

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS, UN ESTUDIO AL CULTIVO IN VITRO DE CANNABIS.

BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS, A STUDY TO THE IN VITRO CULTIVATION OF CANNABIS.

Karina Michelle Garzón Pasquel¹

Centro ecuatoriano de biotecnología y ambiente, Ibarra, Ecuador

Recibido: 10 Octubre 2021

Aceptado: 11 Enero de 2022

RESUMEN

En las últimas décadas el cannabis ha generado mayor interés en el ámbito científico, tecnológico y productivo, debido a su gran potencial terapéutico emergente, sus amplias aplicaciones industriales y a los cambios en las leyes gubernamentales. La reciente legalización en varias regiones y el gran potencial biotecnológico que el cannabis representa, revela la necesidad de establecer protocolos para la propagación rápida y eficiente de plantas clonales libres de virus y enfermedades, desarrollar técnicas para la mejora vegetal y el almacenamiento de germoplasma, sin embargo, las investigaciones avanzan de manera pausada debido a las distintas condiciones que rigen en país, se espera que la flexibilidad en las leyes actuales permitan el desarrollo de nuevas técnicas para el manejo del cannabis y sus posibles aplicaciones. La revisión proporcionará una breve reseña de la historia cannabis, así como un análisis crítico del cultivo de tejidos de en relación con el cannabis y se prestará atención a los estudios de micropropagación de cannabis existentes y las direcciones futuras de las tecnologías de cultivo de tejidos de cannabis.

PALABRAS CLAVE: callogénesis cannabis, cañamo, cultivo in vitro, micropropagación.

ABSTRACT

In recent decades, Cannabis has received major attention within the scientific, technological and production fields, due to its outstanding therapeutic potential and wide industrial and biotechnological applications. This has led to substantial changes in the legislative frameworks worldwide, which have boosted Cannabis production and processing in many countries. As a result, it is of paramount importance to develop and establish protocols for rapid and efficient propagation of clonal plants, free of viruses and diseases, by working on plants improvement and germplasm storage. However, despite the depenalization of Cannabis grow in Ecuador, laws remain arbitrary and have delayed research on the development of new techniques for the management of Cannabis and its possible applications. Therefore, this review aims to provide a brief overview of this plant. Besides, critical analysis of tissue culture in relation to cannabis and will pay attention to the limitations of existing cannabis micropropagation studies and future directions of cultivation technologies of cannabis tissues.

KEYWORDS: callus induction, cannabis, hemp, in vitro culture, micropropagation

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cáñamo inició en Asia, siendo la fuente más antigua de fibra, se utilizaba para fabricar cuerdas de importantes embarcaciones debido a la resistencia y fuerza del material, además de su uso en rituales por sus características psicoativas, y el uso de la semilla aleoginosa como fuente de alimento. Desde hace más de 6000 años, China ha sido el principal productor de fibra de cáñamo inclusive en la actualidad se fabrican variedades de telas, posteriormente entre el año 1000 y 2000 a.C. se introdujo el cáñamo a Europa para producción de cuerdas para embarcaciones y en 1545 la cosecha llega por primera vez a América del Sur por Chile hasta Norteamérica (Chandra, Lata, Mehmedic, Khan, & Elsohly, 2010).

Después de la segunda guerra mundial el cáñamo empezó a perder interés en Europa y América del Norte debido al creciente uso de la planta como fuente de drogas en el mundo occidental, esto le dio al cáñamo una muy mala imagen, y condujo a una legislación que prohíbe el cultivo de cáñamo, aunque la producción continuó a un nivel disminuido en Asia, Europa oriental y la Unión Soviética durante el siglo XX. (Chandra et al., 2010)

En 1990 se reanuda el cultivo de cáñamo con la imagen dominante de la planta como fuente de marihuana. Aproximadamente 3 docenas de países crecen actualmente en el cultivo de cáñamo y actualmente se realizan cambios en la legislación con el propósito del uso de cáñamo como nueva fuente y recurso potencial para la creación de oportunidades de crecimiento y desarrollo potencial en el uso y aplicación de la planta. (Chandra et al., 2010)

Características importantes de Cannabis sativa.

