UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2022 **Daniel Král**

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Exprese genů zapojených do metabolismu ABA a auxinů během embryogeneze u konopí setého

Bakalářská práce

Daniel Král

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022 **Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Daniel KRÁL**
Osobní číslo:	**R19838**
Studijní program:	**B1501 Biologie**
Studijní obor:	**Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce:	**Exprese genů zapojených do metabolismu ABA a auxinů během embryogeneze u konopí setého**
Zadávající katedra:	**Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů
3. Založení embryokultur *in vitro* konopí setého (technického) *Cannabis sativa*
4. Morfologická pozorování vývojových zygotických embryí
5. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů
6. Zpracování multimediální prezentace k obhajobě bakalářské práce

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Anglické články z knihovny vedoucího

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

Datum zadání bakalářské práce: **20. dubna 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. července 2022**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice
tel.: +420 585 634 901
-2-

L.S.

22 -04- 2021

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 21. dubna 2021

Bibliografické údaje

Autor:	Daniel Král
Název práce:	Exprese genů zapojených do metabolismu ABA a auxinů během embryogeneze u konopí setého
Typ práce:	bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie, prezenční forma
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Rok obhajoby:	2022

Souhrn:

Tato bakalářská práce je zaměřena na téma embryogeneze u technického konopí setého (*Cannabis sativa* L.). Přináší poznatky ohledně změn v expresi vybraných genů nejen pouze v průběhu samotné embryogeneze *in vivo*, ale zkoumá i vliv kultivace *in vitro*. Studovány byly geny zapojené do metabolismu auxinů (*IAA-1, IAA-2, X15-1, X15-2*), kyseliny abscisové (*PYL4, PP2C-1*) a také 1 člen rodiny *LEA* genů – *CanLea34*. Vybrané geny mohou hrát důležitou roli při reakci na dehydrataci organismu a studium jejich exprese může být proto klíčové pro vývoj nových a odolnějších kultivarů konopí.

Míra exprese byla kvantifikována metodou RT-qPCR. Bylo potvrzeno, že se vybrané geny exprimují odlišně v závislosti na vývoji a kultivaci embrya. Po porovnání expresních profilů bylo zjištěno, že pro vývoj nezralých embryí mohou být podstatné geny *IAA-1, IAA-2* a *PYL4*. Pro plně maturová embrya byla charakteristická pouze zvýšená exprese genu *CanLea34*, která byla kultivací ještě mnohokrát znásobena. Celkově lze říci, že kultivace vedla k nárůstu exprese všech studovaných genů.

Klíčová slova:	*Cannabis sativa* L.; embryo; embryogeneze; embryokultury; auxin; ABA; RT-qPCR; genová exprese
Počet stran:	53
Jazyk práce:	český

Bibliograhic info

Author:	Daniel Král
Title:	Expression patterns of genes involved in ABA and auxin metabolism during embryogenesis in hemp
Thesis type:	bachelor thesis
Department:	Department of Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Study field:	Molecular and Cellular Biology, full-time form
Supervisor:	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Year of defense:	2022

Summary:

This bachelor thesis focuses on the embryogenesis of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). This paper illuminates the changes in expressions of observed genes in the process of embryogenesis (*in vivo*) and brings insight into the influence of its cultivation (*in vitro*). Genes studied for this paper were those implemented to the auxin metabolism (*IAA-1, IAA-2, X15-1, X15-2*), the abscisic acid (*PYL4, PP2C-1*) alongside one member of *LEA* gene family – *CanLea34*. The selected genes may take an important part in the response to dehydration of organism and the research on their expressions can be quintessential for developing new and more resilient cultivars of cannabis.

The measure of expression was quantified using the RT-qPCR method. Results confirmed the selected genes express differently depending on the development and cultivation of the embryo. A comparison of expression profiles showed that for the development of immature embryos, the genes (*IAA-1, IAA-2, PYL4*) are likely to be fundamental. Only a heightened expression of the *CanLea34* gene was characteristic for the fully developed embryos. In addition, this feature was significantly increased by cultivation. In conclusion, the cultivation led to the upsurge of expression of all studied genes.

Keywords:	*Cannabis sativa* L.; embryo; embryogenesis; embryo cultures; auxin; ABA; RT-qPCR; gene expression
Page count:	53
Thesis language:	Czech

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

V Olomouci dne ....

Velice rád bych tímto poděkoval svému vedoucímu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za vstřícnost a odborné vedení mé bakalářské práce. Poděkování za ochotnou pomoc při práci v laboratoři patří i dalším členům katedry botaniky, zejména však Ing. Josefu Baltazarovi Šenkyříkovi, který mě provázel celým experimentem.

Obsah

1 Úvod 1

2 Cíle práce 2

3 Literární přehled 3

3.1 Konopí (*Cannabis* L.) . . . 3

3.2 Dějiny konopí . . . 3

3.2.1 Původ rodu *Cannabis* . . . 3

3.2.2 Od domestikace po současnost . . . 4

3.3 Botanická charakteristika . . . 5

3.3.1 Morfologie konopí . . . 5

3.3.2 Taxonomie . . . 7

3.3.3 Dělení konopí . . . 8

3.3.4 Genetická charakterizace . . . 9

3.4 Embryogeneze rostlin . . . 10

3.4.1 Pohlavní generace . . . 10

3.4.2 Vývojové fáze embrya . . . 12

3.4.3 Embryokultury *in vitro* . . . 13

3.5 Molekulární aspekty . . . 15

3.5.1 Signální dráha auxinu . . . 15

3.5.2 Signální dráha kyseliny abscisové . . . 16

3.5.3 *LEA* geny . . . 17

4 Materiál a metody 19

4.1 Biologický materiál . . . 19

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky . . . 19

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení . . . 20

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy . . . 21

4.4.1 Izolace embryí a založení embryokultur *in vitro* . . . 21

4.4.2 Izolace RNA . . . 22

4.4.3 Ošetření RNA DNázou . . . 22

4.4.4 Gelová elektroforéza . . . 22

4.4.5 Reverzní transkripce 23
4.4.6 RT-qPCR 23

5 Výsledky **26**
5.1 Analýza morfologie vývojových zygotických embryí 26
5.2 Analýza genové exprese 27
5.2.1 Exprese genu *IAA-1* 28
5.2.2 Exprese genu *IAA-2* 29
5.2.3 Exprese genu *X15-1* 30
5.2.4 Exprese genu *X15-2* 31
5.2.5 Exprese genu *PP2C-1* 32
5.2.6 Exprese genu *PYL4* 33
5.2.7 Exprese genu *CanLea34* 34

6 Diskuse **35**

7 Závěr **38**

Literatura **39**

Seznam obrázků

1 Vývojové fáze rostlinné embryogeneze 14

2 *In vitro* embryokultury *Cannabis sativa* 'KC Dora' a 'USO 31' 27

3 Změna exprese genu *IAA-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 28

4 Změna exprese genu *IAA-2* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 29

5 Změna exprese genu *X15-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 30

6 Změna exprese genu *X15-2* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 31

7 Změna exprese genu *PP2C-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 32

8 Změna exprese genu *PYL4* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 33

9 Změna exprese genu *CanLea34* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya 34

Seznam tabulek

1 Taxonomie konopí 8

2 Složení reakčního mixu 23

3 Reakční podmínky RT-qPCR 24

4 Primery použité pro RT-qPCR 25

1 Úvod

Termín embryogeneze označuje proces, při kterém dochází ke vzniku a vývoji embrya. V tomto období dochází k ustanovení základního tělesného plánu rostliny, aniž by došlo k plné organogenezi. Rostlinná embryogeneze končí stadiem maturovaného embrya, jehož buňky se už přestávají dělit. Následně dochází k navození klidového stavu dormance, při kterém je metabolická aktivita potlačena na minimum. Takovéto semeno je u některých rostlinných druhů schopno vyčkávat na správné podmínky ke klíčení velice dlouhou dobu za cenu pouze nepatrné ztráty na klíčivosti. Konopí však mezi tyto rostliny nepatří.

Pěstování konopí není celkově náročné. Pro pěstitele je však nejen brzká ztráta klíčovosti semen problematická, jsou to i vysoké nároky na kvalitu půdy a na závlahu (v počátečním období růstu). Vzhledem ke zvyšujícímu se suchu jsou úrodné půdy v nížinách přednostně využívány pro pěstování náchylnějších plodin. Tím dochází k vytlačování konopných polí stále do vyšších poloh, kde se drží méně vlhkosti a vrstva humusu je menší. Dochází tak k poklesu kvality konopného materiálu a jeho produkce. Právě proto je tolik podstatné věnovat se a porozumět mechanismům vzniku tolerance na sucho. Poznatky ze zkoumání genů, jejichž exprese je ovlivněna hydratací rostliny, by mohly být podstatné pro šlechtitelské programy. Poptávka po odolnějších kultivarech konopí, u kterých sucho není tak limitujícím faktorem, by tak mohla být uspokojena.

2 Cíle práce

Teoretická část:

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů

Praktická část:

1. Založení embryokultur *in vitro* konopí setého (technického) *Cannabis sativa*
2. Morfologická pozorování vývojových zygotických embryí
3. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů

3 Literární přehled

3.1 Konopí (*Cannabis* L.)

Pro správnou orientaci v ne příliš jasné tematice konopí je třeba správně rozumět používaným termínům. Jak uvádí Small (2015), konopí označuje pouze rostlinu jako takovou. V souvislosti s využíváním konopí, jakožto zdroje psychoaktivních látek, může být sama rostlina označena jako marihuana a stejně tak přípravky z ní vyrobené.

Konopí (*Cannabis* spp.) je rostlinný druh, který nás provází životem již po tisíce let. Tato rostlina je jednou z nejvšestrannějších ve smyslu využití v průmyslu. V průběhu let jsme se naučili zpracovat a zužitkovat snad každou její část a stala se tak nedílnou součástí našeho života.

Lidmi je historicky využívána především pro svá velice pevná a dlouhá vlákna lýka. I nyní je podstatná část textilního průmyslu na této surovině závislá. V potravinářském průmyslu nachází využití především semena, jelikož jsou bohatým zdrojem bílkovin, rostlinných olejů, a pro lidi esenciálních nenasycených mastných kyselin. Tato rostlina produkuje také psychoaktivní a omamné látky, canabinoidy a jiné, díky kterým se dostala do obecného povědomí.

Canabinoidy mají veliký léčebný potenciál a hrají podstatnou roli při vývoji fytofarmak. I když užívání marihuany je nedílně spojeno s historií lidstva, nelze její negativní účinky na organismus zcela přehlížet. Jak uvádí Connor *et al.* (2021), poruchy z nadměrného užívání marihuany jsou podceňovaným rizikem. Zdravotní nebezpečí není tak vysoké jako u jiných drog, ale projevuje se až u 10 % ze 193 milionů uživatelů marihuany, což zastupuje podstatnou část osob.

3.2 Dějiny konopí

3.2.1 Původ rodu *Cannabis*

Není tomu dlouho, co jsme o původu konopí věděli pouze to, že ke vzniku došlo zhruba v oblasti Střední Asie. Nyní již víme, že se to s největší pravděpodobností událo v severovýchodní oblasti Tibetské náhorní plošiny v blízkosti jezera Qinghai. Tam se před 27,8 mil. let oddělil nový rod *Cannabis* od rodu *Humulus*. Následné šíření probíhalo směrem na západ a jeho přítomnost na území Evropy je datována k době před 6 mil. lety. Až poté

došlo k rozšíření do oblasti východní Číny (před 1,2 mil. lety) a Japonska (před 32,6 tisíci lety) (McPartland *et al*., 2019).

3.2.2 Od domestikace po současnost

Otázku první domestikace konopí objasnil Ren *et al.* (2021). S největší pravděpodobností lidé začali využívat konopí již před 10 tis. lety, tedy v období raného neolitu, což se odrazilo ve změně genetické výbavy druhu. To je v souladu s datováním nalezené keramiky v jižní Číně a Tchaj-wanu, která byla zdobena konopnými vlákny. Jak uvádí Mitchell (2014), archeologové se domnívají, že konopná vlákna se v tomto období rané doby kamenné již používala na výrobu oděvů a sloužila také jako materiál pro rybářské vlasce a tětivy luků. Konopná semena byla nalezena v keramice z Japonska (8 tis. let př. n. l.). Byly objeveny i další konopné artefakty na více místech Japonska a Číny (5,5 tis. let př. n. l.). Analýzy pylu nasvědčují tomu, že během doby bronzové došlo pouze k malému rozšíření domestikovaných forem konopí do Evropy a do oblasti Středního východu (Ren *et al.*, 2021).

V období starověku se tato rostlina začala uplatňovat i pro své euforické a opojné vlastnosti. Jako kadidlo sloužilo konopí v Asýrii, v Thébách se z konopí vyráběl nápoj s vlastnostmi podobnými opiu, Galén prohlašoval, že konopné dorty jsou ve větším množství omamné a mnohé hinduistické obřady byly spjaty s účinky konopí. Je pravděpodobné, že v Himálaji, v samé kolébce konopí na Tibetské náhorní plošině, nabyly omamné vlastnosti přípravků z konopí největší význam, a to v náboženském kontextu (Schultes a Hofmann, 1996). První zmínky o používání konopí čistě pro léčebné účely pocházejí z Indie z 9. stol. př. n. l. O 200 let později Skytové (kočovné kmeny obývající pontskou step) rozšířili pěstování konopí do Evropy. Na území Ameriky se tento trend dostal až později (17. stol.) zásluhou španělských kolonistů. Konopný materiál byl využíván námořníky na plachty, lana a obyvateli na výrobu oděvů. Během druhé světové války zájem o konopné výrobky vzrostl, ale později byla konopná vlákna nahrazena novými umělými materiály (Gabrielová, 2007).

Až do 30. let 19. stol. nebylo pěstování konopí nijak omezeno. V roce 1937 byl v USA prosazen zákon, který uvalil daň na prodej konopí. To byl začátek prohibiční politiky proti konopí, který vyústil téměř v celosvětové omezení pěstování. Podle nařízení Evropské komise je ve státech EU od roku 2001 povoleno pěstování konopí pouze za účelem zisku

vlákna a semen. Obsah THC[1] však nesmí být u odrůd vyšší než 0,2 %. I v následujících letech docházelo k rozvolňování konopných restrikcí.

