

**VZPOSTAVITEV METODE IZOLACIJE PROTOPLASTOV PRI HMELJU
(*Humulus lupulus* L.)**Ester STAJIČ¹, Petra KUNC² in Urban KUNEJ³

Izvirni znanstveni članek / Original scientific article

Prispelo / Received: 10. 10. 2022

Sprejeto / Accepted: 22 10. 2022

Izvilleček

Učinkovit protokol izolacije protoplastov je glavni pogoj za razvoj metod transformacije protoplastov, ki imajo široko uporabnost, od bazičnih študij funkcij genov do regeneracije transformiranih rastlin s spremenjenimi lastnostmi. Pri hmelju je takšnih protokolov zelo malo. Z namenom vzpostavitve metode izolacije protoplastov pri hmelju smo preizkusili različna gojišča za rast v tkivni kulturi. Na gojišču brez hormonov je bila ta najhitrejša, listi so bili lepo razviti in primerni za izolacijo protoplastov. Z optimizacijo sestave encimske mešanice smo pri sorti Celeia dosegli visok donos ($8,0 \times 10^5$ protoplastov na g tkiva) in (86 %) živost izoliranih protoplastov. Vzpostavljen protokol se je izkazal za primerne tudi za izolacijo protoplastov pri drugih slovenskih sortah hmelja, pri čemer smo med uporabljenimi sortami opazili razlike v donosu in v živosti izoliranih protoplastov. Poročamo o prvem protokolu za izolacijo protoplastov iz listov hmelja, ki bo omogočala številne nadaljnje aplikacije za zlahtnjenje hmelja.

Ključne besede: hmelj, protoplasti, protokol, izolacija

**ESTABLISHMENT OF PROTOPLAST ISOLATION METHOD FOR HOP
(*Humulus lupulus* L.)****Abstract**

An efficient protoplast isolation protocol is the main requirement for development of protoplast transformation methods that have wide applicability, from basic studies of gene functions to the regeneration of transformed plants with modified characteristics. Very few such protocols exist for hop. In order to establish a method for the isolation of protoplasts for hop, we tested different media for growth in tissue culture. On the hormone-free medium, growth was fastest and leaves were well developed and suitable for protoplast isolation. By optimizing the composition of the enzyme mixture, we achieved high yield (8.0×10^5 protoplasts per g of leaves) and

¹ Asist. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (UL BF), Oddelek za agronomijo, e-naslov: ester.stajic@bf.uni-lj.si

² Mag. inž. hort., UL BF, e-naslov: petra.kunc@bf.uni-lj.si

³ Asist. dr., UL BF, e-naslov: urban.kunej@bf.uni-lj.si

(86 %) viability of the isolated protoplasts in the Celeia cultivar. The established protocol also proved to be suitable for the isolation of protoplasts from other Slovenian hop cultivars, although we observed differences in yield and viability of isolated protoplasts between the cultivars used. We report the first protocol for isolation of protoplasts from hop leaves, which will enable many further applications for hop breeding.

Key words: hop, protoplasts, protocol, isolation

1 UVOD

Žlahtnjenje novih sort s klasičnimi metodami vnašanja novih lastnosti je dolgotrajen postopek. Nove biotehnoške metode, kot so tehnike preurejanja genoma (angl. genome editing), bi lahko s tarčnim spreminjanjem genov ta proces pospešile (Reed in Bargmann, 2021). Ključno pri vzpostavljanju metod tarčnega preurejanja je razvoj enostavnega in hitrega sistema za testiranje učinkovitosti vektorjev. V ta namen lahko uporabimo protoplaste, rastlinske celice brez celične stene, pri katerih je zaradi odstranjene celične stene vnos DNA, RNA in proteinov veliko enostavnejši (Nadakuduti in sod., 2019). Transformacija protoplastov je primerna tudi za *in vivo* funkcijske študije, preučevanje interakcij med proteini in določanje njihove lokalizacije znotraj celic (Priyadarshani in sod., 2018).