Cannabis sativa, miembro de la familia cannabaceae, es fuente natural productora de

compuestos terpenofenólicos conocidos como cannabinoides que se acumulan en los tricomas glandulares de la planta (Chandra et al., 2010). Las principales moléculas biológicamente activas, son: el cannabidiol (CBD) molécula no psicoactiva con gran potencial terapéutico para el tratamiento de varias enfermedades y el 9-tetrahidrocannabinol conocido por su psicoactividad y su respuesta analgésica y antiinflamatoria. (Lata, Chandra, Techen, Khan, & Elsohly, 2016).

Debido a sus importantes características y aplicaciones industriales, medicas farmacéuticas, y alimentarias, varios países optaron por flexibilizar las restricciones en torno al cultivo comercial, productos consumibles y desarrollo de investigación del cannabis y sus derivados, de esta manera se espera que la innovación e incursión en el área permitan mayor comprensión del crecimiento, fisiología y bioquímica del C. sativa (Monthony, Page, Hesami, & Jones, 2021).

Esta especie se caracteriza por ser diocea y altamente polinizada por el viento, su naturaleza alógama impide obtener la misma consistencia en la materia prima de partida y reduce la eficacia de mantener las mismas variedades selectas de alto rendimiento en THC a partir de semillas en condición de campo, estas características dificultan garantizar la calidad del producto final y la estandarización en los procesos productivos.

Cannabinoides

El cannabis contiene una clase única de compuestos terpenofenólicos conocidos como cannabinoides, relacionados con los terpenos por su estructura de anillo derivada del pirofosfato de geranilo, desde el descubrimiento del THC molécula responsable de los efectos psicoactivos se han descubierto 565 constituyentes y alrededor de 120 cannabinoides de C. sativa (Chandra et al., 2010). El cannabinoide de mayor interés es el

cannabidiol (CBD) debido a su actividad como agente antiepiléptico.

Para la obtención de cannabinoides se prefieren las plantas femeninas debido a que producen mayor cantidad de estas moléculas de interés en comparación con las plantas masculinas, además si se cultivan diferentes variedades de cannabis, la polinización cruzada entre las variedades afectaría la calidad (perfil químico) del producto final por tal motivo es necesario seleccionar y retirar las plantas masculinas del cultivo ya que al ser altamente polinizadas por el viento y en presencia de plantas masculinas, las plantas femeninas producen muchas semillas en la madurez, mientras que las plantas sin semillas se prefieren por su mayor capacidad para producción de metabolitos secundarios.

Por lo tanto, las técnicas de cultivo in vitro de mano de la biotecnología pueden usarse como una alternativa eficiente para el control y la propagación rápida de clones femeninos elites y de alto rendimiento, además la micropropagación ofrece una forma adecuada de garantizar la consistencia en el perfil químico y genético de un cultivo de cannabis de interés industrial.

Cultivo in vitro de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos in vitro es un método eficaz que busca preservar una misma línea germinal de interés para la producción de compuestos específicos mientras que en la naturaleza hay muchas variables que dificultan mantener homogeneidad en la población, la técnica de cultivo in vitro de tejidos garantiza la estabilidad de los componentes químicos útiles, permite el establecimiento, mantenimiento y manipulación de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Thacker, Thomas, Fuller, Smith, & DuBois, 2018).

El proceso implica cultivos asépticos (explantes), un medio nutritivo que contiene

sales minerales, azúcares y hormonas (fitohormonas) para el desarrollo de tejidos a partir de un explante, y la aclimatación de las plántulas en condiciones de laboratorio. El método de cultivo de tejidos rompe la tradición, ya que no se necesita suelo ni luz solar para iniciar la producción. (Thacker et al., 2018)

A pesar de la poca información existente con respecto a la mejora vegetal de cannabis, los recientes estudios en el área (Tabla 1) dirigen sus esfuerzos para la identificación de nuevos compuestos en la estimulación del crecimiento de la plántula (Lata et al., 2016) y en la regeneración de brotes desde explantes para una eficaz proliferación de plántulas elites libres de virus, enfermedades y sin variación genética.

