium je vůbec vhodné. Z tohoto důvodu nelze výsledky plně porovnat. Je však možné zhodnotit, že tato práce přinesla záznam o iniciaci buněčné proliferace v časnějším období, než bylo dosud publikováno. To by mohlo být způsobeno odlišným složením kultivačního média, nebo jinou hustotou kultivovaných protoplastů (McCarthy *et al.*, 2001; Monthony *et Jones*, 2024).

Expresní analýza proliferačního markeru *PCNA* prokázala, že k aktivaci exprese došlo již před samotnou kultivací v návaznosti na proces protoplastizace. Shodný výsledek byl sledován i u jiných rostlinných druhů (Cápal, 2012; Trusinová, 2012). Jelikož by se *PCNA* měl exprimovat až těsně před vstupem do S fáze buněčného cyklu, dva vrcholy expresního profilu tak naznačují, že k tomu v průběhu kultivace došlo minimálně jednou, a to v čase 72 h, anebo dvakrát v časech 24 a 72 h. Podle dostupných zdrojů je pravděpodobnější první varianta, kterou autoři sami pozorovali (Williams *et al.*, 2003; Cápal, 2012; Trusinová, 2012). Oproti výše zmíněným pracem *PCNA* nebyl v tomto experimentu detekován v kontrolním vzorku. To bylo zaznamenáno i u tabáku (Williams *et al.*, 2003). Z expresního profilu genu *IAA-2* je možno vyčíst, že k signifikantnímu nárůstu exprese došlo až po 24 h kultivace. Auxinová signální dráha se tedy více aktivovala až po kontaktu s fytohormony obsaženými v regeneračním médiu, což potvrzuje jeho vhodnost pro protoplastové kultury konopí. Up-regulace exprese *IAA-2* v průběhu úspěšné kultivace protoplastů zaznamenali také Pasternak *et al.* (2021) u *A. thaliana*.

PP2C-1 a *LEA34* souvisí se signální drahou kyseliny abscisové (ABA), která up-reguluje jejich expresi. Protoplastizací došlo k výraznému snížení ABA signalizace, která se v průběhu kultivace neobnovila. Je tedy možné, že protoplasty nebyly v průběhu kultivace vystaveny zásadnímu, nebo zvyšujícímu se abiotickému stresu. Výsledky by se ale také mohly interpretovat tak, že protoplasty byly vystaveny pouze menšímu abiotickému

stresu nežli *in vitro* pěstované konopí (vzorek List). Konopné *in vitro* kultury totiž čelí velkému stresu (Kráal *et al.*, 2022).

Produkty genů *APX* a *CAT*, dvou samostatných antioxidačních systémů, se podílí na rozkladu společného substrátu (peroxidu vodíku). Tento vztah je možno vidět na průběhu detekovaných změn exprese obou genů. Pokud se zvýšila exprese jednoho genu, exprese druhého poklesla. To by mohlo potvrzovat dominantní postavení peroxidázového cyklu a vedlejší postavení katalázové reakce (Caverzan *et al.*, 2012). Celkově lze konstatovat, že při kultivaci viabilnějších kultur došlo k silnější aktivaci antioxidačních ochranných, což je klíčové pro úspěšné kultivování. S rostoucí expresí *APX* a *CAT* dochází ke snížení hladiny reaktivních forem kyslíku. Toto snížení má přímý vliv na rekondenzaci chromatinu u protoplastů, na důležitý krok v dediferenciačních procesech (Ondřej *et al.*, 2008; 2010). Je zajímavé si povšimnout naprosto shodných trendů exprese *APX* s *PCNA*. To potvrzuje, že pro vstup do buněčného cyklu je důležité, aby došlo ke snížení koncentrace ROS (Ondřej *et al.*, 2010).

Z porovnání kultur založených z protoplastů s vyšší a nižší viabilitou je možno lépe identifikovat zásadní rozdíly v genové expresi, které mohou vypovídat o stavu a osudu daných kultur. Tyto odlišnosti by mohly být způsobeny změnou mezibuněčnou komunikací vlivem posunutého zastoupení živých a mrtvých buněk. To by mohlo vysvětlovat obecně platnou závislost úspěšnosti kultivace protoplastů na použité hustotě buněk (McCarthy *et al.*, 2001; Monthony *et Jones*, (2024).

