MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017 **JOSEF BALTAZER ŠENKYŘÍK**

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin

Možnosti biotechnologií u konopí

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
MVDr. Ing. Václav Trojan, Ph.D.

Vypracoval:
Josef Baltazar Šenkyřík

Brno 2017

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Možnosti biotechnologií u konopí“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše

V Brně dne:……

……..

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Velice rád bych poděkoval svému vedoucímu MVDr. Ing. Václavovi Trojanovi, Ph.D. za možnost dělat mou bakalářskou práci pod Ústavem biologie rostlin. Dále bych chtěl velmi poděkovat svému konzultantovi doc. Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za veškerou pomoc při zpracovávání bakalářské práce, za věcné připomínky, ochotu a vstřícnost při konzultacích a za odborné vedení při vykonávání mých experimentů.

ABSTRAKT

Teoretická část práce Možnosti biotechnologií u konopí se zabývá morfologickou, taxonomickou a genetickou charakterizací rodu *Cannabis* a také přehledem biotechnologických metod využívaných při vědeckém výzkumu konopí. Vlastní experiment byl zaměřen na analýzu genetické variability mezi jednotlivými genotypy konopí. Analyzováno bylo celkem 6 směsných vzorků konopí pomocí 8 mikrosatelitních markerů založených na PCR. Bylo detekováno celkem 23 alel s průměrem 2,88 na lokus, jejichž velikost se pohybovala od 140 do 240 bp. Největší počet alel byl zjištěn u markerů CAN0039 a CAN0093. Pro každý z mikrosatelitů byly vypočítány statistické hodnoty index diverzity (DI), polymorfní informační obsah (PIC) a index pravděpodobnosti (PI) a na základě statistického vyhodnocení byl sestaven dendrogram podobnosti. Výsledky vykazují využitelnost mikrosatelitních markerů pro analýzu genetické variability u konopí.

Klíčová slova: *Cannabis sativa* L., mikrosatelitní markery, genetická variabilita, PCR

ABSTRACT

Theoretical part of the thesis Possibilities of Biotechnology for *Cannabis* deals with morphological, taxonomic and genetic characterization of *Cannabis* genus and presents an overview of biotechnological methods employed in scientific research of *Cannabis*. Aim of the experiment itself was to analyze genetic variability between particular genotypes of *Cannabis*. Six mixed Cannabis samples were analyzed using 8 microsatellite markers based on PCR. Twenty-three alleles with diameter of 2,88 per locus, whose size varied from 140 to 240 bp. The largest number of alleles was found in markers CAN0039 and CAN0093. Values of diversity index (DI), polymorphic information content (PIC) and probability index (PI) were calculated for each of the microsatellites and based on statistical evaluation, a dendrogram of similarity was determined. The results show applicability of microsatellite markers for analysis of genetic variability in *Cannabis*.

Key words: *Cannabis sativa* L., microsatellite markers, genetic variability, PCR

Obsah

1 ÚVOD 9

2 CÍLE PRÁCE 11

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 12

3.1 Konopí 12

3.1.1 Legislativa 12

3.1.2 Taxonomie 13

3.1.3 Biologická a morfologická charakterizace 14

3.1.4 Genetická charakteristika 15

3.2 Biotechnologie 18

3.2.1 Rozdělení biotechnologií 18

3.2.2 Využívané biotechnologické metody u konopí 19

3.2.3 Genetické markery 23

4 MATERIÁL a METODIKA 30

4.1 Experimentální materiál 30

4.2 Metodika 30

4.2.1 Izolace rostlinné DNA 31

4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR 31

4.2.3 Příprava agarózových gelů, kontrolní elektroforéza a vizualizace produktů 33

4.2.4 Příprava polyakrylamidových gelů, elektroforéza a vizualizace produktů 34

4.2.5 Vyhodnocení výsledků 36

5 VÝSLEDKY a DISKUZE 37

5.1 Vyhodnocení analýzy jednotlivých SSR markerů 37

5.2 Genetická diverzita analyzovaných vzorků konopí 40

6 ZÁVĚR 42
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 44
8 SEZNAM OBRÁZKŮ 52
9 SEZNAM TABULEK 52

1 ÚVOD

Konopí (*Cannabis* spp.), jeden z nejdiskutovanějších rostlinných druhů planety, je v současnosti jedním z hlavních témat medicíny, legislativy drog a mnoha dalších oborů. Využití této rostliny zasahuje snad do všech možných odvětví, od medicíny přes textilní průmysl, stavebnictví a papírnictví až po potravu a pohonné hmoty.

Důkazy o užívání konopí pro léčebné a duchovní účely je možné nalézt snad ve veškerých světových kulturách. Podle mnohých důkazů, ať už to jsou vykopávky nebo zmínky ve starých spisech, víme, že konopí je jednou z nejstarších pěstovaných plodin vůbec.

V západní společnosti bylo konopí využíváno po dlouhá staletí především jako technická plodina. Zájem o konopí jako drogu vzrostl v první polovině 20. století. Rekreační konzumace konopí se v Americe objevila okolo roku 1910 a to především v New Orleans a v mexickém pohraničí, kde ho mexičtí dělníci ve formě ubalených cigaret přenášeli přes hranice, přičemž v Jižní Americe a v Karibiku bylo konopí využíváno pro rekreační účely již po desítky let zcela běžně. V souvislosti s alkoholovou prohibicí zájem o tuto drogu jako náhražku za alkohol stále stoupal. Asi nejdůležitějším datem je rok 1930, kdy ministr financí Andrew W. Mellon jmenoval manžela své neteře Harryho J. Anslingera hlavním komisařem nově vytvořeného U.S. Narcotics Bureau. I když se před nástupem do funkce nezajímal o konopí, tak během prvních pár let tuto rostlinu démonizoval. Zákaz užívání pro jiné než léčebné účely byl uzákoněn v Kalifornii 1915, Texasu 1919, Louisianě 1924 a New Yorku 1927.

Těmito „protikonopnými“ kroky se postupně inspirovaly i další státní systémy po celém světě. Postupně došlo k téměř celosvětovému omezení pěstování, zpracovávání a distribuci konopí. K návratu zájmu o konopí jakožto medikamentu a rostlině, která si zaslouží hlubší systematické zkoumání, došlo až v posledních dekádách 20. století. Kromě studia obsahových látek, které jsou důležité právě pro lékařský výzkum, je také důležité zkoumat genetický původ a příbuzenské pozadí jednotlivých odrůd konopí ke komplexnějšímu poznání druhu jako celku. Pomocí novodobých molekulárních metod je dnes možné identifikovat a charakterizovat konopí a tím přispět k snadnějšímu získání genotypů (odrůd), které budou disponovat vhodnějšími vlastnostmi pro dané pole působení.

Jednou z hlavních molekulárních metod, kterými se budu v rámci práce zabývat, je genotypizace pomocí SSR (Simple Sequence Repeats) markerů. Díky genetickému profilování můžeme identifikovat příbuznost jednotlivých genotypů konopí. Má bakalářská práce je zaměřena na studium možností využití biotechnologií a metod spojenými s nimi na genetický výzkum konopí. Praktická část je zaměřena na studium polymorfizmu DNA (deoxyribonukleová kyselina) konopí s pomocí výše zmíněných SSR markerů, jejichž zjišťování je spojené s metodou PCR. Výsledky by mohly být dále využity při identifikaci neznámých genotypů a také například ve šlechtitelském programu konopí.

2 CÍLE PRÁCE

Cíle bakalářské práce byly:

1. vypracování literární rešerše věnované problematice biotechnologií využívaných u konopí;
2. zvládnutí metod molekulární biologie, tzn. izolace genomické DNA konopí, polymerázová řetězová reakce a elektroforetická separace;
3. analýza genetické variability u rostlin konopí (*Cannabis sativa* L.) pomocí mikrosatelitních markerů;
4. vyhodnocení a praktická interpretace výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Konopí

Cannabis sativa L. patří mezi rostlinné druhy, které byly využívány po tisíce let, a to především jako zdroj vlákna pocházejícího ze stonku (rostlina i vlákno jsou označovány anglickým slovem „hemp“; pozn.: s českým překladem „juta“ pro vlákno a překladem „konopí“ pro rostlinu jako takovou) a jako zdroj omamné psychoaktivní pryskyřice (rostlina a drogové přípravky z ní běžně označovány jako „marihuana“). Studie vztahů mezi různými skupinami domestikovaných forem druhů a planě rostoucích rostlin vedly k protichůdným interpretacím evolučních a jiných klasifikací, včetně rozdělení *Cannabis sativa* do několika údajných druhů. Je doporučeno, aby *Cannabis sativa* byl uznán jako jediný druh, v němž je psychoaktivní poddruh jak v domestikovaných, tak v ruderálních varietách, a obdobně je tomu u nepsychoaktivního poddruhu. Navrhuje se alternativní přístup v souladu s mezinárodní nomenklaturou pro kulturní rostliny, a to rozpoznávat šest skupin: dvě skupiny, které se skládají především z nepsychoaktivních přadných a na olejnaté semeno pěstovaných kultivarů a skupina jejich hybridů; a dvě skupiny, které se skládají především z psychoaktivních kmenů a skupina jejich hybridů (Small, 2015).

3.1.1 Legislativa

Od roku 2001 je ve státech Evropské Unie dle nařízení Evropské komise povoleno pěstovat konopí na vlákno a semeno, nicméně pěstované odrůdy nesmí mít obsah nejabundantnějšího kanabinoidu, delta-9-tetrahydrocannabinolu – zkráceně THC, vyšší než 0,2 % (eur-lex.europa.eu).

V České republice řeší problematiku konopí zákon č. 167/1998 (Zákon o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů). Ten označuje konopí jako „kvetoucí nebo plodonosný vrcholík rostliny z rodu konopí (*Cannabis*) nebo nadzemní část rostliny z rodu konopí, jejíž součástí je vrcholík“ a povoluje nakládání s ním bez povolení k zacházení, pokud se jedná o získávání, skladování a zpracovávání rostlin konopí, které mohou obsahovat nejvíce 0,3 % látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů, a to pouze konopí k účelům průmyslovým, technickým a zahradnickým, jakož i k obchodu s konopím za těmito účely.

V roce 2013 byl schválen zákon č. 273/2013, který novelizuje zákon č. 167/1998 a který legalizuje konopí pro lékařské účely.

V roce 2015 byly dokončeny výstavby první oficiální pěstírny léčebného konopí v České republice. Dokud se v roce 2016 nesklidila první úroda, byli čeští pacienti donuceni využívat konopí dovážené z Nizozemí. Veškeré léčebné konopí, které se přes zaregistrované lékárny dostává k pacientům je přísně kontrolováno a se standardizovaným obsahem kanabinoidů. Novelizací a rozšířením také prošly lékařské obory, jejichž specializovaní lékaři mohou léčebné konopí předepisovat.

3.1.2 Taxonomie

Celá problematika taxonomie rodu *Cannabis* je přinejmenším tak složitá, jako problematika konopného práva. Různí autoři rozlišnými způsoby charakterizovali rod a jeho druhy či poddruhy rozdílně.

Zpočátku bylo konopí řazeno do řádu kopřivovité (*Urticaceae*), starší klasifikace ho řadila do čeledi morušovitých (*Mareaceae*). Pozdější výzkumy vedly k vytvoření samostatné čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) (Miovský, 2008).

V čeledi konopovitých (*Cannabaceae*), která náleží do řádu růžotvarých (Rosales), nalezneme oproti jiným čeledím nevelké množství druhů. Pro člověka jsou nejvýznamnějšími rody rod konopí (*Cannabis*) a rod chmel (*Humulus*).

Švédský botanik Carl Linné poprvé odborně popsal *Cannabis sativa* L. v roce 1737 v podhůří Himálaje v Indii. Věřil, že našel jediný druh tohoto rodu. Přesto ve východní Indii v roce 1785 Jean Baptiste de Lamarck, francouzský biolog, popsal a pojmenoval další druh *Cannabis indica* L. V roce 1924 objevil botanik D. E. Janischewsky v jihovýchodním Rusku třetí, poslední známý druh – *Cannabis rudealis* (Miovský, 2008).

Small a Cronquist (1976) určili *Cannabis* jako samostatný druh a rozdělili ho do poddruhů *Cannabis sativa* L. ssp. *indica* a *Cannabis sativa* L. ssp. *sativa*.

Výzkumy alozymů, které provedl Hillig (2005) prokázaly, že rod *Cannabis* byl odvozen ze dvou hlavních genofondů. Z tohoto důvodu by podle Hillinga měl být rod *Cannabis* rozdělen do dvou samostatných druhů, a to *Cannabis sativa* a *Cannabis indica*.

Častým způsobem určování konopí je rozlišování podle morfologie – fenotypu. Proto jsou někdy *Cannabis sativa* a *Cannabis indica* považovány za dva morfotypy.

Zatímco morfotyp *indica* se vyznačuje nižším habitem se širšími čepelemi listů, morfotyp *sativa* má naopak habitus vyšší s listy, které mají čepele prstovité a značně užší (Fischedick *et al*., 2010).