Tabla 1. Protocolos para el cultivo in vitro de cannabis sativa L. (Lata et al., 2016)

Explante	Respuesta	Medio de cultivo	Referencia
Raíz, hipocótilo, hojas de plántula, partes de flores masculinas y femeninas	Cultivos de callos	MS + 0.1–0.01 ppm KIN + 1.0 ppm 2,4-D	Itokawa et al. (1975)
Embrión, hoja, tallo	Cultivos en suspensión de callos y células	MS + 3 mg/l 2,4,5-T	Loh et al. (1983)
Hoja	Cultivos en suspensión celular	B5 + 0.5 mg/l KIN + 1 mg/l 2,4 - D	Braemer et al. (1987)
Anteras	Cultivos en suspensión celular: criopreservación	10% DMSO	Jekkel et al. (1989)
Hoja	Cultivo celular	MS + B5 vitamins + 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l KIN	Flores-Sanchez et al. (2009)
Hoja	Cultivo de callos	MS + 0.5 µM NAA + 1.0 µM TDZ	Lata et al. (2010)
Segmento de tallo y hoja de plántula	Cultivo de callos; Mediada por Agrobacterium transformación	MS + B5 vitamins + 5 µM 2,4 D+1 µM KIN	Feeney and Punja (2003)
Tallo, cotiledón, raíz	Formación de callos	MS + NAA	isse and Andres (1985)
Yemas apicales y axilares	Brotos, raíz	MS + 0.45 mg/l BAP + 20 mg/l IBA	Richez-Dumanois et al. (1986)
Internodos, yemas axilares, pecíolos	Callo, regeneración de brotes.	MS + 2.0 mg/l and 3.0 mg/l dicamba	Slusarkiewicz-Jarzina et al. (2005)
Raíces, hojas, tallo	Regeneración de brotes	Medio DARIA	Plawuszewski et al. (2006)
Segmentos nodales con yemas axilares	Organogénesis directa; Regeneración de brotes y raíces, semilla sintética	MS + 0.5 µM TDZ MS + 2.5 µM IBA	Lata et al. (2009a, b, 2012)
Segmentos nodales con yemas axilares	Organogénesis directa; Regeneración de brotes y raíces	MS + 2 µM m- topolin	Lata et al. (2016)
Epicotilo	Regeneración de brotes y raíces	MS + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l IBA	Movahedi et al. (2015)
Cotiledones	Regeneración de brotes y raíces	MS + 0.4 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA	Chaohua et al (2016)

MS Murashige & Skoog medium; B5 Gamborg medium; BAP 6-Benzylaminopurine; DMSO Di methyl sulphoxide; 2,4-D 2, 4-di chloro phenoxy acetic acid; 2,4,5-T: 2, 4, 5-tri chloro phenoxy acetic acid; IBA Indole 3 butyric acid; KIN Kinetin; NAA Napthalein acetic acid; TDZ Thidiazuron

Las investigaciones de cultivo in vitro de cannabis se han centrado principalmente en optimizar los tejidos recién iniciados, optando por centrarse en combinaciones de reguladores del crecimiento de plantas que dan como resultado una rápida proliferación de brotes. (Monthony et al., 2021)

El objetivo de la propagación de plantas vía cultivo de tejidos, denominada micropropagación, es multiplicar plantas verdaderas de forma clónica, con las ventajas que eso conlleva, los estudios en micropropagación de cannabis indican el uso de medios basal MS en repetidas investigaciones lo que representa una búsqueda dinámica de nuevas alternativas para la optimización de los procesos de propagación in vitro exitosos, varios estudios han realizado comparaciones extensas con otros medios que permitan un mejor desarrollo de los explantes y un mayor rendimiento en cada etapa de la micropropagación.

Page et al., (2020) en su investigación compara el rendimiento del medio de cultivo MS basal con una mezcla de 5 sales basales (WPM, MS, B5, BABI y DKW), en sus resultados reportaron tasas de multiplicación significativamente más altas, mayor crecimiento y adaptación en las etapas de cultivo in vitro y un mayor crecimiento de callos.