Shodný trend, ale menší míra exprese *PCNA* v kulturách s nižší životaschopností vypovídá o tom, že buňky v průběhu kultivace nezemřely a že přípravy na buněčné dělení také probíhaly. Ale to jen v menší míře, i přes rychleji a intenzivněji aktivovanou auxinovou signální dráhu. Z expresních profilů genů *PP2C-1* a *LEA34* lze soudit, že abiotické stresové faktory spustily u méně viabilních kultur shodnou molekulární odpověď. Nižší úroveň exprese *APX* a *CAT* může vypovídat o tom, že méně viabilní kultury nedisponovaly takovou schopností se vypořádat s kyslíkovými radikály, jaká byla sledována u viabilnějších kultur. Pokud by nedošlo k výraznější aktivaci, protoplasty by nemusely projít úspěšnou kultivací (Ondřej *et al.*, 2010). Celkově nižší exprese těchto genů by také mohla být důvodem menší viability a výtěžnosti protoplastizace z důvodu většího oxidativního poškození buněčných membrán (Ishii, 1987; 1988).

7 Závěr

Tato práce byla zaměřena na nalezení vhodného materiálu a postupu pro izolaci a kultivaci mezofylových protoplastů u konopí (*Cannabis sativa*). Protoplastizace byla úspěšně provedena z mladých listů *in vitro* pěstovaných semenáčků kultivaru 'USO 31'. Bylo odhaleno, že částečně modifikované regenerační médium standardně používané pro *A. thaliana* může být použito pro iniciační fázi kultivace konopných protoplastů.

Stav protoplastových kultur byl dále hodnocen na základě transkriptomické analýzy vybraných markerů asociovaných s buněčnou proliferací (*PCNA*, *IAA-2*) a se stresovou odpovědí (*PP2C-1*, *LEA34*, *APX* a *CAT*). Výsledky prokázaly viabilitu a celkově dobrý stav protoplastových kultur. Z hlediska abiotického stresu byly dokonce méně zatížené nežli *in vitro* vyklíčené rostliny. Došlo k aktivaci antioxidantních mechanismů a minimálně jednou vstoupily do S fáze buněčného cyklu.

Tato práce rozšiřuje znalosti *in vitro* kultivace konopí a izolace konopných protoplastů. Přináší celkově druhý záznam o jejich úspěšné kultivaci. Získané informace by mohly prospět budoucímu rozvoji zatím tak málo prozkoumané problematiky protoplastových kultur *Cannabis sativa* L.

Literatura

- [1] Abdalla N., El-Ramady H., Seliem M. K., El-Mahrouk M. E., Taha N., Bayoumi Y., Shalaby T. A., Dobránszki J. (2022): An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 8: 677.
- [2] Adamek K., Jones A. M. P., Torkamaneh D. (2021): Accumulation of somatic mutations leads to genetic mosaicism in *Cannabis*. *The Plant Genome* 15: e20169.
- [3] Adhikary D., Kulkarni M., El-Mezawy A., Mobini S., Elhiti M., Gjuric R., Ray A., Polowick P., Slaski J. J., Jones M. P., Bhowmik P. (2021): Medical *Cannabis* and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Frontiers in Plant Science* 12: 627240.
- [4] Ahmed A. T. M. F., Islam M. Z., Mahmud M. S., Sarker M. E., Islam M. R. (2022): Hemp as a potential raw material toward a sustainable world. *Heliyon* 8: e08753.
- [5] Bakel H., Stout J. M., Cote A. G., Tallon C. M., Sharpe A. G., Hughes T. R., Page J. E. (2011): The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology* 12: R102.
- [6] Beard K. M., Boling A. W. H., Bargmann B. O. R. (2021): Protoplast isolation, transient transformation, and flow-cytometric analysis of reporter-gene activation in *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops and Products* 164: 113360.
- [7] Bidabadi S. S., Jain S. M. (2020): Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of *In Vitro* Plant Regeneration. *Plants* 9: 702.
- [8] Cápál P. (2012): Epigenetické aspekty protoplastových kultur. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- [9] Cápál P., Ondřej V. (2014): Expression and epigenetic profile of protoplast cultures (*Cucumis sativus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 50: 789–794.
- [10] Cassells A. C., Curry R. F. (2001): Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145–157.
- [11] Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Ribeiro C. W., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012): Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1011–1019.
- [12] Cui J., Mackenzie K., Eeckhaut T., Müller R., Lütken H. (2019): Protoplast isolation and culture from *Kalanchoë* species: optimization of plant growth regulator concentration for efficient callus production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 138: 287–297.
- [13] Davey M. R., Anthony P. (2010): *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Wiley-Blackwell, Loughborough, UK.
- [14] Debergh P. C., Maene L. J. (1981): A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14: 335–345.