V České republice dosáhlo pěstování konopí největšího rozmachu v 18. století. Důsledkem hospodářské krize kleslo množství osevních ploch na polovinu. Před začátkem 2. světové války však byl již tento výkyv vyrovnán a konopí se opět pěstovalo téměř na 9000 ha. Později se ale osívat konopím přestalo vyplácet a od roku 1955 bylo pěstování přesunuto do jiných zemí. Až koncem 20. stol. konopí začalo prožívat své období renesance. Lidé se začali touto rostlinou zabývat z hlediska moderních technologií a našla využití ve farmaceutickém průmyslu (Gabrielová, 2007). V roce 2013 byl schválen zákon, který mimo jiné nově legalizuje pěstování konopí pro lékařské účely.

3.3 Botanická charakteristika

Konopí seté (*Cannabis sativa*) L. je jednoletá a původně dvoudomá bylina o výšce nejčastěji 80-350 cm. Rostliny většiny odrůd tvoří tedy samčí a samičí květenství odděleně. Byly ale už vyšlechtěny jednodomé odrůdy, které nyní v zemědělství převládají. V přírodě se ojediněle vyskytují i neplodné hermafroditní rostliny (Miovský *et al.*, 2008).

Samičí rostliny obvykle dosahují větší výšky, nežli je tomu u rostlin samčích. Samičí rostliny jsou také více olistěné a celkově mají tmavší barvu, čemuž odpovídají i tmavozelené květy. Květy samčích rostlin jsou žluté. Samčí rostliny dozrávají až o měsíc dříve a za normálních podmínek populaci tvoří 53 % samčích a 47 % samičích rostlin (Pantůček, 2010).

3.3.1 Morfologie konopí

Stonek konopí je přímá lodyha, která může být až 6 m vysoká o síle od 3 mm do 60 mm. Lodyhy jsou zpočátku zelené (poté postupně hnědnou), duté a válcovité s podélným rýhováním. Podle typu konopí může být stonek čtyř- nebo šestihranný. U dospělé rostliny se počet internodií pohybuje v rozmezí 7–15. V korové oblasti se vyskytují lýkové provazce, které jsou velice dlouhé, pevné a pružné (Miovský *et al.*, 2008; Raman *et al.*, 2017).

[1] delta-9-tetrahydrocannabinol – nejhojnější kanabinoid konopí. Je jednou z mnoha chemických sloučenin obsažených ve vylučované pryskyřici a je odpovědná za hlavní psychoaktivní účinky konopí.

Řapíky jsou válcovité se střední rýhou podél horní strany a až 7 cm dlouhé. Stejně jako listy jsou i řapíky pokryty trichomy (Raman *et al*., 2017).

Listy jsou vstřícně postavené a dlanitě složené ze 3–13 lístků, které jsou úzké, podlouhlé, kopinaté, a velikost jejich řapíčků se pohybuje kolem 0,5 až 1,5 cm. Celkově mohou být až 20 cm dlouhé a 1,8 cm široké (Miovský *et al.*, 2008; Raman *et al*., 2017).

Květy samčích rostlin jsou světlezelené a vyskytují se buď jednotlivě, v hroznech, nebo ve 3květých latách, které se tvoří v paždí horních větví (úžlabní lata). Květ je složen z pěti okvětních plátků, pěti tyčinek a nese ho štíhlá stopka. Samičí květy jsou v porovnání se samčími tmavší, přisedlejší a obvykle se vyskytují v páru. Květy jsou těsně seskupené v horních částech rostliny a tvoří hustě olistěné hrozny. Samičí květy obsahují svrchní dvoupouzdrý semeník a dvě dlouhé nitkovité blizny (Miovský *et al.*, 2008; Raman *et al*., 2017).

Plodem konopí je vejčitá jednosemenná nažka. Obsah endospermu je poměrně malý a téměř celé semeno vyplňuje podkovovitě stočené embryo. HTS[2] se pohybuje v rozmezí 8–26 g (Miovský *et al.*, 2008).

Kořenový systém konopí je tvořen kolmo rostoucím kůlovitým kořenem, z něhož vyrůstají postranní kořeny, které se mohou dále větvit. Délka kořenového systému je dána kvalitou půdy a může dosáhnout hloubky 2 m i více (Miovský *et al.*, 2008).

Trichomy jsou přítomny na celé rostlině vyjímaje kořenový systém. Hammond a Mahlberg (1973) studovali konopné trichomy a jejich zásluhou byly objeveny 3 typy žláznatých trichomů, které byly označeny jako baňaté, baňaté se stopkou a baňaté přisedlé.

Nyní již na konopí rozeznáváme nejméně 6 typů trichomů, jak uvádí společnost Canna Media (2017). Vyskytují se jak žláznaté, tak bezžláznaté. Bezžláznaté trichomy chrání rostlinu primárně před mechanickým poškozením a byly detekovány jak jednobuněčné, tak mnohobuněčné s cystolitem [3]. Žláznaté trichomy jsou primárně zodpovědné za biosyntézu kanabinoidů a dalších biologicky aktivních látek. Produkovaná pryskyřice poskytuje rostlině přirozenou ochranu před býložravci, houbami a hmyzem. Pro mnohé organismy jsou produkované látky toxické. Žláznaté trichomy dále chrání rostlinu i před poškozením UV zářením. Dělíme je na objemové trichomy, které neprodukují kanabinoidy, dále na přisedlé a baňaté. Ty jsou nejčastější, ale neobsahují kanabinoidy o tak vysoké

[2]HTS – hmotnost tisíce semen. Slouží pro stanovení výsevu a pro orientační stanovení množství semen v gramu osiva.

[3]cystilot – výrůstek buněčné stěny, na kterém se ukládají silné vrstvy uhličitanu vápenatého.

koncentraci jako trichomy stopkaté. Žláznaté stopkaté trichomy se vyvíjejí až po vytvoření květu a nejvíce je jich přítomno právě na listenech samičích květů.

3.3.2 Taxonomie

O správné klasifikaci konopí se již mnoho let vedou spory a správné zařazení je dodnes předmětem mnoha diskusí. Konfliktní evoluční interpretace je způsobena křížením domestikovaných forem této rostliny s divoce rostoucími příbuznými. Lidským výběrem došlo k umělé selekci různých genotypů přes žádané fenotypy a v průběhu let docházelo neustále k hybridizaci. Jedná se o zajímavý evoluční jev symbiotického vztahu mezi lidmi a konopím, který je příčinou biologické evoluce této rostliny (Small, 2015).

Jak popisuje Miovský *et al.* (2008), z počátku byla klasifikace založena především na podobnosti v morfologických znacích a podle toho došlo k zařazení konopí do čeledi kopřivovitých (*urticaceae*). Další klasifikací bylo konopí zařazeno do čeledi morušovitých (*mareaceae*). Nyní se konopí řadí do čeledi, která byla podle této rostliny pojmenována. Do čeledi konopovitých rostlin (*cannabidaceae*) se dále řadí pouze jeden další rod, a to rod *Humulus*.

Cannabis sativa L. byla poprvé odborně popsána v roce 1737 švédským botanikem Carlem von Linné. O necelých 50 let později Jean Baptista de Lamarck popsal další druh konopí *Cannabis indica* L. A bezmála za dalších 40 let, roku 1924, objevil v Rusku botanik D. E. Janischewsky poslední druh konopí, které pojmenoval jako *Cannabis ruderalis* (Miovský *et al.*, 2008).

Small (2015) doporučuje, aby byl uznáván pouze jeden druh konopí, a to *Cannabis sativa*. V rámci tohoto druhu by se měly zařadit narkotické a nenarkotické poddruhy s jejich domestikovanými a volně žijícími odrůdami.

Nyní je uznáván jediný druh konopí – *Cannabis sativa* L. se dvěma poddruhy – *Cannabis sativa* subsp. *indica* (Lam.) Small Cronq. – konopí seté indické a *Cannabis sativa* subsp. *sativa* L. – konopí seté pravé. Zařazení bývalého druhu *Cannabis ruderalis* je dosud nejasné. Zatím se uvádí jako varieta *Cannabis sativa* var. *ruderalis* (Janisch.) S. Z. Liou – konopí seté rumištní. ITIS (Integrovaný taxonomický informační systém) uvádí další 2 variety: *Cannabis sativa* var. *sativa* L. a var. *spontanea* Vavilov.

Tabulka 1: Taxonomie konopí

Říše	Rostliny (*Plantae*)
Podříše	Cévnaté (*Tracheobionta*)
Oddělení	Krytosemenné (*Magnoliophyta*)
Třída	Vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)
Řád	Růžotvaré (*Rosales*)
Čeleď	Konopovité (C*annabidaceae*)
Rod	Konopí (*Cannabis*)
Druh	Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)
Poddruhy	Konopí seté indické (*Cannabis sativa* subsp. *indica*) (Lam.) Konopí seté pravé (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) L.

3.3.3 Dělení konopí

Lidová klasifikace je jedním z nejpoužívanějších dělení konopí, které je nezávislé na vědeckých a taxonomických klasifikačních systémech. Bere v úvahu pouze významné morfologické znaky jakožto především tvar listu, výšku rostliny a její celkový profil. Tímto lidovým systémem jsou odlišovány pouze typy "Sativa", "Indica" a "Ruderalis". Kultivary konopí typu "Sativa" mají delší a tenčí listy a celkově dosahují většího vzrůstu. Kultivary typu "Indica" jsou menší, širolisté a obvykle dozrávají dříve (Erkelens a Hazekamp, 2014). Rostliny "Ruderalis" vykazují jednu až 3 vlastnosti, a to podobný obsah THC a CBD[4], morfologie odpovídající původním druhům a dále ta vlastnost, že indukce kvetení není závislá na fotoperiodě, ale pouze na stáří rostliny (McPartland, 2018). "Sativa" má po konzumaci povznášející, energizující a až halucinogenní účinek. Přináší pocit optimismu a pohody. "Indica" způsobuje spíše celkové uvolnění, uzemnění a úlevu od stresu a navozuje až meditativní stavy (Pearce *et al*., 2014)

Konopí se také dělí podle země původu. Americký botanik Robert Connell Clarke (2005) v rozhovoru shrnuje, že konopí z Evropy by se mělo nazývat jako konopí úzkolisté. Z Číny, Koreje, Japonska a Severního Vietnamu pochází širolisté konopí, které má oproti evropskému vyšší obsah canabinoidů, ale přesto se ještě nejedná o drogu. Konopí

[4]Canabidiol – kanabinoid nacházející se v konopí. Je to druhý nejběžnější kanabinoid v rostlině a nemá psychoaktivní účinek.

s vysokým obsahem THC a úzkými listy pochází Indie, Nepálu, Thajska, Afriky, Mexika a Kolumbie. Drogové odrůdy z širokými listy jsou afghánské.

Jiné dělení konopí je do geografických skupin. Vyčleňuje se konopí středoruské (*medioruthenice*), severní (*borealis*), jižní (*australis*) a hašišné (*asiatica*). Geografická poloha ovlivňuje délku vegetační doby a obecně platí, že čím je kratší vegetační doba, tím je tvořeno méně kvalitní vlákno a květenství je celkově menší. Proto konopí jižní a středoruské má největší zemědělský význam a je jím oseto více než 90 % pěstitelských ploch (Miovský *et al.*, 2008).

Z právního hlediska je podstatné správně vymezit konopí technické. Technické konopí je uměle vytvořená kategorie, která zahrnuje odrůdy se sníženým obsahem THC, který by neměl být větší než 0,3 %. Tyto odrůdy jsou vhodné k produkci vlákna a semene a jsou řazeny mezi zemědělské plodiny. Jedinou výjimkou je možnost pěstování léčebného konopí, což je další uměle vytvořená kategorie v české legislativě. Obsah účinných látek v tomto konopí, které se smí vyžít pouze pro léčebné účely, není nijak omezen. Jakékoliv konopí, pokud by bylo podrobeno požadovaným testům, může být použito pro léčbu.

3.3.4 Genetická charakterizace

Genom konopí je diploidní (2n = 20; x = 10), skládá se tedy ze dvou sad chromozomů a obsahuje 9 párů autozomů a jeden pár gonozomů. Samičí rostliny jsou homogametické a nesou 2 pohlavní chromozomy XX. Konstituce pohlavních chromozomů u samčích rostlin je XY, jedná se tedy o heterogametické pohlaví. Poměr počtu autozomů ku počtu pohlavního chromozomu X determinuje pohlaví (Sakamoto *et al.*, 1998; Ming *et al.*, 2011).

V roce 2011 byl získán neúplný genom této rostliny. Velikost haploidního genomu byla u samičích rostlin odhadnuta na 818 Mb a u samčích na 843 Mb. To odpovídá menší velikosti submetacentrického chromozomu X. Subtelocentrický chromozom Y je větší kvůli mnoha kopiím retrotranspozonů bez dlouhých koncových repetic, které se v průběhu evoluce akumulovaly na dlouhém raménku. U obou těchto pohlavních chromozomů se vyskytuje na konci krátkého raménka typický satelit (Sakamoto *et al.*, 1998; Ming *et al.*, 2011). Velikost chromozomů objasnil až Divashuk *et al.* (2014). Bylo zjištěno, že autozomy jsou metacentrické a poměrně malé. Velikost všech chromozomů se pohybuje v rozpětí 2,6 až 3,8 μm.

Gao *et al.* (2020) sestavil vysoce kvalitní referenční genom divokého konopí setého.

Získaný genom byl 808 Mb veliký a ze 74,75 % byl tvořen repetitivními sekvencemi. Bylo analyzováno celkem 38 828 protein kódujících genů, z nichž 98,3 % bylo plně funkčních.