Si bien es probable que se puedan realizar mejoras a través de la optimización de los medios, este estudio representa un paso importante hacia el desarrollo de prácticas de micropropagación estandarizadas para el cultivo en campo de cannabis y la búsqueda de nuevas alternativas para la obtención de los metabolitos de interés mediante la mejora vegetal. (Page et al., 2020)

Micropropagación de *C. sativa*

En la micropropagación los explantes (fragmento de la planta) se cultivan en medios de cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio (Figura 1.), esta técnica permite mantener un gran número de plantas de interés en un espacio reducido y lo más

importante es que mediante la micropropagación se mantiene el mismo genotipo en todos los clones de la planta de interés además que se produce plantas libres de patógenos, virus enfermedades e insectos debido a las condiciones estériles en las que se desarrolla el proceso.

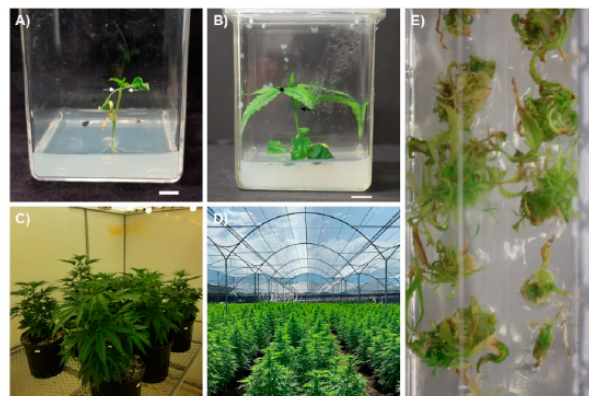


Figura 1. Micropropagación de Cannabis Sativa. (A) Siembra de explante en medio de cultivo. (B) Incubación, crecimiento y desarrollo de la especie. (C, D) Aclimatación en invernadero de plantas cultivadas in vitro (E) Micropropagación de varios explantes en un mismo recipiente con medio de cultivo. (Monthony et al., 2021)

La técnica de micropropagación consta de 5 etapas en donde cada etapa debe desarrollarse con la finalidad de establecer y estandarizar un método que permita el completo desarrollo de la planta. El éxito en la técnica consiste en la elección correcta de la planta madre y del explante, siempre que la planta madre se encuentre en buenas condiciones los explantes responderán bien a las diferentes etapas de la micropropagación.

Etapas:
Etapa 0: Consiste en la selección y desinfección de la planta madre en base a las características genotípicas y fenotípicas de la planta de interés.

Etapa 1: Inicio de cultivos: Establecimiento de explantes en medios de cultivo estériles para la producción de brotes.

Etapa 2: Multiplicación de brotes: Consiste multiplicación exponencial de los brotes.

Etapa 3: Elongación y enraizamiento de los brotes: Se añade los nutrientes necesarios para la producción de raíces y crecimiento de la plántula.

Etapa 4: Aclimatación: Fase de cultivo en campo (invernadero).

Para la producción rápida de plantas, un protocolo in vitro que utilice plantas de la Etapa 2 con una tasa de multiplicación razonable de 10 produciría un millón de plantas después de solo seis subcultivos.

Cuando se ha producido una cantidad suficiente de plantas en la Etapa 2, luego se transfieren a la Etapa 3 para alargar y desarrollar raíces, o alternativamente, se transfieren directamente desde su ambiente In Vitro a una instalación de invernadero para aclimatarse.

La combinación de estas etapas a menudo se prefiere para aplicaciones comerciales, ya que reduce el número de pasos in vitro, lo que ahorra tiempo y costos de mano de obra.