- [15] Deguchi M., Bogush D., Weeden H., Spuhler Z., Potlakayala S., Kondo T., Zhang Z. J., Rudrabhatla S. (2020): Establishment and optimization of a hemp (*Cannabis sativa* L.) agroinfiltration system for gene expression and silencing studies. *Scientific Reports* 10: 3504.
- [16] Deguchi M., Potlakayala S., Spuhler Z., George H., Sheri V., Agili R., Patel A., Rudrabhatla S. (2021): Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR data to study the cannabinoid pathway genes in industrial hemp. *Plos One* 16: e0260660.
- [17] Divashuk M. G., Alexandrov O. S., Razumova O. V., Kirov I. V., Karlov G. I. (2014): Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system. *Plos One* 9: e85118.
- [18] Eeckhaut T., Lakshmanan P. S., Deryckere D., Van Bockstaele E., Van Huylenbroeck J. (2013): Progress in plant protoplast research. *Planta* 238: 991–1003.
- [19] Evans D. A., Bravo J. E. (2013): Plant Protoplast Isolation and Culture. In: Giles K. L. (ed.): pp. 33–53, Elsevier Science, New Jersey.
- [20] Feeney M., Punja Z. K. (2003): Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.) *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39: 578–585.
- [21] Agricultural Research Organization of Israel. Methods of Regenerating and Transforming *Cannabis*. Flaishman M. A., Cohen Peer R., Cohen O., Bocobza S., [cit. 2023-12-11]. Dostupný z: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=W02019234750>.
- [22] Galán-Ávila A., García-Fortea E., Prohens J., Herraiz F. J. (2020): Development of a Direct *in vitro* Plant Regeneration Protocol From *Cannabis sativa* L. Seedling Explants: Developmental Morphology of Shoot Regeneration and Ploidy Level of Regenerated Plants. *Frontiers in Plant Science* 11: 645.
- [23] Galán-Ávila A., Gramazio P., Ron M., Prohens J., Herraiz F. J. (2021): A novel and rapid method for Agrobacterium-mediated production of stably transformed *Cannabis sativa* L. plants. *Industrial Crops and Products* 170: 113691.
- [24] Gao C., Cheng C., Zhao L., Yu Y.-t., Tang Q., Xin P., Liu T., Yan Z., Guo Y., Zang G. (2018): Genome-Wide Expression Profiles of Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Response to Drought Stress. *International Journal of Genomics* 2018: 1–13.
- [25] Gao S., Wang B., Xie S., Xu X., Zhang J., Pei L., Yu Y., Yang W., Zhang Y. (2020): A high-quality reference genome of wild *Cannabis sativa*. *Horticulture Research* 7: 73.
- [26] Genschik P., Parmentier Y., Durr A., Marbach J., Criqui M.-C., Jamet E., Fleck J. (1992): Ubiquitin genes are differentially regulated in protoplast-derived cultures of *Nicotiana sylvestris* and in response to various stresses. *Plant Molecular Biology* 20: 897–910.
- [27] Goff N. K., Guenther J. F., Roberts J. K., Adler M., Molle M. D., Mathews G., Kourouski D. (2022): Non-Invasive and Confirmatory Differentiation of Hermaphrodite from Both Male and Female *Cannabis* Plants Using a Hand-Held Raman Spectrometer. *Molecules* 27: 4978.