Pri rastlinah je celična stena sestavljena iz mešanice celuloze, hemiceluloze, pektina, beljakovin in lipidov. Za pridobivanje protoplastov je zato celično steno potrebno odstraniti z mešanico encimov, ki razgrajujejo celično steno in vsebujejo celulaže, hemicelulaže in pektinaze. Za optimalno razgradnjo je glede na rastlinsko vrsto in izvorno tkivo potrebno določiti najbolj učinkovito kombinacijo in koncentracijo encimov (Naing in sod., 2021). Na uspešnost izolacije protoplastov poleg sestave encimske mešanice pomembno vplivajo tudi drugi dejavniki, kot je fiziološko stanje donorskih rastlin, izbira osmotika in način čiščenja izoliranih protoplastov (Navrátilová, 2004).

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je pomembna kmetijska rastlina, katere storžki ženskih rastlin se uporabljajo v pivovarski industriji, zaradi številnih bioaktivnih komponent pa je hmelj uporaben tudi v farmaciji in medicini (Hrnčič in sod., 2019). Pridelava hmelja ima v Sloveniji dolgoletno tradicijo, zato je žlahtnjenje lastnih sort izrednega pomena. Kljub pomembnosti hmelja je do sedaj edini objavljen protokol za izolacijo protoplastov iz leta 1987 (Furze in sod., 1987), kjer so protoplaste izolirali iz suspenzijskih celic, medtem ko protokol za izolacijo protoplastov iz listov hmelja še ni bil objavljen. V raziskavi smo najprej želeli optimizirati rast hmelja v tkivni kulturi za izolacijo protoplastov in preizkusiti različne encimske mešanice, ki bi omogočale visok donos živih protoplastov. Najbolj primerno encimsko mešanico smo nato preizkusili še na različnih sortah hmelja.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

V poskusih izolacije protoplastov smo uporabili *in vitro* gojene rastline hmelja sort Atlas, Blisk, Celeia, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold, ki smo jih pridobili od Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Aseptične kulture smo vzdrževali s subkultivacijo nodijev na gojišču MS (Murashige in Skoog, 1962) z vitamini in dodano saharozo 30 g/l ter agarjem 8 g/l; pH 5,8. Rastline smo gojili v rastni komori pri 16/8 urni fotoperiodi in $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Optimizacija rasti v *in vitro* pogojih

Da bi optimizirali rast rastlin hmelja v tkivni kulturi in pridobili čim večje število rastlin z lepo razviti listi, primernimi za izolacijo protoplastov, smo nodije inokulirali na tri različna trdna gojišča:

- gojišče 1 – MS gojišče z vitamini in 20 g/l glukoze
- gojišče 2 – MS gojišče z vitamini, 20 g/l glukoze in 1 mg/l BAP
- gojišče 3 – MS gojišče z vitamini, 20 g/l glukoze, 0,5 mg/l TDZ in 0,1 mg/l IAA

Na vsako gojišče smo inokulirali 16 nodijev sorte Celeia in po 6 (Termin 1) ter 8 tednih (Termin 2) izmerili višino rastlin, ocenili razvitost listov in pojav nezaželenih lastnosti, kot sta kalus in vitrifikacija tkiva. Za ugotavljanje vpliva obeh preučevanih faktorjev, t.j. vpliv gojišča in termina na velikost rastlin smo izvedli smiselne primerjave med skupinami obeh faktorjev ter pridobili koeficiente razlik med skupinami ter prilagojene *p*-vrednosti.

2.3 Protokol za izolacijo protoplastov

Za izolacijo protoplastov smo sledili protokolu Kielkowske in Adamus (2012) in najprej primerjali uspešnost izolacije s šestimi različnimi encimskimi raztopinami pri sorti Celeia, nato pa smo najbolj učinkovito encimsko mešanico uporabili za izolacijo protoplastov pri različnih sortah (Atlas, Blisk, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold). Uspešnost izolacije protoplastov smo vrednotili s štetjem izoliranih protoplastov in barvanjem z barvilom fluorescein diacetat (FDA), s katerim smo določili njihovo živost. Za vsak poskus smo naredili tri ponovitve in izvedli statistično analizo na smiselnih primerjavah za oceno vpliva koncentracije macerocima in celulaze na donos in živost protoplastov ter s Tukey-evim testom mnogoterih primerjav ugotavljali razlike med posameznimi sortami.