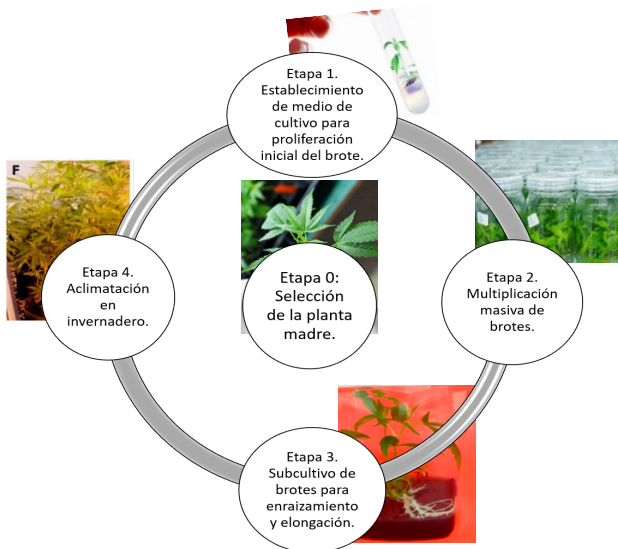


Figura 2. Etapas de micropropagación de Cannabis. Etapa 0. Elección de la planta madre, Etapa 1. Preparación de medio de cultivo para la regeneración inicial de los brotes, Etapa 2. Micropropagación masiva de brotes, Etapa 3. Subcultivo para enraizamiento y elongación, Etapa 4. Aclimatación de las plántulas en invernadero.

Durante la etapa 1 se ha considerado que la planta dispone de reguladores endógenos de crecimiento residuales de la planta madre, esto favorece al crecimiento inicial durante la fase de iniciación seguido del crecimiento esporádico hasta que los cultivos se estabilizan a las condiciones in vitro. Actualmente los medios para micropropagación de cannabis se basan en el uso de MS como medio estándar y se ha reportado como idóneo para la formación de brotes a partir de explantes, sin

embargo, los estudios indican la necesidad apremiante de mantener las plantas In Vitro a largo plazo (Etapa 2) mediante el uso de medios alternativos y la optimización de macro y micronutrientes para el cultivo de plantas in vitro.

(Page et al., 2020) demostró un mejor rendimiento del crecimiento de explantes en la Etapa 2, utilizando varias mezclas de sales basales, lo que demuestra que el cannabis requiere de niveles altos de nutrientes, azufre, calcio y cobre característico del medio DKW, en este medio los explantes presentaron altas tasa de multiplicación en comparación con el medio MS y mayor estabilidad y adaptación a largo plazo en la etapa 2 sin signos de declive. Los métodos de micropropagación inician desde la elección del explante, en el caso del cannabis se han reportado varios protocolos (Tabla 1.) en los que se establece la multiplicación desde meristemas apicales y axilares debido a que son regiones con gran cantidad de células que se encuentran en proliferación y dan lugar al desarrollo de nuevo brotes, sin embargo en las investigaciones ya realizadas se utilizaron tejidos recién iniciados (Etapa 1) y no incluyeron una evaluación del rendimiento en la Etapa 2 esto revela una notable falta de estudios utilizando germoplasmas cultivados in vitro a largo plazo, destacando la necesidad de estudios futuros en esta área (Monthony et al., 2021).

Por otro lado, los informes reportan que Cannabis tiende a producir un solo brote, pero con alto grado de dominancia apical esto significa una baja tasa de multiplicación de la especie. (Wróbel, Dreger, Wielgus, & Słomski, 2020) reporto que la multiplicación nodal representa pérdidas de material vegetal y sugiere el uso de explantes de dos nodos reduciendo la cantidad de explantes que se puede obtener de una planta. Como alternativa realizo el cultivo de brotes únicos y con el tiempo elimino el meristemo apical para permitir el desarrollo de yemas axilares a ramas axilares que luego se utilizan como

explantes de la etapa 2. (Wróbel et al., 2020) aumento la tasa de multiplicación y el índice de supervivencia en la etapa 2 del cultivo in vitro de cannabis, el autor informa que se utilizaron subcultivos bien establecidos en sus experimentos y que se realizaron un mínimo de diez ciclos de cultivo (Monthony et al., 2021), las investigaciones actuales se enfocan en buscar y estandarizar protocolos que busquen mayor eficiencia y desarrollo del cannabis in vitro en todas sus etapas y promete ser una alternativa menos riesgosa hacia la producción industrial debido a las ventajas que la técnica de micropropagación representa, desde la obtención de mayor cantidad de vitro plantas en menor espacio y el control de la propagación en masa.

