

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



STUDIUM POLYMORFIZMU DNA KONOPI

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.

Vypracovala:

Barbora Balgová

Brno 2016

ZADÁNÍ

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: „*Studium polymorfizmu DNA konopí*“ vypracovala 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 ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, 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 ráda bych poděkovala svému vedoucímu Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za veškerou pomoc při zpracování bakalářské práce, za věcné připomínky, ochotu a vstřícnost při konzultacích, a za odborné vedení při experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Haně Gabrielové z firmy Hempoint a Dr. Arnu Hazekampovi z firmy Bedrocan za poskytnutí experimentálního materiálu.

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na studium genetické variability mezi jednotlivými vzorky kolekce konopí. Analyzováno bylo celkem 22 vybraných vzorků konopí pomocí 24 mikrosatelitních markerů založených na PCR. Bylo nalezeno celkem 105 alel, jejichž velikost se pohybovala od 100 do 320bp. Současně byl detekován jeden uniformní marker (CAN1690B), který není vhodný pro identifikaci vzorků konopí. Index diverzity (DI), polymorfni informační obsah (PIC) a index pravděpodobnosti (PI) byly vypočteny pro každý z mikrosatelitů. Na základě statistického vyhodnocení byl sestaven dendrogram podobnosti. Vzorky technického konopí a *Cannabis sativa* se podařilo oddělit od ostatních genotypů. Výsledky ukazují, že mikrosatelitní markery jsou užitečné pro detekci genetické rozmanitosti u konopí.

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

ABSTRACT

This work is focused on the study of genetic variability between *Cannabis* samples. 22 genotypes of hemp were analyzed with 24 microsatellite markers based on PCR. We found 105 alleles whose size ranged from 100 to 320bp. Uniform marker was detected (CAN1690B) and this marker was not suitable for identification genotypes of *Cannabis*. The diversity index (DI), the polymorphic information content (PIC) and the probability of identity (PI) were calculated for every microsatellite marker. Dendrogram of similarity was constructed on base of statistical evaluation. The samples of industrial hemp varieties and *Cannabis sativa* were separated from other genotypes. Results show usefulness of microsatellite markers for detection of genetic diversity in *Cannabis*.

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

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Konopí	11
3.1.1	Taxonomické zařazení a biologická charakteristika.....	11
3.1.2	Genetická charakteristika.....	13
3.1.3	Využití konopí	15
3.2	Markery.....	17
3.2.1	Využití DNA markerů	17
3.2.2	Rozdělení DNA markerů	18
3.2.3	Využití DNA markerů u konopí	19
4	MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1	Experimentální materiál.....	22
4.2	Metodika	22
4.2.1	Izolace rostlinné DNA	23
4.2.2	Příprava reakčních směsí pro PCR	23
4.2.3	Příprava agarózového gelu, elektroforéza a vizualizace produktů	25
4.2.4	Příprava polyakrylamidového gelu, elektroforéza, vizualizace produktů ..	26
4.2.5	Vyhodnocení výsledků	27
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.1	Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů	29
5.2	Genetická diverzita analyzovaných vzorků konopí	30
6	ZÁVĚR.....	33

7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
8	PREZENTACE VÝSLEDKŮ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	41
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	42
10	SEZNAM TABULEK	42

1 ÚVOD

Člověk a konopí (*Cannabis sativa* L.) se setkávají již po dlouhá tisíciletí. Konopí poskytuje široké spektrum vlastností s využitím ve většině průmyslových odvětví.

Záznamy o užívání konopí jako léku a omamném nástroji můžeme najít ve všech možných kulturách celého světa. V první polovině 20. století civilizovaná společnost začala konopí využívat především kvůli jeho psychedelickým účinkům. Proto bylo postupně státními systémy zakázáno a omezena byla také možnost konopí pěstovat, zpracovávat a distribuovat. Teprve v posledních desetiletích minulého století se jeho užití pro léčebné účely dostalo opět do popředí zájmů lékařů a vědců, kteří jej začali opět systematicky zkoumat. U konopí jako léku je velmi důležité znát nejen obsah látek, ale také jeho genetický původ a příbuznosti. Díky novým molekulárním metodám nastal velký posun v možnostech identifikovat konopí, určit jeho původ a v možnostech získání genotypů (odrůd) s vhodnými a lepšími terapeutickými vlastnostmi.

Jednou z takových molekulárních metod je genotypování pomocí SSR (Simple Sequence Repeats) markerů. Genetické profilování může být použito jako nástroj k identifikaci blízkce příbuzných druhů konopí. Tato práce je zaměřena na studium polymorfizmu DNA konopí s pomocí právě SSR markerů, které jsou založené na PCR. Dosažené výsledky mohou být dále využity při identifikaci jednotlivých genotypů nebo například ve šlechtění rostlin.

V posledních letech zájem zemědělců o pěstování technického konopí velmi vzrostl. Dnes je využíváno zejména v energetice jako biopalivo, ve stavebnictví díky jeho mechanickým vlastnostem a také jako izolant. Nadále jeho využití vzrůstá také v kosmetice a potravinářském průmyslu.

Rozvoj nejmodernějších biotechnologií, které pomohou zajistit konopí jako kvalitní a bezpečný lék, je v současné době velmi aktuálním tématem.

2 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo:

1. zvládnutí metod molekulární biologie, tzn. izolace genomické DNA konopí;
2. analýza genetické variability v kolekci konopí (*Cannabis* L.) pomocí mikrosatelitních markerů;
3. vyhodnocení a praktická interpretace výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Konopí

Cannabis sativa L. je jedním z mála rostlinných druhů s tak dlouhou historií využití. Je pěstováno nejméně posledních 10 000 let (Schultes et al., 1974). Pěstuje se především jako zdroj vlákna, kdy rostlina i vlákno jsou označovány jako “konopí”, a pro silice, kdy rostlina i příprava drog jsou souhrnně označovány jako “marihuana”. Studie vztahů mezi různými domestikovanými druhy a volně rostoucími rostlinami vedly k protichůdným interpretacím a evolučně odlišným klasifikacím, včetně rozdělení *Cannabis sativa* do několika údajných druhů (Small, 2015).

Dle nařízení Evropské komise je v Evropské Unii od roku 2001 povoleno pěstovat konopí na vlákno, avšak obsah tetrahydrokanabinolu (THC) v použitých odrůdách nesmí být vyšší než 0,2% (eur-lex.europa.eu).

V České republice povoluje zákon č. 167/1998, o návykových látkách a změně některých dalších zákonů, pěstovat druhy a odrůdy rostliny konopí, které obsahují nejvíce 0,3% THC, a to pouze k účelům průmyslovým, technickým a zahradnickým.

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

Na podzim roku 2015 byla postavena a otevřena první oficiální pěstírna konopí v zemi. Na začátku letošního roku 2016 byly v České republice vypěstovány první kilogramy léčebného konopí, které splňuje přísné podmínky a má přesně stanovený obsah kanabinoidů. Byly také rozšířeny lékařské specializace, které mohou konopí předepisovat (Fuksová, 2016).

3.1.1 Taxonomické zařazení a biologická charakteristika

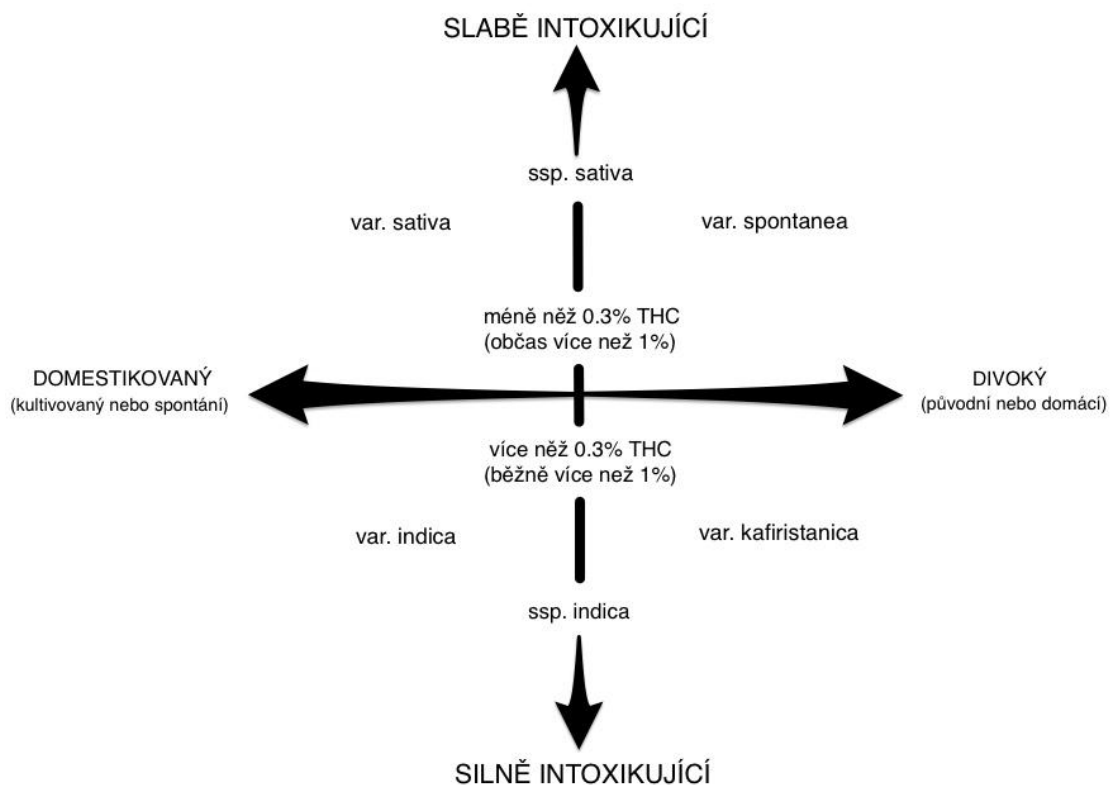
Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) patří do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*), do řádu růžotvarých (*Rosales*) (www.itis.gov).