Morfologická rozmanitost jednotlivých kultivarů, kterých bylo doposud identifikováno okolo 700 (Hazekamp a Fischedick, 2012), je způsobena dlouholetým prokřižováním ať už šlechtitelským procesem nebo více či méně řízenou hybridizací malopěstitelů.

Hazekamp a Fischedick (2012) v rámci klasifikace konopí na základě chemického složení popisují nutnost zařazení jak biologicky aktivních kanabinoidů tak biologicky aktivních terpenoidů, které jsou díky svému vysokému obsahu v samičích květenstvích hlavními kandidáty pro jasnější pochopení léčivých vlastností konopných rostlin a základem pro lepší klasifikační systém. Na základě analýzy 28 hlavních složek obsažených ve vzorcích byli schopni identifikovat konopí a zařadit ho do odlišných skupin chemovarů pro chemotaxonomickou klasifikaci odrůd rodu *Cannabis*.

V současnosti je taxonomické zařazení dle ITIS (Integrated Taxonomic Information System) takové, že určuje *Cannabis sativa* L. jako samostatný druh, který se dělí na dva poddruhy *Cannabis sativa* ssp. *indica* a *Cannabis sativa* ssp. *sativa*. Nicméně tohle zařazení je stále diskutováno. V současnosti je vesměs respektován názor, že rod *Cannabis* zahrnuje více vysoce hybridizovaných, introgresních, panmiktických a velmi variabilních druhů (Small a Cronquist, 1976).

3.1.3 Biologická a morfologická charakterizace

Rod *Cannabis* v sobě zahrnuje rostliny jednoleté a původně dvoudomé. Dlouhodobým šlechtěním je dnes na trhu také mnoho jednodomých odrůd. Lodyha rostlin z rodu *Cannabis* je přímá, lysá nebo chlupatá, většinou čtyř nebo šestihranná, která dosahuje výšky od 0,3 do 6 metrů. Listy jsou dlouze řapíkaté s vytrvalými palisty a s čepelí tří až jedenácti-četnou. Lístky jsou úzce podlouhlé, k oběma koncům zúžené, na okrajích pilovité, dlouze zašpičatělé (Valíček, 2003).

Míra počtu samičích a samčích rostlin v přirozené populaci dvoudomého konopí je blízko 1 : 1. Samčí a samičí rostliny vykazují rozlišitelnou morfologickou charakterizaci, která se nazývá pohlavní dimorfismus (Finta-Korpeľová a Berenji, 2007). Tento sexuální dimorfismus je více patrný na rostlinách v pozdějších ontogenetických stádiích. Samičí rostliny mají více kompaktní a robustní charakter,

internodia jsou kratší a jejich počet je zpravidla větší než u rostlin samčích. Samičí rostliny také charakterizuje bujně rozvětvený habitus a květy blíže u sebe tvořící hroznovitá květenství s hojnou produkcí pryskyřice, jejíž množství se liší napříč odrůdami. Uvnitř květů je dvouplodolistý pestík se dvěma bliznami a svrchním jednopouzdrým semeníkem. Květ je částečně obalen podpůrným listenem, který může být svrchu porostlý žláznatými chlupy, vylučujícími pryskyřici. Samčí rostliny jsou oproti tomu méně větvené s méně robustním habitem a disponují delšími internodii. Samčí květy jsou uspořádány do laty a disponují pětičetnými bělavými nebo nazelenalými okvětími a pěti tyčinkami (Valíček, 2003). Prašníky samčích rostlin tvoří mnoho pylových zrn, která se přenáší větrem na vzdálenost 10-12 km. Konopí kvete 15-30 dní a po odkvětu samčí rostliny odumírají. Plodem konopí je vejčitá jednosemenná nažka barvy šedě tmavohnědé až tmavé; s hmotností tisíce semen (HTS) 13-20 g. Semena konopí brzy ztrácí klíčivost (třetím rokem o 30-40 %). Celkové olistění samčích rostlin je řidší, než je tomu u samičích rostlin (Ruman a Hamšík, 2008).

3.1.4 Genetická charakteristika

Genom *Cannabis sativa* se skládá ze dvou sad chromozomů, tudíž se jedná o klasický diploidní organismus (2n = 20). Základní chromozomové číslo x = 10, z těchto deseti chromozomů (v haploidním stavu) je devět autozomů a jeden gonozom, čili pohlavní chromozom. Chromozomální determinace pohlaví je savčího typu neboli typu *Drosophila*, přičemž samčí rostliny disponují heterogametickými pohlavními chromozomy XY a rostliny samičí mají ve svém karyotypu homogametické gonozomy XX. Determinace pohlaví je řízena poměrem počtu gonozomů X k počtu sad autozomů (Ming *et al*., 2011).

V roce 2011 byl poprvé zdárně osekvenován genom *Cannabis sativa*. Přesněji byla osekvenována genomická DNA a RNA (ribonukleová kyselina) z kmene Purple Kush. Po porovnání transkriptomu kmene Purple Kush s transkriptomem kultivaru konopí Finola (technický kultivar, v České republice schválený pro pěstování) zjistili, že mnoho genů, které kódují proteiny zapojené do syntetických drah kanabinoidů a jejich prekurzorů, jsou mnohem více exprimovány v kmenu Purple Kush než v kultivaru Finola (van Bakel *et al*., 2011).

Před tím byly genomické údaje v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information) omezeny pouze na informace o velikosti transkriptomu,

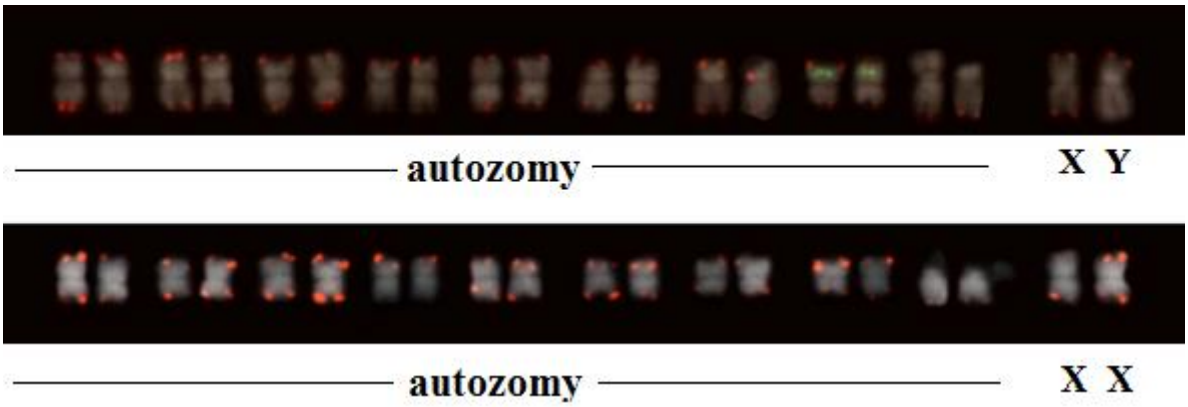
jako například 12 907 EST (Expressed Sequence Tags) a 23 neposkládaných sekvencí RNA. Přesto, že genom konopí byl přibližně dvacátým rostlinným genomem, který byl osekvenován, jedná se o první osekvenovaný genom léčivé rostliny.

Velikost haploidního genomu je dnes odhadována na 818 Mb u samičí rostliny a 843 Mb u rostliny samčí. Tento rozdíl (25 Mb) mezi velikostmi genomů u jednotlivých pohlaví je dán větší velikostí chromozomu Y v porovnání s chromozomem X. na chromozomu Y se v průběhu evoluce na dlouhém raménku nakumulovaly stovky kopií retrotranspozonů bez dlouhých koncových repetic (Non-LTR retrotransposons) a proto je gonozom Y větší než X (Ming *et al*., 2011).

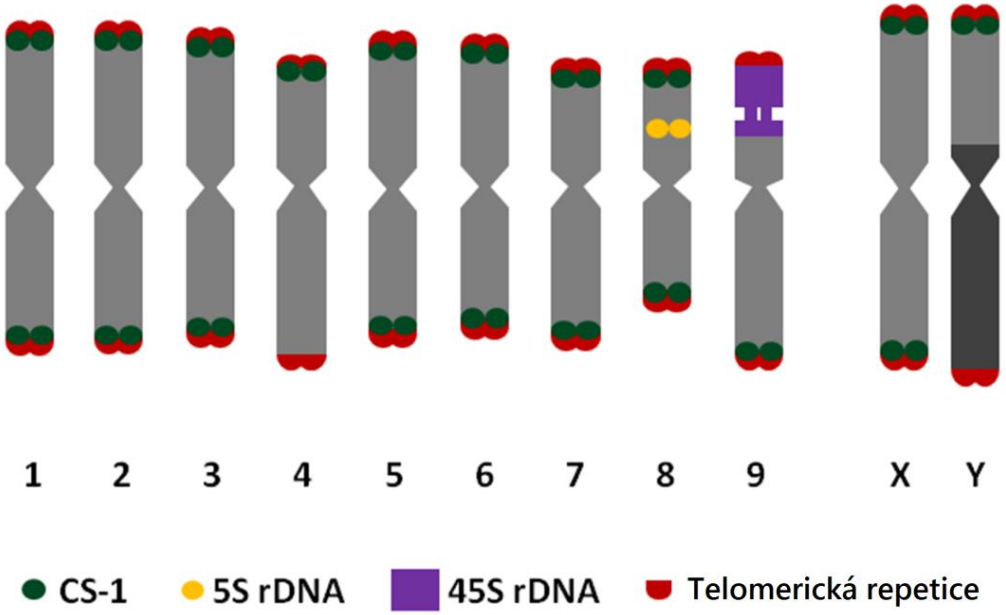
Zatím není známa ani fyzikální ani genetická mapa genomu. Hlubší porozumění transkriptomu a genomu je nezbytné k hlubšímu porozumění funkce, propojení a evoluci jednotlivých genů. Sekvenování genomu *Cannabis sativa* je mnohdy omezováno přísnými opatřeními a podmínkami pro pěstování této rostliny a manipulaci s ní (van Bakel *et al*., 2011).

V roce 1998 byly pomocí Giemsova barvení popsány samičí i samčí kondenzované prometafázní chromozomy. Subtelocentrický chromozom Y disponuje typickým satelitem na konci kratšího ramene a submetacentrický chromozom X také disponuje satelitní sekvencí na konci krátkého ramene (Sakamoto *et al*., 1998).

V roce 2014 byla publikována molekulárně cytogenetická studie, díky které byly charakterizovány všechny konopné chromozomy a určena jejich velikost, která se pohybuje v rozpětí od 2,6 do 3,8 μm. Všechny chromozomy bylo možné rozlišit podle jejich délky a umístění centromery pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) pruhování společně s metodou FISH (fluorescence *in situ* hybridization), kde byly hybridizovány sondy pro 5S a 45S rDNA oblasti společně se sondami pro telomerické repetice a subtelomerické repetice (CS-1). Podle snímku po barvení DAPI a po provedení metody FISH za použití fluorescenčního mikroskopu (obrázek 1) byl sestaven idiogram haploidní sady chromozomů rostliny s vyznačenými subtelometrickými repeticemi CS-1, telomerickými repeticemi typu *Arabidopsis* a sekvencemi pro 45S rDNA a 5S rDNA (obrázek 2) (Divashuk *et al.*, 2014).