Prvi korak pri izolaciji protoplastov je bila priprava listov za izolacijo. Uporabili smo 0,4 g listov rastlin hmelja, ki so rastle v tkivni kulturi vsaj 8 tednov. Liste smo sterilno

prenesli v petrijevko in jih ob prisotnosti 0,4 M manitola (pH 5,8) razrezali. Petrijevke smo inkubirali v temi 1 uro na 25 °C in stresanjem 30 obr./min. Nato smo tekočino odpipetirali in dodali 8 ml encimske raztopine z 1,5 %, 2,0 % ali 2,5 % celulozo (Cellulase Onozuka R-10), 0,5 % ali 0,7 % macerocimom (Macerozyme R-10) v 20 mM MES (pH 5,7) z 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 20mM KCl in 0,4 M manitolom. Sledila je prekonočna inkubacija (16 ur) v temi na 25 °C in stresanjem 30 obr./min.

Naslednji dan smo v vsako petrijevko dodali 2 ml raztopine W5 (Menczel in sod., 1981), s 5 ml nastavkom za pipete premešali in vsebino najprej precedilo skozi cedilo, nato pa čez 40 µm najlonske filtre. Nerazgrajeni rastlinski material smo vrnili v petrijevko in spiranje ponovili z 10 ml raztopine W5 in tekočino precedili. Sledilo je centrifugiranje pri 900 obr./min 5 min, nato smo tekočino odpipetirali in pelet protoplastov resuspendirali v 4 ml raztopine za flotacijo (0,5 M saharoza, 1 mM MES; pH 5,8). Protoplaste obeh spiranj smo združili v eno centrifugirko in previdno dodali 2 ml raztopine W5, tako da se vsebina ni zmešala. Po centrifugiranju (10 min pri 1100 obr./min) so se živi in nepoškodovani protoplasti nahajali med obema raztopinama. Te smo prenesli v novo centrifugirko in jih sprali z 10 ml raztopine W5. Pelet smo resuspendirali v enaki raztopini in odvzeli 10 µl za vrednotenje uspešnosti izolacije.

Za določanje živosti smo 10 µl izoliranih protoplastov dodali 10 µl 0,005 % barvila FDA, premešali in 10 µl prenesli na hemocitometer. Pod mikroskopom Nikon Eclipse 80i smo prešteli število izoliranih protoplastov in z uporabo filtrov za detekcijo zelene fluorescence določili odstotek živih protoplastov, ki so pod mikroskopom svetili zeleno.

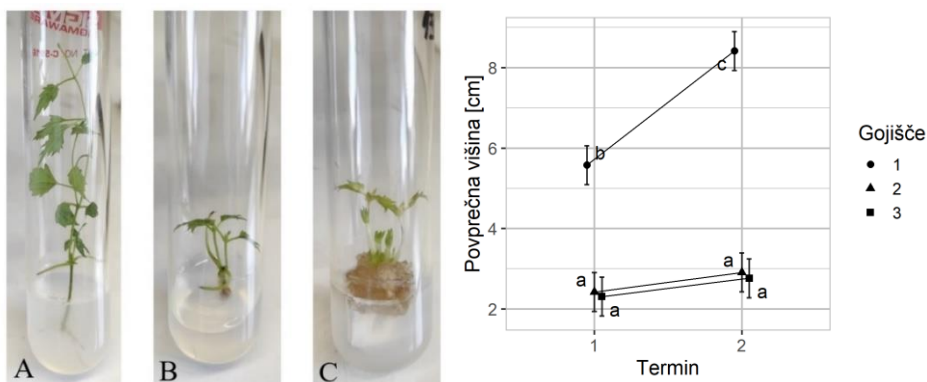
3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Vpliv sestave gojišča na rast rastlin

Fiziološko stanje izhodiščnega materiala je eden izmed ključnih dejavnikov za uspešno izolacijo protoplastov (Navrátilová, 2004). Iz tega razloga smo se odločili, da v prvem poskusu ovrednotimo rast rastlin hmelja v tkivni kulturi na treh različnih gojiščih. V prvem ocenjevalnem terminu (6 tednov po inokulaciji nodijev na gojišča) smo lahko opazili izrazite razlike v višini rastlin na različnih gojiščih in na gojišču 3 pojav nezaželenih lastnosti, kot sta kalus in vitrificiranost rastlin (Slika 1).