Carl Linné poprvé odborně popsal *Cannabis sativa* L. a věřil, že se jedná o jediný druh tohoto rodu (Miovský, 2008). Kdežto Lamarck rozhodl, že indické druhy se liší od konopí evropského, a dal nové specifické jméno indickému konopí jako *Cannabis indica* (de Lamarck, 1785 cit Hillig, 2005). Small a Croquist (1976) určili *Cannabis* jako samostatný druh a rozdělili ho do poddruhů *Cannabis sativa* L. ssp. *indica* a *Cannabis sativa* L. ssp. *sativa*. Nedávno Hillig (2005) na základě výzkumů alozymů

prokázal, že *Cannabis* byla odvozena ze dvou hlavních genofondů. Tak rozpoznal, že *Cannabis sativa* a *Cannabis indica* jsou dva oddělené druhy.

Dva morfologické typy konopí, které běžně rozeznáváme jsou *Cannabis sativa*, která je vyšší, rozvětvenější a její variety se používají zejména na vlákno, a *Cannabis indica*, která je naopak nižší, má širší listy a její nejčastější užití je k rekreačním nebo k medicínským účelům (Fischedick et al., 2010). Další typ *Cannabis ruderalis* (konopí rumištní) je popisován jako nízká, málo rozvětvená rostlina s malým množstvím kanabinoidů. Zda jsou nebo nejsou tyto morfotypy různé druhy je stále předmětem diskuzí (Russo, 2007).

Jednotlivé druhy se také liší v množství obsahu THC. Podle Small a Cronquist (1976) má na obsah THC značný vliv domestikace (Obr. 1).



Obrázek 1: Klasifikace *Cannabis sativa* (upraveno Small a Cronquist, 1976)

Konopí seté je jednoletou dvoudomou rostlinou, což znamená, že na jedné rostlině jsou vytvářeny samičí a na druhé samčí květenství. Dlouholetou šlechtitelskou činností byly získány také jednodomé varianty. Ojedinele se můžeme setkat i s typy hermafroditními, které jsou neplodné (Miovský, 2008).

Sexuální dimorfismus je u konopí extrémně výrazný. Mezi pohlavím a celkovým vzhledem rostliny můžeme pozorovat velmi úzký vztah. Samičí rostlina je charakterizována jako více robustní a intenzivněji rozvětvená s květy blízko u sebe, které vytvářejí hrozny. Má poměrně dlouhou vegetační dobu, jejímž následkem jsou bujné dlouhověké listy. Samčí rostlina je méně robustní a méně náchylná k rozvětvení. Samčí květy tvoří latu, olistění je méně bujné a vegetační doba je o pět až sedm týdnů kratší než u samičí rostliny. Existují časté přechody mezi samičím a samčím habitem. Tyto přechodné formy jsou známy v literatuře jako intersexuální formy (Hoffman, 1961 cit Rode et al., 2005).

1. Intersexuální formy se samičím habitem:

- a) nesoucí výhradně samičí květy = dvoudomá samičí rostlina
- b) nesoucí samičí a oboupohlavné květy = oboupohlavní samičí rostlina
- c) nesoucí samičí, oboupohlavné a samčí květy = oboupohlavní jednodomá rostlina
- d) nesoucí samčí a samičí květy = jednodomá rostlina
- e) nesoucí výhradně oboupohlavné květy = oboupohlavné formy se samičím vzhledem
- f) samčí rostlina nesoucí výhradně samčí květy se samičím vzhledem

Všech šest intersexuálních forem můžeme také najít u rostlin se samčím vzhledem, což nám dává celkem dvanáct možných intersexuálních forem (Hoffman, 1961 cit Rode et al., 2005).

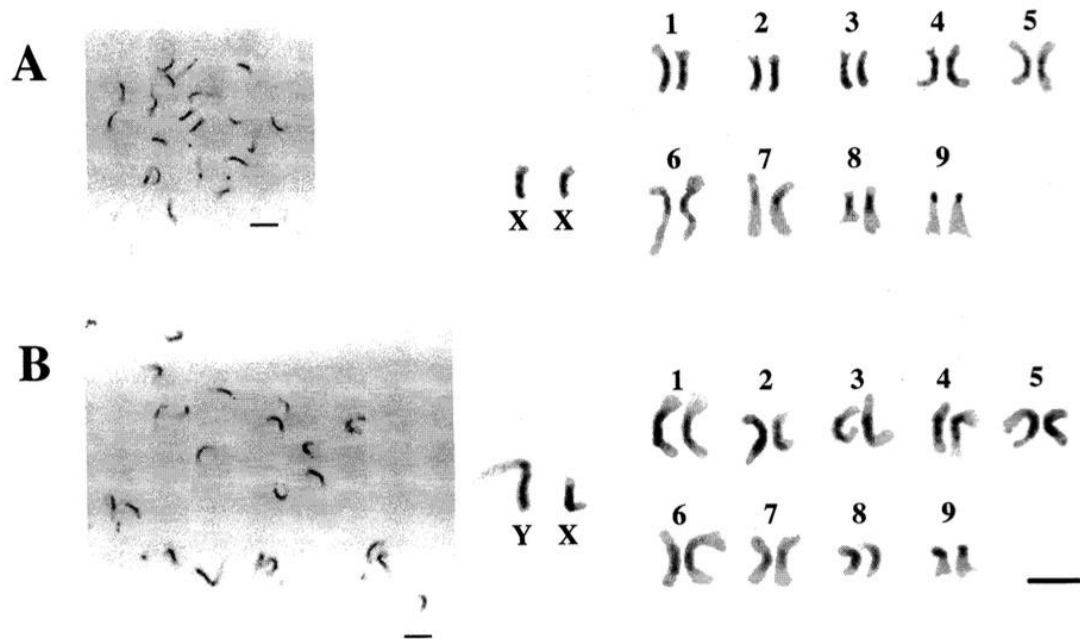
3.1.2 Genetická charakteristika

Pohlaví u *Cannabis* je řízeno pomocí X/Y mechanismu. Pohlavní chromozomové páry jsou homogametické (XX) u samičí rostliny a heterogametické (XY) u samčí rostliny (Hoffmann et al., 1985 cit Rode, 2005).

Cannabis je diploidní druh ($2n=2x=20$) s devíti páry autozomů plus pohlavními XX nebo XY chromozomy. Sakamoto et al. (1998) prokázali, že velikost genomu u diploidní samčí rostliny je 1683 Mbp a u samičí diploidní rostliny je 1636 Mbp. Tato velikostní odlišnost mezi genomy (47 Mbp) není obvykle zjistitelná pomocí klasických mikroskopických technik. Sekvenační výsledky potvrzují dřívější Hoffmanova (1961 cit Rode et al., 2005) pozorování, že Y je větší než X, čímž vysvětlují velikostní rozdíl mezi genomem samčí a samičí rostliny. Y je větší díky stovkám kopií retrotranspozomů

bez dlouhých koncových repetic, které se během evoluce naakumulovaly na jeho dlouhém ramenu (Ming et al., 2011).

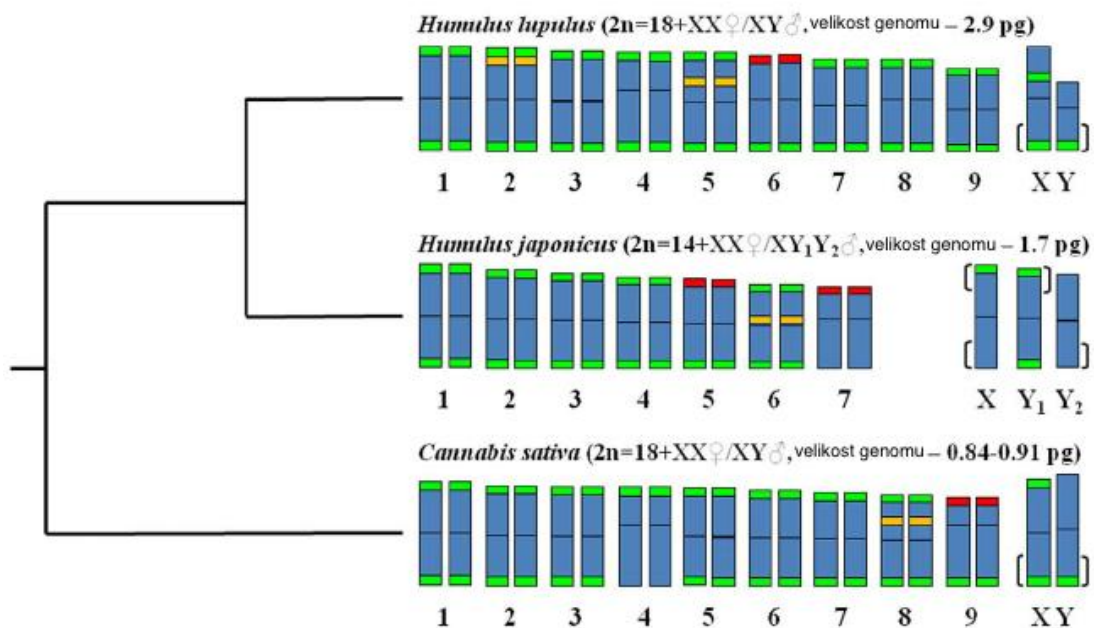
Sakamoto et al. (1998) popsali v prometafázi samčí i samičí kondenzované chromozomy pomocí Giemsova barvení (Obr. 2). Chromozom Y je subtelocentrický a je u něj typický satelit na konci kratšího ramene. X chromozom byl objeven submetacentrický a má také satelit, který můžeme najít na krátkém konci ramene.