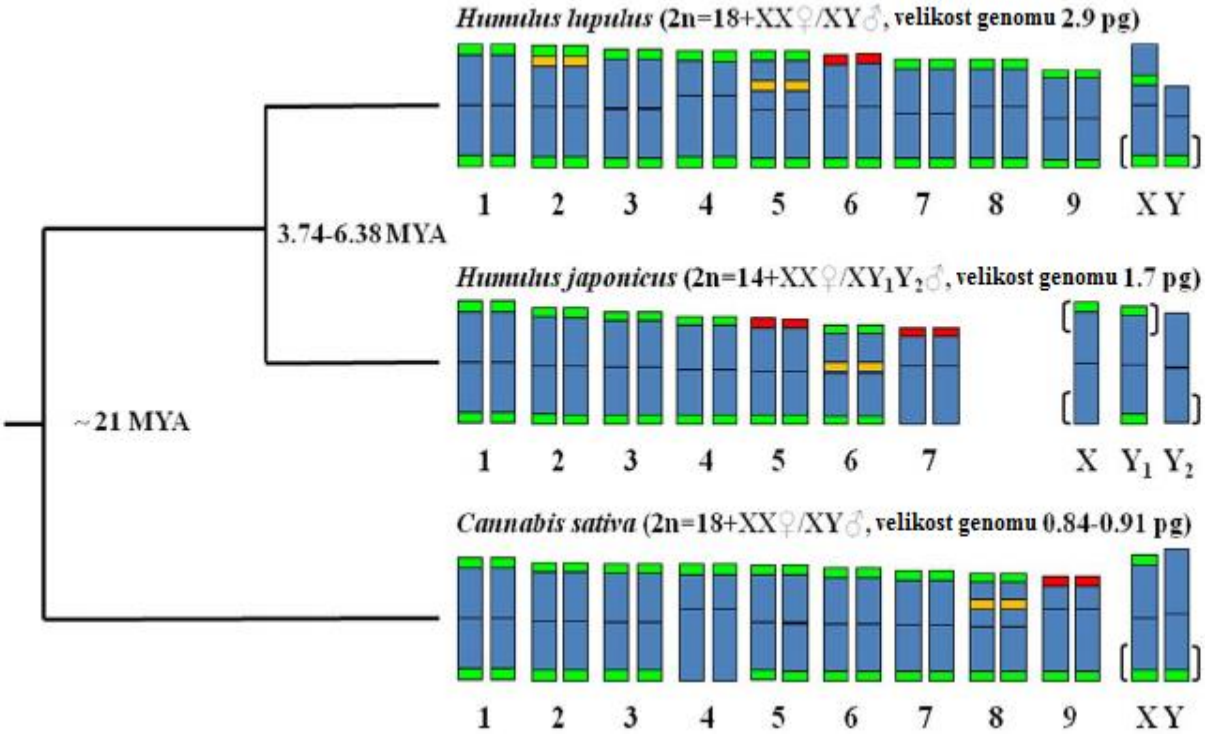


Obrázek 1: Karyotyp *Cannabis sativa* samčí a samičí rostliny – subtelometrické repetice CS-1 jsou zbarveny červeně (upraveno podle Divashuk *et al.*, 2014)



Obrázek 2: Idiogram haploidní sady chromozomů rostliny *Cannabis sativa*. Na chromozomech jsou vyznačeny subtelomerické repetice CS-1, telomerické repetice typu *Arabidopsis*, sekvence pro 45S rDNA a 5S rDNA (upraveno podle Divashuk *et al.*, 2014)

Výzkum neposkytl pouze cytogenetické výsledky, ale byla provedena také srovnávací fylogenetická studie (obrázek 3) třech nejvýznamnějších zástupců čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) a to porovnání chmele otáčivého (*Humulus lupulus*), chmele japonského (*Humulus japonicus*) a konopí setého (*Cannabis sativa*) (Divashuk *et al.*, 2014).



Obrázek 3: Zjednodušený fylogenetický strom čeledi tří rostlin *Cannabaceae* se zařazenými ideogramy, kde je postavení pseudoautozomálního regionu na pohlavních chromozomech označeno závorkami (upraveno Divashuk *et al*., 2014)

3.2 Biotechnologie

Termín „biotechnologie“ poprvé použil uherský zemědělský inženýr Karl Erekys s definicí: „všechny pracovní postupy, kdy se za účelem potravy či jiného užitku využívaly živé organismy“. V dnešní době je termín spíše posunut do roviny s významem komplexu biologických, biochemických, bioinformatických a molekulárně genetických metod, které jsou nějakým způsobem spojeny s modifikací živých organismů.

3.2.1 Rozdělení biotechnologií

I když existuje několik různých klasifikací biotechnologií, tak nejvíce oblíbená je ta, která využívá barevný kód pro jednotlivá odvětví. Nejčastěji jsou biotechnologie rozděleny na čtyři hlavní barvy (červená, zelená, bílá a fialová), nicméně klasifikace využívá mnohem více barev. Zde jsou stručně popsány některé základní, barevně rozdělené biotechnologie (Kafarski, 2012).

- Červená biotechnologie – zastřešuje aplikace biotechnologií v lékařství, farmacii a klinickém prostředí. Příkladem jsou například geneticky modifikované bakterie produkující požadované látky kupříkladu inzulín nebo rekombinantní adenoviry požívané v genové terapii.
- Žlutá biotechnologie – zabývá se využitím biotechnologií v potravinářském průmyslu. Kromě využívání biotechnologií při výrobě potravin se také zaobírá nutričními vědami, jako je např. nutriční farmakologie.
- Modrá biotechnologie – zaměřuje se na výzkum spojený s živými organismy hydrosféry Země.
- Zelená biotechnologie – zabývá se kompletní aplikací biotechnologií v zemědělství. Tato kategorie zahrnuje například bakteriální kmeny využívané na kompostování, transgenní rostliny a rostlinné explantátové kultury.
- Hnědá biotechnologie – je podmnožinou biotechnologií, která má za úkol popis a zkoumání biotechnologií, které jsou spřaženy s vyprahlými oblastmi a pouštěmi.
- Tmavá biotechnologie – popisuje biotechnologie spojené s bioterorismem, biologickými válkami a bio-zločinem.
- Fialová biotechnologie – zde se řadí biotechnologické patenty, publikace a vynálezy.
- Bílá biotechnologie – je aplikována při průmyslové výrobě chemických látek nejčastěji pomocí geneticky modifikovaných baterií s výhodou nižších nákladů a vyšší ekologickou šetrností.
- Zlatá biotechnologie – je pojena s bioinformatikou, počítačovými vědami a čipovými technologiemi.
- Šedá biotechnologie – věnuje se problémům environmentalistiky a ochrany přírody.

3.2.2 Využívané biotechnologické metody u konopí

Následný text se bude zabývat biotechnologickými metodami, které se hojně využívají u konopí. Nejdříve budou charakterizovány základní informace o jednotlivých metodách, poté bude text zaměřen na konkrétní případy využití biotechnologických analýz u *Cannabis sativa*.

3.2.2.1 In vitro kultivace

Rostlinné tkáňové kultury je soubor technik používaných k udržení nebo růstu rostlinných buněk, tkání nebo orgánů ve sterilních podmínkách v živném kultivačním médiu o známém složení. Různé techniky nabízejí určité výhody oproti tradičním pěstebním metodám, jako např. produkce klonů, rychlé získání dospělých rostlin bez nutnosti použití semen a opylovačů, regenerace celých rostlin z geneticky modifikovaných buněk, ozdravování virózních rostlinných materiálů nebo klíčení semen, která by měla jen velmi nízkou pravděpodobnost vyklíčení a zdravého růstu klíčních rostlin. Zároveň pokud jsme schopni z rostliny vytvořit tkáňovou kulturu, odpadá nám nutnost pracovat s celým jedincem. Tím expandují možnosti experimentů, snižují se nároky na místo a mnohdy je usnadněna manipulace. Mikropropagace je metoda využívaná k produkci geneticky identických klonů rostlin využívající techniky explantátových kultur (Kubota, 2002).

3.2.2.1.1 In vitro kultivace konopí

Od 70. let 20. století začaly pokusy s pěstováním konopí v *in vitro* podmínkách. Byla především snaha o odvození buněčné kultury pro produkci sekundárních metabolitů (Turner *et al*., 1980). Kalusové a suspenzní kultury konopí zprvu vykazovaly diferenciaci pouze kořenových struktur a vůči faktorům, které klasicky indukují regeneraci prýtů, vykazovaly prakticky absolutní necitlivost. Ranalli *et al.* (1999) poprvé dosáhli částečného úspěchu při snaze regenerovat prýty z kalusu. Z okrajových částí primárních explantátů byl odvozen kalus, ze kterého byla pomocí vhodných faktorů navozena diferenciace prýtových primordií. Z nich vzniklé prýty byly namnoženy a následně odděleny a přepasážovány na nové médium se změněným složením pro indukci diferenciace kořenových částí. Pro vytvoření primárních explantátů byly použity hypokotyly, dělohy, kořeny, listy i embrya. Celé rostliny se podařilo zregenerovat pouze u hypokotylů a děloh, navíc jen s malou četností přeživších rostlin.

Dlouhodobé buněčné suspenzní kultury vykazují vysoký stupeň somaklonální variability a díky tomu je možné z nich postupným testováním odvodit genotyp, který bude například vykazovat větší produkci požadovaného sekundárního metabolitu. Suspenzní kultury je možné využívat jak na transformace tak jako bioreaktory. Bioreaktory chápeme jako *in vitro* buněčné kultury, které konstitutivně produkují

sekundární metabolity ve vysokých koncentracích (Ranalli *et al*., 1999). Nicméně pravé bioreaktory vytvořené z buněk *Cannabis sativa* doposud nebyly popsány. Popsány byly pouze bioreaktory s pravidelným zaplavováním (temporary immersion bioreactor; TIB), které byly testovány v rámci snahy optimalizovat podmínky pro multiplikaci *Cannabis sativa* ve sterilním kontrolovaném prostředí pro biochemickou charakterizaci a výrobu léčivých přípravků ve vysoké kvalitě. Tento postup využívající TIB měl za následek zvýšení množství biomasy společně se zvýšením míry multiplikace a také zvýšení transplantátové efektivity (Lata *et al*., 2010).

Regenerace *Cannabis sativa* prostřednictvím přímé nebo nepřímé somatické embryogeneze nebyla doposud zaznamenána (Farag, 2014). Proto se nabízí cesta druhá, kterou je organogeneze. Při této metodě dochází po introdukci separované a sterilizované rostlinné části do živného média k diferenciaci buněk a tvorbě orgánů – kořenů nebo prýtů. Obě dvě cesty mohou být buď přímé, nebo nepřímé. Pokud procesy probíhají přímo na primárním explantátu, mluvíme o organogenezi či somatické embryogenezi přímé, předbíhá-li však těmto procesům nejdříve tvorba kalusu na primárním explantátu a pak teprve organogeneze nebo tvorba embryí jedná se o procesy nepřímé.

Účinky různých kombinací a různých koncentrací rostlinných růstových regulátorů (kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová; 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina; kinetin; 1-naftalenoctová kyselina) na indukci růstu kalusu a regeneraci rostlin z něj byly zkoumány u různých zdrojů primárních explantátů (mladé listy, řapíky, internodia, axilární pupeny). Nejvyšší frekvence indukce kalusu byla vypozorována na variantě řapíkových primárních explantátů. Regenerace rostlin z kalusů byla dosažena u všech studovaných kultivarů a nejvyšší počet zregenerovaných rostlin byl u kalusových kultur získaných z řapíkových primárních explantátů na MS médiu s obsahem DICAMBA (3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina) (Slusarkiewicz-Jarzina *et al.*, 2005).

Později bylo dosaženo optimalizace protokolu na jednoduchou a účinnou metodu pro *in vitro* propagaci pomocí metody syntetických semen. Umělá semena byla vytvořena z axilárních pupenů *Cannabis sativa*, které byly izolovány z aseptických kultur a enkapsulovány do alginátu vápenatého (Lata *et al*., 2009).

3.2.2.2 Genetická transformace

Genetická modifikace rostlin se dá provést jak metodami nepřímými, kde se využívá schopnosti bakterií z rodu *Agrobacterium* vnášet genetickou informaci do hostitelského organismu, tak také metodami přímými, kterými je například biolistika, elektroporace nebo transformace s využitím polyethylenglykolu.

Rod *Agrobacterium* zahrnuje gramnegativní půdní bakterie, které jsou patogeny dvouděložných rostlin. Tyto bakterie mají charakteristickou vlastnost vnášení specifického segmentu své genetické informace (Ti-plazmid) do buněk hostitelského organismu, čímž vytvářejí krčkové nádory (anglicky crown-gall). Ti-plazmid (tumor inducing) má schopnost začlenit do genomu hostitelské buňky oblast T-DNA. Oblast T-DNA je ohraničena pravou a levou hraniční specifickou sekvencí, přičemž délka jedné sekvence je 25 bp. Tyto hraniční sekvence jsou nezbytné pro začlenění T-DNA do rostlinné jaderné DNA (Gelvin, 2003).

Typickým druhem rodu *Agrobacterium* je bakterie *Agrobacterium tumefacines*, která je hojně využívaná v genovém inženýrství již od 80. let 20. století. Jednotlivé kmeny tohoto druhu se rozdělují na základě typu opionů, které syntetizují. Jsou rozlišovány dva základní typy: oktopiony a nopaliny. Kmeny, které syntetizují nopaliny, jsou většinou využívány pro genetickou transformaci. Jedním z příkladů kmene nopalinového typu je *Agrobacterium tumefaciens* C58. Osekvenovaný genom tohoto kmene je charakteristický tím, že je tvořen dvěma chromozomy, přičemž jeden je kružnicový a druhý lineární, a dvěma plazmidy, které jsou označovány jako pTiC58 a pAtC58 (Goodner *et al*., 2001).

Genetická transformace konopí je poměrně hojně diskutována. Mnozí lidé se domnívali nebo domnívají, že za obrovským nárůstem obsahu kanabinoidů (především Δ(9)-THC) v marihuaně na černém trhu stojí právě genetické modifikace. Je těžko představitelné, že by někdo byl schopen provést transgenozi konopí bez specializované laboratoře, a kromě toho domněnky o geneticky modifikované marihuaně nebyly nikdy potvrzeny.