Pohlavní dimorfismus konopí je patrný především u dospělých rostlin. Campbell *et al*. (2021) poprvé popsal morfologické rozdíly samčích, samičích a hermafroditních klíčních rostlin. Hypokotyl u samčích 2týdenních semenáčků je znatelně delší, nežli je tomu u samičích rostlin. Poznatky nasvědčují tomu, že u hermafroditních jedinců je délka hypokotylu nejmenší.

3.4 Embryogeneze rostlin

Embryogeneze označuje proces, kdy ze zygoty vzniká mnohobuněčné embryo. V průběhu jeho vývoje se stanovuje základní tělní plán rostliny a vznikem apikálně-bazální osy se určuje polarita embrya. Na horním konci této osy je situován spolu s děložními listy meristém primárního výhonku. Meristém primárního kořene se vyskytuje na spodním konci. Výsledkem embryogeneze je zralé embryo, které již v radiálním seskupení kmenových buněk vykazuje organizaci rostlinného těla (De Smet *et al*., 2010). Embryogeneze končí zráním a dehydratací embrya a jeho vstupem do klidového období dormance.

3.4.1 Pohlavní generace

V průběhu rané fáze živočišné embryogeneze dochází k rozrůzňování kmenových buněk a tím ke snížení jejich potence. Rostliny však ve svém sporofytu nenesou trvale odlišené zárodečné linie a je udržována populace terminálně nediferencovaných kmenových buněk. Ty konstantně produkují vegetativní tkáně a orgány, ale stejně tak mohou sloužit jako mateřské buňky iniciující vznik mikro- a makrospor, ze kterých se vyvíjí samčí (pyl) a samičí (zárodečný vak) gametofyt[5]. Jeho podstatou je dát vzniku buňkám, haploidním gametám, které spolu mohou splynout za vzniku zygoty a tím započít první fázi embryogeneze (Twell, 2011). Z morfologického hlediska lze gametofyty považovat za více či méně členitou stélku [6] (Pavlová a Fischer, 2011).

Samčí gametofyt se u krytosemenných rostlin vyvíjí uvnitř prašníků tyčinek. Z meiotického dělení mateřské buňky mikrospory vzniká tetráda mikrospor. Klíčovou událostí

[5]Gametofyt – pohlavní generace rostlin. Je tvořen malou populací haploidních buněk.

[6]Stélka – (lat. *thallus*) označuje tělo rostliny, které není rozrůzněno a není tvořeno diferencovanými pletivy.

je asymetrické dělení haploidní mikrospory, které produkuje buňky o rozdílné velikosti, transkripční aktivitě a struktuře chromatinu (Twell, 2011).

Aby došlo k asymetrickému dělení, musí dojít k migraci jádra mikrospory do budoucího pólu zárodečné buňky. Migraci jádra zajišťují mikrotubuly a dochází k ní u rostlin i napříč mezi taxony. Vzniká tak tedy vetší vegetativní buňka a menší generativní, která se mitoticky dělí na 2 buňky spermatické (Twell *et al*., 1998; Twell, 2011).

Samičí gametofyt krytosemenných rostlin se vyvíjí jako součást sporofytu v semeníku v útvaru, který se jmenuje vajíčko. Diploidní mateřská buňka megaspory podstoupí meiotické dělení a tím vznikají čtyři megaspory. Obvykle se však pouze jedna megaspora účastní dalších dějů, ostatní podléhají buněčné smrti. Megaspora se dále mitoticky dělí. Karyokineze proběhne obvykle 3x, a to bez cytokineze. Tento vícejaderný útvar se nazývá jako koenocyt. Následně jsou jádra od sebe oddělena buněčnou stěnou a výsledkem je celularizovaný samičí gametofyt. V průběhu tohoto kroku, nebo až těsně před oplodněním, dochází ke splynutí dvou jader v diploidní centrální buňku. Výsledný zárodečný vak sestává ze sedmi buněk, a to ze tří antipodálních v chalázní oblasti, dvou synergických a jedné vaječné buňky v mikropylární oblasti a jedné centrální buňky (Yadegari a Drews, 2004).

Jak popisuje Pagnussat *et al*. (2009), při migraci jader, konečném umístění buněk a při určení jejich funkce v zárodečném vaku hraje významnou roli rostlinný hormon auxin (AUX1). V průběhu vzniku koenocytu až po jeho zánik byla dokázána asymetrická distribuce tohoto hormonu. Nejvíce se vyskytoval v mikropylární oblasti, kde byla i zvýšená jeho biosyntéza. Při manipulaci s fyziologickým výskytem auxinu docházelo ke změnám v určení identity mezi gametickými a negametickými buňkami. Skinner a Sundaresan (2018) doplnili toto genetické pozadí o další rostlinný hormon a objasnili, že osud buněk v chalázní oblasti je řízen zvýšenou expresí cytokininu (CKI1).

Samčí gametofyt se v určité fázi svého vývoje stává dočasně samostatným, opouští mateřský sporofyt a pasivními způsoby je přenesen na bliznu pestíku (u krytosemenných rostlin), nebo přímo na vajíčko (u nahosemenných rostlin) (Pavlová a Fischer, 2011).

Dvojí oplození je velmi složitý proces, který se vyvinul u krytosemenných rostlin a charakterizuje rostliny tohoto oddělení. Spermatické buňky krytosemenných rostlin ztratily svou pohyblivost a aby mohlo dojít k oplodnění, musí překonat milimetrové a u některých druhů až centimetrové vzdálenosti. Vyvinul se tedy mechanismus, pomocí kterého

jsou samčí gamety dopraveny do samčího gametofytu. Po opylení je prvním kritickým faktorem překonání sporofytické inkompatibility. Na základě rozpoznání proteinů ve sporodermě je rozeznán kompatibilní pyl od potenciálních patogenů a pouze takový se začne hydratovat a klíčit. Vegetativní buňka pylu se prodlužuje a vytváří tím pylovou láčku, která prorůstá bliznou a následně čnělkou semeníku. V této fázi se kontroluje gametofytická kompatibilita. Směr růstu láčky je řízen gradientem vápenatých iontů a vnějšími signálními molekulami. Vedení pylové láčky směrem k mikropyle je řízeno sekrecí mnoha peptidů a atraktantů synergidními buňkami. Pylová láčka následně prorůstá skrze mikropyle kolem jedné synergidní buňky. Interakce pylové láčky se synergidní buňkou vede ke vzájemné lýze buněk a tím dojde k uvolnění spermatických buněk a dvojímu oplodnění. Jedna spermatická buňka se spojí s centrální buňkou a tím dá vzniku obvykle triploidnímu výživnému pletivu endospermu. Druhá spermatická buňka fúzuje s vaječnou buňkou za vzniku zygoty (Dresselhaus *et al*., 2016; Adhikari *et al*., 2020).

3.4.2 Vývojové fáze embrya

Po vzniku zygoty je třeba vytvořit dostatečný počet buněk pro stavbu nového těla. Navíc tyto buňky musí být uspořádány přesným způsobem, aby mohly být prostorově definovány různé typy kmenových buněk. Vše začíná prvním asymetrickým dělením zygoty, kdy vznikají dceřiné buňky s odlišnými vlastnostmi. Právě nestejné rozdělení objemu může způsobovat rozdíly v buněčné identitě. Menší buňka (apikální) bývá spojena s pletivy semene a obvykle dává vzniku embryonálním buňkám (proembryo). Z větší buňky (bazální) se vyvíjí suspenzor [7]. Asymetrické dělení je závislé na přítomnosti auxinu, který v následujících fázích vývoje embrya spouští lokálně specifickou genovou expresi (de Vries a Weijers, 2017).

Lineární fáze vývoje rostlinného embrya je charakteristická proliferací apikální i bazální buňky takovým způsobem, že proembrya mají podlouhlý tvar. Apikální buňka podstupuje dvě podélná buněčná dělení, která jsou následována jedním kolem dělení příčných. Z apikální buňky tak vzniká 8 buněk. Bazální buňka se ale dělí dříve a výhradně v příčném směru. Vzniká tak suspenzor. Ten zastává vyživovací funkci, kterou později přebírá endosperm. Pouze buňka, která je nejblíže k proembryu, se stává jeho součástí

[7] Suspenzor – Extraembryonální buněčná linie, spojuje embryo se zárodečným vakem a zprostředkovává přísun živin.

a přispívá ke vzniku kořenového meristému (Zhang a Laux, 2011).

Následujícím periklinálním dělením vzniká 16buněčné proembryo v globulárním stadiu. V této fázi se odděluje vnější protoderm a již lze určit, které buňky dají vzniku primordiím děložních listů, primordiu centrálnímu výhonkovému meristému a ze kterých buněk vznikne hypokotyl a kořenový meristém (Zhang a Laux, 2011).

V embryích pozdního globulárního stadia je auxin transportován PIN proteiny (PIN1) směrem k počínajícímu primordiu děložních listů. Zvýšenou koncentrací auxinu dochází k proliferaci buněk děložních listů a tím vzniká embryo, jehož tvar odpovídá symbolu srdce. Proto se tato fáze nazývá srdčitá (De Smet *et al*., 2010).

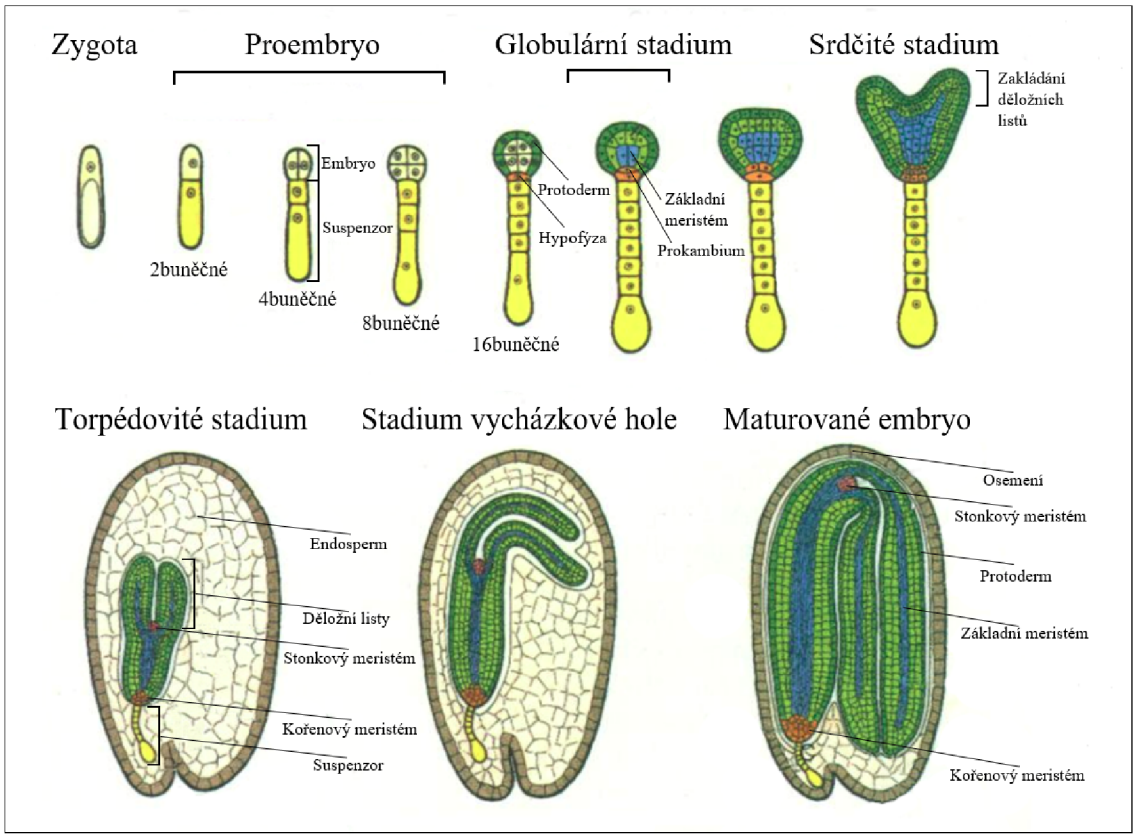
Do torpédovité fáze se řadí embrya, která proliferují v oblasti děloh a suspenzoru směrem od sebe. Z prostorových důvodů dochází v průběhu dělení buněk k ohnutí budoucích děložních listů a tato fáze se označuje termínem vycházková hůl.

V období pozdní embryogeneze exprese auxinu klesá, buňky se přestávají dělit a obsah endospermu se zmenšuje (u některých rostlinných druhů je i zcela spotřebován). Toto období je charakteristické akumulací zásobních látek (proteiny, lipidy, škrob…), stejně jako inhibitorů klíčení, mezi které patří například kyselina abscisová. Dochází taktéž k dehydrataci celého embrya až na kritickou úroveň, aniž by byly narušeny buněčné struktury. Ochrannou funkci v tomto procesu zastávají ve velké míře LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteiny (Goldberg *et al*., 1994). Připravené maturované embryo vstupuje do stavu dormance, kdy jsou potlačeny mnohé buněčné aktivity. Tím je ukončena rostlinná embryogeneze a zralé semeno může čekat až roky na vhodné podmínky k vyklíčení.

3.4.3 Embryokultury *in vitro*

Metody rostlinné biotechnologie je možno rozdělit na techniky zvyšující genetickou variabilitu a na ty, které spíše zachovávají původní genotyp. Do této druhé skupiny se řadí meristémové kultury, mikropropagace, organogeneze, somatická embryogeneze a kultury izolovaných embryí, neboli embryokultury *in vitro*. Tato poslední metoda je založena na kultivaci zygotických embryí na vhodném agarovém médiu. Odvozené rostliny mají tedy obvykle identický genotyp s kultivovaným embryem.

Embryokultury se dělí podle stupně vývoje izolovaného embrya. Rozlišují se kultury semenných embryí a proembryí. U kultur semenných embryí se pracuje s již vyvinutými



Obrázek 1: Vývojové fáze rostlinné embryogeneze
Převzato a upraveno dle Goldberg *et al*., 1994).

embryi. Jako proembrya jsou považována taková, u kterých ještě nedošlo k diferenciaci děloh. Taková embrya jsou oproti semenným heterotrofní a to se projevuje odlišnými nároky na výživu a tedy i na složení kultivačního média (Hussain *et al*., 2012).