Obrázek 2: Chromozomy a karyogram s X a Y chromozomy *Cannabis sativa* v prometafázi (Sakamoto et al., 1998)

A) samičí B) samčí, naznačená čára má velikost $5\mu\text{m}$

Divashuk et al. v roce 2014 publikovali molekulárně cytogenetickou studii, která charakterizovala všechny chromozomy, včetně pohlavních, a určila jejich velikost. Ta se pohybovala v rozmezí od 2,6 do 3,8 μm . Ne všechny chromozomy se ale podařilo rozlišit podle jejich délky a pozice centromery. Během výzkumu byla také provedena fylogenetická srovnávací analýza v rámci čeledě *Cannabaceae* mezi *Humulus lupulus*, *Humulus japonicus* a *Cannabis sativa* (Obr 3). Tuto studii můžeme považovat za základní kámen ve studiu evoluce pohlavních chromozomů konopí a také možného využití *Cannabis* jako modelového organismu.



Obrázek 3: Zjednodušený fylogenetický strom čeledi *Cannabaceae* s ideogramy (upraveno Divashuk et al., 2014)

3.1.3 Využití konopí

Cannabis sativa L. je přadnou a olejnatou kulturní rostlinou. Kromě květů, které obsahují látky s léčebnými účinky, poskytuje nutričně bohaté olejnaté semeno a stonek obsahující lýková vlákna. Člověk využívá kvalit těchto surovin nepřetržitě od raného starověku (Mioviský, 2008).

3.1.3.1 Technické konopí

Cannabis sativa L. komerčně pěstovaná pro vlákno, semena a jako víceúčelová plodina je celkově nazývána jako technické konopí (Singh, 2010).

Konopná vlákna jsou používána v širokém spektru produktů zahrnující tkaniny a textilie, příze, lana, papír, koberce, domácí zařízení, konstrukční a izolační materiál nebo automobilové součástky. Konopné semeno a pokrutiny se využívají především v jídle nebo nápojích a jsou výborným zdrojem bílkovin. Olej z konopného rozdrceného semene je jednou ze složek výrobků pro péči o tělo a také doplňků stravy. Konopné semeno se dále používá pro průmyslový olej nebo ve farmacii (Johnson, 2014).

3.1.3.2 *Medicinální konopí*

V dnešní době většina národů považuje *Cannabis* za celosvětově zneužívanou ilegální drogu. I přes její zneužívání, výzkum konopí dokázal, že má také léčebné vlastnosti. Díky chemické analýze v letech 1940-1960 byla objevena skupina terpenofenolických sekundárních metabolitů, známé jako kanabinoidy (Pertwee, 2006). Obecně jsou chápány jako látky se schopností vázat se na receptory, které jsou součástí endokanabinoidního systému (Howlett et al., 2004).

Hlavní psychoaktivní látkou je THC, respektive jeho forma trans-(-)- Δ^9 -THC (Pertwee, 2006). Kromě THC je ještě jedna látka, která je produkována ve vysokých koncentracích některými rostlinami, a tou je kanabidiol (CBD) (Meijer et al., 2003 cit Thichak et al., 2011). Kanabidiol není psychoaktivní látkou, ale nedávno bylo dokázáno, že inhibuje účinek THC (Zuardi et al., 2006). Obě látky jsou nepřírozně odvozeny pomocí neenzymatické dekarboxylace z jejich původních kyselin, Δ^9 -tetrahydrokanabinolické kyseliny a kanabinolické kyseliny (Taura, 2007).

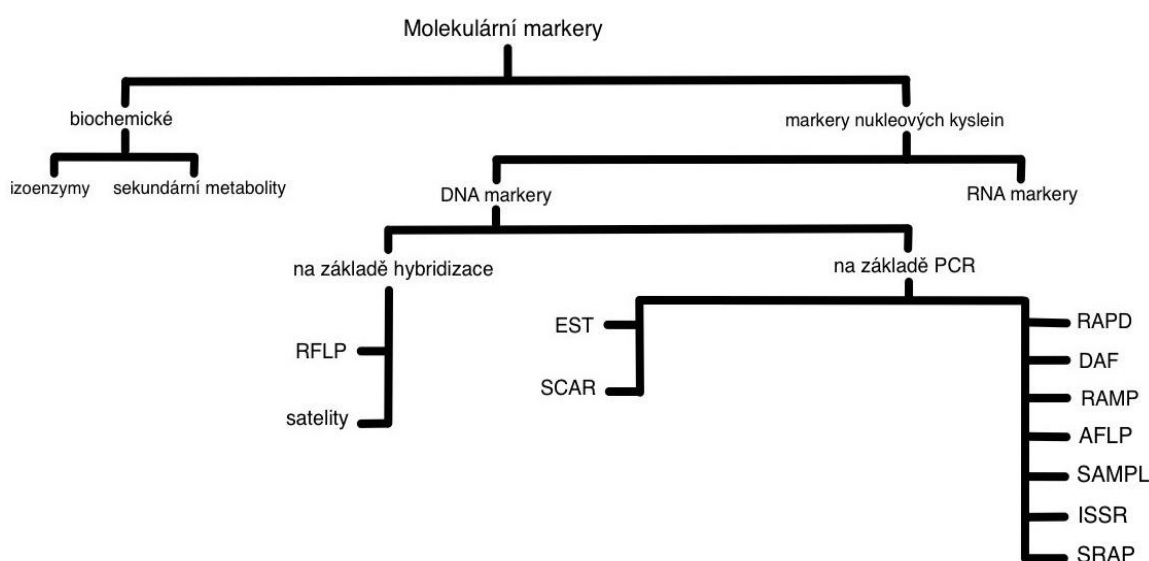
Z chemického hlediska založeném na CBD/THC poměru konopí existuje ve třech hlavních typech. První forma je definována jako drogový typ a má nízkou koncentraci CBD a vysokou THC. U druhého typu je poměr CBD/THC blízko 1, běžně ale dosahuje od 0,5-0,3. A za třetí je to typ nazývaný jako „fiber“, u kterého je vysoký obsah CBD a nízký THC (Pacífico et al., 2006).

Klinické studie konopí, čistých kanabinoidů a syntetických analogů prokázaly jejich účinnost jako analgetik pro chronické neuropatické bolesti, jako chuť stimulační látky pro pacienty s rakovinou, AIDS a roztroušenou sklerózou (Ben Amar, 2006). Konopí se dále využívá k léčbě zeleného zákalu, epilepsie, Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby, Alzheimerova onemocnění, autoimunitního onemocnění revmatoidní artritidy a plno dalších (Miovský, 2008).

Medicínské užití konopí v dnešní době stále narůstá a v mnoha zemích vznikají oficiální programy, které poskytují pacientům bezpečný přístup ke kvalitnímu léčivému konopí. Důležitou otázkou, kterou je třeba zodpovědět, je, které z mnoha odrůd konopí jsou vhodné pro medicínské užití. Ve studii *Cannabis* – od kultivaru k chemovaru, se Hazekamp a Fishedick (2010) zaměřují na klasifikaci konopí na základě chemického složení.

3.2 Markery

Molekulární markery jsou užitečným nástrojem pro testování genetické variability a jsou velmi nápomocny při analýzách rostlin (Vatshney et al., 2005). Dělí se do dvou hlavních skupin, a to na biochemické markery a markery nukleových kyselin, zejména na bázi deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Obr. 4). Biochemické markery zahrnují izoenzymy a do jisté míry i sekundární metabolity. Obě tyto kategorie jsou založeny na expresi genů a jsou závislé na životní a vývojové fázi. DNA markery jsou neutrální a jsou nezávislé na jakékoliv životní či vývojové fázi. Proto mají DNA markery obrovskou výhodu nad biochemickými markery (Sarwat et al., 2012).



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

3.2.1 Využití DNA markerů

Za pomoci DNA markerů lze detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými buňkami, druhy nebo např. jedinci. DNA markery jsou založeny na polymorfismu sekvencí DNA. Jsou využívány např. pro DNA fingerprinting při zjišťování genetické čistoty osiva, ale i pro testování otcovství, genetické mapování, populační genetiku a při studiu evoluce na molekulární úrovni. Molekulární markery založené na DNA mají díky fyzikálním vlastnostem několik výhod. Například to, že DNA můžeme získat nejenom ze živých, ale i z mrtvých tkání, v případě rostlin z herbářových položek. Další výhodou je, že molekula DNA je natolik stabilní, že ji můžeme zachovat i po dobu několika miliónů let (Cano et al., 1993).

3.2.2 Rozdělení DNA markerů

DNA markery mohou být rozříděny do dvou hlavních skupin v závislosti na typu testu. Testem může být buď hybridizace nebo amplifikace. V prvním případě jsou profily DNA vizualizovány hybridizací restrikčního enzymu, který štěpí DNA se značenou sondou. Ta může být DNA nebo RNA fragment neznámého původu nebo sekvence. Markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) zahrnují *in vitro* amplifikaci určitých sekvencí DNA s pomocí lokusu specifické nebo libovolně zvolené oligonukleotidové sekvence (primeru) a termostabilní DNA polymerázy (Sarwat et al., 2012).