Callogénesis

Itokawa (1977) realizaron un estudio a partir de cultivos de callos de diferentes explantes en medio MS con concentraciones mínimas de KIN, además estudio la biotransformación de precursores de cannabinoides mediante la suspensión celular de cannabis.

Loh et al. (1983) indujeron varios explantes de embriones, hojas y tallos a callogénesis con diferentes combinaciones de auxinas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético y Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) e informaron que el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético a concentración de 3 mg / l es el mejor medio para el crecimiento de callos utilizando medio MS.

Wielgus et al. (2008) han utilizado variedades de Cannabis (Beniko, Silesia y Bialobrzeskie) para la producción de callos. Lata y col. (2009a, b, 2010, 2012) han trabajado en la variedad MX para los estudios de propagación de C. sativa mediante callogénesis.

El mayor número de investigaciones en cultivo in vitro de cannabis fueron desarrolladas mediante la producción de callos a partir de cotiledones, hipocótilos, epicótilos hojas, peciolo y otros explantes para la obtención de metabolitos secundarios particularmente THC por suspensión celular.

Un análisis a la estabilidad genética.

La variación somaclonal es una de las principales desventajas del cultivo in vitro y representa una gran desventaja para el mantenimiento de una misma línea clonal de especies vegetales, generalmente se conoce que a través de la micropropagación por meristemas y brotes los índices de mutación son mucho menor que a través de una generación por callosidad (callogénesis), en general se ha demostrado que el cannabis cultivado in vitro produce plantas que son similares morfológica y genéticamente similares al material inicial. Sin embargo, se requiere el uso de técnicas modernas de secuenciación que permitan identificar si existe mutación en las plantas micropropagadas, llevadas a invernadero y al exterior, así como de las plantas de cannabis cultivadas desde meristemas, brotes y mediante la formación de callos (células en proliferación) de manera más exhaustiva y eficaz.

Una alternativa para mantener la fidelidad genética de las líneas clonales es la criopreservación este es uno de los pocos métodos para evitar mutaciones en el cultivo de especies vegetales y se ha determinado que a pesar del costo inicial que representa, es una técnica eficaz y viable para la conservación de germoplasma de plantas de cannabis así lo reporto Uchendu et al.(Uchendu, Lata, Chandra, Khan, & ElSohly, 2019) en su investigación donde obtuvo el 63% de rebrotes de germoplasma de cannabis sin inferir en la condición genética de la planta del material parental.

Un enfoque hacia nuevos estudios.

La micropropagación es un proceso complejo que puede verse influenciado por varios factores, las condiciones del explante, condiciones de incubación, composición del medio de cultivo, la experiencia del técnico y otros. El enfoque hacia nuevos estudios y la aplicación de nuevas tecnologías pueden abrir nuevas oportunidades para la mejora de las técnicas de regeneración de Cannabis en

condiciones in vitro. Para ello es importante analizar varios factores que actualmente se pasan por alto en los estudios existentes de micropropagación.

El explante: no existen suficientes estudios que comparen la regeneración in vitro a partir de explantes in vitro y ex vitro, siendo la elección del explante uno de los aspectos principales para el éxito en la técnica de cultivo in vitro además el análisis bioquímico del cannabis no solo enfocado en la determinación de los fitocannabinoides sino también en la producción de fitohormonas endógenas y su relación con la capacidad de regeneración de la planta. Además de la disposición del explante que influye puede afectar el sitio de inicio de la regeneración, (Cui et al., 2020) Informo que los explantes colocados de manera horizontal tienen tasas de regeneración mayor que los que se encuentran verticalmente probablemente porque tienen mayor superficie de contacto con el medio de cultivo. El estudio de las condiciones del explante, la disposición en el medio de cultivo, la edad y la condición representa un enfoque prometedor para la investigación y la optimización de protocolos de micropropagación de cannabis.