K analýze rostlinných vzorků konopí, u kterých bylo podezření, že by mohly obsahovat nějaký transgen, který by zvýšil jejich potenci, byly použity tradiční metody pro detekci geneticky modifikovaných organismů (GMO). Analýzy podpořily hypotézu, že vzorky marihuany předložené forenzním laboratořím s charakterizovanou abnormální úrovní Δ(9)-THC, jsou spíše produktem šlechtitelské selekce než produktem transgenních modifikací (Cascini, 2011).

V laboratorních podmínkách byly u konopí úspěšně transformovány suspenzní kultury, které byly odvozené ze stonkových a listových primárních explantátů. Nicméně i přes vyzkoušení mnoha různých podmínek a použití různých růstových regulátorů nebylo dosažené žádné regenerace v rostlinu (Feeney a Punja, 2003).

V roce 2007 byl vyvinut nový expresní systém pro THCA (kyselina Δ(9)-tetrahydrokanabinolová) syntázu s využitím methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris* jako hostitele (Taura *et al.*, 2007).

Také byla provedena transformace konopí pomocí bakterie *Agrobacterium rhizogenes*, která indukuje růst kořenových struktur z transformovaných buněk hostitelského rostlinného organismu (Berahmand *et al.*, 2016).

3.2.3 Genetické markery

Molekulární markery jsou užitečným nástrojem pro testování genetické variability, a výrazně zlepšují genetickou analýzu plodin (Varshney *et al.*, 2005). Dále molekulární markery poskytují informace nejen o genetické diverzitě, ale také o populační struktuře v rozsahu od nukleotidové úrovně (SNPs) do úrovně genů a frekvence jejich alel. Molekulární markery jsou obecně rozděleny do dvou hlavních skupin: biochemické markery a markery nukleových kyselin (zejména DNA) (obrázek 4). Biochemické markery zahrnují izoenzymy a do jisté míry také sekundární metabolity. Obě tyto kategorie biochemických markerů jsou založeny na expresi genů, které jsou závislé na prostředí a také na ontogenetickém stádiu. Navíc jsou tyto markery pod vlivem epistatických a pleiotropních interakcí. Tyto interakce působí jako hlavní „zastrašující prostředky“ k jejich využívání ve velkém měřítku pro analýzy genofondu. Na druhé straně, DNA markery jsou neutrální a jsou nezávislé na životním prostředí nebo na ontogenetickém stádiu (časově a prostorově nezávislé). Proto mají markery na bázi DNA obrovskou výhodu oproti biochemickým markerům pro analýzy genetické diverzity (Sarwat *et al.*, 2012).

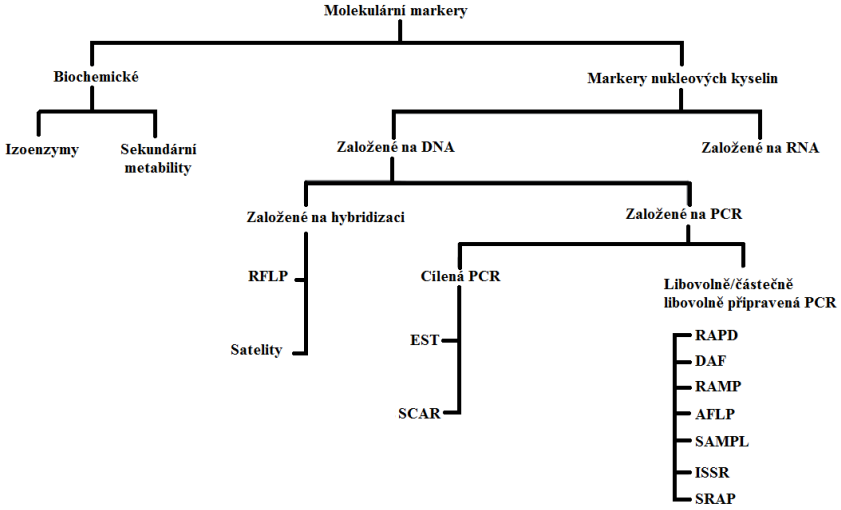


Figure 1. Classification of markers.

Obrázek 4: Klasifikace markerů (upraveno Sarwat *et al*., 2012)

3.2.3.1 Markery založené na DNA

Asi nejvhodnějšími markery pro analýzu variability genetické informace u buněk, pletiv, tkání, jedinců nebo dokonce druhů jsou markery založené na DNA. Genetický marker založený na DNA je chápán jako pozičně známá sekvence nukleotidů DNA, která může být jednoduše identifikována a která v sobě nese variace napříč jedinci či druhy. Podstata těchto markerů je polymorfismus v sekvenci nukleotidů DNA. Tzv. DNA markery jsou hojně využívány např. pro testování otcovství, populační a evoluční studie nebo také při zjišťování genetické čistoty osiva.

Podle Sarwat *et al*. (2012) mohou být markery založené na DNA rozděleny podle typu testu do dvou hlavních skupin. Tento test může být na bázi hybridizace nebo amplifikace. V prvním případě se profily DNA vizualizují hybridizací DNA, která byla nejprve štěpena restrikčním enzymem, se značenou sondou, která je DNA nebo RNA fragment známého původu nebo sekvence. Markery založené na PCR amplifikaci zahrnují *in vitro* amplifikaci určitých sekvencí DNA nebo lokusů, s pomocí specifických nebo libovolně zvolených oligonukleotidových sekvencí (primery) a termostabilní DNA polymerázy. Amplifikované fragmenty se oddělí elektroforeticky a tzv. zóny (anglicky bands) jsou detekovány různými způsoby, jako je barvení nebo autoradiografie. (Sarwat *et al*., 2012).

Metody pro individualizaci *Cannabis* zahrnují techniky: Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) a Short

Sequence Repeat (SSR) (Coyle *et al.*, 2003). Dále se využívá hybridizační metoda Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

3.2.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Jednou z metod pro zjišťování variability DNA sekvencí je tzv. délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP). RFLP markery vznikají na základě štěpení DNA restrikčními endonukleázami (Becker *et al*., 2009 cit Machlin *et al.* 2012).

RFLP markery byly dle Botstein *et al.* (1980) poprvé použity při konstrukci genetických map. Díky své kodominantní povaze jsou RFLP markery populárním nástrojem pro vytváření genetických map. RFLP markery byly široce využívány pro konstrukce genetických map u rostlin *Brassica juncea* (Pradhan *et al*., 2003) a *Olea europea* (de la Rosa *et al*., 2003).

Použití sondy na bázi hybridizace pro detekci diverzity nebo pro genetické mapování je limitováno několika nevýhodami, které jsou spojené, včetně požadavku velkého množství vysoce čisté DNA, s použitím radioaktivity pro detekci, tudíž je potřeba vysoce kvalifikované pracovní síly, a přesto je dosaženo nízké míry detekce polymorfismu. Tyto negativní vlastnosti dělají markery založené na hybridizaci méně efektivní než markery založené na PCR amplifikaci (Sarwat *et al*., 2012).

3.2.3.1.2 RAPD (Radomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD, v překladu do češtiny „Náhodně Amplifikovaná Polymorfní DNA“, je technika, která byla jednou z prvních modifikací PCR pro snímání a analýzu genomu (Williams *et al.*, 1990). DNA markery jsou generovány v jedné standardní PCR reakci, kde jsou PCR primery náhodnými sekvencemi (standardně oligomery 10-15 bází). Primer se naváže všude tam, kde má sekvenční homologii s DNA templátu a tím se vytvoří pomocí termostabilní DNA polymerázy PCR produkt. PCR produkty mají různou velikost a díky tomu jsou od sebe odděleny na 1% agarózovém gelu a barveny ethidiumbromidem pro detekci zón vzorku. (Coyle *et al.*, 2003)

3.2.3.1.3 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP (polymorfismus délek restrikčních fragmentů) je metoda založená na detekci DNA restrikčních fragmentů, čímž se podobá metodě RFLP. Hlavní rozdíl

je v tom, že se na detekci restrikčních fragmentů místo Southernova přenosu používá PCR amplifikace. Amplifikace restrikčních fragmentů probíhá pomocí ligace dvouřetězcových adaptorových sekvencí na konec restrikčního místa po štěpení dvěma různými restrikčními endonukleázami. Po ligaci adaptorových sekvencích tyto koncové oblasti slouží jako universální vazebná místa pro komplementární nasedání primerů při PCR. Technika se využívá na zjištění přítomnosti či nepřítomnosti restrikčních fragmentů a nikoliv na zjišťování rozdílů v délkách, proto je akronym AFLP, který byl nejspíše vybrán právě kvůli podobnosti s metodou RFLP, nepřesný. Metoda AFLP nevyžaduje charakterizaci sekvencí v cílovém genomu. Z tohoto důvodu je často používána rostlinnými genetiky. Není využívána na mapování živočišných genomů, neboť závisí na přítomnosti vysokého počtu substitučních variací v DNA. Fragmenty jsou vizualizovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (PAGE) nebo kapilární elektroforézou buď prostřednictvím autoradiografických, nebo fluorescenčních metod (Vos *et al.*, 1995). Pomocí separace PCR produktů jsou generovány tzv. otisky prstů, a to jakékoliv DNA bez ohledu na původ nebo komplexitu. Počet amplifikovaných fragmentů je dán frekvencí enzymatického štěpení a počtem selektivních bází, které se nacházejí na koncích restrikčně štěpených fragmentů.

3.2.3.1.4 SSR (Simple Sequence Repeats)

SSR markery, neboli mikrosatelitní opakování, která se skládají z tandemových repetic krátkých nukleotidových sekvencí, patří do skupiny repetitivních sekvencí DNA, které představují významnou část genomů vyšších eukaryot. Počet opakování tandemových repetic se může napříč populací lišit a tím je tvořeno mnoho variant (alel). SSR markery se skládají ze dvou až šesti nukleotidů, ale obvyklým počtem jsou dva až tři nukleotidy. Mikrosatelity se obvykle nacházejí v nekódujících oblastech autozomální nebo gonozomální DNA (Köhnemann *et al.*, 2012). Mohou sloužit jako vysoce informativní genetické markery, a ve spojení s použitím PCR umožňují detekci délkové variace (Powell, 1996). Využívání SSR markerů je levné a je přínosné pro testování funkční rozmanitosti přírodních populací díky vysoké úrovni přenositelnosti na příbuzné druhy. Díky tomu jsou často využívány jako elementární markery pro srovnávací mapování a evoluční studie. Jednotlivé markery byly vyvinuty a mapovány pro několik druhů plodin a můžou být užitečné pro tzv. „marker assisted

selection“ (MAS), obzvláště když jsou markery umístěny v genech zodpovědných za fenotypový znak (Varshney *et al.*, 2005).

3.2.3.1.5 Využití markerů založených na DNA u konopí

Markery založené na DNA polymorfizmu jsou u konopí mnohdy využívány pro studium variability a diverzity populací nebo jednotlivých odrůd, ke studiu nejen pohlavních chromozomů a také pro zařazení vzorků konopí do skupin podle genetického geografického původu. Rovněž jsou využívány pro mapování konopného genomu.

RAPD metoda byla využita na klasifikaci a rozlišení 51 genotypů rostliny *Cannabis sativa* a 2 genotypů rostliny *Humulus lupulus*. DNA se povedlo nejlépe izolovat z čerstvých pletiv s použitím pufrů a detergentu. Při izolaci ze suchých pletiv a semen byla izolována pouze degradovaná DNA. Po separaci bylo získáno celkem 102 různých zón užitím čtyř primerů dlouhých 10 nukleotidů s libovolně zvolenou sekvencí. Vzory zón byly porovnány analýzou distančních metod pomocí různých algoritmů. Analýzy prokázaly jasný rozdíl mezi *Cannabis sativa* a *Humulus lupulus*, a rozdělily vzorky do tří odlišných skupin; jedna skupina zahrnovala všechny vzorky pocházející z oblasti Papua – Nová Guinea, další skupina zahrnovala vzorky pocházející z australské Canberry a třetí skupina zahrnovala tři vzorky technického konopí (Jagadish *et al.* 1996).

Cílem týmu Forapani *et al.* (2001) bylo studovat genetickou strukturu a stupeň variability u odrůd konopí (*Cannabis sativa* L.). Šest odrůd konopí bylo analyzováno pomocí RAPD, přičemž bylo analyzováno 10 rostlin na odrůdu. Testované odrůdy se skládaly jak z dvoudomých, tak jednodomých krajových odrůd. Dále byly přítomny jak kmeny typu droga, tak inbrední ženské linie. Genetická komplexnost každé odrůdy byla zkoumána stanovením počtu zón, které byly viditelné na elektroforetogramu, podle užitých primerů, počtu stálých a polymorfní lokusů, podle průměrné frekvence alely a heterozygotnosti. Mezi těmito parametry, genetickým původem a šlechtitelskou strategií každé odrůdy byla zjištěna dobrá korelace (Forapani *et al.*, 2001).