Mezi nejčastěji používané metody u konopí patří např. RFLP, RAPD, AFLP nebo SSR.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

Jedním z typů variabilní DNA sekvence je délkový polymorfismus restrikčních fragmentů (RFLP). RFLP vznikají na základě řezání DNA restrikčními endonukleázami (Becker et al., 2009 cit Machlin et al. 2012). Délka určitého fragmentu závisí na vzdálenosti mezi oběma místy štěpení. Fragmenty jednotlivců se mohou lišit na základě počtu opakujících se prvků. Pokud je použit restrikční enzym, který řeže jen zřídka, mohou vzniknout RFLP dlouhé až 35 000 bází (Machlin et al. 2012). Poprvé byly RFLP markery použity pro konstrukci genetických map (Botstein et al., 1980).

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Technika RAPD byla jednou z prvních modifikací PCR pro snímání a analýzu genomu (Williams et al., 1990). Tento postup detekuje nukleotidové sekvence polymorfismů v DNA za použití jediného primeru libovolné nukleotidové sekvence. Jednotlivé druhy primeru nasednou na genomickou DNA ve dvou různých místech komplementárních vláken templátu DNA a tím dojde k vytvoření PCR produktu. Tyto produkty jsou následně odděleny na agarovém gelu (Sarwat et al., 2012).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Tato technika je kombinací RFLP a RAPD. Je založena na selektivní amplifikaci souboru fragmentů DNA, který vznikl štěpením většinou dvěma endonukleázami. Fragmenty jsou vizualizovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (PAGE) nebo kapilární elektroforézou buď prostřednictvím autoradiografických

nebo fluorescenčních metod (Vos et al., 1995). Polymorfismus je zjišťován z rozdílů v délkách amplifikovaných fragmentů (Matthes a Edwards, 1998 cit Kumar et al., 2013).

SSR (Simple Sequence Repeats)

SSR markery mají řadu využití v genetice rostlin a v jejich šlechtění. A to zejména kvůli jejich reprodukovatelnosti, multialelické povaze, kodominantní dědičnosti a kvůli relativně hojnému a dobrému genomickému rozsahu (Powell, 1996). SSR, známé také jako mikrosatelitní opakování, se skládají z krátkých nukleotidových sekvencí (např. GTA), které se opakují mnohokrát v tandemu (...GTAGTAGTAGTA..). Počet opakování tandemových repetice se může lišit v sekvenci a mnoho takových variant (alel) se může vyskytovat v jedné populaci. Mikrosatelity (SSR) se skládají ze dvou až šesti nukleotidů, ale obvykle obsahují dva až tři nukleotidy. Mikrosatelitní primery vyvinuté pro jeden druh mohou být málokdy použity pro jiný nejbližší druh. Z tohoto důvodu je třeba rozvíjet mikrosatelitní primery pro každý druh zvlášť (Kumar et al., 2013).

3.2.3 Využití DNA markerů u konopí

DNA markery se u konopí využívají např. ke studiu genetické diverzity a variability, pro rozdělení vzorků konopí do konkrétních skupin podle geografického původu, k identifikaci pohlaví a ke studiu struktury pohlavních chromozomů. Dále se vědci zaměřují na přečtení genomu konopí.

Jagadish et al. (1996) využili RAPD metodu k rozlišení 51 vzorků *Cannabis sativa* a 2 vzorků *Humulus lupulus*. Analýza ukázala jasné rozdíly mezi chmelem a konopím a také rozdělila vzorky konopí do tří odlišných skupin. Tyto výsledky naznačily, že *Cannabis sativa* z různých geografických regionů má mezi sebou genetické rozdíly, které mohou být detekovány pomocí RAPD techniky.

U *Cannabis* byla použita RFLP metoda, která se ale při studiu genetické variability neosvědčila. Mandolino et al. (1999) použili metodu RFLP k identifikaci DNA markerů u samčího pohlaví u dvoudomého konopí. Bylo získáno několik rozdílných křížených vzorků, nicméně u žádného z nich nebyl prokázán polymorfismus spojený s pohlavím.

U *Cannabis sativa* bylo identifikováno šest specifických samčích RAPD markerů od MADC1 (male associated DNA sequences in *Cannabis sativa*) do MADC6 (Sakamoto et al., 1995; Mandolino et al., 1999; Törjék et al., 2002).

Sakamoto et al. (2005) ve svém článku popisují dva RAPD markery (MADC3, MADC4) a debatují o vztahu mezi jejich sekvencemi a o struktuře Y chromosomu. Na experiment bylo použito pět samčích a pět samičích rostlin. Ze 120 primerů pouze 17 přineslo fragmenty dlouhé 400-1500 bp. U 11 z těchto 17 specifických sond však nebyly prokázány rozdíly mezi DNA samčí a samičí rostliny.

Cílem Peil et al. (2003) bylo analyzovat polymorfismus pomocí AFLP markery na X a Y chromozomech a použít je k porozumění struktuře pohlavních chromozomů. Pět objevených markerů bylo umístěno na obou chromozomech. Dále v průběhu experimentu byl objeven velký počet markerů specifických pro samičí rostliny.

Rode et al. (2005) popisují ve svém článku pohlavní krátké tandemové repetice (SSR). Jeden SSR marker byl polymorfický v obou populacích, další dva markery byly polymorfické pouze v jedné ze dvou populací. Tři alely byly zjištěny pro dva SSR markery ukazující polymorfismus nejen mezi X a Y, ale taky mezi rozdílnými X chromozomy.

Gilmore a Peakall (2003) identifikovali 15 mikrosatelitů ze 48 vzorků *Cannabis sativa*. Tyto mikrosatelity měly vysokou variabilitu a vysoký informativní charakter. Jejich výsledky potvrzují užitečnost těchto markerů pro charakteristiku genetické rozmanitosti u pěstovaných a přírodních populací konopí.

U 11 mikrosatelitů, které byly objeveny ve studii Alghanim a Almirall (2003), bylo zjištěno, že jsou vhodné pro DNA typizaci a pro stanovení genetické příbuznosti konopí. Většina mikrosatelitních markerů byla složena z GA/CT dinukleotidů představujících 50% celkem.

Van Bakel et al. (2011) jako první osekvenovali DNA a RNA konopí z kmene Purple Kush (PK). Tento kmen má vysoký obsah THC a používá se pro medicínské účely. Genom byl osekvenován metodou Illumina (sekvenace *de novo*). Genomická DNA byla vyzolována z listů a použita na tvorbu knihovny pro sekvenování paired-end s adaptéry připojenými na koncích fragmentů. Sekvence byly následně doplněny o delší fragmenty knihovny pro sekvenování pomocí techniky 454. Pro charakteristiku transkriptomu konopí osekvenovali polyA a RNA z šesti typů tkání PK (z kořene, stonku, vegetativní části, pupene a z květů, které byly v rané a střední fázi kvetení). Po sekvenování byla data doplněna z knihovny komplementární DNA (cDNA).

Další částí výzkumu bylo srovnání genomické sekvence PK s genomy technických odrůd FIN-314 a USO-31 a srovnání transkriptomu květenství PK s transkriptomem květenství odrůdy Finola. Tato srovnání prokázala genetickou odlišnost mezi technickými a vysoko obsahovými typy.

Genomové sekvence nám nakonec mohou pomoci objasnit evoluční historii a molekulární dopad domestikace a pěstování na rod *Cannabis*. Jak už bylo řečeno, taxonomie konopí je velmi sporná, a proto by genotypování mohlo být využito pro sledování vztahu dvou domnělých skupin *sativa* a *indica* (Van Bakel et al., 2011).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Experimentální materiál

Pro experiment bylo použito 22 vzorků konopí. Kolekce zahrnovala šest odrůd technického konopí, které poskytla firma Hempoint, Ltd. - Bc. Hana Gabrielová. Zbytek kolekce pocházel z Nizozemí od Dr. Arna Hazekampa (Bedrocan) a obsahoval čtyři vzorky *Cannabis sativa*, čtyři *Cannabis indica*, čtyři vzorky konopných směsí a čtyři vzorky hybridů (tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled genotypů *Cannabis* použitých pro analýzy

Pořadí	Označení	Název	Typ
1.	TE1	Finola (finská odrůda)	technické konopí
2.	TE2	Tiborszálási (maďarská odrůda)	technické konopí
3.	TE3	Tisza (maďarská odrůda)	technické konopí
4.	TE4	Kompolti (maďarská odrůda)	technické konopí
5.	TE5	Kompolti hybrid TC (maďarská odrůda)	technické konopí
6.	TE6	Carmagnolu (italská odrůda)	technické konopí
7.	SA1	Arjan's Haze (obecně Haze)	sativa
8.	SA2	Amnesia Haze	sativa
9.	SA3	Sour Diesel	sativa
10.	SA4	Presidential O.G. (O.G. Presidential Kush)	sativa
11.	IN1	Great White Shark	indica
12.	IN2	Northern Light	indica
13.	IN3	Skunk +1 (obecně Skunk)	indica
14.	IN4	Royal Caramel	indica
15.	SM1	Special Queen	50/50 - hybrid
16.	SM2	Opium	50/50 – hybrid
17.	SM3	Mohan Ram	50/50 – hybrid
18.	SM4	Biddy Early	50/50 – hybrid
19.	HY1	Super Bud	hybrid (SAxIN, INxSA)
20.	HY2	Royal Medic	hybrid (SAxIN, INxSA)
21.	HY3	Big Bud XXL	hybrid (SAxIN, INxSA)
22.	HY4	Jack Herrer Automatic	hybrid (SAxIN, INxSA)

4.2 Metodika

Pracovní postup se skládal z následujících kroků:

- izolace rostlinné DNA;
- příprava reakčních směsí pro PCR;
- příprava agarózového gelu, elektroforéza a vizualizace produktů;
- příprava polyakrylamidového gelu, elektroforéza, vizualizace produktů;
- vyhodnocení výsledků.