- [28] Grafi G., Chalifa-Caspi V., Nagar T., Plaschkes I., Barak S., Ransbotyn V. (2011): Plant response to stress meets dedifferentiation. *Planta* 233: 433–438.
- [29] Grassa C. J., Weiblen G. D., Wenger J. P., Dabney C., Poplawski S. G., Timothy Motley S., Michael T. P., Schwartz C. J. (2021): A new *Cannabis* genome assembly associates elevated cannabidiol (CBD) with hemp introgressed into marijuana. *New Phytologist* 230: 1665–1679.
- [30] Hesami M., Adamek K., Pepe M., Jones A. M. P. (2023b): Effect of Explant Source on Phenotypic Changes of *In Vitro* Grown *Cannabis* Plantlets over Multiple Subcultures. *Biology* 12: 443.
- [31] Hesami M., Baiton A., Alizadeh M., Pepe M., Torkamaneh D., Jones A. M. P. (2021a): Advances and Perspectives in Tissue Culture and Genetic Engineering of *Cannabis*. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 5671.
- [32] Hesami M., Pepe M., Baiton A., Salami S. A., Jones A. M. P. (2022): New Insight into Ornamental Applications of *Cannabis*: Perspectives and Challenges. *Plants* 11: 2383.
- [33] Hesami M., Pepe M., Jones A. M. P. (2023a): Morphological Characterization of *Cannabis sativa* L. Throughout Its Complete Life Cycle. *Plants* 12: 3646.
- [34] Hesami M., Pepe M., Monthony A. S., Baiton A., Phineas Jones A. M. (2021b): Modeling and optimizing *in vitro* seed germination of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) *Industrial Crops and Products* 170: 113753.
- [35] Hillig K. W., Mahlberg P. G. (2004): A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (*Cannabaceae*). *American Journal of Botany* 91: 966–975.
- [36] Hurgobin B., Tamiru-Oli M., Welling M. T., Doblin M. S., Bacic A., Whelan J., Lewsey M. G. (2021): Recent advances in *Cannabis sativa* genomics research. *New Phytologist* 230: 73–89.
- [37] Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383–389.
- [38] Chandra S., Lata H., Khan I. A., ElSohly M. A. (2017): *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. In: Chandra S., Lata H., ElSohly M. A. (ed.): pp. 79–100, Springer International Publishing, Cham.
- [39] Choury Z., Meschini R., Dell’Orso A., Fardusi M. J., Mugnozza G. S., Kuzminsky E. (2017): Optimized conditions for the isolation of mesophyll protoplasts along the growing season from *Arbutus unedo* and their use in single cell gel electrophoresis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 132: 535–543.
- [40] Ishii S. (1987): Generation of active oxygen species during enzymic isolation of protoplasts from oat leaves. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 23: 653–658.
- [41] Ishii S. (1988): Factors Influencing Protoplast Viability of Suspension-Cultured Rice Cells during Isolation Process 1. *Plant Physiology* 88: 26–29.
- [42] ITIS - Report: *Cannabis sativa*. [online] [cit. 2024-4-9] Dostupný z: (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null).