Po 6 tednih so bile rastline najvišje na gojišču 1 (5,58 cm), prav tako so bili listi lepo razviti. Rastline na tem gojišču so tudi hitreje rastle v primerjavi z rastlinami na gojišču 2 in 3, in so v drugem ocenjevalnem terminu (po 8 tednih) dosegle višino 8,41 cm. Rastline, ki so rastle na gojišču 2 z dodanim hormonom BAP, so bile v prvem terminu veliko nižje (2,43 cm) v primerjavi z rastlinami na gojišču 1 brez

dodanih hormonov. Rast je bila tudi veliko počasnejša in v primerjavi z drugim terminom v višini nismo opazili bistvenih sprememb (2,91 cm). Hormon BAP spada v skupino citokininov, ki naj bi imeli največji vpliv na zmožnost regeneracije pri hmelju (Šuštar-Vozlič in sod., 1999), vendar pa je imel v naših poskusih dodatek hormona BAP ravno nasproten učinek.



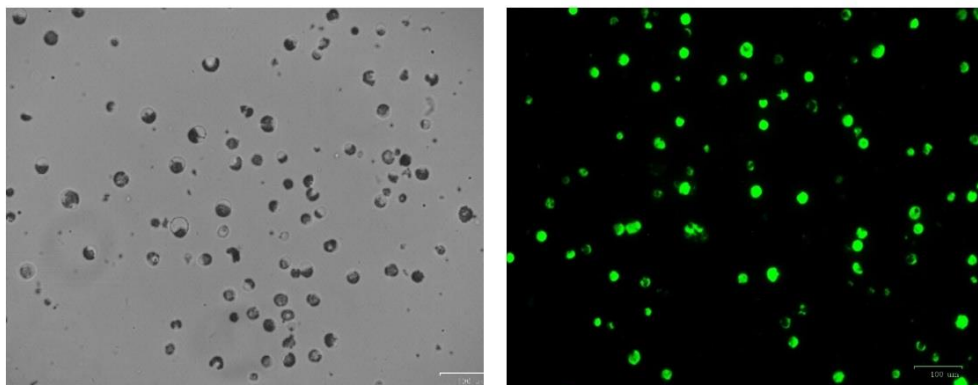
Slika 1: Levo - regeneracija nodijev sorte Celeia po 6 tednih na treh različnih gojiščih (A – gojišče 1, B – gojišče 2 in C – gojišče 3), desno - povprečna višina rastlin (cm) glede na vrsto gojišča in termin vrednotenja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med povprečji.

Pri regeneraciji nodijev na gojišču 3 z dodanima hormonoma TDZ in IAA, smo po 6 tednih opazili nastanek kalusnega tkiva, nastali poganjki so bili kratki (2,31 cm) in vitrificirani. Nastanek kalusnega tkiva pri gojenju rastlin v tkivni kulturi lahko sproži pojav spontanah mutacij, imenovano somaklonska variabilnost, ki je v večini primerov nezaželena, tudi pri gojenju hmelja (de Souza in sod., 2021). Za mikropogajanje so zato priporočljivi protokoli gojenja na gojiščih brez dodanih rastnih hormonov, ki bi lahko sprožili nastanek kalusnega tkiva in s tem zmanjšali možnosti ohranjanja genetsko stabilnega materiala (Beard in sod., 2021). Gojišče 3 so avtorji Roy in sod. (2001) predlagali za namnoževanje hmelja v tkivni kulturi, vendar so bili nastali poganjki v našem primeru neprimerni za nadaljnje gojenje. V vseh preizkušanih gojiščih smo uporabili glukozo namesto saharoze, kot to za hmelj priporočata Hirakawa in Tanno (2022). Zamenjava sladkorja se je tudi v našem primeru izkazala za ustrezno.