4.2.1 Izolace rostlinné DNA

Genomická DNA technického konopí byla izolována z listů za pomoci kitu DNeasy Plant Mini Kit podle příslušného návodu (www.qiagen.com). DNA ze zbylých vzorků byla izolována stejným způsobem v Nizozemí a poslána do České Republiky.

Množství a čistota získané DNA byly změřeny pomocí přístroje Picodrop Spectrometr PICO100 (PicodropTM). Naměřené hodnoty byly dostatečně velké, a proto bylo možno přistoupit k navazujícím analýzám polymorfizmu.

4.2.2 Příprava reakčních směsí pro PCR

Pro analýzy bylo použito 24 SSR markerů. Prvních 8 „ANUCS“ bylo navrženo podle Gilmore a Peakall (2003). Zbylých 16 „CAN“ bylo použito podle Gao et al. (2014). Všechny markery i jejich velikosti, které byly uvedeny u autorů, jsou zaznamenány v tabulce 2.

Tabulka 2: Charakteristika markerů použitých pro analýzy

Název	Opakující se motiv	Primer (začínající - F) Primer (končící - R)	velikost produktu (bp)*
ANUCS201	(GA) ₂₆	GGTTCAATGGAGATTCTCGT CCACTAAACCAAAAGTACTCTTC	187
ANUCS202	(GA) ₂₀	AGGACCAATTTTGAATATGC AGAGAGGGAAGGGCTAACTA	161
ANUCS203	(CT) ₅₀	GCTCTTCTTATTAATTCTCCTT GAATATGATAAGACACAACCTTCATT	195
ANUCS204	(CT) ₂₆	TGGAAGATATGCAACTGGAG AACGAAGATAAGCACGAACA	150
ANUCS205	(CT) ₂₁	TTGACTAACCGCAAAGATA AAATTCAAAACCGATTCTCAG	168
ANUCS301	(TTA) ₁₅	ATATGGTTGAAATCCATTGC TAACAAAGTTTCGTGAGGGT	234
ANUCS302	(CAA) ₇ -(CAA) ₄	AACATAAACACCAACAACCTGC ATGGTTGATGTTTTGATGGT	147
ANUCS304	(CAA) ₇ TCA(TCT) ₇	TCTTCACTCACCTCCTCTCT TCTTTAAGCGGGACTCGT	173
CAN0039	(CAT) ₈	AGCGGCTAGCGTAACAGTAT GTCATTGGAAAGACCAGCTT	220
CAN0093	(GA) ₁₁	CAGTCTCTCAGATCAGACTACC AGCGGCTAGCGTAACAGTAT	211
CAN0110	(AT) ₁₀	GGGTAAAGCTTACGCAAAGT AACAAACAGTTGGACACCCT	111
CAN0126	(AATACC) ₃ (CAG) ₆	GAGTAAGAGAAGGCGAACCA CCTGTGTAACAGAAAACCCC	188
CAN0585	(ACTTCTATT) ₂ T(CAAAAC) ₃	TCATCATCATCCCTCCCTAT GGTCCATAGTTGGCTGATCT	221
CAN1347	(AAC) ₆ (ATC) ₇	TGTTTTAAGGCTCAGTCCC GGCAAAGGTAAAGCAAGTGT	133

Tabulka 2 (pokračování): Charakteristika markerů použitých pro analýzy

CAN1690B	(CAA) ₆ (CATCATAT) ₂	CAAACAGGGGAAAAGAGAGA ATGAAGCGTTGGTACTAGGC	237
CAN2913	(AAG) ₇	AGGAACACTTTGAAAGCGAG CGGTCATCTACCTTGAGCTT	130
CAN0010	(GTG) ₆	TCCAAACGTTTCTCTCTCC CTACTAACCCAATCAGACCCA	276
CAN0023	(AACAAAG) ₃ (AAGAACAAG) ₂	CTCACTGTGATAGTTGAGCTTC CCCAACTTCTGTTTCATTCC	224
CAN0031	(TA) ₉	GGGAGCTGCCTTCTATGTTA AGGGAAAAGCTTGACTGCT	288
CAN0051	(TCA) ₆	AACCCAAAAGAGCTGAGAGA CTCAGCAAGGTGAGTACACG	291
CAN0865	(TCTCTCTTC) ₂ (TC) ₉	CTTCTCTAATCCGATTCCCA GAACGAAGAAAACCCAGAAG	206
CAN1419	(CAGAAC) ₃ CAA(AACCAG) ₃	TGAGGATCATCATGGTTCAG TTTTCTTCTCCGCTACATC	270
CAN1660	(AATCCC) ₃ (AACCCC) ₄	AAGCCTTGAATCTCCAACAG TGAAGTGTGAAGATGATCGG	162
CAN2633	(TC) ₉	GGCAAACCTGTAGTGCTCTT GGAAGTTAGCACTGCAGACA	151

Reakční směs pro PCR byla připravena postupným přidáváním jednotlivých komponent (tabulka 3). Celkové množství reakční směsi bylo následně rozpipetováno po 24 μ l do mikrozkušavek a přidán 1 μ l předem připravené templátové DNA daného vzorku *Cannabis*. Po pečlivém uzavření byly mikrozkušavky vloženy do jamek termocykleru T3 (Biometra). Po uzavření termocykleru byl nastaven program s příslušným teplotním a časovým profilem. Pro ANUCS301, ANUCS302, ANUCS201 a ANUCS201: 10min inkubace při 94°C pro aktivaci *Taq* polymerázy, potom cyklus 15s při 95°C, 52°C po dobu 15s, poté 60s při 72°C, zopakováno 30x. Závěrečné prodloužení trvalo 5min při 72°C. Pro ANUCS203-205 a ANUCS304: inkubace 10min při 90°C, 15s při 95°C, 54°C po dobu 15s a 72°C po dobu 60s, celkem 30 cyklů po sobě. Závěrečné prodloužení opět trvalo 5min při 72°C (Gilmore a Peakall, 2003). Pro „CAN“ markery: délka inkubace byla 10min při 94°C, následný cyklus při 94°C trval 30s, 57°C po dobu 30s a 72°C po dobu 40s, zopakováno 35x. Závěrečné prodloužení proběhlo při 72°C po dobu 10min (Gao et al., 2014).

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro 1 vzorek.

Složky reakce	množství (μl)
deionizovaná H ₂ O	16,8
pufř	5
dNTP	0,1
primer (začínající – F)	1
primer (končící – R)	1
Taq polymeráza	0,1
Celkem	24

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

4.2.3 Příprava agarózového gelu, elektroforéza a vizualizace produktů

Po PCR byla izolovaná DNA zkontrolována na 1,5% agarózovém gelu. Před přípravou gelu byla sestavena elektroforetická vanička a spolu s hřebeny, které slouží na tvorbu jamek pro DNA, umístěna do zapnuté digestoře. 1,5% agarózový gel byl připraven následovně. V 1891,4ml destilované vody bylo rozmícháno 38,6ml 50x koncentrovaného pufru TAE (tris-acetátový pufř). Do láhve s hrdlem bylo ze vzniklého roztoku odlito 270ml a přidáno 4,2g agarózy. Celý obsah byl promíchán a přiveden k varu pomocí mikrovlnné trouby. Láhev s vroucím roztokem byla, za stálého míchání, pomalu ochlazována pod tekoucím proudem vlažné vody. Následně byly v digestoři do roztoku přidány 2μl ethidium bromidu. Obsah láhve byl poté vylit do vaničky a po odstranění bublin byly umístěny hřebeny. Gel tuhnul po dobu 15-20min v digestoři. Po vyjmutí hřebenů a odstranění gumových těsnění byla vanička přesunuta do elektroforetické vany a zalita zbytkem naředěného pufru TAE. Takto připravený gel byl přichystán na nanášení jednotlivých vzorků. Komponenty jsou uvedeny v tabulce 4.

Na horizontální gelovou elektroforézu jsme použili systém Agagel Maxi (Biometra). Vzorky DNA byly postupně rozpipetovány do jamek gelu po 8μl. Vana byla následně zakryta bezpečnostním krytem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Separace probíhala při napětí 80V, po dobu 1-2h.