- [43] Jamet E., Durr A., Parmentier Y., Criqui M.-C., Fleck J. (1990): Is ubiquitin involved in the dedifferentiation of higher plant cells? *Cell Differentiation and Development* 29: 37–46.
- [44] Jiang F., Zhu J., Liu H.-L. (2013): Protoplasts: a useful research system for plant cell biology, especially dedifferentiation. *Protoplasma* 250: 1231–1238.
- [45] Jones R. (1979): Cell culture, protoplast isolation, and cell fusion of *Cannabis sativa* L.; Evaluation of chilling preventative chemicals and quality control of bananas in the tropics. Diplomová práce. College of Natural Science and Math, University of Houston.
- [46] Kapur R., Saleem M., Harvey B. L., Cutler A. J. (1993): Oxidative metabolism and protoplast culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 29: 200–206.
- [47] Kemat N., Visser R. G. F., Krens F. A. (2021): Hypolignification: A Decisive Factor in the Development of Hyperhydricity. *Plants* 10: 2625.
- [48] Keskitalo M. (2001): Can protoplast production from *in vitro* cultured shoots of *Tanacetum* vary during the season? *Agricultural and Food Science* 10: 145–151.
- [49] Kim A. L., Yun Y. J., Choi H. W., Hong C.-H., Shim H. J., Lee J. H., Kim Y.-C. (2022): Establishment of efficient cannabis (*Cannabis sativa* L.) protoplast isolation and transient expression condition. *Plant Biotechnology Reports* 16: 613–619.
- [50] Korhoňová M. (2011): Regenerační procesy v protoplastových kulturách rodu *Brassica*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- [51] Král D., Šenkyřík J. B., Ondřej V. (2022): Expression of Genes Involved in ABA and Auxin Metabolism and LEA Gene during Embryogenesis in Hemp. *Plants* 11: 2995.
- [52] Lapierre É., Monthony A. S., Torkamaneh D. (2023): Genomics-based taxonomy to clarify *Cannabis* classification. *Genome* 66: 202–211.
- [53] Lata H., Chandra S., Khan I. A., ElSohly M. A. (2010b): *Cannabis sativa* L. Micropropagation in Temporary Immersion Bioreactor System. *Planta Medica* 76: P9.
- [54] Lata H., Chandra S., Khan I. A., ElSohly M. A. (2017): Micropropagation of *Cannabis sativa* L.—An Update. In: Chandra S., Lata H., ElSohly M. A. (ed.): pp. 285–297, Springer International Publishing, Cham.
- [55] Lata H., Chandra S., Khan I. A., Elsohly M. A. (2010a): High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high 9-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Medica* 76: 1629–1633.
- [56] Laverty K. U., Stout J. M., Sullivan M. J., Shah H., Gill N., Holbrook L., Deikus G., Sebra R., Hughes T. R., Page J. E., Bakel H. v. (2019): A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome Research* 29: 146–156.
- [57] Lazič S. (2020): Izolacija protoplastov navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) Magisterská práce, Univerzita v Lublani, Biotehnološka fakulta, Lublaň.

- [58] Lee C.-C., Wang J.-W., Leu W.-M., Huang Y.-T., Huang Y.-W., Hsu Y.-H., Meng M. (2019): Proliferating Cell Nuclear Antigen Suppresses RNA Replication of *Bamboo Mosaic Virus* through an Interaction with the Viral Genome. *Journal of Virology* 93: 10.1128/jvi.00961–19.
- [59] Leyser O. (2018): Auxin Signaling. *Plant Physiology* 176: 465–479.
- [60] Li L., Yu S., Chen J., Cheng C., Sun J., Xu Y., Deng C., Dai Z., Yang Z., Chen X., Tang Q., Su J., Zhang X. (2022): Releasing the Full Potential of *Cannabis* through Biotechnology. *Agronomy* 12: 2439.
- [61] Li S.-M., Zheng H.-X., Zhang X.-S., Sui N. (2021): Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports* 40: 271–282.
- [62] Liu H., Xing M., Yang W., Mu X., Wang X., Lu F., Wang Y., Zhang L. (2019): Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (*LEA*) gene family in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Scientific Reports* 9: 13375.
- [63] MacKinnon L., McDougal G., Aziz N., Millam S. (2000): Progress towards transformation of fibre hemp. *Annual Report Scottish Crop Research Institute*: 84–86.
- [64] Maćkowska K., Jarosz A., Grzebelus E. (2014): Plant regeneration from leaf-derived protoplasts within the *Daucus* genus: effect of different conditions in alginate embedding and phytosulfokine application. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 241–252.
- [65] Majada J. P., Fal M. A., Sánchez-Tamés R. (1997): The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 33: 62–69.
- [66] Mathur J., Koncz C. (1998): Protoplast Isolation, Culture, and Regeneration. In: Martinez-Zapater J. M., Salinas J. (ed.): pp. 35–42, Humana Press, Totowa, NJ.
- [67] Matchett-Oates L., Mohamaden E., Spangenberg G. C., Cogan N. O. I. (2021b): Development of a robust transient expression screening system in protoplasts of *Cannabis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 57: 1040–1050.
- [68] Matchett-Oates L. (2022): Production of Novel Medicinal *Cannabis* Using Genome Editing Technology. *Dizertační práce*, School of Applied Systems Biology, La Trobe University, Victoria.
- [69] Matchett-Oates L., Spangenberg G. C., Cogan N. O. I. (2021a): Manipulation of Cannabinoid Biosynthesis via Transient RNAi Expression. *Frontiers in Plant Science* 12: 773474.
- [70] McCarthy W. H., Wehner T. C., Xie J., Daub M. E. (2001): Improving Culture Efficiency of *Cucumis metuliferus* Protoplasts. *Cucurbit Genetics Cooperative* 24: 97–101.
- [71] McPartland J. M., Hegman W., Long T. (2019): *Cannabis* in Asia: its center of origin and early cultivation, based on a synthesis of subfossil pollen and archaeobotanical studies. *Vegetation History and Archaeobotany* 28: 691–702.
- [72] Miller N. G. (1970): The Genera of the *Cannabaceae* in the Southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 51: 185–203.