Ve výzkumu v roce 2002 bylo testováno 10 RAPD primerů u dvoudomých a jednodomých kultivarů konopí k identifikaci molekulárních pohlavně specifických markerů. Použití dvou primerů (OPD05 a UBC354) vytvořilo na elektroforetogramu u samčích rostlin specifické zóny. Tyto dva DNA fragmenty byly izolovány, klonovány

a sekvenovány. Oba markery byly prokázány jedinečnými, protože v databázích nebyla nalezena žádná sekvence s významnou homologií k OPD05961 a UBC354151 markerům. Tyto značky byly pojmenovány MADC3 (OPD05961) a MADC4 (UBC354151) (Male-Associated DNA from *Cannabis sativa*). Značky byly převedeny do SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region) markerů. SCAR markery korelují s pohlavím segregující F_2 populace a prokazují těsnou vazbu na mužský fenotyp. Výsledky analýzy F_2 populace rostlin naznačují, že tyto markery jsou spojeny s chromozomem Y (Törjék *et al*., 2002).

U konopí byly také analyzovány DNA sekvence asociované se samčím pohlavím. DNA byla izolována ze samčích a samičích rostlin a podrobena RAPD analýze. Ze 120 použitých primerů 17 poskytlo 400 bp až 1500 bp dlouhé fragmenty detekovatelné pouze u samčích genotypů. Tyto fragmenty byly klonovány a použity jako sondy pro Southernův gelový přenos. (Sakamoto *et al*., 2005)

Analýzou polymorfizmu na pohlavních chromozomech konopí pomocí AFLP markerů bylo zjištěno pět markerů, které se nachází na obou chromozomech a rekombinační analýzou byla na pohlavních chromozomech zjištěna přítomnost pseudoautozomální oblasti (PAR) umožňující rekombinaci mezi chromozomy X a Y. Ostatní oblasti pohlavních chromozomů vykazovaly pouze malou míru rekombinace. Tyto výsledky byly diskutovány ve srovnání s jinými dvoudomými rostlinami (Peil *et al*., 2003).

Pohlavní chromozomy mohou být také charakterizovány pomocí mikrosatelitních SSR markerů. Z celkově pěti testovaných mikrosatelitů byl jeden SSR marker polymorfní v obou populacích, další dva markery byly polymorfní pouze v jedné ze dvou populací. Dále byly zjištěny tři alelové varianty pro dva SSR markery prokazující polymorfismus nejen mezi chromozomy X a Y, ale taky mezi rozdílnými X chromozomy. Kromě toho bylo v jedné populaci detekováno několik na pohlaví vázaných RAPD markerů (Rode *et al.* 2005).

V roce 2003 bylo identifikováno 15 mikrosatelitních variabilních markerů u 48 vzorků konopí, které pocházely z pěti přadných odrůd. V průměru bylo identifikováno 10 alel na lokus (rozsah 2-28) s průměrnou hodnotou heterozygozity 0,68 (rozmezí 0,28-0,94). Tím byla prokázána významná genetická variabilita těchto SSR markerů a potažmo také jejich užitečnost pro charakterizaci genetické diverzity u kulturních i planých populací konopí (Gilmore a Peakall, 2003).

Další mikrosatelitní markery pro genotypizaci a měření genetické příbuznosti u různých rostlin konopí byly popsány ve studii Alghanim a Almirall (2003). Bylo použito celkem 12 různých oligonukleotidových sond, ze kterých bylo 11 uznáno za vhodné pro analýzy. Charakterizace mikrosatelitních lokusů u *Cannabis* prokázala, že nejabundantnější třída izolovaných mikrosatelitů se skládala z dinukleotidů GA/CT reprezentujících 50 % celku. Bylo zjištěno celkem 52 alel s průměrným zastoupením 4,7 alely na lokus a očekávaná heterozygotnost jedenácti lokusů byla v rozmezí 0,368-0,710.

Podle Gao *et al.* (2014) je pro konopí stále nedostatek adekvátních SSR markerů, který omezil rozvoj konopného genetického výzkumu. Proto provedli velkokapacitní rozvoj EST-SSR markerů. Tím napomohli posuzování genetické variability u konopí. Bylo vybráno 45 polymorfních párů primerů pro hodnocení genetické diverzity a příbuznosti mezi 115 genotypy konopí. Výsledky ukázaly, že všech 115 odrůd může být rozděleno do 4 skupin, které jsou primárně založené na geografii: severní Čína, Evropa, střední Čína a jižní Čína (Gao *et al*., 2014).

4 MATERIÁL a METODIKA

4.1 Experimentální materiál

Pro experiment bylo použito 6 směsných vzorků konopí (tabulka 1) získaných z rostlin pěstovaných na Mendelově univerzitě pod záštitou španělské firmy CBD Botanic, se kterou má Centrum transferu technologií MENDELU podepsanou smlouvu o spolupráci ve věci výzkumu medicinálního konopí s vyšším obsahem kanabinoidu CBD. Samotný experiment byl prováděn na Ústavu biologie rostlin AF MENDELU. Vzorky byly získány ze sad experimentálních samičích rostlinných materiálů označených písmeny „A“, „B“, „C“, „E“, „F“ a jedné sady samičích rostlin, které prošly procesem maskulinizace a tím u nich byl indukován růst také samčích květů – označení „♂“.

Tabulka 1: Charakterizace genotypů podle relativního obsahu THC a CBD

Genotyp	obsah THC	obsah CBD
A	vysoký	nízký
B	střední	střední
C	střední	střední
E	nízký	vysoký
F	nízký	vysoký

4.2 Metodika

Pracovní postup se skládal z následujících kroků:

- izolace rostlinné DNA z jednotlivých směsných vzorků;
- příprava reakčních směsí pro PCR reakce;
- příprava agarózových gelů, elektroforéza a kontrolní vizualizace produktů;
- příprava polyakrylamidových gelů, elektroforéza, vizualizace produktů;
- vyhodnocení výsledků.

4.2.1 Izolace rostlinné DNA

Genomická DNA jednotlivých směsných vzorků byla izolována z mladých listů, které byly homogenizovány pomocí tekutého dusíku a třecích misek, za pomocí kitu DNeasy Plant mini Kit podle příslušného návodu (www.qiagen.com). Izolace byla provedena v triplikátech a pro následné analýzy byla vždy použita izolovaná DNA s největší koncentrací v roztoku.

Koncentrace a čistota izolované DNA byly stanoveny pomocí přístroje Picodrop Spectrometr PICO100 (Picodrop^{TM}). Udává se, že minimální hodnota koncentrace DNA pro PCR je 20ng/µl. Téhle hodnoty sice nebylo dosaženo u vzorků pocházejících z genotypů označených „F“ a „♂“, ale hodnoty koncentrace i čistoty byly uznány za dostatečné pro následnou analýzu polymorfizmu. Také následné ověření přítomnosti produktů po PCR na agarózové gelové elektroforéze prokázalo, že amplifikace proběhla správně.

4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR

Pro analýzu bylo použito celkově 8 SSR markerů. Všech 8 „CAN“ markerů bylo použito podle Gao *et al*. (2014). Názvy markerů společně s opakujícím se motivem mikrosatelitu, sekvencemi použitých primerů a přibližnou délkou produktů podle autora jsou zaznamenány v tabulce 2.

Tabulka 2: Charakteristika markerů použitých pro analýzy (sloupce „Název“, „Opakující se motiv“ a „Primer foward/Primer reverse“ byly převzaty od Gao *et al*. (2014))

Název	**Opakující se motiv**	**Primer foward (začínající) Primer reverse (končící)**	**Velikost produktu (bp)**
CAN0039	$(CAT)_8$	AGCGGCTAGCGTAACAGTAT GTCATTGGAAAGACCAGCTT	200-220
CAN0093	$(GA)_{11}$	CAGTCTCTCAGATCAGACTACC AGCGGCTAGCGTAACAGTAT	200-240
CAN0585	$(ACTTCTATT)_2$ $T(CAAAAC)_3$	TCATCATCATCCCTCCCTAT GGTCCATAGTTGGCTGATCT	200-220
CAN1347	$(AAC)_6$ $(ATC)_7$	TGTTTCTAAGGCTCAGTCCC GGCAAAGGTAAAGCAAGTGT	200-220
CAN0865	$(TCTCTCTTC)_2$ $(TC)_9$	CTTCTCTAATCCGATTCCCA GAACGAAGAAAACCCAGAAG	180-200
CAN1660	$(AATCCC)_3$ $(AACCCC)_4$	AAGCCTTGAATCTCCAACAG TGAAGTGTGAAGATGATCGG	160-170
CAN2633	$(TC)_9$	GGCAAACTTGTAGTGCTCTT GGAAGTTAGCACTGCAGACA	140-160
CAN0126	$(AATACC)_3$ $(CAG)_6$	GAGTAAGAGAAGGCGAACCA CCTGTGTAACAGAAAACCCC	170-190

Reakční směs pro PCR byla připravena postupným přidáváním jednotlivých komponent (tabulka 3). Celkové množství reakční směsi bylo následně rozděleno po 24 µl do mikrozkumavek typu Eppendorf a poté byl přidán 1 µl předem připravené izolované templátové DNA daného vzorku konopí. Po uzavření byly mikrozkumavky protřepány na MS1 minishaker (IKA®) a poté vloženy do jamek termocykleru T3 (Biometra). Po řádném uzavření komory termocykleru byl nastaven program s příslušným teplotním a časovým profilem. Délka prvotní inkubace byla 10 min při 94 °C pro aktivaci *Taq* polymerázy, následný cyklus při 94 °C trval 30 s, 57 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 40 s, zopakováno 35x. Závěrečné prodloužení proběhlo při 72 °C po dobu 10 min (Gao *et al*., 2014).

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro 1 vzorek

Složky reakce	**množství (µl)**
deionizovaná H_2O	16,8
pufr	5
dNTP	0,1
primer (forward – F)	1
primer (reverse – R)	1
Taq polymeráza	0,1
Celkem	24

Vysvětlivky: dNTP – dinukleotid trifosfát, *Taq – Thermus aquaticus*

4.2.3 Příprava agarózových gelů, kontrolní elektroforéza a vizualizace produktů

Po proběhnutí PCR byla přítomnost PCR produktů ověřena elektroforeticky na 1,5% agarózových gelech. Před samotnou přípravou gelů byla sestavena elektroforetická aparatura. Vanička, ve které se gel nechává tuhnout, byla umístěna do zapnuté digestoře. Příprava jednoho 1,5% agarózového gelu proběhla následovně. K 1891,4 ml destilované vody bylo přidáno 38,6 ml 50x koncentrovaného pufru TAE (tris-acetátový pufr). Do láhve s hrdlem bylo odlito 270 ml připraveného roztoku a přidáno 4,2 g agarózy. Obsah láhve byl krouživým pohybem promíchán a poté pomocí mikrovlnné trouby přiveden k varu. Po plném rozpuštění agarózy byla láhev s vroucím roztokem vyjmuta z mikrovlnné trouby a za stálého míchání byl obsah pomalu ochlazován pod proudem vlažné vody. Následně byly v digestoři do roztoku přidány 2 µl ethidium bromidu, který má schopnost vázat se na dvouvláknové řetězce nukleových kyselin. Roztok byl poté z láhve vylit do vany. Po odstranění případných bublin byly do vaničky umístěny hřebeny, po jejichž vyjmutí ze ztuhlého gelu se vytvoří jamky pro nanášení vzorků obsahujících DNA, která má být separována. Gel tuhnul po dobu cca 15 minut v digestoři. Po vyjmutí hřebenů a odstranění gumových těsnění byla vanička s gelem přesunuta do eletroforetické aparatury a zalita zbytkem naředěného pufru TAE, který slouží jako elektrolyt. Takto připravený gel byl přichystán na nanášení jednotlivých vzorků. Komponenty jsou uvedeny v tabulce 4.

Na horizontální gelovou elektroforézu byly vzorky DNA postupně rozpipetovány do jamek gelu po 5 µl. Vana byla následně zakryta bezpečnostním

krytem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí (Biometra). Separace probíhala při napětí 55 V, po dobu 1 až 2 hodin.

Po ukončení elektroforetické separace byla provedena vizualizace pod UV lampou transiluminátoru Ultraviolet (UltraLum Inc.).