Techniky embryokultur, známé také jako "embryo rescue", jsou nejstarší a nejvíce úspěšné z *in vitro* procedur. Využívají se k získání hybridních embryí, což může vést ke vzniku mezidruhových a mezirodových hybridních rostlin, jejichž vývoj by nebyl *in vivo* možný. Touto metodou totiž dochází k zamezení aborce embryí po vzdálené hybridizaci, eliminuje se vliv postzygotické inkompatibility a překonává se absolutní inhibice klíčení (Trigiano a Gray, 2005). Kultury izolovaných embryí jsou vhodné i k vegetativnímu množení rostlin, a to indukcí somatické embryogeneze na samotných embryích. Ve šlechtitelských programech se embryokultury využívají ke zkrácení celého procesu, protože vývoj nové rostliny není pozdržen obdobím dormance semen (Hussain *et al*., 2012).

3.5 Molekulární aspekty

3.5.1 Signální dráha auxinu

Rostlinný hormon auxin (Aux) lze chápat jako obecný koordinátor růstu a vývoje rostlin. Dokáže přenášet informace jak na krátké, tak i na dlouhé vzdálenosti. Je velice multifunkční a mnoho buněk reaguje na změnu jeho hladiny značně odlišným způsobem. Jeho základním molekulárním mechanismem je rychlé přepínání mezi represí a aktivací transkripce genů prostřednictvím na auxinu závislé degradace transkripčních represorů (Leyser, 2018).

V rostlinách se přirozeně vyskytují 4 auxiny: kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA). Biosyntéza IAA vychází buď to z tryptofanu, nebo z indolyl-3-glycerolfosfátu (IGP). Vysoká hladina auxinu je obecně v mladých a rychle se dělících buňkách (mladé listy, apikální a bazální meristém a vyvíjející se embrya). IAA je inaktivována odbouráváním, nebo reverzibilní konjugací s *myo*-inositolem, kyselinou asparagovou, s řetězcem glukózy, a nebo s glykoproteiny (Pavlová a Fischer, 2011).

Auxin reguluje expresi až několika set genů, a to na úrovni transkripce. Základní složky poměrně krátké a přitom velice všestranné auxinové signální dráhy patří do 3 proteinových rodin: F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN (TIR1/AFB) auxinové koreceptory, Auxin/INDOLE-3-OCETIC ACID (Aux/IAA) nukleární regulační proteiny a AUXIN RESPONSE FAKTOR (ARF) transkripční faktory. Promotor genů reagulovaných auxinem obsahuje *cis*-elementy ARE (např. TGTCTC). Na tyto elementy se jako monomery, homo- nebo heterodimery mohou vázat transkripční faktory ARF. Aktivitu ARF proteinů ovlivňuje množství proteinů Aux/IAA. Ty se jako homo- nebo heterodimery vážou na ARF a tím je inaktivují. Tento represivní mechanismus je spojen i s přestavbou chromatinu ve prospěch fakultativního heterochromatinu. Auxin zprostředkovává vazbu F-boxových proteinů TIR1/AFB s Aux/IAA. F-boxové proteiny jsou součástí komplexu E3 ubikvitin protein ligázy typu SCF, který přenáší aktivovaný ubikvitin z enzymového systému E1/E2 na Aux/IAA. Transkripční represory jsou takto označeny ubikvitinem a jsou následně degradovány v proteasomu 26S. Takto se hladina auxinu odráží na změně množství Aux/IAA a tím na regulaci exprese časných genů. K expresi pozdních genů je nutná syntéza proteinů *de novo* (např. transkripční faktory), proto se jejich funkce projeví až po několika hodinách (Pavlová

a Fischer, 2011; Leyser, 2018).

AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) je dalším membránovým receptorem auxinu. Po navázání auxinu dojde aktivací H^+ATPáz k hyperpolarizaci mambrán a k následnému dlouživému růstu buněk. V apoplastu tak dochází ke snížení pH a tím se zvyšuje pravděpodobnost, že auxin prostoupí buněčnou membránou do cytosolu. Auxin takto moduluje svůj vlastní transport do buněk (Pavlová a Fischer, 2011). Auxin stimuluje aktivitu těchto H^+ATPáz taktéž zvýšením exprese členů *SMALL AUXIN UP-REGULATED RNA* (*SAUR*) genové rodiny. SAUR podporují růst buněk tím, že inhibují aktivitu protein fosfatáz typu 2C (PP2C). PP2C totiž interaguje s H^+ATPázami a snižuje jejich aktivitu (Leyser, 2018).

Gao *et al.* (2018) identifikoval odlišně exprimované geny u konopí setého za podmínek, kdy byly rostliny vystaveny abiotickým stresům. Součástí expreimentu byly geny *X15-1, X15-2, IAA-1* a *IAA-2*, které souvisí s metabolismem auxinu. *X15-1* a *X15-2* kódují auxin-induced proteiny X15, jejichž exprese je stimulována auxinem. Tyto geny jsou členy genové rodiny *SAUR*. *IAA-1* nebo také *GH3,6* kóduje enzym indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6. Tento enzym katalyzuje syntézu konjugátů IAA s aminokyselinami. Tímto způsobem je korigováno nadbytečné množství IAA v buňkách (Staswick *et al.*, 2005). Gen *IAA-2* patří taktéž do genové rodiny *SAUR* a kóduje auxin-induced protein X10A.

3.5.2 Signální dráha kyseliny abscisové

Kyselina abscisová (ABA) je esenciální fytohormon, který je zapojen do mnoha aspektů růstu a vývoje rostlin. Obecně se vyskytuje u všech cévnatých rostlin, a to téměř v každé buňce. Kontroluje vývojové události od zrání po klíčení semen, ovlivňuje vývoj plodů a uzavírání průduchů. ABA podporuje senescenci, opad listů a podílí se také na řízení reakcí závislých na aktuálním působení biotických a abiotických stresových faktorů (Cutler *et al.*, 2010).

ABA je seskviterpen, který se odvozuje od karotenoidů. Vyskytuje se převážně ve formě 2-*cis*-4-*trans*-izomeru, ale může přecházet i v biologicky méně účinný *trans*-*trans*-izomer. Syntéza vychází buď to z pyruvátu, a nebo z 3-fosfoglyceraldehydu, a v prvních fázích je společná s karotenoidy. Probíhá převážně v plastidech a až poslední kroky se uskutečňují v cytosolu, kde dochází i k její degradaci oxidací na kyselinu fazeovou a dihydroxifazeovou. ABA může být také inaktivována konjugací s monosacharidy (Pavlová a Fischer,

2011).

Jak uvádí Pavlová a Fischer (2011), ABA na úrovni transkripce ovlivňuje expresi až 10 % genů jaderného genomu. Signální dráha kyseliny abscisové sestává ze tří základních složek. Mezi ně patří ABA receptory proteinových rodin PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABSCISIC ACID RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR), podrodina proteinových fosfatáz 2C (PP2C) jako negativní regulátor a podrodina SNF1-related proteinkináz 2 (SnRK2), které slouží jako pozitivní regulátor. Pokud ABA není přítomna, PP2C jsou asociovány s kinázami SnRK2. Defosforylací serinového zbytku a blokováním katalytického místa jsou takto SnRK2 udržovány v neaktivním stavu. Navázání ABA na receptory PYR/PYL/RCAR způsobuje jejich konformační změnu, čímž se vytvoří vazebné místo pro PP2C. Receptory interagují s PP2C za vzniku komplexu ABA-PYR/PYL/RCAR-PP2C. Touto vazbou dochází k inhibici aktivity proteinfosfatázy PP2C a k uvolnění kinázy SnRK2. Následně se SnRK2 aktivují autofosforylací a předávají signál aktivací mnohých transkrypčních faktorů, např. ABFs/AREBs/ABI5. Ty se vážou na ABA-responzivními elementy (ABRE), což vede ke genové expresi závislé na ABRE (Soon *et al.*, 2012; Miyakawa *et al.*, 2013). Touto signální drahou je také indukována exprese genů kódujících LEA proteiny, proteiny teplotního šoku HSP, enzymy sacharidového metabolismu, enzymy detoxikující reaktivní formy kyslíku (ROS), transportní proteiny pro ionty a vodu, transkripční faktory a proteinové kinázy. Naopak inhibována je např. exprese genů *GA-MYB* (Pavlová a Fischer, 2011).

Gao *et al.* (2018) se v již zmíněné práci věnoval také expresi genu *PYL4* (receptor kyseliny abscisové), *PP2C-1* (proteinfosfatáza 2C) a genu proteinkinázy SAPK3 (podrodina SnRK2) u konopí setého. Vliv abiotického stresu se odrazil na změně exprese všech těchto genů.

3.5.3 *LEA* geny

Geny *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*) tvoří velkou a rozmanitou genovou rodinu. Jak je již z názvu patrné, pro rostlinné *LEA* geny je charakteristická zvýšená exprese ve fázích pozdní embryogeneze. LEA proteiny se v tomto období hromadí v embryu a jsou obecně spojeny s navozením tolerance vůči abiotickým stresům (nepříznivá teplota, sucho, nebo slanost) (Liu *et al.*, 2019). LEA proteiny byly poprvé identifikovány

v semenech bavlníku (*Gossypium hirsutum*) (Dure *et al.*, 1981). Později byla jejich přítomnost dokázána i v dalších rostlinných částech a rostlinách, stejně jako u některých bakterií, bezobratlých a hub.

Klasifikace LEA proteinů je komplikovaná. Poslední studie se na základě sekvenční homologie, konzervovaných motivů a fylogenetických vztahů shodují na vyčlenění 8 podskupin (LEA1, LEA2, LEA3, LEA4, LEA5, LEA6, dehydrin a SMP). LEA proteiny jsou malé (MW = 10–30 kDa) a převážně hydrofilní polypeptidy. Obsahují totiž vysoký počet hydrofilních aminokyselin, které se často vyskytují ve formě tandemových repetic (Li *et al.*, 2021).

Na rozdíl od jiných proteinů, které taktéž chrání buňku před abiotickým stresem, LEA proteiny nevykazují žádnou významnou enzymatickou aktivitu. V hydratovaném stavu nezaujímají trojrozměrné uspořádání, což odpovídá jejich hydrofilnímu charakteru. K jejich skládání dochází až při dehydrataci buňky. Až poté se mohou vázat na jiné proteiny a tím je chránit (stejně jako chaperony) před ztrátou jejich prostorového uspořádání odpovídající nativní konformaci, a to bez spotřeby ATP [8]. LEA proteiny taktéž přispívají ke stabilizaci membrán, vážou kovové ionty, slouží jako hydratační pufr a stabilizují mRNA (Liu *et al.*, 2019).

[8] ATP–Adenosintrifosfát je organická sloučenina, která poskytuje energii k řízení mnoha procesů v živých buňkách.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Konopí seté technické, 2 kultivary, *Cannabis sativa* 'KC Dora' (semena poskytnuta firmou SEMO Smržice) a *Cannabis sativa* 'USO 31' (semena poskytnuta firmou Agritec Šumperk). Rostliny byly pěstovány ve skleníku. V době 4 až 5 měsíců od vysetí byly v různých fázích zralosti sbírány jednotlivé nažky, které byly ihned poté využity pro experiment.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agarose SERVA (Serva, kat. č. 11404.05)
- BAP (Sigma-Aldrich, B3408)
- DNase/RNase free voda
- EZ-Vision® Bluelight DNA dye 10,000X
  (VWR Life Science, kat. č. 10791-798)
- HyperLadder™ 50bp (Bioline, kat. č. BIO-33054)
- IBA (Sigma-Aldrich, kat. č.I5386)
- Murashige a Skoog médium včetně vitamínů (Duchefa, kat. č. M0222)
- Primery (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- RNA nanášecí pufr (složení dle: RNA Gel Loading Dye (2X)
  (ThermoScientific, kat. č. R0641))
- Sacharóza (Duchefa, kat. č. S0809)
- 2-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, kat. č. M6250)

Použité soupravy

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

Použité roztoky a jejich příprava

- 0,5M EDTA (pH 8): 186,1 g $N_2EDTA{\cdot}2H_2O$ rozmíchat v 800 ml dH_2O, upravit pH na hodnotu 8,0 přídavkem NaOH (18-20 g), doplnit do 1000 ml, sterilizováno filtrací.
- 10x TBE pufr: 108 g Tris base a 55 g kyseliny borité rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH_2O a přidat 40 ml 0,5M EDTA (pH 8), doplnit do 1000 ml, sterilizováno filtrováním.
- 0,5x TBE pufr: 250 ml 10x TBE doplnit do 5000 ml dH_2O.
- OK médium (1 l): 4,405 g MS média (Murashige-Skoog médium, 1962) a 30 g sacharózy rozpustit v 400 ml dH_2O. 8 g agaru rozpustit v 500 ml dH_2O. Získané roztoky smíchat, doplnit dH_2O do 1000 ml, upravit pH na 5,8 a sterilizovat autoklávováním. Přidat 0,01 mg IBA, 0,01 mg BAP a 20 mg kys. askorbové.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Analytická váha HR-120 EC (A&D)
- Automatické pipety (Eppendorf)
- Centrifuga 5415R (Eppendorf)
- Digestoř (Merci®)
- Digitální předvážky (KERN)
- Dokumenteční systém (UVITEC Cambridge)

- Elektroforetický systém Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad)
- Fytotron (PSI)
- Homogenizátor FastPrep®-24 (MP Biomedicals)
- Laminární box Helios 48 (Steril)
- Mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR)
- Mikrovlnná trouba MS023 (Hitachi)
- Real-Time PCR detekční systém CFX Connect (Bio-Rad)
- Stereolupa SZ51 (Olympus)
- Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific)
- Termoblok Mixing Block MB-102 (Bioer)
- Termocyklér PTC-200 (MJ Research)
- UV transiluminátor (Herolab)
- Vortex TTS 2 Yellowline (IKA)
- Zdroj stejnosměrného napětí EPS-601 (Amersham Biosciences)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace embryí a založení embryokultur *in vitro*

Nažky byly nejprve sterilizovány 70% ethanolem po dobu 1 min, následně 3 min v 2,5% roztoku chloraminu T a poté byly třikrát promyty sterilní vodou. Ve sterilních podmínkách byla na základě stupně vývoje preparována embrya. Pro další postupy byla použita izolovaná embrya ve vývojové fázi vycházkové hole a embrya v závěrečné fázi vývoje. Reprezentativní embrya obou fází byla umístěna na Petriho misky s OK médiem. Kultivace probíhala ve fytotronu po dobu 1 týdne za těchto podmínek: 22 °C, relativní vlhkost 40 %, světelný cyklus – 16 h světlo a 8 h tma. Ostatní embrya byla uskladněna při teplotě –70 °C.