Las condiciones ambientales: la etapa de aclimatación del cannabis a condiciones in vitro es una etapa crítica del cultivo in vitro; las condiciones de luz, temperatura, fotoperiodo, densidad de flujo influyen directamente en el desarrollo de la planta y en sus procesos bioquímicos de manera significativa, sin embargo, no existen suficientes estudios en donde se analicen diferentes condiciones de adaptación del cultivo de cannabis para optimización de protocolos. Las variedades de cannabis pueden responder de diferente manera a las condiciones ambientales debido a que las condiciones de temperatura óptimas pueden variar dependiendo del genotipo, es esencial optimizar estas condiciones para mejorar la micropropagación del cannabis. Los medios de cultivo y las fitohormonas, en la tabla 1 se observa el medio estándar comúnmente utilizado MS reporta la

regeneración de brotes de Cannabis sin embargo, no son estables en el tiempo (Etapa 2), además del medio DKW no existen más reportes en donde se analice diferentes concentraciones de vitaminas y otros componentes para la formación de brotes, probablemente debido al tiempo y el costo que representa estandarizar una formulación de medios de cultivo, sin embargo en la actualidad existen alternativas in silico que mediante algoritmos simulan la formulación de medios de cultivo así como la respuesta del Cannabis ante los diferentes tratamientos, los avances de nuevas tecnologías pueden abrir una nueva ventana para el estudio integral de la micropropagación de Cannabis. (Monthony et al., 2021)

Conclusiones

El cultivo de Cannabis y las biotecnologías de las plantas deben mantenerse al día con esta industria que crece día a día debido a sus amplias aplicaciones y lo que esto representa, una serie de oportunidades, además de ser una industria que genera costos bajos y brinda una economía circular, da materiales y materia prima que son mucho más amigables con el medio ambiente y es un dinamizador de la economía.

A medida que las restricciones se flexibilizan en diferentes regiones del mundo, las investigaciones deben encaminarse hacia nuevos estudios de micropropagación para Cannabis en las que se aborden los desafíos actuales para la regeneración de la planta. Se necesitan métodos precisos que puedan ser utilizados para replicar genotipos de cannabis de manera precisa y eficiente por otros investigadores, con la finalidad de atender las necesidades de los productores y consumidores en esta industria potencial del cannabis para aportar en el desarrollo económico y productivo del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & Elsohly, M. A. (2010). Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of cannabis sativa and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Planta Medica*, *76*(7), 743–750. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240628>
- Cui, S., Ren, Y., Hao, Y., Zhang, J., Chen, Z., Zou, J., ... Chen, X. (2020). An efficient protocol for regenerating shoots from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) leaf explants. *Open Life Sciences*, *15*(1), 318–325. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0034>
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2016). In vitro mass propagation of Cannabis sativa L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *3*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.001>
- Monthony, A. S., Page, S. R., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). The past, present and future of cannabis sativa tissue culture. *Plants*, *10*(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants10010185>
- Page, S. R. G., Monthony, A. S., & Jones, A. M. P. (2020). Basal media optimization for the micropropagation and callogenesis of Cannabis sativa L. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939181>
- Thacker, X., Thomas, K., Fuller, M., Smith, S., & DuBois, J. (2018). Determination of Optimal Hormone and Mineral Salts Levels in Tissue Culture Media for Callus Induction and Growth of Industrial Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.). *Agricultural Sciences*, *09*(10), 1250–1268. <https://doi.org/10.4236/as.2018.910088>
- Uchendu, E., Lata, H., Chandra, S., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2019). Cryopreservation of Shoot Tips of Elite Cultivars of Cannabis sativa L. by Droplet Vitrification. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *2*(1), 29–34. <https://doi.org/10.1159/000496869>
- Wróbel, T., Dreger, M., Wielgus, K., & Słomski, R. (2020). Modified Nodal Cuttings and Shoot Tips Protocol for Rapid Regeneration of Cannabis sativa L. *Journal of Natural Fibers*, *00*(00), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15440478.2020.1748160>