3.2 Vzpostavitev protokola izolacije protoplastov in primerjava uspešnosti izolacije protoplastov z različnimi encimskimi raztopinami

Liste rastlin iz gojišča 1 smo dalje uporabili za izolacijo protoplastov. Pri tem smo sledili protokolu Kielkowske in Adamus (2012) za izolacijo protoplastov iz listov in

hipokotilov zelja, ter spreminjali sestavo encimske raztopine za uspešno izolacijo protoplastov iz listov hmelja. Za ta poskus smo uporabili tri različne koncentracije celulaz (1,5 %, 2,0 % in 2,5 %) in dve koncentraciji macerocima (0,5 % in 0,7 %). Vpliv koncentracije encimov na uspešnost izolacije protoplastov smo preverili na listih sorte Celeia.



Slika 2: Uspešno izolirani protoplasti hmelja. Levo – izolirani protoplasti pod svetlobnim mikroskopom, desno – protoplasti, obarvani z barvilom FDA pod fluorescenčnim mikroskopom, zeleno svetijo živi protoplasti.

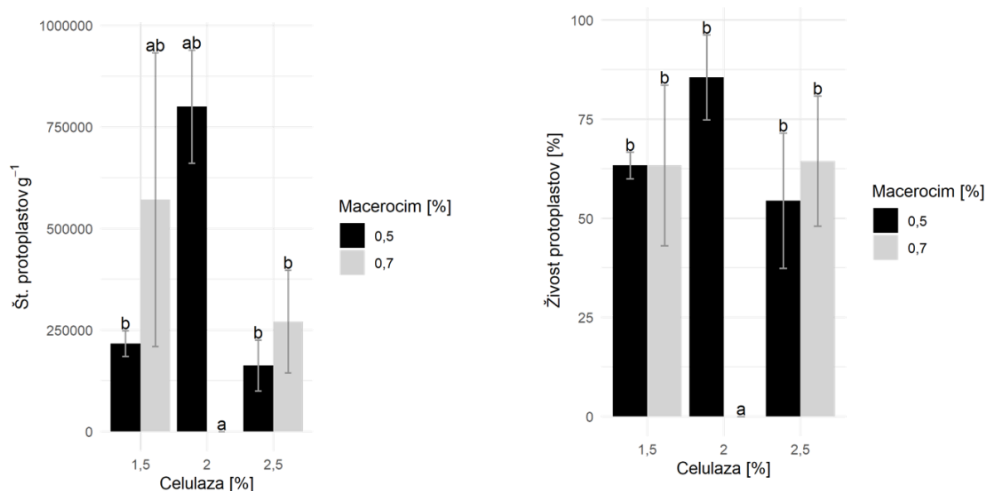
Protoplaste smo uspešno izolirali z uporabo 5 od 6 preizkušenih encimskih mešanic (Slika 2), pri čemer smo najvišji donos izoliranih protoplastov dosegli z uporabo encimske mešanice ER2, ki je vsebovala 1,5 % celulazo in 0,7 % macerocim ($5,7 \times 10^5$ protoplastov na g tkiva) ter ER3, ki je vsebovala 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocim ($8,0 \times 10^5$ protoplastov na g tkiva) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava encimskih mešanic in njihov vpliv na donos in živost izoliranih protoplastov iz listov sorte Celeia. Različne črke v posameznem stolpcu označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med povprečji.

Encimska raztopina	Koncentracija encimov	Donos izoliranih protoplastov ($\times 10^5$) na g tkiva $\pm$ SD	Živost izoliranih protoplastov $\pm$ SD [%]
ER1	1,5C + 0,5M	$2,2 \pm 0,3$ b	63 ± 3 b
ER2	1,5C + 0,7M	$5,7 \pm 3,6$ ab	63 ± 2 b
ER3	2,0C + 0,5M	$8,0 \pm 1,4$ ab	86 ± 11 b
ER4	2,0C + 0,7M	0 ± 0 a	0 ± 0 a
ER5	2,5C + 0,5M	$1,6 \pm 0,6$ b	54 ± 17 b
ER6	2,5C + 0,7M	$2,7 \pm 1,3$ b	64 ± 16 b

Naši rezultati donosa izoliranih protoplastov so primerljivi z objavo pri konoplji, pri kateri so z uporabo 1,25 % celulaze in 0,3 % macerocimom pridobili $9,1 \times 10^5$ protoplastov na gram tkiva (Beard in sod., 2021). Pri encimski mešanici ER4 z 2,0 % celulazo in 0,7 % macerocimom nismo dobili dovolj protoplastov, da bi lahko vrednotili uspešnost izolacije.