4.4.2 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí kitu Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) podle přiloženého návodu. Ze vzorků embryokultur byla RNA izolována podle protokolu A a vzorky izolovaných embryí a listu byly zpracovány podle protokolu B. Vzorky byly homogenizovány po dobu 30 s v homogenizátoru FastPrep®-24 a poté následovala 4min inkubace. U vzorků embryí proběhla při pokojové teplotě, ale u ostatních vzorků byla teplota nastavena na 56 °C. Pomocí filtrační kolonky byl homogenát přefiltrován, dále byla RNA promývána a nakonec proběhla eluce RNA. U vzorků z embryí byla eluce provedena 2x. Centrifugace probíhala vždy při 13 000 rpm.

Koncentrace vyizolované RNA ve vzorcích byla změřena na spektrofotometru NanoDrop a uložena při –70 °C.

4.4.3 Ošetření RNA DNázou

Pro odstranění DNA ze vzorků vyizolované RNA bylo použito ošetření DNázou (DNase I Amplification Grade (Sigma-Aldrich). Byl dodržen postup doporučený výrobcem. Ke vzorkům bylo přidáno odpovídající množství reakčního pufru a DNázy I v poměru 8 (vzorek RNA):1 (reakční pufr):1 (DNáza I). Následná inkubace probíhala po dobu 15 min za pokojové teploty. Reakce byla zastavena přidáním Stop roztoku v poměru 1 (Stop roztok):1 (Dnáza I) a 10min inkubací v 70 °C.

Po ošetření DNázou byla změřena koncentrace RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop. Vzorky byly uskladněny při –70 °C.

4.4.4 Gelová elektroforéza

Hodnocení kvality RNA před a po ošetření DNázou probíhalo pomocí metody elektroforetické separace. Nanášeny byly vzorky s nedenaturovanou RNA, která byla smíchána s nanášecím pufrem s denaturačními vlastnostmi. Dělení frakcí probíhalo v 1,5% nedenaturačním agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru při napětí 100 V po dobu 40 min. Nukleové kyseliny byly vizualizovány barvivem EZ-Vision® Bluelight DNA dye 10,000X a jako standard molekulové váhy byl použit HyperLadder™ 50bp s rozsahem 50 – 2000 bp.

4.4.5 Reverzní transkripce

Pro přepis RNA do cDNA byl použit SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) a postupovalo se dle přiloženého návodu. Podle počtu reakcí byl připraven premix obsahující 5x TransAmp pufr a reverzní transkriptázu v poměru 4:1. Každá reakce sestává z 5 µl premixu, množství vzorku RNA obsahující 1000 ng RNA a z DNase/RNase free vody, která doplňuje na konečný objem 20 µl. Vzorky byly vloženy do termocykléru a proces reverzní transkripce probíhal za těchto podmínek: 10 min při 25 °C pro nasednutí primerů, 15 min při 42 °C pro přepis do cDNA a 5 min při 85 °C pro inaktivaci reverzní trankriptázy.

Vzorky byly uloženy při teplotě –70 °C.

4.4.6 RT-qPCR

Pro realizaci kvantitativní RT-PCR byl použit kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline). Reakční směs byla připravována odlišně, nežli výrobce doporučuje (Tab. 2). U vzorků pocházejících z kultivaru USO 31 a z embryí kultivaru KC Dora bylo pro přípravu templátu použito ředění 1:9. Vzorky cDNA embryokultur KC Dory bylo třeba ředit v poměru 1:2 a pro analýzu exprese genu *CanLea34* byla jako templát použitá cDNA ředěna v poměru 1:1. Jako negativní kontrola byla použita DNase/RNase free voda. Reakční podmínky byly nastaveny v souladu s doporučeními od výrobce (Tab. 3).

Tabulka 2: Složení reakčního mixu

Reagencie	Objem [µl]
2x SensiFAST SYBR® No-ROX mix	12,5
f primer (10 µmol·l^{-1})	1,5
r primer (10 µmol·l^{-1})	1,5
DNase/RNase free voda	4,5
Templátová cDNA	4

Tabulka 3: Reakční podmínky RT-qPCR

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

Získaná data byla zpracována pomocí softwaru CFX Maestro™, kdy byla ke vzorkům přiřazena jim odpovídající Ct hodnota. Specifita PCR produktů byla ověřena disociační (melting) analýzou křivek tání. Relativní exprese byla určena pomocí metody zohledňující efektivitu nasedání primerů dle Pfaffla.

$$\Delta C_{t\ studovaný\ gen} = C_{t\ kontrola} - C_{t\ vzorek}$$

$$\Delta C_{t\ referenční\ gen} = C_{t\ kontrola} - C_{t\ vzorek}$$

$$Poměr = \frac{(E_{studovaný\ gen})^{\Delta C_{t\ studovaný\ gen}}}{(E_{referenční\ gen})^{\Delta C_{t\ referenční\ gen}}}$$

Relativní změna genové exprese v testovaných vzorkách byla porovnávána oproti kontrolnímu vzorku – mladé listy kultivaru USO 31. Ct amplifikační křivky studovaných genů byly normalizovány oproti Ct referenčního genu – *ACT-1*.

Tabulka 4: Primery použité pro RT-qPCR

Sledovaný gen GenBank acc. no.	**Sekvence primerů (5´- 3´)**	**Velikost produktu**	**Literatura**
Actin AGQN01269064	F: CCAATAGCCTTGCATTCCAT R: TCGATTGGAAAGCCGAATAC	172	van Bakel *et al.*, 2011
IAA-1 JP480028	F: ACGGAGTGTCGTAAGGAG R: GAAGAAGCGTACATAGTGC	161	van Bakel *et al.*, 2011
IAA-2 JP461329	F: GACACTTGGTGGTTTGCG R: TGCCCGAGTTACCTGAAT	213	van Bakel *et al.*, 2011
X15-1 JP473847	F: TTTGGCAGTTTATGTTGG R: TGTGCAGGGAATTGTTAG	150	van Bakel *et al.*, 2011
X15-2 JP472037	F: ATGGTGGTGATAATAACGG R: AGGGCTGAGAAGCTGATA	116	van Bakel *et al.*, 2011
PP2C-1 JP474397	F: GGGTTGATCTTGCTGCTC R: AACGCTAATGTTGTCCTTGC	83	van Bakel *et al.*, 2011
PYL4 JP449530	F: AAAATGCCAGTGAATCCG R: TGGTCCGCTCTAATCTCG	170	van Bakel *et al.*, 2011
CanLea34 XM_030629974.1	F: CCAGAAGAACGGTGAAGCCT R: TCTCCGCATTTGCTATCGCT	416	navrženo

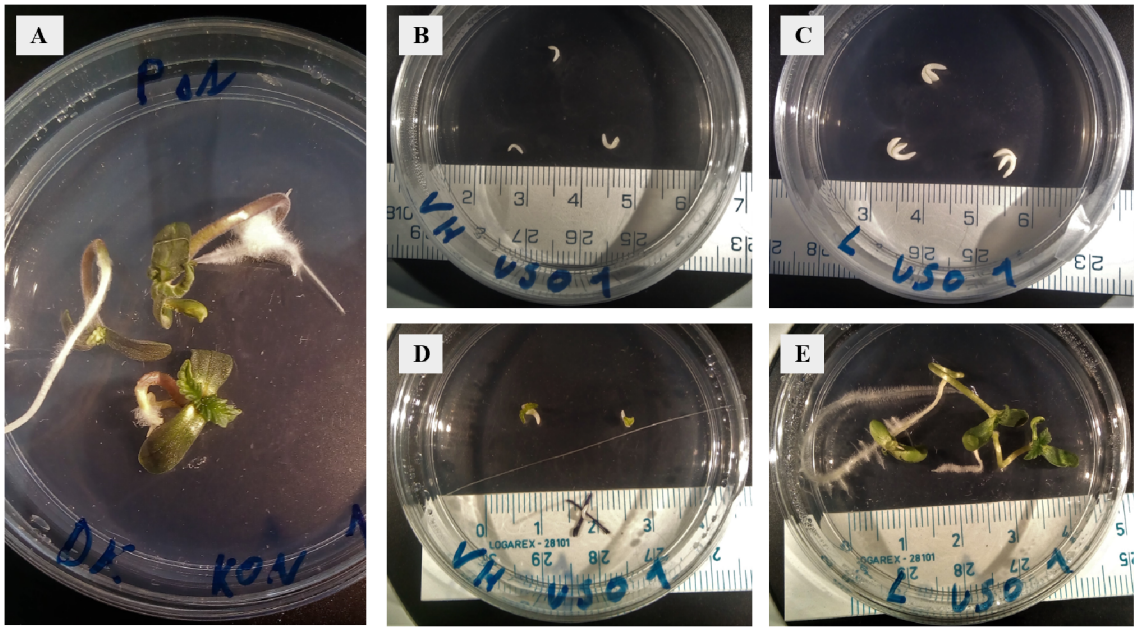
5 Výsledky

5.1 Analýza morfologie vývojových zygotických embryí

Byla studována morfologická proměnlivost izolovaných embryí mezi dvěma kultivary konopí setého v závislosti na stupni vývoje a na 7denní kultivaci v *in vitro* prostředí. V den 0 založení embryokultur nebyly objeveny rozdíly, které by byly závislé na genotypu konopí. Embrya ve fázi závěrečného vývoje (L) byly oproti embryím ve fázi vycházkové hole (VH) celkově objemnější a jejich velikost se pohybovala kolem 4–5 mm. VH embrya byla celkově menší a protáhlého tvaru s charakteristickým ohybem v počáteční oblasti děložních listů. Suspenzor nebyl pozorován.

Kultivací embryí bylo zjištěno, že samotná úspěšnost založení embryokultur je závislá na vývojovém stupni embryí. Až 30 % VH embryí abortovala, či byla značně deformovaná, zatímco L embrya 100% úspěšná. U VH embryí se kultivace projevila především růstem prvních pravých listů, zatímco děložní listy zůstávaly téměř beze změny a nezelené. U 42 % VH embryokultur KC Dory a u 22 % embryokultur USO 31 došlo k vývoji nevětveného kořenu s vlášením. Hypokotyl však byl nepoměrně krátký.

L embryokultury byly celkově vyvinutější a bez deformací. Byly pozorovány zelené děložní listy, stejně tak i první pravé listy a mnohdy až centimetry dlouhý kořen (Obr. 2). U L embryokultur zkoumaných kultivarů bylo objeveno odlišné zabarvení hypokotylu. U embryokultur KC Dory byl světle hnědý, zatímco u USO 31 byl světlezelený.



Obrázek 2: *In vitro* embryokultury *Cannabis sativa* 'KC Dora' a 'USO 31'
(**A**) Zralá embrya 'KC Dora', 7. den kultivace. (**B**) Embrya 'USO 31' fáze vycházkové hole, 0. den kultivace. (**C**) Zralá embrya 'USO 31', 0. den kultivace. (**D**) Embrya 'USO 31' fáze vycházkové hole, 7. den kultivace. (**E**) Zralá embrya 'USO 31', 7. den kultivace.

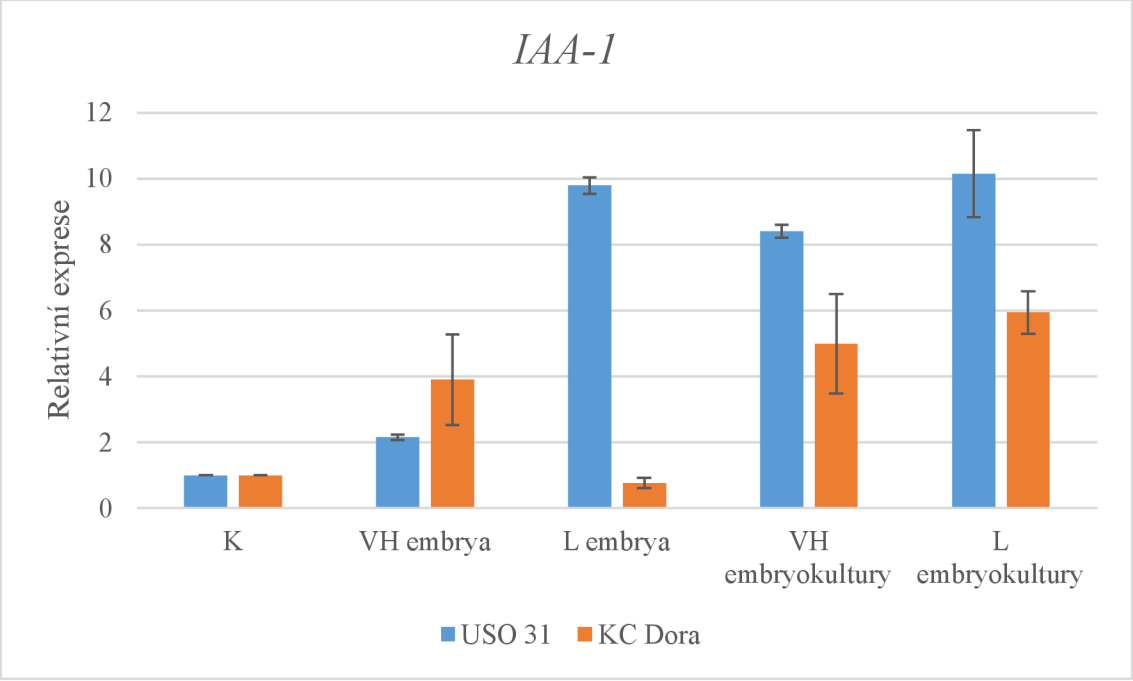
5.2 Analýza genové exprese

Metodou RT-qPCR byly zjištěny změny v expresi genů v průběhu embryogeneze u 2 kultivarů *Cannabis sativa* 'KC Dora' a *Cannabis sativa* 'USO 31'. Analyzována byla cDNA získaná přepisem z RNA, která byla izolována z VH a L embryí a jejich 7denních embryokultur. Z genů zapojených do metabolismu auxinů byly studovány geny *IAA-1, IAA-2, X15-1 a X15-2*, dále geny *PP2C-1 a PYL4*, jenž jsou zapojené do metabolismu ABA a gen *CanLea34*, který souvisí s rostlinnou embryogenezí.