Tabulka 4: Komponenty pro přípravu 1,5% agarózového gelu

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Použité množství
Destilovaná voda	-	1891,4ml
TAE (tris-acetátový pufr)	50x	38,6ml
Agaróza (Serva, USA)	-	4,2 g
Etidium bromid (Serva, USA)	10 mg/ml	2 µl

4.2.4 Příprava polyakrylamidových gelů, elektroforéza a vizualizace produktů

Na polyakrylamidových gelech byla provedena separace PCR produktů k zjištění jejich velikosti, pro studium genetické diverzity mezi jednotlivými směsnými vzorky konopí. Polyakrylamidový gel má lepší rozlišovací schopnost, než je tomu u gelu agarózového, a proto můžeme mnohem lépe rozlišit jednotlivé alelové varianty mikrosatelitních genetických markerů podle množství opakujících se tandemů potažmo velikosti PCR produktů. Před přípravou samotného gelu byly sestaveny aparatury z elektroforetických skel. Skla, silikonová těsnění a hřebínky byly důkladně omyty vodou a následně přetřeny etanolem, aby se zamezilo přítomnosti nečistot, které by mohli ztížit manipulaci s gelem po separaci. Mezi očištěná skla bylo vloženo silikonové těsnění. Následně byla skla zajištěna svorkami pro správné utěsnění vnitřního prostoru, kde se bude nalévat ještě tekutý gel. Takto připravené aparatury byly umístěny do vertikální polohy. Následovala příprava gelů. Složení gelu je uvedeno v tabulce 5. Při míchání jednotlivých komponent je nutné dbát na pořadí, v jakém jsou komponenty uvedeny v tabulce. Jelikož APS (persíran amonný) započíná polymerační reakci, byl přidán jako poslední komponent. Jednotlivé složky byly rozmíchány v kádince s magnetickým míchadlem. Připravený roztok byl přelit do vnitřního prostoru dvojice vertikálně umístěných skel a poté byl navrch dán hřebínek, díky kterému byly po ztuhnutí gelu vytvořeny jamky pro nanášení vzorků obsahujících DNA, která má být separována. Polyakrylamidový gel byl ponechán přes noc pro správné ztuhnutí. Tuhnutí přes noc bylo zvoleno kvůli časovému harmonogramu, běžně totiž stačí nechat tuhnout přibližně 30 min při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelu byly vyjmuty hřebínky

a jamky byly zality elektrolytem, který byl připraven z komponent uvedených v tabulce 6. Zbylý elektrolytický roztok byl nalit do elektroforetické aparatury.

Tabulka 5: Komponenty pro přípravu 8% polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Použité množství
Destilovaná voda	-	34,650ml
TBE	10x	5ml
AKRYL/BIS	-	10ml
TEMED	-	334 µl
APS	10%	334 µl

Vysvětlivky: TBE – trisbáze (trishydroxymethyldiaminomethan; Biotech), kyselina boritá, disosium (Biotech); AKRYL/BIS – akrylamid/biskrylamid; TEMED – tetramethylendiamin (Biotech); APS – amonium persulfát (Biotech)

Tabulka 6: Složení elektrolytu

Elektrolyt
100ml TBE 10x koncentrovaný
900ml destilované H_2O

Do dvou jamek na gel bylo naneseno 12 µl velikostního markeru (DNA ladder). Do zbylých jamek byly vzorky rozděleny po 12 µl. Ze skel byla odstraněna silikonová těsnění a skla byla umístěna naproti sobě do elektroforetické aparatury. Aparatura byla poté zakryta ochranným krytem a připojena ke zdroji stejnoměrného elektrického napětí. Elektroforéza probíhala ve dvou fázích. První fáze trvala 10 min při 120 V a druhá při 300 V po dobu 60 až 120 min v závislosti na odhadované velikosti separovaných PCR produktů.

Vizualizace produktů na polyakrylamidovém gelu byla prováděna dusičnanem stříbrným ($AgNO_3$). Složení roztoků je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7: Složení jednotlivých roztoků pro vizualizaci

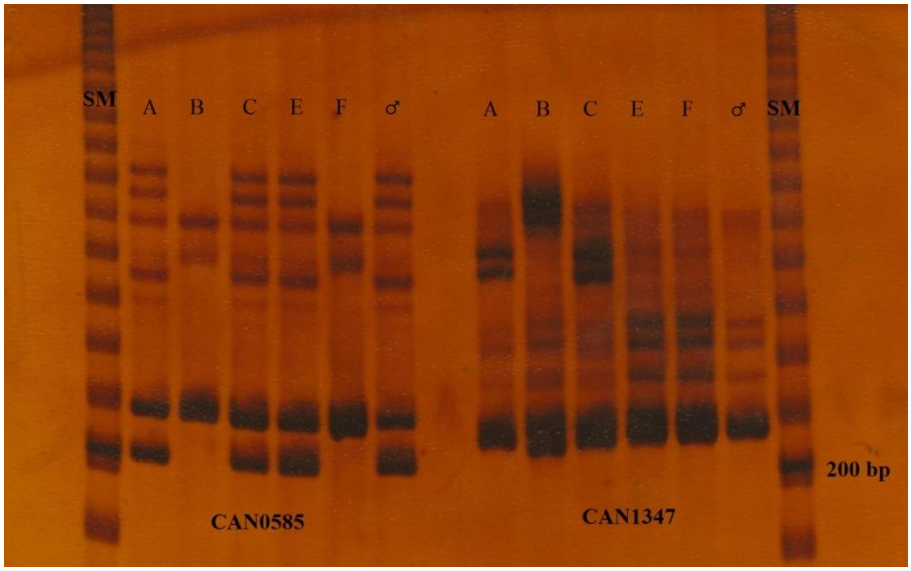
Fixační roztok	**Roztok dusičnanu stříbrného**	**Vývojka**
41,6ml etanolu	2 g $AgNO_3$	10ml 37% formaldehydu
2ml kyseliny octové	1000ml destilované H_2O	22,2 g NaOH
356,4ml destilované H_2O		730ml destilované H2O

Po ukončení gelové elektroforézy byly gely jednotlivě přeneseny ze skleněných desek do nádoby s fixačním roztokem, kde se po dobu jedné minuty za občasného protřepání nechal gel fixovat, aby separované PCR produkty již neputovaly a nedifundovaly v gelu. Poté byly gely jednotlivě přeneseny do nádoby s dusičnanem stříbrným, kde byly ponechány tři minuty. Gely byly po navázání stříbra 2x promyty destilovanou vodou a přeneseny do nádoby s vývojkou. K vizualizaci došlo téměř okamžitě, ale pro jistotu byly gely ve vývojce ponechány až 10 minut. Gely byly po procesu barvení přeneseny na fólie, zataveny a naskenovány (obrázek 5).

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

Výsledky analýz, které byly získány z pozice amplikonů na polyakrylamidovém gelu, byly vyhodnoceny pomocí jednoduché binární matice, do které byly zaznamenány hodnoty „0“ nebo „1“, přičemž „0“ značí nepřítomnost a „1“ značí přítomnost PCR produktu pro danou velikostní alelovou variantu (tabulka č. 8). Zpracovávání matic bylo provedeno pomocí statistického softwaru FreeTree verze 9.1 (Hampl *et al.* 2001) pomocí UPGMA (metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů) společně s využitím Jaccardova koeficientu podobnosti (Jaccard, 1908). Pro vytvoření vizuálního výstupu matic ve formě dendrogramu byl použit software TreeView verze 1.6.6 (Page, 1996). Nakonec byly pro jednotlivé mikrosatelity vypočítány statistické hodnoty DI (index diverzity), PI (index pravděpodobnosti) a PIC (polymorfní informační obsah) (Russell *et al.* 1997).

Obrázek 5: Nasnímaný polyakrylamidový gel, markery CAN0585 a CAN1347



Vysvětlivky: SM – velikostní marker (DNA ladder)

5 VÝSLEDKY a DISKUZE

5.1 Vyhodnocení analýzy jednotlivých SSR markerů

Podle Wang *et al.* (1994) se v rostlinné DNA průměrně vyskytuje jeden mikrosatelitní marker každých 64,6 kb, u jednoděložných rostlin a u dvouděložných každých 21,2 kb. Pro analýzu 6 směsných vzorků konopí bylo použito celkem 8 SSR markerů. U všech osmi analyzovaných mikrosatelitních markerů bylo celkově nalezeno 23 rozličných alel s průměrem 2,88 na lokus. Tato hodnota je stejná jako hodnota 2,87 alel na lokus, kterou uvádí Gao *et al.* (2014). Během analýzy nebyl detekován žádný marker, který by byl uniformní.

Nanejvýš byly zjištěny 4 alelické varianty, a to u SSR markerů CAN0039 a CAN0093. U markeru CAN0039 byly na gelu pozorovány dva specifické produkty pro genotypy s označením „♂“ a „E“ s přibližnou velikostí 205 bp. Proto by mohl být tento SSR marker, díky kodominantní dědičnosti, využít pro testování a vyhodnocování úspěšnosti křížení. Dále u markerů CAN1347, CAN2633 a CAN0865 byly zjištěny 3 alelické varianty a u markerů CAN0585, CAN0126 a CAN1660 byly zjištěné alelické varianty 2. Velikosti amplikonů markerů CAN0039, CAN0093, CAN0585 a CAN1347 se pohybovaly v rozmezí od 200 do 240 bp, zatímco velikosti amplikonů markerů CAN0126, CAN2633, CAN1660 a CAN0865 se pohybovaly v rozmezí od 140 do 200 bp (tabulka 9). Během vyhodnocování analýzy byl v porovnání s Gao *et al.* (2014) zjištěn velikostní rozdíl PCR produktu u markeru CAN1347 a to až 70 bp. Tato skutečnost může být zdůvodněna tím, že byl použit větší počet genotypů, které byly zároveň dosti odlišné od těch, které byly analyzovány v rámci mého experimentu. Při porovnávání velikostí amplikonů s výsledky analýz Presinszké *et al.* (2015), nebyly zjištěny až na jednu drobnou odchylku žádné velikostní rozdíly produktů. Její experiment byl proveden na větší kolekci, což bylo 22 různých genotypů, mezi kterými byly jak zástupci z technických odrůd jako je např. Finola, tak zástupci vysoko-obsažných odrůd z Nizozemska jako např. „Amnesia Haze“. Při analýze bylo použito 24 SSR markerů.

Po vytvoření jednoduché binární matice (tabulka 8) bylo provedeno vyhodnocení statistických ukazatelů (DI, PI, PIC) pro jednotlivé SSR markery (tabulka 9). Hraniční hodnotě DI = 0,80 se s hodnotou DI = 0,72 nejblíže přiblížil marker CAN0093, u kterého byly vyhodnoceny hodnoty PI = 0,09 a PIC = 0,69. Jako

druhý marker s nejvhodnějšími statistickými ukazateli byl marker CAN0039, u kterého byla vyhodnocena hodnota DI = 0,65 a hodnoty PI = 0,14 a PIC = 0,62. Tyto vypočítané hodnoty značí, že markery CAN0093 a CAN0039 jsou vhodné pro identifikaci genotypů z analyzované sady a že by bylo také možné je využít pro hodnocení účinnosti křížení genotypů, na kterých byl experiment prováděn. Oproti tomu marker CAN0126, u kterého byly nalezeny jen dvě alelové varianty, měl hodnoty DI = 0,28; PI = 0,56 a PIC = 0,24. I když tento marker není zcela uniformní, jeho statistické ukazatele značí, že se nejedná o vhodný marker na charakterizaci genetické variability v rámci analyzované sady genotypů. Při porovnání hodnot statistických ukazatelů pro jednotlivé SSR markery s hodnotami, které byly publikovány Presinszkou *et al.* (2015) bylo zjištěno, že mimo markery CAN0126, CAN1660 a CAN0865 byly hodnoty DI a PIC vyšší, zatímco hodnoty PI nižší. Veškeré rozdíly byly s největší pravděpodobností způsobeny využitím jiných genotypů, a především počtem analyzovaných genotypů a použitých mikrosatelitních markerů, který byl v mém experimentu výrazně nižší.

Kayis *et al* (2010) srovnávali metodu RAPD a ISSR pro analýzu genetické variability 17 vzorků psychoaktivního konopí z oblasti Turecka. Pro metodu ISSR markerů uvedli hodnotu PIC = 0,25 a pro metodu RAPD hodnotu PIC = 0,28. Tyto hodnoty jsou nižší než většina hodnot uvedených v tabulce 9, což může být způsobeno faktem, že mnou analyzovaný rostlinný materiál má pro mě neznámý původ a může se jednat o genotypy pocházející z různých oblastí.