Po ukončení elektroforézy 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 pufř)	50x	38,6ml
Agaróza (Serva, USA)	-	4,2g
Etidium bromid (Serva, USA)	10 mg/ml	2μl

4.2.4 Příprava polyakrylamidového gelu, elektroforéza, vizualizace produktů

Na polyakrylamidovém gelu byla provedena separace fragmentů k zjištění jejich velikosti, pro studium genetické diverzity mezi jednotlivými druhy *Cannabis*. Před přípravou samotného gelu byly sestaveny dvě soustavy elektroforetických skel. Skla, silikonová těsnění a hřebínky, byly důkladně omyty vodou a následně přetřeny etanolem. Mezi očištěná skla bylo vloženo silikonové těsnění. Následně byla skla zajištěna svorkami, aby nedošlo k vytečení roztoku gelu. Takto připravené soustavy byly umístěny do vertikální polohy. Následovala příprava gelu. Složení gelu je uvedeno v tabulce 5. Jednotlivé komponenty v tabulce je nutné přidávat v pořadí, v jakém jsou uvedeny. Jelikož APS (persíran amonný) začíná polymerační reakci, která je velmi rychlá, byl přidán až jako finální složka. Jednotlivé složky byly přidávány do kádinky s magnetickým míchadlem. Připravený roztok byl přelit přes okraj kádinky do vertikálně umístěných skel a mezi skla byl následně zasunut hřebínek, díky kterému byly vytvořeny jamky pro DNA. Polyakrylamidový gel tuhnul po dobu 30min. Během tuhnutí byl připraven roztok elektrolytu (tabulka 6). Po ztuhnutí gelu, byly vyjmuty hřebínky a jamky byly zality elektrolytem. Zbylý elektrolytický roztok byl nalit do elektroforetické aparatury.

Tabulka 5: Komponenty pro přípravu 8% polyakrylamidového gelu

Chemikálie	Zásobní koncentrace	Použité množství
Destilovaná H ₂ O	-	34,650 ml
TBE	10x	5ml
AKRYL/BIS	-	10ml
TEMED	-	334μl
APS	10%	334μl

Vysvětlivky: TBE – trisbáze (trishydroxymethylaminomethan; 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 ₂ O

Do dvou jamek, většinou do první a předposlední, ztuhlého gelu bylo napipetováno 12 μ l velikostního markeru (DNA ladder). Do zbylých jamek byly rozpipetovány vzorky po 12 μ l. 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 10min při 120V a druhá při 300V po dobu 60-120min v závislosti na velikosti separovaných amplikonů.

Vizualizace produktů na polyakrylamidovém gelu byla prováděna dusičnanem stříbrným (AgNO₃). Složení roztoků je uvedeno v tabulce 7.

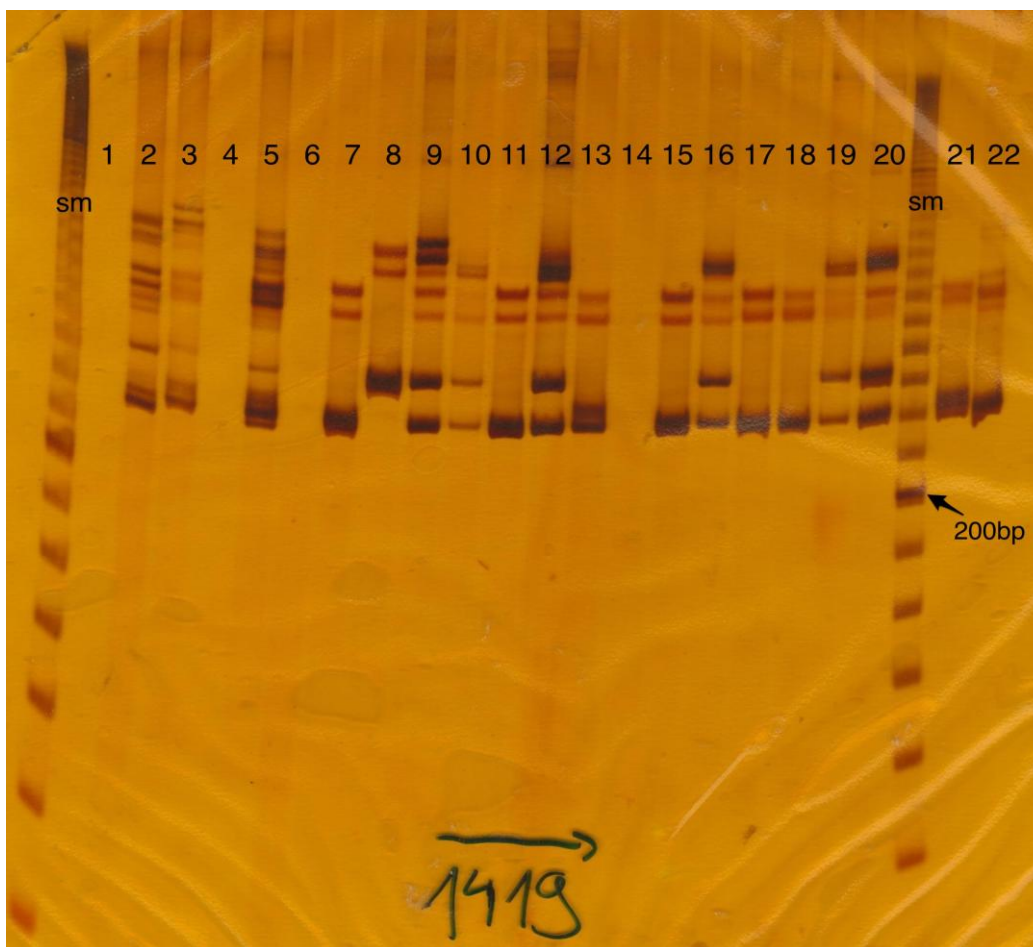
Tabulka 7: Složení jednotlivých roztoků pro vizualizaci

Fixační roztok	AgNO ₃	Vývojka
41,6ml etanolu 2ml kyseliny octové 356,4ml destilované H ₂ O	2g dusičnanu stříbrného 1000ml destilované H ₂ O	10ml 37% formaldehydu 22,2g NaOH 730ml destilované H ₂ O

Proces barvení probíhal v digestoři na třepacím přístroji. Po ukončení gelové elektroforézy byl nejdříve jeden a následně druhý gel přenesen ze skleněných desek do nádoby s fixačním roztokem. Nádoba byla umístěna na třepacím přístroji po dobu 1 minuty. Poté byl gel přenesen do nádoby s dusičnanem stříbrným, kde trvalo navázání stříbra 3 minuty. Gel byl následně 3x omyt destilovanou vodou a přenesen do nádoby s vývojkou. Po 5-10 minutách došlo k vizualizaci. Gely byly pro procesu barvení přeneseny na fólie, zataveny a naskenovány (Obr. 5) pro lepší vyhodnocení pomocí počítače.

4.2.5 Vyhodnocení výsledků

Výsledky analýz byly vyhodnoceny pomocí binární matice, kde byla zaznamenána přítomnost (1) či nepřítomnost (0) alel (tabulka 8). Matice byly dále zpracovány pomocí statistického softwaru FreeTree verze 9.1 (Hampl et al. 2001) pomocí UPGMA (metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů) a s využitím Jaccardova koeficientu podobnosti (Jaccard, 1908). Pro vizuální zpracování matice byl použit software TreeView verze 1.6 (Page, 1996). Statistické hodnoty DI (index diverzity), PI (index pravděpodobnosti) a PIC (polymorfní informační obsah) byly vypočteny pro každý z mikrosatelitů podle Russell et al. (1997).



Obrázek 5: Nasnímaný polyakrylamidový gel, marker CAN1419

Vysvětlivky: sm- velikostní markery (DNA ladder); 1 - Finola, 2 - Tiborszálási, 3 - Tisza, 4 - Kompoli, 5 – Kompoli hybrid TC, 6 – Carmagnola, 7 – Arjan’s Haze, 8 – Amnesia Haze, 9 – Sour Diesel, 10 – Presidential O. G., 11 – Great White Shark, 12 – Northern Light, 13 – Skunk +1, 14 – Royal Caramel, 15 – Special Queen, 16 – Opium, 17 – Mohan Ram, 18 – Biddy Early, 19 – Super Bud, 20 – Royal Medic, 21 – Big Bud XXL, 22 – Jack Herrer Automatic

Tabulka 8: Ukázka binární matice pro marker CAN1419

Marker																					suma	Počet alel		
CAN1419	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	10	4
CAN1419	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	12	
CAN1419	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	5	
CAN1419	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4	
Velikost (bp)	240-260																							
DI	0,703																							
PI	0,114																							
PIC	0,664																							

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

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů

Pro analýzy kolekce 22 vzorků *Cannabis* bylo použito celkem 24 SSR markerů. V průměru se mikrosatelity v rostlinné DNA vyskytují každých 33kb (Wang et al., 1994). Rozdíly mezi jednotlivými rostlinami mohou být způsobeny změnami ve struktuře genomu (Cordeiro et al., 2000). Během analýz byl detekován jeden uniformní SSR marker (CAN1690B). Tento marker není vhodný pro identifikaci vzorků konopí v naší kolekci. Velikost alel se pohybovala v rozmezí od 100 do 320bp (tabulka 9) Během analýz byl v porovnání s Gao et al. (2014) zjištěn velikostní rozdíl až 70bp u markerů CAN1337, CAN1419, CAN2913, což mohlo být způsobeno použitím rozdílných genotypů, kde se nacházely i směsné vzorky. Nejvíce alel bylo zjištěno pomocí markerů ANUCS204 (7) a CAN0110 (7). Celkem bylo nalezeno 105 rozdílných alel s průměrem 4,375 na lokus. Podobnou hodnotu zjistili Alghanim a Almirall (2003), kdy průměr počet alel na lokus byl o něco vyšší, a to 4,7. Zato Gao et al. (2014) uvádí nižší hodnotu, a to 2,87 alel na lokus, což mohlo být způsobeno použitím vzorků pouze *Cannabis sativa*.