Teplota nasedání primerů byla po optimalizaci pro všechny geny nastavena na 62 °C a jejich specifita byla zkontrolována analýzou křivek tání. Exprese genů v listu byla použita jako kontrola a gen pro aktin *ACT-1* sloužil jako referenční gen.

5.2.1 Exprese genu *IAA-1*

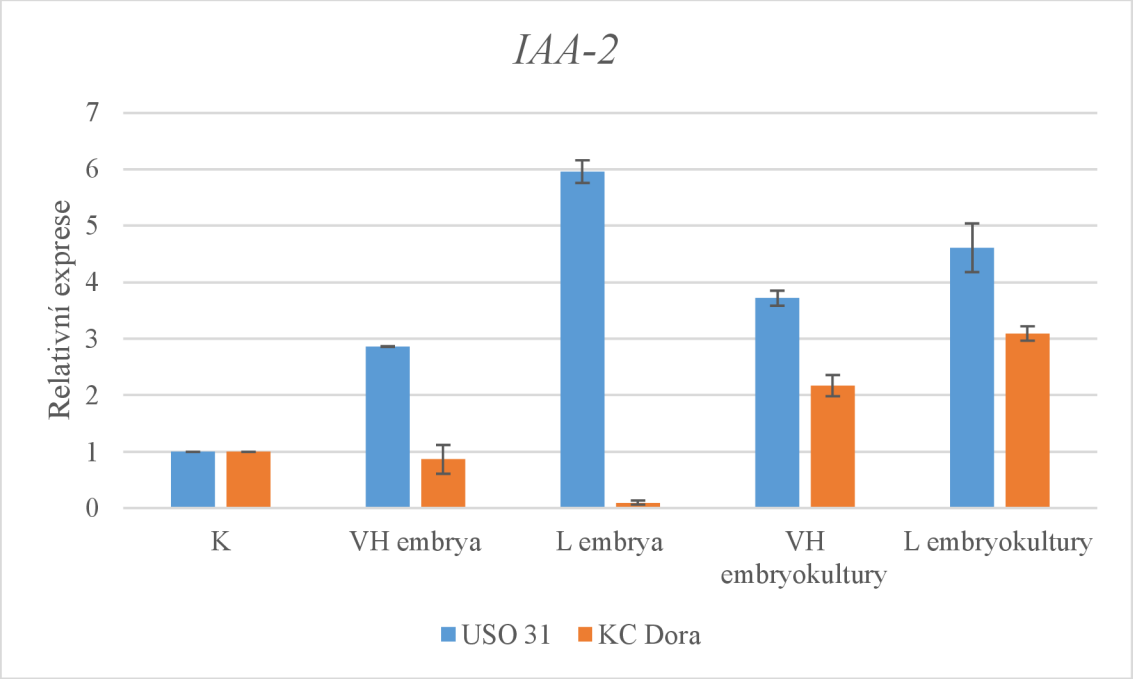
U embryí USO 31 vykazuje exprese tohoto genu vzestupnou tendenci (Obr. 3). Až 4,6x byla jeho exprese větší u L embryí. Opačná tendence byla sledována u embryí KC Dory, kdy došlo ke snížení exprese na 20 %. 7denní kultivace embryí způsobila vždy zvýšení exprese. U VH embryokultur USO 31 došlo k signifikantnímu nárůstu, zatímco u VH embryokultur KC Dory byla změna mnohem menší. U L embryokultur tomu bylo opačně, větší nárůst exprese proběhl v L embryokulturách KC Dory.



Obrázek 3: Změna exprese genu *IAA-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.2 Exprese genu *IAA-2*

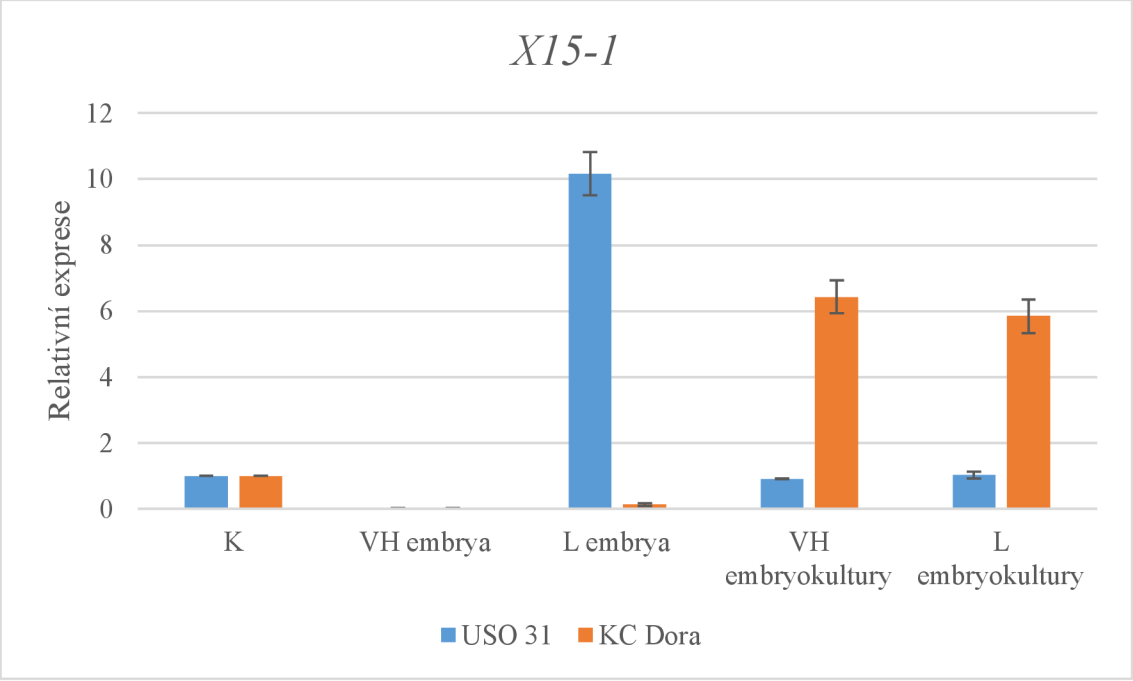
L embrya kutivaru USO 31 exprimovala gen *IAA-2* až 2,1x více nežli VH embrya. U VH embryokultur se exprese zvýšila o 30 %, ale kultivací L embryí došlo k poklesu o 23 %. Exprese u VH embryí KC Dory byla menší a L embrya exprimovala tento gen jen ve velice malé míře. Kultivací však došlo vždy k nárůstu exprese. U VH embryí 2,5x a u L embryí 31x (Obr. 4).



Obrázek 4: Změna exprese genu *IAA-2* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.3 Exprese genu *X15-1*

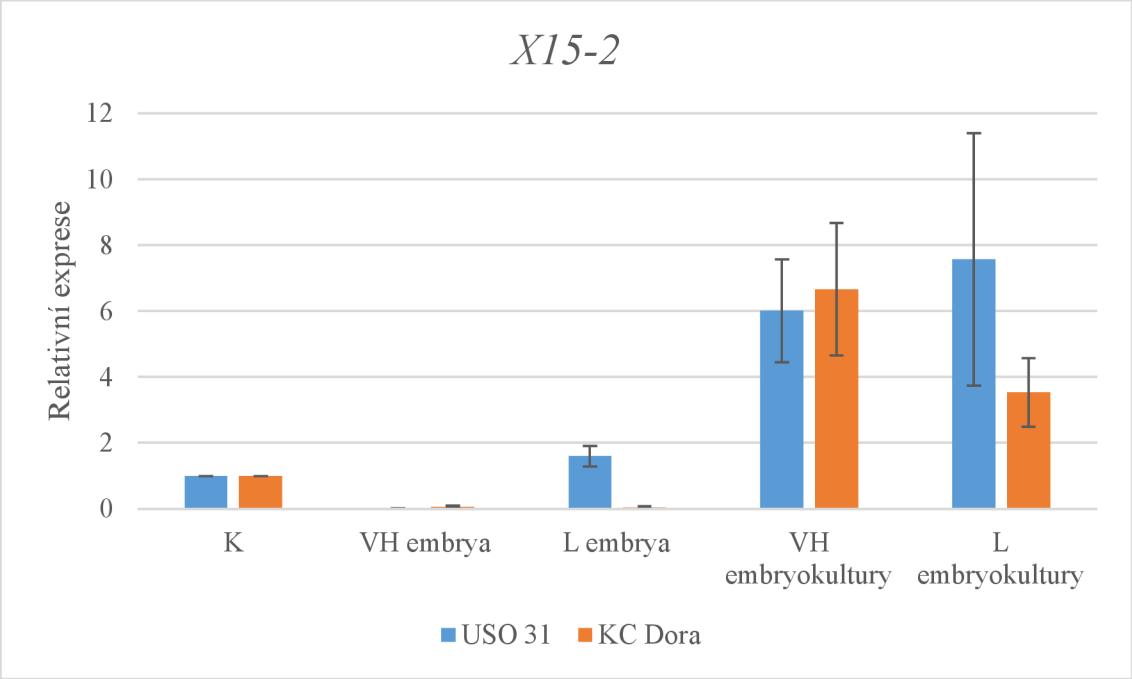
Bylo zjištěno, že míra exprese genu *X15-1* se velice mění v závislosti na kultivaci embryí a je zároveň genotypově specifická. U VH embryí obou kultivarů se tento gen téměř neexprimoval. Zatímco byl detekován drobný nárůst exprese u L embryí KC Dory, u embryí USO 31 v závěrečné fázi vývoje se *X15-1* exprimoval celkově nejvíce. Kultivací embryí KC Dory byla exprese tohoto genu výrazně indukována (Obr. 5). Embryokultury USO 31 však exprimovaly *X15-1* přibližně ve stejné míře jako kontrolní vzorky listu.



Obrázek 5: Změna exprese genu *X15-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.4 Exprese genu *X15-2*

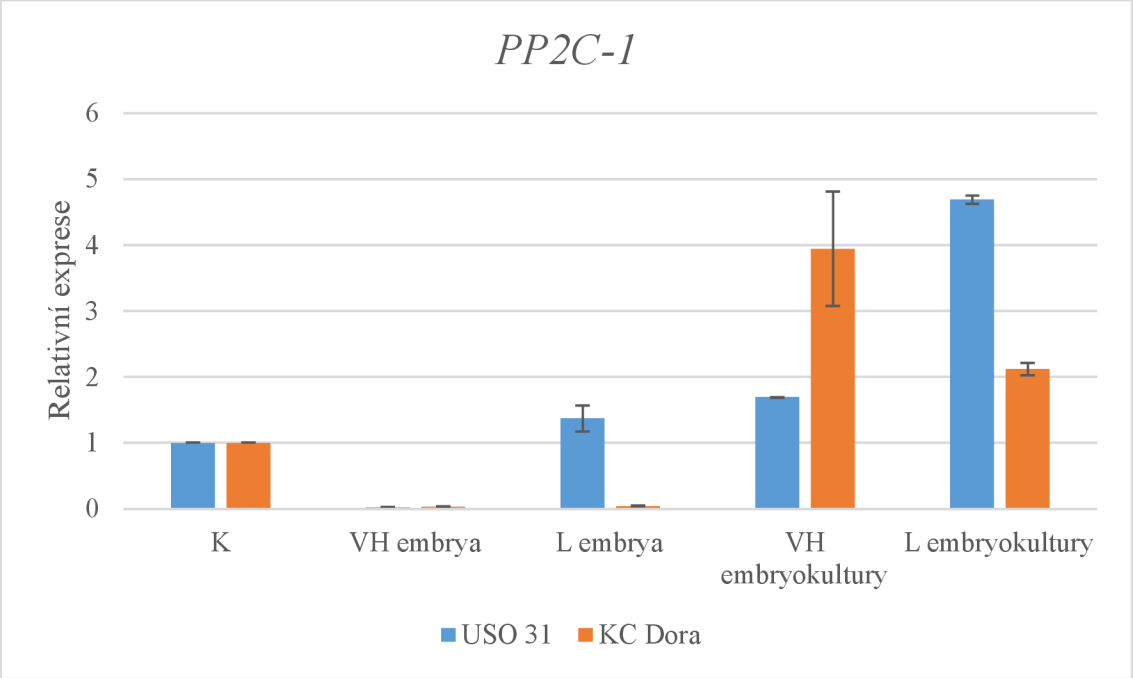
Vývojové stadium embrya neovlivnilo hladinu exprese *X15-2* v takové míře jako kultivace *in vitro*. Embrya ve vývojové fázi vycházkové holi tento gen téměř neexprimovala. U L embryí USO 31 byl zaznamenán drobný nárůst exprese 16x, ale u KC Dory došlo k poklesu o 43 %. Kultivace embryí přinesla výrazné zvýšení exprese tohoto genu u obou zkoumaných odrůd konopí. U USO 31 byl *X15-2* ve VH embryokulturých 600x více exprimován, nežli v izolovaných VH embryích, a v L embryokulturách 4,7x více oproti L embryím. U KC Dory se kultivací VH embryí zvýšila exprese 95x a u L embryí 88x (Obr. 6).