Tabulka 8: Tabulka s maticemi pro jednotlivé SSR markery

Markery	A	B	C	E	F	♂	Suma	Počet alelových variant
CAN0039	1	1	1	1	1	1	6	4
CAN0039	0	1	1	0	1	0	3	
CAN0039	0	0	0	1	0	1	2	
CAN0039	1	0	0	0	0	0	1	
CAN0093	0	0	1	0	0	0	1	4
CAN0093	0	0	1	1	0	1	3	
CAN0093	0	0	1	1	0	1	3	
CAN0093	1	1	0	0	1	0	3	
CAN0585	1	0	1	1	0	1	4	2
CAN0585	1	1	1	1	1	1	6	
CAN1347	0	1	0	0	0	0	1	3
CAN1347	1	0	1	1	1	1	5	
CAN1347	0	1	0	0	0	0	1	
CAN0126	0	0	1	0	0	0	1	2
CAN0126	1	1	0	1	1	1	5	
CAN2633	1	1	1	1	1	1	6	3
CAN2633	0	0	1	0	0	0	1	
CAN2633	1	0	0	0	0	0	1	
CAN1660	1	1	1	1	1	1	6	2
CAN1660	0	0	1	1	1	1	4	
CAN0865	1	1	1	1	1	1	6	3
CAN0865	1	1	0	0	1	1	4	
CAN0865	0	0	1	1	0	0	2	

Tabulka 9: Charakteristika analyzovaných mikrosatelitních markerů

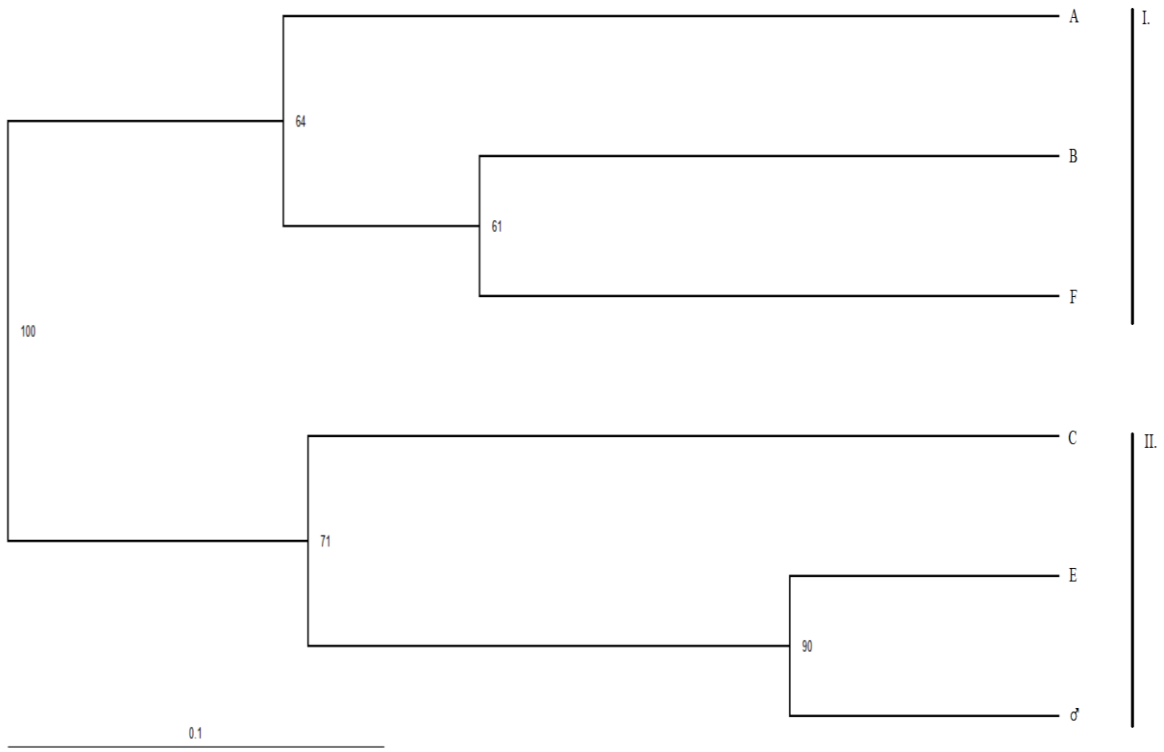
SSR marker	velikost alel (bp)	počet alel	DI	PI	PIC
CAN0039	200-220	4	0,65	0,14	0,62
CAN0093	200-220	4	0,72	0,09	0,69
CAN0585	200-220	2	0,48	0,39	0,36
CAN1347	200-220	3	0,45	0,34	0,41
CAN0126	180-190	2	0,28	0,56	0,24
CAN2633	140-160	3	0,41	0,35	0,39
CAN1660	160-170	2	0,48	0,39	0,36
CAN0865	180-200	3	0,61	0,20	0,55
Průměr		**2,88**	0,51	0,31	0,45

Vysvětlivky: DI – index diverzity, PI – index pravděpodobnosti, PIC – polymorfní informační obsah

5.2 Genetická diverzita analyzovaných vzorků konopí

Genetická diverzita analyzovaných vzorků konopí byla graficky znázorněna formou dendrogramu. Dendrogram byl rozdělen do dvou shluků (I. a II.), přičemž do každého byly zařazeny 3 genotypy. Ve shluku II. je patrné, že genotypy „E“ a „♂“ mají 90% shodu, což naznačuje, že rostliny s označením „♂“ byly odvozeny právě z genotypů s označením „E“. Rostliny genotypu „♂“, které krom samičích květů disponovaly také květy samčími, byly vytvořeny maskulinizací samičích rostlin genotypu „E“, která se nejčastěji provádí působením nepříznivého prostředí a aplikací růstových regulátorů. Častým využívaným růstovým regulátorem pro kontrolu sexuální diferenciace u dvoudomých odrůd konopí jsou fytohormony giberilin kyselina giberelová (GA3) a auxin kyselina indol-3-octová (IAA). Kyselina giberelová indukuje maskulinizaci, oproti tomu, IAA, kinetin a ethylen indukují feminizační efekt na pohlaví konopí. Kyselina abscisová nezpůsobuje žádný přímý vliv na determinaci pohlaví, ale má antagonistické účinky ve vztahu k účinku způsobeného GA3 a IAA (Galoche, 2015). Takto pozměněné (maskulinizované) samičí genotypy se využívají jako samčí komponenty při šlechtitelském procesu a také pro tvorbu feminizovaných semen u dvoudomých rostlin.

Nebyla zjištěna žádná závislost mezi poměrem 2 nejabundantnějších kanabinoidů (THC a CBD) a genetickou příbuzností znázorněnou v dendrogramu (obrázek 6). Genotypy „F“ a „E“, které jsou CBD vysoko-obsažné, byly ve dvou různých shlucích dendrogramu a to stejné platí pro genotypy „B“ a „C“, které disponovaly vyrovnaným poměrem obsahů THC a CBD. Druhá nejbližší příbuznost (za výše zmiňovanou 90% shodou genotypů „E“ a „♂“) byla pozorována u genotypů „B“ a „F“ s 61% shodou. Protože veškeré mnou analyzované genotypy byly ve své podstatě dvoudomé samičí rostliny léčebného, vysoko-obsažného konopí, tak se nedalo v rámci analýzy genetické diverzity zjistit vztah SSR markerů k jednodomosti a dvoudomosti. Balgová (2016) ve své bakalářské práci nenalezla vztah mezi jednodomostí a dvoudomostí analyzovaných odrůd technického konopí s testovanými SSR markery. Kvůli absenci technických genotypů v analýze nebylo možné s testovanými SSR markery nalézt vztah mezi technickými a medicinálními odrůdami. Pro tato zjištění by bylo nutné do analyzované kolekce zařadit větší množství genotypů, mezi kterými by se vyskytovaly technické odrůdy a odrůdy jednodomé.



Obrázek 6: Dendrogram genetické příbuznosti

Vysvětlivky: I. a II. – shluk

Gao *et al.* (2014) na základě mikrosatelitních markerů rozdělil analyzované vzorky konopí do čtyř skupin podle geografického původu. Pro analýzu genetické diverzity využil 45 polymorfních párů primerů na 115 různých genotypech. Bylo by velmi vhodné pro následné analýzy využít další, ne-li všechny, markery, které ve svém výzkumu využil právě Gao *et al.* (2014). Na výsledcích je viditelné, že malý počet přebraných markerů z oné studie byl nedostačující.

Protože experimentální materiál, který byl využit pro analýzu genetické diverzity v experimentální části této bakalářské práce, byl neznámého geografického původu, nebylo možné posoudit relevanci výsledků na rozdělení genotypů podle geografických regionů odkud genotypy nebo jejich předci pocházeli. Výsledky mají také kvůli omezenému rozsahu analyzovaných genotypů a použitých SSR markerů mnohem menší vypovídající schopnost než výsledky příbuznosti v dříve zmiňovaných studiích.

6 ZÁVĚR

Rostlina *Cannabis sativa* L., která díky svému všestrannému využití doprovází lidské dějiny již po několik tisíciletí, je v současné době velmi diskutovaným tématem ve vědě, především medicíně, a to díky objevení endokanabinoidního systému.

V rámci literární rešerše bylo kromě základních informací konopí charakterizováno hned z několika hledisek. Byla lehce nastíněna problematika evropské a české legislativy, která bývá pro širokou veřejnost často velmi nejasná, dále byla popsána přinejmenším stejně složitá taxonomická charakterizace. Dále bylo konopí rozebráno z biologicko-morfologické stránky a důležitou součástí rešerše byla také charakterizace genetická. Následně byla pozornost věnována problematice biotechnologií a jejich rozdělení. Největší část byla věnována biotechnologickým metodám, které se u konopí využívají, jako jsou *in vitro* kultivace, genetická transformace a konečně metodám využívající genetické markery, kterým byla věnovaná také experimentální část této práce.

Praktická část této bakalářské práce byla zaměřena na studium polymorfizmu DNA rostlin *Cannabis sativa*. Cílem bylo vyhodnocení genetické variability zkoumaných genotypů konopí pěstovaných na Mendelově univerzitě pod záštitou španělské společnosti CBD Botanic pomocí analýzy mikrosatelitních markerů. Nedílnou součástí byly molekulárně genetické metody jako izolace genomické DNA, PCR nebo elektroforetická separace. Experimenty byly provedeny v laboratoři molekulární biologie na Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

Analyzovaná kolekce konopí se skládala z 6 genotypů, které byly analyzovány pomocí 8 SSR markerů. Vyhodnocení analýzy nepoukazovalo na žádný uniformní marker, ale bylo zjištěno, které markery by byly vhodné, a které ne, pro následné zjišťování genetické variability. Celkem bylo detekováno 23 rozličných alel s průměrem 2,88 alel na lokus. Velikost amplikonů se pohybovala od 140 do 240 bp. Největší počet alelických variant bylo zjištěno u markerů CAN0039 a CAN0093. U všech SSR markerů byly vypočteny statistické hodnoty DI, PI a PIC, díky kterým bylo určeno, které markery se hodí na vyhodnocení genetické variability a které ne.

Genetická rozmanitost byla graficky vyhodnocena ve formě dendrogramu podobnosti, který rozdělil genotypy konopí na dva shluky. Z 90% genetické podobnosti

na základě zkoumaných mikrosatelitních markerů bylo předpokládáno, že genotyp s označením „♂“ byl jen vlastně genotyp s označením „E“, který prošel procesem maskulinizace, čímž se u něj indukoval růst samčích květů tvořící pyl.

Pro více relevantní a přesnější výsledky by bylo vhodné nejen rozšířit zkoumané genotypy například některými odrůdami technického konopí, ale především rozšířit množství zkoumaných mikrosatelitních markerů. Navýšení množství SSR markerů bude především důležité pro identifikaci hybridů, pro tyto analýzy se běžně používá 20 a více SSR markerů.

Veškeré poznatky, zkušenosti a výsledky získané z bakalářské práce bych rád využil v rámci navazující diplomové práce.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALGHANIM H. J., ALMIRALL J. R., 2003: Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol 376: 1225-1233. ISSN: 1618-2642

BALGOVÁ B., 2016: Studium polymorfizmu DNA konopí. Brno. Bakalářská práce (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav biologie rostlin.

BERAHMAND F., BEIZAEE N., DEHGHAN NAYYERI M., SHARAFI A., KHEIRI MANJILI H., DANAFAR H., HASHEMI SOHI, H., 2016: Cannabis sativa L. genetically transformed root based culture via Agrobacterium rhizogenes. Pharmaceutical and Biomedical Research [online]. 2016-9-01, 2(3), 13-18 DOI: 10.18869/acadpub.pbr.2.3.13. ISSN: 2423-4486. Dostupné z: http://pbr.mazums.ac.ir/article-1-122-en.html

BOTSTEIN D., WHITE R. L., SKOLNICK M., DAVIS R. W., 1980: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, Vol. 32: 314-331. ISSN: 0002-9297

CASCINI F., 2011: Investigations into the hypothesis of transgenic Cannabis. Journal of Forensic Sciences 57(3):718-21 · December 2011. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.02021.x. Epub 2011 Dec 28. ISSN: 1556-4029

COYLE H. M., PALMBACH T., JULIANO N., LADD C., LEE H. C., 2003: An Overview of DNA Methods for the Identification and Individualization of Marijuana. State of Connecticut Department of Public Safety, Division of Scientific Services, Forensic Science Laboratory, 278 Colony Street, Meriden, CT USA 06451, 2003, 44(3), 315-321. ISSN: 0379-0738

DE LA ROSA R., ANGIOLILLO A., GUERRERO C., PELLEGRINI M., RALLO L., BESNARD G., BERVILLÉ A., MARTIN A., BALDONI L., 2003: a first linkage map

of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. Theor Appl Genet, Vol. 106: 1273. doi:10.1007/s00122-002-1189-5. ISSN: 1432-2242

DIVASHUK M. G., ALEXANDROV O. S., RAZUMOVA O. V., KIROV I. V., KARLOV G. I., 2014. Molecular cytogenetic Charasterization of the Dioecious *Cannabis sativa* with an XY Chromosome Sex Determination System. PLoS ONE, Vol. 9: e85118. ISSN: 1932-6203

EUR-Lex [online]. 2015 [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32000R2860

FARAG S., 2014: Cannabinoids production in *Cannabis sativa* L.: An *in vitro* approach. Dortmund. Disertační práce. Technická univerzita v Dortmundu. Katedra biochemického a chemického inženýrství.