- [73] Ming R., Bendahmane A., Renner S. S. (2011): Sex chromosomes in land plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 485–514.
- [74] Mitchell J. (2014): The Secret History of *Cannabis* in Japan. *The Asia-Pacific Journal* 12: 6.
- [75] Monthony A. S., Jones A. M. P. (2024): Enhancing Protoplast Isolation and Early Cell Division from *Cannabis sativa* Callus Cultures via Phenylpropanoid Inhibition. *Plants* 13: 130.
- [76] Monthony A. S., Kyne S. T., Grainger C. M., Jones A. M. P. (2021): Recalcitrance of *Cannabis sativa* to *de novo* regeneration; a multi-genotype replication study. *Plos One* 16: e0235525.
- [77] Morimoto S., Tanaka Y., Sasaki K., Tanaka H., Fukamizu T., Shoyama Y., Shoyama Y., Taura F. (2007): Identification and Characterization of Cannabinoids That Induce Cell Death through Mitochondrial Permeability Transition in *Cannabis* Leaf Cells. *Journal of Biological Chemistry* 282: 20739–20751.
- [78] Murthy H. N., Joseph K. S., Paek K. Y., Park S. Y. (2023): Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 14:
- [79] NCBI-*Cannabis sativa* genome assembly ASM2916894v1. [online] [cit. 2024-1-7] Dostupný z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_029168945.1/.
- [80] NCBI-*Cannabis sativa* genome assembly cs10. [online] [cit. 2023-11-12] Dostupný z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_900626175.2/.
- [81] Ondřej V., Navrátilová B., Lebeda A. (2008): The heterochromatin as a marker for protoplast differentiation of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96: 229–234.
- [82] Ondřej V., Navrátilová B., Protivánková I., Piterková J., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 61: 2395–2401.
- [83] Page S. R., Monthony A. S., Jones A. M. P. (2021): DKW basal salts improve micropropagation and callogenesis compared with MS basal salts in multiple commercial cultivars of *Cannabis sativa*. *Botany* 99: 269–279.
- [84] Pâques M., Boxus P. (1987): A model to learn “vitrification”, the rootstock apple M. 26. Present Results. *Acta Horticulturae*: 193–210.
- [85] Park S.-Y. aj. (2009): Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* 324: 1068–1071.
- [86] Pasternak T., Paponov I. A., Kondratenko S. (2021): Optimizing Protocols for *Arabidopsis* Shoot and Root Protoplast Cultivation. *Plants* 10: 375.