Byly vyhodnoceny statistické ukazatele jednotlivých SSR markerů v souboru konopných vzorků. Hodnoty DI byly vyšší než 0,80 u šesti SSR markerů (ANUCS203, ANUCS205, CAN0039, CAN0093, CAN0110, CAN2913) a hodnoty PIC byly vyšší než 0,80 u pěti markerů (ANUCS20, CAN0039, CAN0093, CAN0110, CAN2913). Zároveň měly všechny tyto markery nižší hodnotu PIC než 0,06. Všechny uvedené markery jsou vhodné pro identifikaci genotypů technického konopí. Můžeme je tedy využít pro sestavení panelu mikrosatelitů pro identifikaci vzorků konopí v našem souboru. Nejlepším markerem, s nejvyšší hodnotou DI a PIC (0,926) a nejnižší hodnotou PI (0,004) byl marker CAN2913. Naopak SSR marker CAN1690B měl hodnoty DI a PIC= 0 a PI= 1, což znamená, že není vhodný pro studium genetické variability. Kayis et al (2010) srovnávali účinnost ISSR a RAPD markerů pro studium genetické variability konopí u vzorků pocházejících z Turecka. Uvedli pro ISSR markery hodnotu PIC= 0,25 a pro RAPD PIC= 0,28, což je téměř třikrát menší než PIC uvedené v tabulce 9. Nízké hodnoty PIC oproti našim výsledkům by mohly být způsobeny použitím pouze vzorků *Cannabis sativa*.

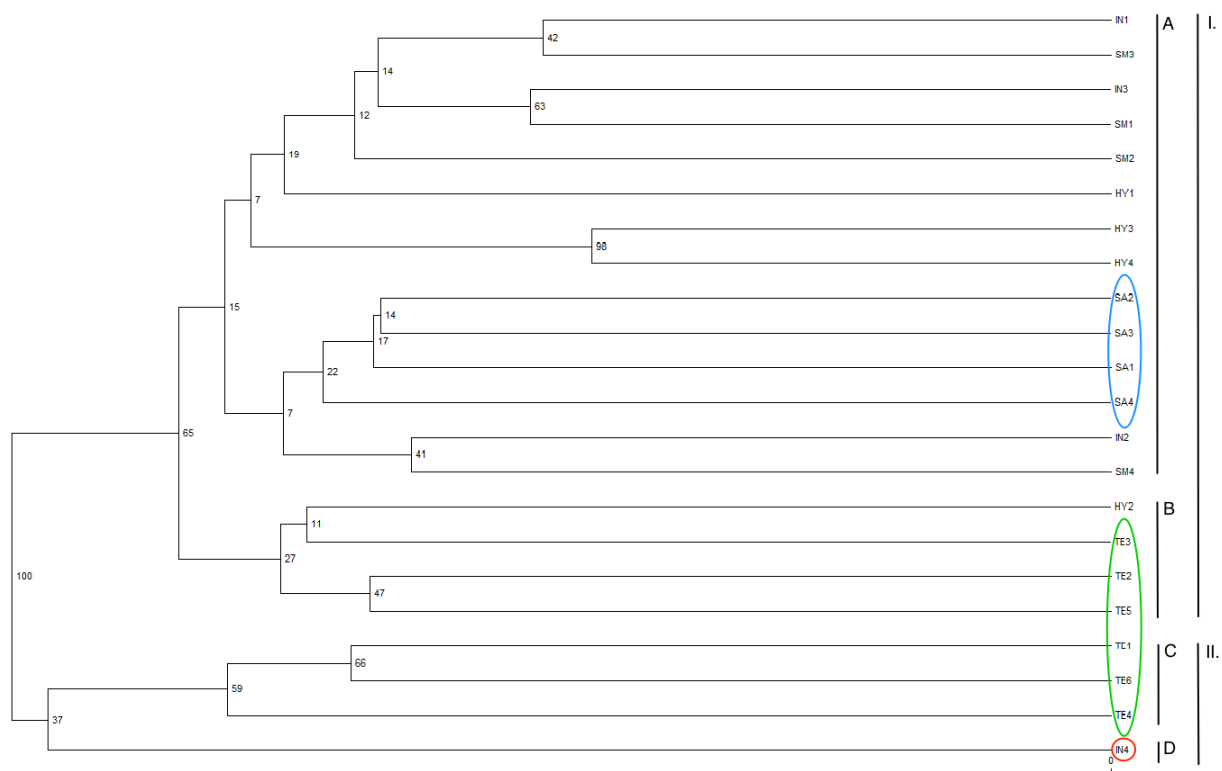
Tabulka 9: Charakteristika analyzovaných mikrosatelitních markerů

SSR marker	Velikost alel (bp)	Počet alel	DI	PI	PIC
ANUCS201	140-200	6	0,690	0,090	0,680
ANUCS202	140-200	5	0,730	0,090	0,720
ANUCS203	120-200	5	0,801	0,052	0,784
ANUCS204	100-180	7	0,780	0,040	0,770
ANUCS205	120-180	5	0,839	0,027	0,830
ANUCS301	200-260	4	0,576	0,200	0,539
ANUCS302	140-160	6	0,770	0,040	0,760
ANUCS304	140-200	4	0,740	0,070	0,720
CAN0039	200-240	4	0,856	0,020	0,852
CAN0093	200-230	5	0,874	0,012	0,874
CAN0110	100-130	7	0,907	0,007	0,906
CAN0126	160-180	4	0,662	0,147	0,620
CAN0585	200-220	4	0,611	0,216	0,542
CAN1347	200-220	4	0,491	0,248	0,490
CAN1690B	220	1	0,000	1,000	0,000
CAN2913	100-120	5	0,926	0,004	0,926
CAN0010	240-270	3	0,532	0,294	0,453
CAN0023	180-220	3	0,510	0,267	0,469
CAN0031	220-300	5	0,690	0,118	0,648
CAN0051	280-320	4	0,603	0,091	0,596
CAN0865	180-200	3	0,370	0,397	0,355
CAN1419	240-260	4	0,703	0,114	0,664
CAN1660	160	2	0,236	0,612	0,208
CAN2633	140-160	5	0,760	0,081	0,736
Průměr		4,375	0,652	0,177	0,631

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

5.2 Genetická diverzita analyzovaných vzorků konopí

Statisticky lze vyhodnotit genetickou diverzitu analyzovaného souboru pomocí vytvoření dendrogramů podobnosti (Henry, 2001). Proto byl i na vyhodnocení rozdílů mezi 22 genotypy *Cannabis* sestaven dendrogram (Obr. 6). Vzorky konopí se rozdělily do dvou shluků (I. a II.), kdy druhý (II.) obsahoval čtyři genotypy (TE1, TE6, TE4 a IN4) a první všechny ostatní genotypy. Shluk I. byl následně rozdělen na dva podshluky (A,B). Na obrázku dendrogramu lze vidět, že se podařilo oddělit v podshluku A vzorky *Cannabis sativa* (SA1-4) od ostatních genotypů. Shluk II. byl také rozdělen do dvou podshluků (C,D), kdy podshluk D obsahoval pouze jediný vzorek a to *Cannabis indica* (Royal Caramel). Oddělit se povedlo odrůdy technického konopí (TE1-6) od zbývajících genotypů.



Obrázek 6: Dendrogram genetické podobnosti

Vysvětlivky: I. a II. – shluk, A,B,C,D – podshluk, TE1 - Finola, TE2 - Tiborszálási, TE3 - Tisza, TE4 - Kompoli, TE5 – Kompoli hybrid TC, TE6 – Carmagnola, SA1 – Arjan’s Haze, SA2 – Amnesia Haze, SA3– Sour Diesel, SA4 – Presidential O. G., IN1 – Great White Shark, IN2 – Northern Light, IN3 – Skunk, IN4 – Royal Caramel, SM1– Special Queen, SM2 – Opium, SM3 – Mohan Ram, SM4 – Biddy Early, HY1 – Super Bud, HY2 – Royal Medic, HY3 – Big Bud XXL, HY4 – Jack Herrer Automatic

S pomocí SSR marekrů se podařilo Gao et al. (2014) rozdělit *Cannabis sativa* do čtyř skupin podle jejich geografického původu. Pomocí techniky RAPD-PCR se podařilo Jagadish et al. (1996) rozdělit *Cannabis sativa* do tří skupin podle tří geografických regionů. Pinarkara et al. (2009) rozděлил vzorky psychoaktivního konopí do dvou skupin podle původu, a to ze západního a východního Turecka. V rámci námi analyzovaných odrůd technického konopí nebyl zjištěn vliv provenience, tzn. původu odrůdy. U dalších vzorků pocházejících z Holandska nebylo možné tuto analýzu realizovat.

Vzorky *Cannabis sativa* pocházející z Holandska se vyznačovaly vysokým stupněm podobnosti (skupina v rámci podshluku I.A), což se nedá konstatovat o vzorcích *Cannabis indica*. Naše výsledky tak částečně korespondují se studií Pilluza et al. (2013), kde kolekce obsahovala vzorky *Cannabis sativa* i *Cannabis indica* a bylo sledováno především rozdělení do shluků podle způsobu využití. Pomocí RAPD metody se podařilo rozdělit vzorky do 8 shluků, kdy šestý obsahoval pouze konopí s využitím

na vlákno. Například Thichak et al. (2011) rozdělil 100 vzorků konopí na typ „fiber“ a typ „drug“ pomocí mnohonásobné PCR.