Obrázek 6: Změna exprese genu *X15-2* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.5 Exprese genu *PP2C-1*

Ačkoliv *PP2C-1* již není genem zapojeným do metabolismu auxinů, expresní profil vykazoval téměř identické tendence, jako tomu bylo u předchozího genu (Obr. 7). VH embrya tento gen téměř neexprimovala a kultivací došlo k výraznému nárůstu exprese. L embrya kultivaru USO 31 exprimovala gen *PP2C-1* až 69x více nežli VH embrya. Kultivací VH embryí došlo k nárůstu exprese, a to 85x, a u L embryokultur se exprese zvýšila 3,4x. U embryí obou různých vývojových fází KC Dory byla exprese velice nízká a mezi fázemi nebyl téměř žádný rozdíl. Kultivací VH i L embryí došlo ke značnému nárůstu exprese. V porovnání s expresními profily dalších studovaných genů se tento gen v použitých vzorcích exprimoval nejméně.

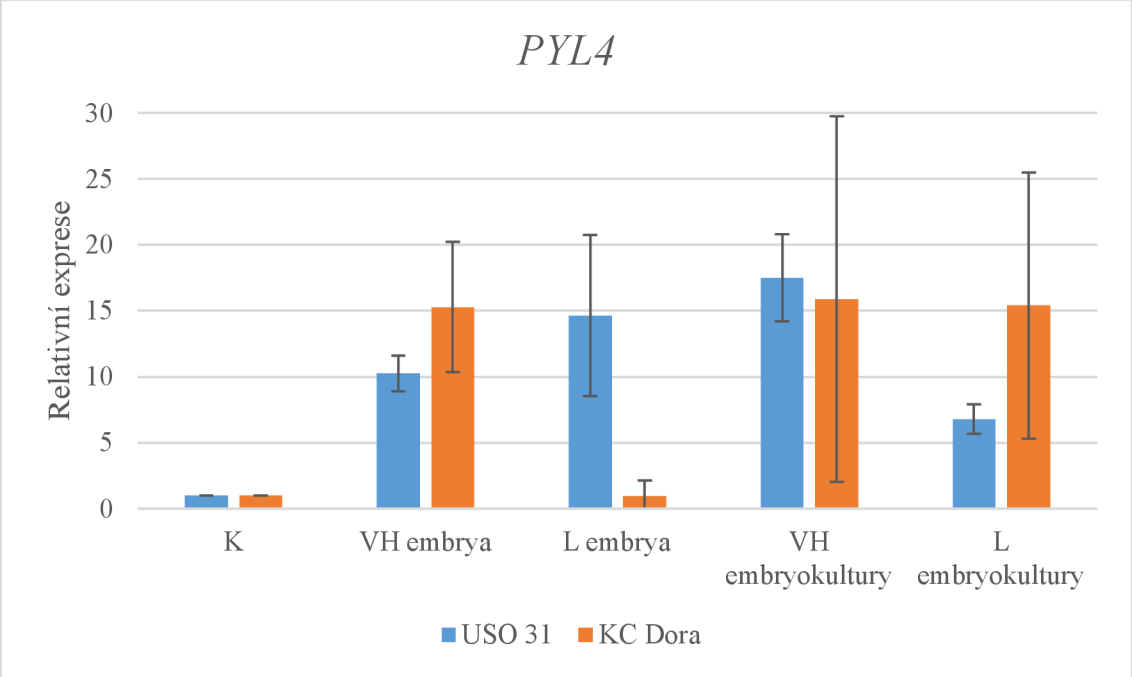


Obrázek 7: Změna exprese genu *PP2C-1* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.6 Exprese genu *PYL4*

Ze všech studovaných genů, vyjma *CanLea34*, byla u tohoto genu míra relativní exprese největší, a to téměř ve všech použitých vzorkách. Značné rozdíly v naměřených hodnotách relativní exprese mezi 2 opakováními RT-qPCR generovaly nejvýraznější nejistoty měření. Oproti ostatním genům byl *PYL4* nejvíce exprimován ve VH embryích a v jejich embryokulturách (Obr. 8).

U L embryí odrůdy USO 31 byl tento gen exprimován o 43 % více nežli tomu bylo u VH embryí. Kultivací VH embryí došlo ke zvýšení exprese o 71 %, zatímco u L embryokultur exprese klesla více jak o polovinu (na 46 %). Exprese ve VH embryích (KC Dora) byla větší nežli tomu bylo u VH embryí (USO 31). U L embryí však exprese poklesla na hodnotu odpovídající exprese v kontrolním vzorku listu. Kultivace způsobila větší expresi genu *PYL4*. U VH embryokultur o 4 % a u L embryokultur až 16x.

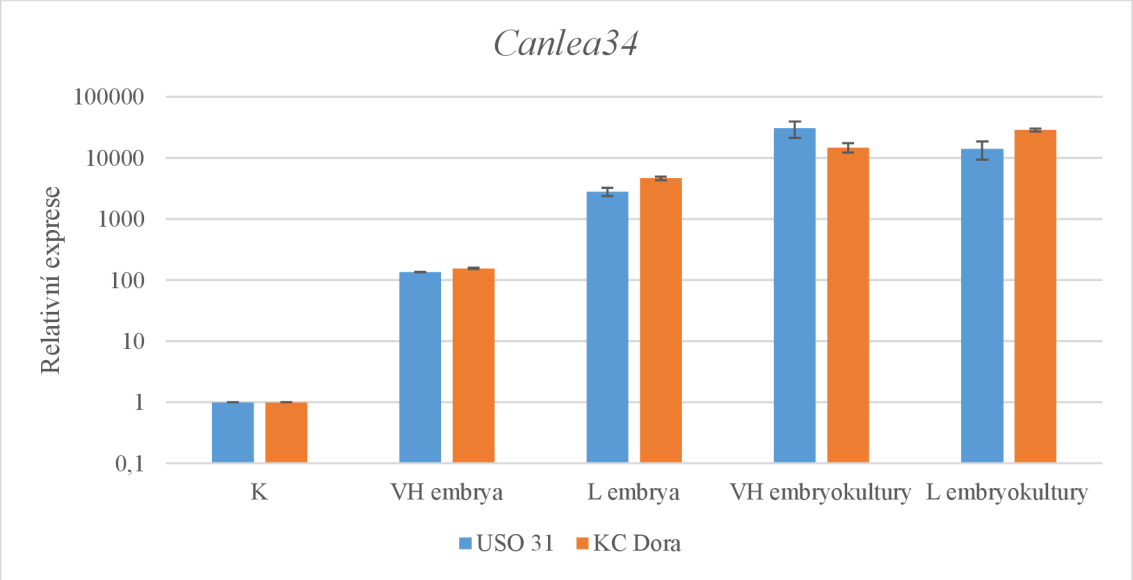


Obrázek 8: Změna exprese genu *PYL4* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

5.2.7 Exprese genu *CanLea34*

CanLea34 byl ze všech zkoumaných genů nejvíce exprimován (relativně k expresi v listu), a to ve všech zkoumaných vzorkách. Nejnižší exprese byla zjištěna ve VH embryích, i ta je však 135x (USO 31) nebo 155x (KC Dora) větší nežli v kontrolním vzorku. L embrya (oproti VH embryím) exprimovala tento gen ještě ve větší míře – L embrya (USO 31) 20,7x a L embrya (KC Dora) až 30x více. Největší změna v expresi však byla zaznamenána u embryokultur. Kultivací VH embryí (USO 31) vzrostla exprese až 225x, u VH embryí (KC Dora) 95x, u L embryí (USO 31) 5x a u L embryí (KC Dora) 6,2x.

Kvůli příliš velkým rozdílům v expresi genu *CanLea34*, byl pro přehlednější grafické znázornění exprese použit graf s logaritmickým vynesením dat na ose y (Obr. 9).



Obrázek 9: Změna exprese genu *CanLea34* u *Cannabis sativa* 'USO 31' a 'KC Dora' v závislosti na vývojové fázi a kultivaci embrya
(**K**) Jako kontrola byla použita exprese v listu. (**VH**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované ve vývojovém stadiu vycházkové hole. (**L**) Embrya a jejich 7denní embryokultury, izolované v konečném vývojovém stadiu.

6 Diskuse

V první experimentální části došlo k založení embryokultur z izolovaných embryí ve vývojovém stadiu vycházkové hole (VH) a v závěrečné fázi vývoje (L). Porovnáním úspěšnosti kultivace a samotných kultivovaných embryí dvou odrůd *Cannabis sativa* 'KC Dora' a *Cannabis sativa* 'USO 31' byly pozorovány drobné odlišnosti, které by mohly být způsobeny genotypovými rozdíly. Pro potvrzení této teorie by však bylo potřeba více experimentů s více opakováním. 70% úspěšnost kultivace VH embryí a 100% u L embryí je v souladu s informacemi, které uvádějí Trigiano a Gray (2005). Úspěšnost kultivace zygotických embryí roste totiž s jejich zralostí.

Hlavní experimentální část se věnovala analýze exprese genů *IAA-1, IAA-2, X15-1* a *X15-2*, které souvisejí s metabolismem auxinů. Dále *PP2C-1* a *PYL4*, ty souvisí s metabolismem ABA a nakonec genu *CanLea34*, který kóduje jeden z LEA proteinů. Získané výsledky potvrzují, že Lea proteiny jsou charakteristické pro pozdní embryogenezi a množství endogenních auxinů a ABA je v průběhu vývoje embrya velice rozličné.

U VH embryí obou kultivarů se nejvíce exprimoval gen *IAA-1, IAA-2* a *PYL4*. *IAA-1*, neboli také *GH3.6*, kóduje enzym indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6. Proteiny GH3 jsou zodpovědné za katalýzu ATP-dependentní tvorby konjugátů auxinu s aminokyselinami. Takto dochází k odbourávání auxinu v buňkách a je obnovována jeho homeostáza (Chen *et al.*, 2010). Oproti kontrolnímu vzorku byla u VH embryí exprese větší. V této vývojové fázi je tedy nutno korigovat množství buněčného auxinu, což by mohlo značit jeho vysokou koncentraci. Z porovnání s ostatními zkoumanými vzorky vychází však najevo, že se tento gen u VH embryí exprimuje nejméně. To by se mohlo vysvětlit tím, že je nutné, aby se auxin v této fázi více akumuloval. *IAA-2* kóduje auxin-induced protein X10A. Jeho exprese tak dokazuje přítomnost auxinu v embryích ve fázi vycházkové hole. Auxin se v průběhu embryogeneze akumuluje nejvíce v raných fázích embryogeneze. Účastní se při stanovení tělního plánu, určuje apikálně-bazální polaritu a hraje roli při vývoji vodivých pletiv, poté jeho koncentrace prudce klesá (Davies, 2010). Produkt *PYL4* je receptorem pro ABA, zprostředkovává tak signál, který vede k buněčné odpovědi závislé na ABA. Vysoká exprese *PYL4* v embryích ve stadiu vycházkové holi značí, že pro embryonální buňky je podstatné, aby došlo k navázání ABA na tento receptor. Davies (2010) uvedl, že ABA je nejvíce koncentrována v období růstu děložních listů. Poté její množství klesá a další vrchol je až v období, kdy dochází k vývoji osemení. To

odpovídá i zjištěné expresi *PYL4* u L embryí (USO 31).

Ze získaných dat byl zjištěn největší meziodrůdový rozdíl v expresi všech zkoumaných genů ve vzorkách L embryí. Tato embrya KC Dory exprimovala sledované geny jen ve velice malé míře. Exprese u L embryí druhého kultivaru byla ale téměř vždy jednou z největších. Nemyslím si, že se jedná o záležitost genotypu, jelikož se takovýto expresní propad projevil pouze u tohoto jednoho vzorku (L embrya). Použitá semena obsahovala embrya v závěrečné fázi vývoje. Domnívám se však, že u KC Dory byla již plně maturovaná a v dormantním stavu. Odpovídá tomu již kompletně pigmentované, pevné a vysušené osemení, které bylo na semenech KC Dory pozorováno. Exprese genů, jak uvádí Mayer a Poljakoff-Mayber (1989), je v období dormance potlačena na minimum. Dokonce i ABA, která samotnou dormanci indukuje, se v tomto stadiu již téměř nevyskytuje. Naopak osemení použitých semen kultivaru USO 31 nebylo takto plně vyvinuto. Obsažená embrya, i když morfologicky byla identická, musela být ještě ve fázi přípravy na dormanci. Z významné exprese zejména *IAA-1, IAA-2, X15-1* a *PYL4* usuzuji, že koncentrace auxinů i ABA byla v této fázi vysoká. Jak již bylo zmíněno, auxiny by v tomto období již neměly být zastoupeny v takové míře. Zvětšování objemu embrya stále ještě tedy mohlo probíhat prostřednictvím auxinem indukované proliferace buněk. Vlivem ABA se však buňky také již mohly pomalu přestat dělit a naopak se začít zvětšovat ukládáním zásobních látek (Davies, 2010).

Gao *et al*. (2018) identifikoval odlišně exprimované geny u rostlin konopí setého za podmínek, kdy byly rostliny vystaveny abiotickým stresům. Bylo zjištěno, že geny *X15-1, X15-2, IAA-1* a *IAA-2* byly za těchto podmínek méně exprimovány. Tyto výsledky jsou v rozporu se zjištěnými v tomto experimentu. Reakce buněk embryí na snížení hydratace v průběhu embryogeneze jsou alespoň v rámci studovaných genů odlišné od buněčné odpovědi celých rostlinných struktur v nepříznivých podmínkách.

Kultivací embryí nastala vynucená fáze klíčení. Buňky začaly růst, proliferovat a diferenciovat. To je nutně spojené s vyšší buněčnou koncentrací auxinů. Za těchto podmínek by měla být u genů *IAA-1, IAA-2, X15-1* a *X15-2* očekávána největší míra exprese u embryokultur, což tento experiment, až na ojedinělé výjimky, potvrdil. Tento výsledek by mohl být ovlivněn i kooperací cukrů v růstovém médiu s auxiny. Účinek cukrů na expresi podobných genů popisuje ve své práci Wang *et al*. (2021). Bylo zjištěno, že za přítomnosti sacharózy se u okurkových liniích zvýšila exprese genů *IAA 14, X15, PP2C* a *GH3.6*.