Pri 0,5 % koncentraciji macerocima smo z zvišanjem koncentracije celulaze iz 1,5 % na 2,0 % pridobili več protoplastov, nato pa se je pri 2,5 % celulazi donos izoliranih protoplastov znižal. Podobno so opazili tudi Wang in sod. (2021) pri izolaciji protoplastov iz sladkornega trsa, ki so z naraščanjem koncentracije celulaze do 2,5 % zvišali donos izoliranih protoplastov, pri 3 % koncentraciji celulaze pa so pridobili manj protoplastov v primerjavi z 2,5 % celulazo pri 0,5 % koncentraciji macerocima. Do tega lahko pride zaradi toksičnosti encimov pri visoki koncentraciji (Ren in sod., 2020). Za višje koncentracije encimov so zato priporočljive krajše (nekaj urne) inkubacije (Naing in sod., 2021).



Slika 3: Vpliv sestave encimske mešanice na donos (levo) in živost (desno) izoliranih protoplastov iz listov hmelja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med povprečji.

Med uporabljenimi encimskimi raztopinami, pri katerih smo vrednotili živost izoliranih protoplastov (ER1, ER2, ER3, ER5 in ER6), ni bilo statistično značilnih razlik. Pri 0,5 % koncentraciji macerocima smo pri živosti opazili podoben trend kot pri donosu protoplastov – ta se je najprej z zvišanjem koncentracije celulaze povečala (iz 63 % pri 1,5 % celulazi na 86 % pri 2,0 % celulazi), nato pa znižala (iz 86 % pri 2,0 % celulazi na 54 % pri 2,5 % celulazi).

Pri encimski raztopini ER2, s katero smo tudi dosegli visok donos protoplastov, je bila variabilnost med ponovitvami pri donosu in živosti zelo visoka, kar za vzpostavitev zanesljivega protokola ni priporočljivo, zato smo na podlagi dobljenih rezultatov zaključili, da je za izolacijo protoplastov iz listov sorte Celeia najbolj primerna encimska raztopina ER3 z 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocimom, s katero smo dosegli tudi visoko živost izoliranih protoplastov (86 %), ki je ključna za nadaljnjo uporabo protoplastov (Priyadarshani in sod., 2018).

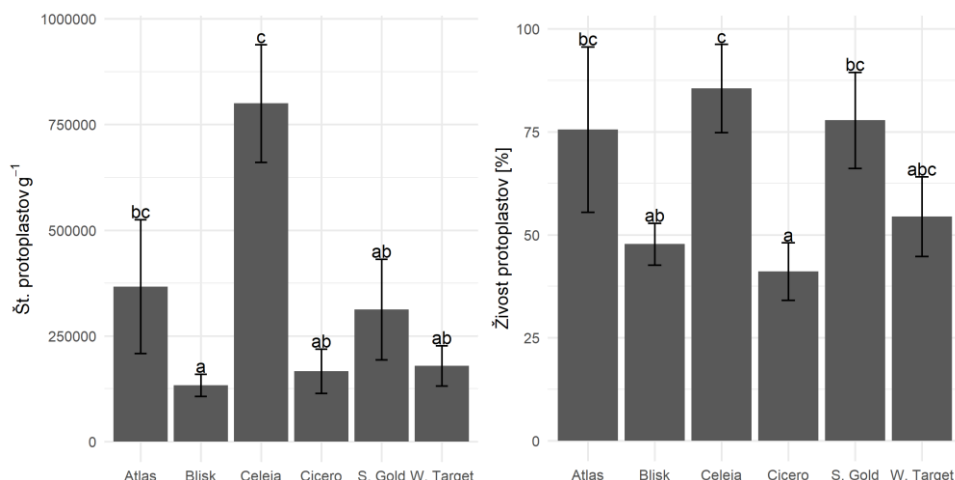
3.3 Izolacija protoplastov pri različnih sortah hmelja