Nebyl nalezen vztah mezi jednodomostí a dvoudomostí analyzovaných odrůd technického konopí s testovanými SSR markery. Slánská (2016, ústní sdělení) tuto skutečnost popisuje v rámci analýzy stejných SSR markerů u kolekce genetických zdrojů technického konopí pocházejících z kolekce Agritec, s. r. o. Šumperk.

6 ZÁVĚR

Cannabis sativa L., neboli konopí, je známou rostlinou s širokou škálou využití od nepaměti lidstva. Nezanedbatelný je význam konopí pro medicínu. V dnešní době je tato kontroverzní rostlina nejdiskutovanějším tématem odborníků i široké veřejnosti.

Bakalářská práce byla zaměřena na studium polymorfizmu DNA konopí. Jejím cílem bylo vyhodnocení genetické variability v kolekci konopí pomocí mikrosatelitních markerů. Pro výzkum byly využity metody molekulární biologie, jako je izolace genomové DNA, PCR nebo elektroforetická separace.

Experimentální část bakalářské práce probíhala v laboratoři molekulární biologie na Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

Kolekce konopí obsahovala 22 genotypů konopí, které byly analyzovány pomocí 24 SSR markerů. Při vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů byl zjištěn jeden uniformní marker, který byl nadále shledán jako nevhodný pro zjišťování genetické variability konopí. Bylo detekováno celkem 105 rozdílných alel a průměrem 4,375 alel na lokus. Jejich velikost se pohybovala od 100 do 320bp. Nejvíce alel bylo zjištěno pomocí dvou markerů (ANUCS204, CAN0110). U všech mikrosatelitních markerů byly vypočteny statistické hodnoty DI, PI a PIC. Pomocí těchto hodnot bylo nalezeno 5 markerů, které jsou vhodné pro vyhodnocení genetické rozmanitosti.

Genetická diverzita byla statisticky vyhodnocena pomocí dendrogramu podobnosti. Ten nám rozdělil vzorky konopí do dvou shluků a ty následně na čtyři podshluky. Čtvrtý podshluk D obsahoval jediný vzorek a to *Cannabis indica*. Od ostatních genotypů se nám podařilo oddělit konopí technické a *Cannabis sativa*. U technického konopí se bohužel nepodařilo nalézt vztah mezi jednodomostí a dvoudomostí.

Pro lepší a přesnější výsledky by bylo vhodné rozšířit kolekci konopí a aplikovat větší počet mikrosatelitních markerů.

Všechny mé získané zkušenosti během vypracování bakalářské práce bych velice ráda využila při zpracování práce diplomové.

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

BEN AMAR M., 2006: Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 105: 1-25. ISSN: 0378-8741

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

CANO R. J., POINAR H. N., PIENIAZEK N. J., ACRA A., POINAR JR G.O., 1993: Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* Vol. 363: 536-538. ISSN: 0028-0836

CORDEIRO G., TAYLOR G., HENRY R., 2000: Cordeiro G. M., Taylor G. O., Henry R. J., 2000. Characterisation of Microsatellite Markers from Sugarcane (*Saccharum* sp.), a Highly Polyploid Species. *Plant Science*, Vol. 155: 161-168. ISSN: 0168-9452

DIVASHUK M. G., ALEXANDROV O. S., RAZUMOVA O. V., KIROV I. V., KARLOV G. I., 2014. Molecular cytogenetic Characterization of the Dioecious *Cannabis sativa* with an XY Chromosome Sex Determination System. *PLoS ONE*, 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>

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

FUKSOVÁ, J., 2016: Česko má léčebné konopí, ve Slušovicích vypěstovali prvních jedenáct kilo. In: Idnes.cz [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://zlin.idnes.cz/cesko-ma-lecebne-konopi-vypestovali-ho-ve-slusovicich-pfh-/zlin-zpravy.aspx?c=A160326_2235061_zlin-zpravy_ppr

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

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

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

HENRY Robert James. *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. 1. vyd. Oxford: CABI Publishing, 2001, 344 s. ISBN: 0–85199–515–2

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

HOWLETT A. C., BREIVOGELB Ch. S., CHILDERSCS. R., DEADWYLERC S. A., HAMPSONC R. E., PORRINOC L. J., 2004: Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. Neuropharmacology, Vol. 47: 345-358. ISSN: 0028-3908

Integrated Taxonomic Information System [online]. 2015 [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19108

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

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

JOHNSON R.. Hemp as an Agricultural Commodity. *Congressional Research Service: Report* [online]. 2014 : 1-33 [cit. 2015-11-11]. Dostupné z: <http://www.votehemp.com/PDF/RL32725-20140214.pdf>

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

KUMAR A., MISRA P., DUBE A., 2013: Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites. *Parasitology Research*. Vol. 112: 457-466. ISSN: 14321955

MACHLIN E., RODRIGUEZ N., WHITE K.. DNA fingerprinting. Worcester Polytechnic Institute [online] 2012, : 1-71 [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: http://www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-082412-133340/unrestricted/Nicolas_Kevin_Emily_IQP_Final.pdf

MANDOLINO G., CARBONI A., FORAPANI S., 1999: Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Vol 98:86-92. ISSN: 0040-5752

MING R., BENDAHMANE, A., RENNER, S. S., 2011: Sex chromosomes in land plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, Vol: 62: 485-514, ISSN: 1543-5008

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

PACIFICO D., MISELLI F., MICHELER M., CARBONI A., RANALLI P., MANDOLINO G., 2006: Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*, Vol. 17: 257-268. ISSN: 1380-3743

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

PERTWEE, R. G., 2006: Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 147: S163–S171. ISSN: 0014-2999

PILLUZA G., DELOGU G., CABRAS A., MARCEDDU S., BULLITTA S., 2013: Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Vol. 60: 2331-2342. ISSN: 0925-9864

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

Qiagen [online]. 2015 [cit 2016-01-22]. Dostupné z:
<https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=95dec8a9-ec37-4457-8884-5dedd8ba9448&lang=en>

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

RUSSO, E. B., 2007: History of *Cannabis* and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 4: 1614–1648. ISSN: 1612-1880

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 Morphology of Sex Chromosomes in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Cytologia*, Vol. 63, No 4:459-464. ISSN: 1348-7019

SAKAMOTO K., SHIMOMURA K., KOMEDA Y., KAMADA H., SATOH S., 1995: A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiology*, Vol. 36: 1549-1554. ISSN: 0032-0781

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

SCHULTES R. E., KLEIN W. M., PLOWMAN T., LOCKWOOD T. E., 1974: *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University Herbaria*, Vol. 23, No. 9: 337-367. ISSN: 00068098.

SINGH B.P. *Industrial Crops and Uses*. 1. vyd. CAB International, 2010, 512s. ISBN: 13: 978 1 84593 616 7

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

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.

TAURA F., 2007: Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS. Letters*, Vol. 581: 2929-2934. ISSN: 0014-5793

THICHAK S., NATAKANKITKUL S., CHANSAKAOW S., CHUTIPOVGVIVATE S., 2011: Identification of Drug-Type and Fiber-Type of Hemp (*Cannabis sativa* L.) by Multiplex PCR. *Chiang Mai, Journal of Science*, Vol. 38: 608-618. ISSN: 0125-2526

TÖRJÉK O., BUCHERNA N., KISS E., HOMOKI H., FINTA-KORPELOVÁ Z., BÓSCA I., NAGY I., HESZKY L. E., 2002: Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. *Euphytica*, Vol. 127: 209-218. ISSN: 0014-2336

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

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>

ZUARDI A.W., CRIPPA J. A. S., HALLAK J. E. C., MOREIRA F. A., GUIMARAES F. S., 2006: Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 39: 421-429. ISSN: 1414-431X

8 PREZENTACE VÝSLEDKŮ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

V souvislosti s předkládanou bakalářskou prací a problematikou byly publikovány následující výsledky:

VYHNÁNEK, T., BALGOVÁ, B., PRESINSZKÁ, M., ŠTIASNA, K., TROJAN, V., MRKVICOVÁ, E., HŘIVNA, L., HAVEL, L., 2015: Využití mikrosatelitních markerů pro studium variability konopí. *Bulletin České společnosti experimentální biologie rostlin*, Vol. 1: 44. ISSN: 1213-6670.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Klasifikace <i>Cannabis sativa</i> (upraveno Small a Cronquist, 1976)	12
Obrázek 2: Chromozomy a karyogram s X a Y chromozomy <i>Cannabis sativa</i> v prometáfázi (Sakamoto et al., 1998)	14
Obrázek 3: Zjednodušený fylogenetický strom čeledi <i>Cannabaceae</i> s ideogramy (upraveno Divashuk et al., 2014)	15
Obrázek 4: Klasifikace markerů (upraveno Sarwat et al., 2012)	17
Obrázek 5: Nasnímaný polyakrylamidový gel, marker CAN1419	28
Obrázek 6: Dendrogram genetické podobnosti	31

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled genotypů <i>Cannabis</i> použitých pro analýzy	22
Tabulka 2: Markery použité pro analýzy, jejich sekvence a velikost jejich produktů....	23
Tabulka 3: Složení reakční směsi pro 1 vzorek.	25
Tabulka 4: Komponenty pro přípravu 1,5% agaróзовého gelu	25
Tabulka 5: Komponenty pro přípravu 8% polyakrylamidového gelu	26
Tabulka 6: Složení elektrolytu	26
Tabulka 7: Složení jednotlivých roztoků pro vizualizaci	27
Tabulka 8: Ukázka binární matice pro marker CAN1419	28
Tabulka 9: Charakteristika analyzovaných mikrosatelitních markerů	30