- [87] Pepe M., Hesami M., Jones A. M. P. (2021): Machine Learning-Mediated Development and Optimization of Disinfection Protocol and Scarification Method for Improved *In Vitro* Germination of *Cannabis* Seeds. *Plants* 10: 2397.
- [88] Potter D. (2009): The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* as a phytopharmaceutical. Disertační práce, Department of Pharmaceutics Science Research, King's College, London.
- [89] Raman V., Lata H., Chandra S., Khan I. A., ElSohly M. A. (2017): Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa* L.) In: Chandra S., Lata H., ElSohly M. A. (ed.): pp. 123–136, Springer International Publishing, Cham.
- [90] Rasco S. M., Patena L. F. (ed.). (1997): *In vitro* shoot vitrification (hyperhydricity) in shallot (*Allium cepa* var gr. aggregatum). *Philippine Journal of Crop Science* 22: 14–22.
- [91] Ratanasanobon K., Seaton K. A. (2013): Protoplast isolation for species in the Chamaelaurium group and the effect of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) on protoplast viability. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49: 593–598.
- [92] Razumova O. V., Alexandrov O. S., Divashuk M. G., Sukhorada T. I., Karlov G. I. (2016): Molecular cytogenetic analysis of monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars reveals its karyotype variations and sex chromosomes constitution. *Protoplasma* 253: 895–901.
- [93] Ren G., Zhang X., Li Y., Ridout K., Serrano-Serrano M. L., Yang Y., Liu A., Ravikanth G., Nawaz M. A., Mumtaz A. S., Salamin N., Fumagalli L. (2021): Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances* 7: eabg2286.
- [94] Rico S., Garrido J., Sánchez C., Ferreiro-Vera C., Codesido V., Vidal N. (2022): A Temporary Immersion System to Improve *Cannabis sativa* Micropropagation. *Frontiers in Plant Science* 13: 895971.
- [95] Canopy Growth Corporation. Enhanced *Cannabis* Plants and Methods of Making and Using the Same. Roscow R. F., č. 20190119694. [Cit. 2023-12-1]. Dostupný z: <https://patents.justia.com/patent/20190119694>.
- [96] Russo E. B. aj. (2008): Phytochemical and genetic analyses of ancient *Cannabis* from Central Asia. *Journal of Experimental Botany* 59: 4171–4182.
- [97] Sakamoto K., Akiyama Y., Fukui K., Kamada H., Satoh S. (1998): Characterization; Genome Sizes and Morphology of Sex Chromosomes in Hemp (*Cannabis sativa* L.) *Cytologia* 63: 459–464.
- [98] Trait Biosciences Inc. Systems and methods for enhancing trichome formation and density in *Cannabis*. Sayre R., Soto-Aguilar M., Zidenga T., Goncalves E. C., č. 11352635B2. [Cit. 2023-11-30]. Dostupný z: <https://patents.google.com/patent/US11352635B2/en#patentCitations>.

- [99] Sharma D., Bhushan S., Agrawal D. C., Dhar M. K., Kaul S. (2022): *Cannabis* as a Potent Therapeutic Agent for Pharmaceutical Drugs: Recent Advancement in Drug Discovery and Human Healthcare. In: Agrawal D. C., Kumar R., Dhanasekaran M. (ed.): pp. 77–99, Springer Nature, Singapore.
- [100] Schilling S., Dowling C. A., Shi J., Ryan L., Hunt D. J. L., O'Reilly E., Perry A. S., Kinnane O., McCabe P. F., Melzer R. (2021): The Cream of the Crop: Biology, Breeding, and Applications of *Cannabis sativa*. *Annual Plant Reviews* 4: 471–528.
- [101] Siminis C. I., Kanellis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (1994): Catalase Is Differentially Expressed in Dividing and Nondividing Protoplasts. *Plant Physiology* 105: 1375–1383.
- [102] Small E. (2015): Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review* 81: 189–294.
- [103] Stephen C., Zayas V. A., Galic A., Bridgen M. P. (2023): Micropropagation of Hemp (*Cannabis sativa* L.) *HortScience* 58: 307–316.
- [104] Strzalka W., Ziemienowicz A. (2011): Proliferating cell nuclear antigen (*PCNA*): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107: 1127–1140.
- [105] Sturm J., Krause E. H. L., Missbach E. R. (1905): *J. Sturms Flora von Deutschland: in Abbildungen nach der Natur*. K. G. Lutz, Stuttgart.
- [106] Ševčíková H., Lipavská H., Mašková P. (2016): Metodika fotoautotrofní kultivace rostlin za podmínek *in vitro*. Univerzita Karlova v Praze.
- [107] Tanney C. A. S., Backer R., Geitmann A., Smith D. L. (2021): *Cannabis* Glandular Trichomes: A Cellular Metabolite Factory. *Frontiers in Plant Science* 12: 721986.
- [108] Tessadori F., Chupeau M.-C., Chupeau Y., Knip M., Germann S., Driel R., Fransz P., Gaudin V. (2007): Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Journal of Cell Science* 120: 1200–1208.
- [109] Trusinová V. (2012): Protoplastové kultury hrachu (*Pisum sativum* L.) a jeho planých příbuzných. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc.
- [110] Tsay H.-S., Lee C.-Y., Agrawal D. C., Basker S. (2006): Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae*—A medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 445–449.
- [111] Van Diest P. J., Brugal G., Baak J. P. (1998): Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of Clinical Pathology* 51: 716–724.
- [112] Vissenberg K., Quelo A.-H., Van Gestel K., Olyslaegers G., Verbelen J.-P. (2000): From hormone signal, via the cytoskeleton, to cell growth in single cells of tobacco. *Cell Biology International* 24: 343–349.
- [113] 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* 5: 199–207.