Encimsko raztopino 3 smo nato uporabili za izolacijo protoplastov iz listov različnih sort hmelja (Atlas, Blisk, Celeia, Cicero, Wye Target, Styrian Eureka in Styrian Gold), ki smo jih gojili v tkivni kulturi na gojišču 1.

Preglednica 2: Donos in živost izoliranih protoplastov iz listov različnih sort hmelja z encimsko raztopino ER3. Različne črke v posameznem stolpcu označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med povprečji.

Sorta	Donos izoliranih protoplastov ($\times 10^5$) na g tkiva $\pm$ SD	Živost izoliranih protoplastov $\pm$ SD [%]
Atlas	$3,7 \pm 1,6$ bc	76 ± 20 bc
Blisk	$1,3 \pm 0,3$ a	48 ± 5 ab
Celeia	$8,0 \pm 1,4$ c	86 ± 11 c
Cicero	$1,7 \pm 0,5$ ab	41 ± 7 a
Styrian Gold	$3,1 \pm 1,2$ ab	78 ± 12 bc
Wye Target	$1,8 \pm 0,5$ ab	54 ± 10 abc

Protoplaste smo uspešno izolirali pri vseh izbranih sortah, razen pri sorti Styrian Eureka, pri kateri po flotaciji nismo dobili dovolj protoplastov, da bi lahko vrednotili uspešnost izolacije. Med izbranimi sortami smo opazili velike razlike tako v donosu ($1,3$ – $8,0 \times 10^5$ protoplastov na g tkiva), kot tudi v živosti (41–86 %) izoliranih protoplastov (Preglednica 2). Encimska mešanica ER3 z 2,0 % celulazo in 0,5 % macerocimom je bila najbolj primerna za izolacijo protoplastov iz listov sorte Celeia in Atlas, pri katerih smo dosegli najvišji donos (Slika 4). Živost protoplastov je bila visoka pri sortah Atlas, Celeia in Styrian Gold (76–86 %), medtem ko je bila pri sortah Blisk, Cicero in Wye Target nizka (41–54 %) (Slika 4). Pri slednjih bi za nadaljnjo uporabo protoplastov, protokol izolacije morali še optimizirati.



Slika 4: Primerjava donosa (levo) in živosti (desno) izoliranih protoplastov iz listov različnih sort hmelja. Različne črke označujejo statistično značilno razliko ($p \leq 0,05$) med povprečji.

Razlike v uspešnosti izolacije protoplastov pri različnih sortah so na podlagi literature pričakovane, podobno poročajo tudi Meyer in sod. (2009) ter Assani in sod. (2002). Uspešnost izolacije je lahko odvisna od občutljivosti genotipa na uporabljene encime (Reed in Bargmann, 2021) in razlik v rasti v tkivni kulturi, kar vpliva na njihovo fiziološko stanje (Navrátilová, 2004).

4 ZAKLJUČEK

Protoplasti imajo veliko uporabnost, vendar pa protokoli prehodne transformacije protoplastov temeljijo na velikem številu protoplastov z visoko živostjo, ki jih lahko pridobimo le iz vitalnih rastlin. Za uspešno izolacijo protoplastov pri hmelju smo zato najprej vzpostavili tkivno kulturo hmelja na gojišču brez hormonov, na katerem so imele rastline najhitrejšo rast in najlepše razvite liste. Nato smo z optimizacijo sestave encimske mešanice uspešno izolirali protoplaste pri šestih slovenskih sortah hmelja. Furze in sod. (1987) so prvi objavili protokol za izolacijo protoplastov pri hmelju, vendar iz suspenzijskih celic. V naših poskusih smo protoplaste prvič izolirali iz mezofilnega tkiva listov hmelja, saj lahko na ta način pridobimo veliko število izenačenih protoplastov (Pasternak in sod., 2020). Vzpostavljena metoda izolacije protoplastov bo uporabna ne samo za transformacije protoplastov, temveč tudi za bazične študije na celičnem nivoju.