Cukry totiž neslouží pouze jako zdroj energie, jedná se i o signální molekuly, které ve spolupůsobení s auxiny regulují růst rostlin. *PP2C-1* kóduje protein, který patří do podrodiny proteinových fosfatáz 2C. Slouží jako negativní regulátor na ABA závislé genové exprese. Výsledky výše zmíněného experimentu souhlasí s naměřenými hodnotami exprese tohoto genu ve VH a L embryokulturách obou odrůd. Tyto výsledky potvrzuje i Davies (2010). Uvádí, že za přítomnosti sacharózy byl u kultivovaných embryí sóji pozorován signifikantní nárůst hladiny endogenní ABA.

Vysoké hladiny kyseliny abscisové souvisí také s buněčnou odpovědí na abiotické stresy, kterým jsou embryokultury vystaveny. Gao *et al*., (2018) se v již zmíněné práci věnoval také expresi genů *PYL4* a *PP2C-1* u konopí setého. Výsledky byly takové, že se vliv abiotického stresu odrazil na zvýšení exprese genů pro PP2C-1. Gen pro PYL4 byl však méně exprimován, než tomu bylo za optimálních podmínek.

Trigiano a Gray (2005) uvedli, že ABA indukuje expresi *LEA* genů, jejichž produkty jsou charakteristické pro pozdní vývojové fáze rostlinných embryí. V tomto experimentu byl podle očekávání zaznamenán významný nárůst exprese *CanLea34* u L embryí (v porovnání s VH embryi). Větší vyzrálost L embryí (KC Dora) potvrzuje i o bezmála 40 % větší míra exprese tohoto genu, nežli tomu bylo u L embryí druhého kultivaru. Kultivací embryí však exprese vzrostla až 225x (VH embryokultury USO 31). Potvrzuje to, že embryokultury jsou pod vlivem různých abiotických stresů. Výsledky naznačují, že by to mohlo být způsobeno vysokou koncentrací ABA, což, jak již bylo zmíněno, podporuje Davies (2010). Na důležitosti přítomnosti exogenní sacharózy ještě přidá, že dle Hughes a Galau (1991), pokud kultivace embryí probíhá pouze na bazálním médiu, obsah endogenní ABA s časem klesá.

7 Závěr

Bylo potvrzeno, že úspěšnost založení embryokultur roste se stupněm vývoje a vyzrálostí použitých embryí. Kultivace se u embryí ve stadiu vycházkové hole projevila nejdříve růstem v apikální oblasti a zatímco již mohly být pozorovány první pravé listy, další morfologické změny nemusely být ještě patrné.

U embryí 2 kultivarů technického konopí setého – *Cannabis sativa* 'KC Dora' a *Cannabis sativa* 'USO 31' byly v druhé části sledovány změny v expresi genů v závislosti nejen na stupni jejich vývoje, ale i na kultivaci v prostředí *in vitro*. Zkoumány byly geny zapojené do metabolismu auxinů (*IAA-1, IAA-2, X15-1* a *X15-2*), také geny zapojené do metabolismu ABA (*PP2C-2* a *PYL4*) a nakonec gen *CanLea34*. Lea proteiny jsou charakteristické svojí přítomností při pozdních fázích embryogeneze. Embrya ve stadiu vycházkové hole nejvíce exprimovala geny *IAA-1, IAA-2 a PYL4*, což může být spojeno s růstem děložních listů.

Embrya (KC Dora) v závěrečné fázi vývoje byla již plně maturovaná a v dormantním stavu, proto byla naměřena jen minimální exprese všech genů, vyjma *CanLea34*. Tomu odpovídající embrya druhého kultivaru (USO 31) byla naopak ještě metabolicky aktivní a zejména geny *IAA-1, IAA-2* a *X15-1* byly proto signifikantně exprimovány. S tím souhlasí i bezmála o 40 % menší exprese genu *CanLea34* (oproti maturovaným embryím KC Dory).

Kultivace je pro embrya obdobím růstu, ale také velkého stresu, což se odrazilo na vysoké expresi všech zkoumaných genů. U embryokultur byly zaznamenána i celkově největší exprese, a to genu *CanLea34*. Jeho produkty se zdají být pro toto období nezbytné.

Literatura

[1] Adhikari, Prakash B.; Liu, Xiaoyan; Wu, Xiaoyan; Zhu, Shaowei; Kasahara, Ryushiro D. (2020): Fertilization in flowering plants: an odyssey of sperm cell delivery. *Plant Molecular Biology* 103: 9–32.

[2] Anonym. Cannabis trichomes - blog-konopí. [online] [cit. 2021-11-21] Dostupný z: ⟨https://cs.cannabis-mag.com/trichomes/⟩.

[3] Bakel, Harm van; Stout, Jake M.; Cote, Atina G.; Tallon, Carling M.; Sharpe, Andrew G.; Hughes, Timothy R.; Page, Jonathan E. (2011): The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology* 12: R102.

[4] Campbell, Lesley G.; Peach, Kristen; Wizenberg, Sydney B. (2021): Dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.) plants do not express significant sexually dimorphic morphology in the seedling stage. *Scientific Reports* 11: 16825.

[5] Clarke, Robert Conell. Interview with Robert Connell Clarke: Original Hempster. [online] [cit. 2021-11-18] Dostupný z: ⟨https://web.archive.org/web/20110727002712/http://www.norml.org.nz/modules.php?name=News&file=print&sid=588⟩.

[6] Connor, Jason P.; Stjepanović, Daniel; Le Foll, Bernard; Hoch, Eva; Budney, Alan J.; Hall, Wayne D. (2021): Cannabis use and cannabis use disorder. *Nature Reviews Disease Primers* 7: 1–24.

[7] Cutler, Sean R.; Rodriguez, Pedro L.; Finkelstein, Ruth R.; Abrams, Suzanne R. (2010): Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* 61: 651–679.

[8] Davies, Peter J. (ed.). (2010): Plant Hormones. Springer Netherlands, Dordrecht.

[9] De Smet, Ive; Lau, Steffen; Mayer, Ulrike; Jürgens, Gerd. (2010): Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* 61: 959–970.

[10] Divashuk, Mikhail G.; Alexandrov, Oleg S.; Razumova, Olga V.; Kirov, Ilya V.; Karlov, Gennady I. (2014): Molecular Cytogenetic Characterization of the Dioecious *Cannabis sativa* with an XY Chromosome Sex Determination System. *PLOS ONE* 9: e85118.

[11] Dresselhaus, Thomas; Sprunck, Stefanie; Wessel, Gary M. (2016): Fertilization Mechanisms in Flowering Plants. *Current Biology* 26: R125–R139.

[12] Dure, Leon; Greenway, Sally C.; Galau, Glenn A. (1981): Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20: 4162–4168.

[13] Gabrielová, H. (2007): Konopí - biomasa pro život. Konopa, Chvalec.

[14] Gao, Chunsheng; Cheng, Chaohua; Zhao, Lining; Yu, Yong-ting; Tang, Qing; Xin, Pengfei; Liu, Touming; Yan, Zhun; Guo, Yuan; Zang, Gonggu. (2018): Genome-Wide Expression Profiles of Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Response to Drought Stress. *International Journal of Genomics* 2018: 1–13.

[15] Gao, Shan; Wang, Baishi; Xie, Shanshan; Xu, Xiaoyu; Zhang, Jin; Pei, Li; Yu, Yongyi; Yang, Weifei; Zhang, Ying. (2020): A high-quality reference genome of wild *Cannabis sativa*. *Horticulture Research* 7: 1–11.

[16] Goldberg, Robert B.; Paiva, Genaro de; Yadegari, Ramin. (1994): Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science* 266: 605–614.

[17] Hammond, Charles T.; Mahlberg, Paul G. (1973): Morphology of glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy. *American Journal of Botany* 60: 524–528.

[18] Hazekamp, Arno; Erkelens, jaap. (2014): Exploring the Sativa Indica dilemma. *Cannabinoids* 9: 9–15.

[19] Hughes, D. W.; Galau, G. A. (1991): Developmental and environmental induction of Lea and LeaA mRNAs and the postabscission program during embryo culture. *The Plant Cell* 3: 605–618.

[20] Hussain, Altaf; Qarshi, Iqbal Ahmed; Nazir, Hummera; Ullah, Ikram. (2012): Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. IntechOpen, London.

[21] Chen, Qingfeng; Westfall, Corey S.; Hicks, Leslie M.; Wang, Shiping; Jez, Joseph M. (2010): Kinetic Basis for the Conjugation of Auxin by a GH3 Family Indole-acetic Acid-Amido Synthetase*. *Journal of Biological Chemistry* 285: 29780–29786.

[22] Leyser, Ottoline. (2018): Auxin Signaling. *Plant Physiology* 176: 465–479.

[23] Li, Zhen; Chi, Hui; Liu, Caiyue; Zhang, Tianbao; Han, Lida; Li, Liang; Pei, Xinwu; Long, Yan. (2021): Genome-wide identification and functional characterization of LEA genes during seed development process in linseed flax (Linum usitatissimum L.) *BMC Plant Biology* 21: 1–193.

[24] Liu, Hao; Xing, Mingyan; Yang, Wenbo; Mu, Xiaoqian; Wang, Xin; Lu, Feng; Wang, Yao; Zhang, Linsheng. (2019): Genome-wide identification of and functional insights into the late embryogenesis abundant (LEA) gene family in bread wheat (Triticum aestivum). *Scientific Reports* 9: 1–11.

[25] Mayer, A. M.; Poljakoff-Mayber, A. (1989): The Germination of Seeds: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies. Pergamon Press, Oxford.

[26] McPartland, John M. (2018): Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research* 3: 203–212.

[27] McPartland, John M.; Hegman, William; Long, Tengwen. (2019): Cannabis in Asia: its center of origin and early cultivation, based on a synthesis of subfossil pollen and archaeobotanical studies. *Vegetation History and Archaeobotany* 28: 691–702.

[28] Ming, Ray; Bendahmane, Abdelhafid; Renner, Susanne S. (2011): Sex Chromosomes in Land Plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 485–514.

[29] Miovský, M.; Bláha, T.; Dědičová, M.; Dvořáček, J.; Gabrehlík, R.; Gabrielová, H.; Gajdošíková, H.; Hanuš, O. (2008): Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium. Grada, Praha.

[30] Mitchell, Jon. (2014): The Secret History of Cannabis in Japan. *The Asia-Pacific Journal* 12: 6.

[31] Miyakawa, Takuya; Fujita, Yasunari; Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko; Tanokura, Masaru. (2013): Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science* 18: 259–266.

[32] Pagnussat, Gabriela C.; Alandete-Saez, Monica; Bowman, John L.; Sundaresan, Venkatesan. (2009): Auxin-Dependent Patterning and Gamete Specification in the *Arabidopsis* Female Gametophyte. *Science* 324: 1684–1689.

[33] Pantůček, Jiří. Konopí seté (*Cannabis Sativa* L.) [online] [cit. 2021-11-21] Dostupný z: ⟨https://www.topvet.cz/herbar/konopi-sete⟩.

[34] Pavlová, Libuše; Fischer, Lukáš. (2011): Růst a vývoj rostlin. Karolinum, Praha.

[35] Pearce, Daniel D.; Mitsouras, Katherine; Irizarry, Kristopher J. (2014): Discriminating the Effects of *Cannabis sativa* and Cannabis indica: A Web Survey of Medical Cannabis Users. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 20: 787–791.

[36] Raman, Vijayasankar; Lata, Hemant; Chandra, Suman; Khan, Ikhlas A.; ElSohly, Mahmoud A. (2017): Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa* L.) Springer International Publishing, Cham.

[37] Ren, Guangpeng aj. (2021): Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances* 7: eabg2286.

[38] Sakamoto, Koichi; Akiyama, Yukio; Fukui, Kiichi; Kamada, Hiroshi; Satoh, Shinobu. (1998): Characterization; Genome Sizes and Morphology of Sex Chromosomes in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Cytologia* 63: 459–464.

[39] Schultes, Richard Evens; Hofman, Albert. Erowid Cannabis Vault: The Nectar of Delight: Výňatek z "Rostliny bohů", od Schultese a Hofmanna. [online] [cit. 2021-11-17] Dostupný z: ⟨https://www.erowid.org/plants/cannabis/cannabis_culture2.shtml⟩.

[40] Skinner, Debra J; Sundaresan, Venkatesan. (2018): Recent advances in understanding female gametophyte development. *F1000Research*: F1000 Faculty Rev–804.

[41] Small, Ernest. (2015): Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *The Botanical Review* 81: 189–294.

[42] Soon, Fen-Fen et al. (2012): Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. *Science (New York, N.Y.)* 335: 85–88.

[43] Staswick, Paul E.; Serban, Bogdan; Rowe, Martha; Tiryaki, Iskender; Maldonado, Marién T.; Maldonado, Mitsa C.; Suza, Walter. (2005): Characterization of an Arabidopsis Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. *The Plant Cell* 17: 616–627.

[44] Trigiano, Robert N.; Gray, Dennis J. (2005): Plant Development and Biotechnology. CRC Press, New York.

[45] Twell, David. (2011): Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction* 24: 149–160.

[46] Twell, David; Park, Soon Ki; Lalanne, Eric. (1998): Asymmetric division and cell-fate determination in developing pollen. *Trends in Plant Science* 3: 305–310.

[47] Vries, Sacco C. de; Weijers, Dolf. (2017): Plant embryogenesis. *Current Biology* 27: R870–R873.

[48] Wang, Miaoqing; Su, Li; Cong, Yi; Chen, Jingjing; Geng, Youling; Qian, Chunlu; Xu, Qiang; Chen, Xuehao; Qi, Xiaohua. (2021): Sugars enhance parthenocarpic fruit formation in cucumber by promoting auxin and cytokinin signaling. *Scientia Horticulturae* 283: 110061.

[49] Yadegari, Ramin; Drews, Gary N. (2004): Female Gametophyte Development. *The Plant Cell* 16: 133–141.

[50] Zhang, Zhongjuan; Laux, Thomas. (2011): The asymmetric division of the Arabidopsis zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sexual Plant Reproduction* 24: 161–169.