- [114] Williams L., Zhao J., Morozova N., Li Y., Avivi Y., Grafi G. (2003): Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental Dynamics* 228: 113-120.
- [115] Wolffe A. (1998): *Chromatin: Structure and Function*. Academic Press, London, UK.
- [116] Xu L., Li S., Shabala S., Jian T., Zhang W. (2019): Plants Grown in Parafilm-Wrapped Petri Dishes Are Stressed and Possess Altered Gene Expression Profile. *Frontiers in Plant Science* 10: 637.
- [117] Xu M., Du Q., Tian C., Wang Y., Jiao Y. (2021): Stochastic gene expression drives mesophyll protoplast regeneration. *Science Advances* 7: eabg8466.
- [118] Yang Z., Wang Y., Wei X., Zhao X., Wang B., Sui N. (2017): Transcription Profiles of Genes Related to Hormonal Regulations Under Salt Stress in Sweet Sorghum. *Plant Molecular Biology Reporter* 35: 586–599.
- [119] Yildirim B., Aasim M., Aytaç S. (2023): Optimizing *in vitro* germination of primed industrial hemp seeds. *Anatolian Journal of Botany* 7: 112–116.
- [120] Yin M., Pan G., Tao J., Doblin M. S., Zeng W., Pan L., Zhao L., Li Z., Jiang H., Chang L., Deng Y., Li D., Huang S. (2022): Identification of MYB genes reveals their potential functions in cadmium stress response and the regulation of cannabinoid biosynthesis in hemp. *Industrial Crops and Products* 180: 114607.
- [121] Zhang D., Wang R., Xiao J., Zhu S., Li X., Han S., Li Z., Zhao Y., Shohag M. J. I., He Z., Li S. (2022): An integrated physiology, cytology, and proteomics analysis reveals a network of sugarcane protoplast responses to enzymolysis. *Frontiers in Plant Science* 13: 1066073.
- [122] Zhang X., Xu G., Cheng C., Lei L., Sun J., Xu Y., Deng C., Dai Z., Yang Z., Chen X., Liu C., Tang Q., Su J. (2021): Establishment of an Agrobacterium-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis sativa* L.) *Plant Biotechnology Journal* 19: 1979–1987.
- [123] Zhao J., Morozova N., Williams L., Libs L., Avivi Y., Grafi G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells - Distinction between competence for cell fate switch and a commitment for S phase. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22772–22778.
- [124] Zhu J.-K. (2016): Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167: 313–324.
- [125] Zhu P., Zhao Y., You X., Zhang Y. J., Vasseur L., Haughn G., Liu Y. (2022): A versatile protoplast system and its application in *Cannabis sativa* L. *Botany* 101: 291–300.