Zahvala. Avtorji se za finančno podporo zahvaljujemo Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (raziskovalni program P4-0077).

Zahvala za rastlinski material gre tudi Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije.

5 VIRI

- Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Côte F. X., Ducreux G., Ambroise A., Grapin A. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science*. 2002; 162, 3: 355-362.
- Beard K. M., Boling A. W. H., Bargmann B. O. R. Protoplast isolation, transient transformation, and flow-cytometric analysis of reporter-gene activation in *Cannabis sativa* L. *Industrial Crops & Production*. 2021; 164: 113360.
- De Souza R., Adams C. R., de Melo R. C., Guidolin A. F., Michel A., Coimbra J. L. M. Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under *in vitro* conditions. *Brazilian Journal of Biology*. 2021; 147: 379-387.
- Furze J. M., Rhodes M. J. C., Richard J. R. The use of agarose bead culture for the regeneration of single cell-derived colonies from protoplast isolated from suspension cultures of *Humulus lupulus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1987; 8: 17-25.
- Hirakawa T. in Tanno S. *In Vitro Propagation of Humulus lupulus through the Induction of Axillary Bud Development*. *Plants*. 2022; 11, 1066.
- Hrnčič M. K., Spaninger E., Košir I. J., Knez Z., Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*. 2019; 11, 2: 275.
- Kielkowska A. in Adamus A. An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 2012; 48: 265-273.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor Appl Genet*. 1981; 59:191-195.
- Meyer L., Serek M., Winkelmann T. Protoplast isolation and plant regeneration of different genotypes of *Petunia* and *Calibrachoa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2009; 99: 27-34.
- Murashige T. in Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15: 473-497.
- Nadakuduti S. S., Starker C. G., Ko D. K., Jayakody T. B., Buell C. R., Voytas D. F., Douches D. S., Evaluation of methods to assess *in vivo* activity of engineered genome-editing nucleases in protoplasts. *Front. Plant Sci*. 2019; 10.
- Naing A. H., Adedeji O. S., Kim C. K. Protoplast technology in ornamental plants: Current progress and potential applications on genetic improvement. *Scientia Horticulturae*. 2021; 283.
- Navrátilová B. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae – a review. *Horticultural Science*. 2004; 31, 4: 140-157.
- Pasternak T., Lystvan K., Betekhtin A., Hasterok R. From Single Cell to Plants: Mesophyll Protoplasts as a Versatile System for Investigating Plant Cell Reprogramming. *Int J Mol Sci*. 2020; 21, 12: 4195.
- Priyadarshani S. V. G. N., Hu B., Li W., Ali H., Jia H., Zhao L., Ojolo S. P., Azam S. M., Xiong J., Yan M., ur Rahman Z., Wu Q., Qin Y. Simple protoplast isolation system for

- gene expression and protein interaction studies in pineapple (*Ananas comosus* L.). *Plant Methods*. 2018; 14: 95.
- Reed K. M. in Bargmann B. O. R. Protoplast Regeneration and Its Use in New Plant Breeding Technologies. *Front. Genome Ed.*. 2021; 3: 734951.
- Ren R., Gao J., Yin D., Li K., Lu C., Ahmad S., Wei Y., Jin J., Zhu G., Yang F. Highly Efficient Leaf Base Protoplast Isolation and Transient Expression Systems for Orchids and Other Important Monocot Crops. *Front. Plant Sci.* 2021; 12.
- Roy A. T., Legget G., Koutoulis A. Shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 2001; 37: 79-83.
- Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Bohanec B. Studies of Somaclonal Variation in hop (*Humulus lupulus* L.). *Phyton-Annales Reis Botanica*. 1999; 39: 283-287.
- Wang Q., Yu G., Chen Z., Han J., Hu Y., Wang K. Optimization of protoplast isolation, transformation and its application in sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.). *The Crop Journal*. 2021; 9: 133-142.