FEENEY M., PUNJA Z. K., 2003: Tissue culture and Agrobacterium- mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 39**,** 578- 585. ISSN: 1054-5476

FINTA- KORPEĽOVÁ Z., BERENJI J. 2007: Trends and achievements in industrial hemp (*Cannabis sativa* L) breeding. Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje, 39, pp. 63- 75.

FISCHEDICK J. T., HAKEKAMP A., ERKELENKS T., CHOI Y. H., VERPOORTE R., 2010: Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. Phytochemistry, Vol. 71: 2058-2073. ISSN: 0031-9422

FORAPANI S., CARBONI A., PAOLETTI C., MOLITERNI V. M. C., RANALLI P., MANDOLINO G., 2001: Comparison of Hemp Varieties Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Crop Science. 41(6), 1682- [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.2135/cropsci2001.1682. ISSN 1435-0653.

GALOCH E., 2015: The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 47(1–2):153-162 · May 2015 DOI: 10.5586/asbp.1978.013. ISSN: 0001-6977

GAO C., XIN P., CHENG C., TANG Q., CHEN P., WANG C., ZANG G., ZHAO L., 2014: Diversity Analysis in *Cannabis sativa* Based on Large-Scale Development of Expressed Sequence Tag-Derived Simple Sequence Repeat Markers. PLoS ONE, Vol: 9: e110638. ISSN: 1932-6203

GELVIN S. B., 2003: Agobacterium-mediated plant transformation. The biology behind the "gene-jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 16-37. ISSN: 1098-5557

GILMORE S., PEAKALL R., 2003: Isolation of microsatellite markers in *Cannabis sativa* L. (marijuana). Molecular Ecology Notes, Vol. 3: 105–107. ISSN: 1471-8286

GOODNER B., HINKLE G., GATTUNG S., MILLER N., BLANCHARD M., QUROLLO B., GOLDMAN B. S., CAO Y., ASKENAZI M., HALLING C., MULLIN L., HOUMIEL K., GORDON J., VAUDIN M., IARTCHOUK O., EPP A., LIU F., WOLLAM C., ALLINGER M., DOUGHTY D., SCOTT C., LAPPAS C., MARKELZ B., FLANAGAN C., CROWELL C., GURSON J., LOMO C., SEAR C., STRUB G., CIELO C., SLATER S., 2001: Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent Agrobacterium tumefaciens C58. Science, 294, 2323-2328. ISSN: 1095-9203.

HAMPL V., PAVLÍČEK A., FLEGR J., 2001: Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to Trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 51: 731 – 735. ISSN: 1466-5026

HAZEKAMP A., FISCHEDICK J. T., 2012: *Cannabis* – from cultivar to chemovar. Drug Testing and Analysis, Vol. 4: 660-667. ISSN: 1942-7611.

HILLIG K. W., 2005: Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (*Cannabaceae*). Genetic Resources and Crop Evolution, Vol. 52: 161-180. ISSN: 0925-9864.

JACCARD P., 1908: Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin Del La Societé Vaudoise Des Scientes Naturelles, Vol. 44: 223 – 270. ISSN: 0037-9603

JAGADISH V., ROBERTSON J., BIBBS A., 1996: RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. Forensic Science International, Vol. 79: 113-121. ISSN: 0379-0738

KAFARSKI P., 2012: Rainbow code of biotechnology. Chemik, Vol. 66, 8.: 811-816. ISSN: 2450-7105

KAYIS S. A., HAKKI E. E., PINAEKARA E., 2010: Comparison of Effectiveness of ISSR and RAPD Markers in Genetic Characterization of Seized Marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research, Vol. 5: 2925–2933. ISSN: 1991-637X

KÖHNEMANN S., NEDELE J., SCHWOTZER D., MORZFELD J., PFEIFFER H., 2012: The validation of a 15 STR multiplex PCR for Cannabis species. International Journal of Legal Medicine. 126: 601–606. ISSN: 1437-1596

KUBOTA C., 2002: Photoautotrophic Micropropagation: Importance of Controlled Environment in Plant Tissue Culture© Controlled Environment in Plant Tissue Culture© Controlled Environment in Plant Tissue Culture. International Plant Propagators' Society. Combined Proceedings of Annual Meetings, 52. ISSN: 0538-9143

LATA H., CHANDRA S., KHAN I., ELSOHLY M., 2009: Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. Physiology and Molecular Biology of Plants, 15, 79- 86. ISSN: 0974-0430

LATA H., CHANDRA S., KHAN I., ELSOHLY M., 2010: *Cannabis sativa* L. Micropropagation in Temporary Immersion Bioreactor System. Planta

Medica [online]., **76** (05), ISSN: 0032-0943. Dostupné z: http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1251771

MACHLIN E., RODRIGUEZ N., WHITE K., 2012: DNA fingerprinting. Worcester Polytechnic Institute [online] 1-71. ISSN: 2193-6595. Dostupné z: http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-082412-133340/unrestricted/Nicolas_Kevin_Emily_IQP_Final.pdf

MING R., BENDAHMANE, A., RENNER, S. S., 2011: Sex chromosomes in landplants. Annual Reviewsof Plant Biology, Vol: 62: 485-514, ISSN: 1543-5008

MIOVSKÝ M., 2008: Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium. 1. vyd. Praha: Grada, 533 s. ISBN: 978-80-247-0865-2.

PAGE R. D. M., 1996: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, Vol. 12: 357 – 358. ISSN: 0266-7061

PEIL A., FLACHOWSKY H., SCHUMANN E., WEBER W. E., 2003: Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.*)*. Theoretical and Applied Genetics, Vol. 107: 102-109. ISSN: 0040-5752

PINARKARA E., KYIS S. A., HAKKI E., SAG A., 2009: RAPD analysis of seized marihuana (*Cannabis sativa*) in Turkey. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 12: 1-13. ISSN: 0717-3458

POWELL W., MACHRAY G. C., PROVAN J., 1996: Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science, Vol. 1: 215-222. ISSN: 1360-1385

PRADHAN A., GUPTA V., MUKHOPADHYAY A., ARUMUGAM N., SODHI Y., PENTAL D., 2003: a high-density linkage map in *Brassica juncea* (Indian mustard) using AFLP and RFLP markers. Theor Appl Genet, 106, 607–614. doi:10.1007/s00122-002-1083-1, ISSN: 1432-2242

PRESINSZKÁ M., ŠTIASNA K., VYHNÁNEK T., TROJAN V., MRKVICOVÁ E., HŘIVNA L., HAVEL L., 2015: Analysis of microsatellite markers in hemp (*Cannabis sativa* L.). In Proceedings of International PhD Students Conference MendelNet2015. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 434-438. ISBN: 978-80-7509-363-9.

RANALLI P., MANDOLINO G., GRASSI G., CARBONI A., MOSCHETTA A., 1999: Advances of biotechnological approaches in hemp breeding. In: Ranalli P. (ed.) Advances in hemp research. New York, Food Products Press-imprint Haworth Press, 185-208. ISBN: 1-56022-872-5.

RUMAN M. a HAMŠÍK P., 2008: Konopí - biomasa pro život: Vlastnosti a použití v ekologickém kontext. Chvaleč: Konopa. ISBN: 978-80-254-1149-0.

RODE J., IN-CHOL K., SAAL B., FLACHOWSKY H., KRIESE U., WEBER W. E., 2005: Sex-linked SSR markers in hemp. Plant Breeding, Vol. 124: 167–170. ISSN: 1439-0523

RUSSELL J. R., FULLER J., YOUNG G., THOMAS B., TARAMINO G., MACAULAY M., WAUGH R., POWELL W., 1997: Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. Genome. Vol. 40: 442–450. ISSN: 0831-2796

SAKAMOTO K., ABE T. MARSUYAMA T., YOSHIDA S., OHMIDO N., FUKUI K., 2005: RAPD markers encoding retrotransposable elements are linked to the male sex in *Cannabis sativa* L. Genome, Vol. 48: 931-936. ISSN: 0831-2796

SAKAMOTO K., AKIYAMA Y., FUKUI K., KAMADA H., SATOH S., 1998: Characterization; Genome Sizes and Morphologyof Sex Chromosomes in Hemp (*Cannabis sativa* L.). Cytologia, Vol. 63, No 4:459-464. ISSN: 1348-7019

SARWAT M., NABI G., DAS S., SHANKAR P., 2012: Molecular markers in medicinal plant biotechnology: past and present. Critical Reviews in Biotechnology, Vol. 32: 74-92. ISSN: 0738-8551

SLUSARKIEWICZ-JARZINA A., PONTIKA A., KACZMAREK Z., 2005: Influence ofcultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica, 2 (47) ISSN: 1898-0295

SMALL E., 2015: Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. The Botanical Review, Vol. 81: 189-294. ISSN: 0006-8101.

SMALL E., CRONQUIST A., 1976: a Practical and Natural Taxonomy for *Cannabis.* Taxon, Vol. 25, No. 4: 405-435. ISSN: 00400262.

TAURA F., DONO E., SIRIKANTARAMAS S., YOSHIMURA K., SHOYAMA Y., MORIMOTO S., 2007: Production of Δ1-tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic Pichia pastoris. Biochemical and Biophysical Research Communications [online]. 361(3), 675-680. ISSN: 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.07.079. ISSN 0006291x. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07015665

TÖRJÉK O., BUCHERNA N., KISS E., HOMOKI H., FINTA-KORPELOVÁ Z., BÓCSA I., NAGY I., HESZKY L. E., 2002: Euphytica . **127**(2), 209-218 [cit. 2017-02-24]. DOI: 10.1023/A:1020204729122. ISSN: 0014-2336

TURNER C. E., ELSOHLY M. A., BOEREN E. G., 1980: Constitutents of *Cannabis sativa* L. 17. a review of the natural constituents. Journal of Natural Products, 43, 169- 234. ISSN: 0163-3864

VALÍČEK P., 2003: Léčivé rostliny a omamné drogy. Vol. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 94 s. ISBN: 80-7157-725-1.

VAN 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, Vol. 12: R102. ISSN: 1465-6906

VARSHNEY R. K., GRANER A., SORRELLS M. E., 2005: Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications. Trends in Biotechnology, Vol. 23: 48-55. ISSN: 0167-7799

VATSHNEY R. K., GRANER A., SORRELLS M. E., 2005: Genic Microsatellite Markers in Plants: Features and Applications. Trends in Biotechnology, Vol. 23: 48-55. ISSN: 0167-7799

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., LEE van de T., HORNES M., FRITERS A., POT J., PALEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, Vol. 23: 4407-4414. ISSN: 0305-1048

WANG Z., WEBER J. L., ZHONG G., TANKSLEY S. D., 1994: Survey of plant short tandem DNA repeats. Theoretical and Applied genetics, Vol. 88: 1-6. ISSN: 0040-5752

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A., TINGEY S. V., 1990: Dna polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, Vol. 18: 6531-6535. ISSN: 0305-1048

Zákon č. 167 ze dne 11. 6. 1998 o návykových látkách a změně některých dalších zákonů. In: Sbírka zákonů České Republiky. 1998, částka 57, s. 6770-6800. Dostupné z: http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?sn=y&hledany=167%2F1998&zdroj=sb98167&cd=76&typ=r

Zákon č. 273 ze dne 22. 8. 2013, kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a některé další zákony. In: Sbírka zákonů České republiky, 2013, částka 105, s. 2925-2939. Dostupné z: http://www.sagit.cz/pages/sbirkatxt.asp?sn=y&hledany=273%2F2013&zdroj=sb13273&cd=76&typ=r

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Karyotyp *Cannabis sativa* samčí a samičí rostliny (upraveno podle Divashuk *et al.*, 2014) 17

Obrázek 2: Idiogram haploidní sady chromozomů rostliny *Cannabis sativa*. (upraveno podle Divashuk *et al.*, 2014) 17

Obrázek 3: Zjednodušený fylogenetický strom čeledi tří rostlin *Cannabaceae se* zařazenými ideogramy (upraveno Divashuk *et al*., 2014) 18

Obrázek 4: Klasifikace markerů (upraveno Sarwat *et al*., 2012) 24

Obrázek 5: Nasnímaný polyakrylamidový gel, markery CAN0585 a CAN1347 36

Obrázek 6: Dendrogram genetické příbuznosti 41

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Charakterizace genotypů podle relativního obsahu THC a CBD 30

Tabulka 2: Charakteristika markerů použitých pro analýzy 32

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro 1 vzorek 33

Tabulka 4: Komponenty pro přípravu 1,5% agarózového gelu 34

Tabulka 5: Komponenty pro přípravu 8% polyakrylamidového gelu 35

Tabulka 6: Složení elektrolytu 35

Tabulka 7: Složení jednotlivých roztoků pro vizualizaci 35

Tabulka 8: Tabulka s maticemi pro jednotlivé SSR markery 39

Tabulka 9: Charakteristika analyzovaných mikrosatelitních markerů 39