

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Využití biotechnologických metod při pěstování technického konopí (*Cannabis sativa* L.)



Bakalářská práce

Marek Širl

2011

Školitel bakalářské práce:

RNDr. Sylva Zelenková, CSc.

Katedra experimentální biologie rostlin PřF UK

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Sylvě Zelenkové CSc. za nezměrnou trpělivost, ochotu, cenné rady a věcné připomínky ke vzniku této práce. Také děkuji svým blízkým za podporu psychickou i materiální.

Obsah

Obsah.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratk.....	6
1. Úvod.....	7
1. Botanika konopí setého.....	7
1.1 Vlastnosti.....	9
1.2 Využití.....	13
2. Přehled využívaných biotechnologických metod.....	16
2.1 Mikropropagace.....	16
2.1.1 Sterilizace.....	16
2.1.2 Klíčení.....	17
2.1.3 Produkce vzrostných vrcholů.....	17
2.1.4 Tvorba kalusu.....	17
2.1.5 Kořenění.....	18
2.1.6 Kultivace pomocí umělých semen.....	18
2.2 Genetická transformace.....	19
2.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.2.2 Ti-plasmid.....	20
2.2.3 Transformace kokultivací s <i>Agrobacteriem</i>	22
3. Výběr vhodného genotypu pro transformaci dle požadovaných vlastností.....	24
3.1.1 Přehled odrůd.....	24
3.1.2 Přehled znaků pro potenciální transformaci.....	25
4. Závěr.....	26
5. Seznam literatury.....	27
6. Přílohy.....	31

Abstrakt

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je všestranně využitelná rostlina, která poskytuje vlákno, celulózu a pazdeří pro průmyslové zpracování, biomasu pro energetické využití a produkuje sekundární metabolity využitelné ve farmaceutickém průmyslu. Pro svoji odolnost vůči stresům a schopnosti akumulovat těžké kovy má potenciální využití i pro fytořemediace. V současné době je snaha získat a odvodit genotypy konopí se specificky vylepšenými vlastnostmi, rozšiřující možnosti jeho uplatnění, nejen pomocí klasického šlechtění, ale zejména transgenozí. Cílem současného výzkumu je proto nalézt optimalizované podmínky, umožňující efektivní kultivaci *in vitro*, jako základní předpoklad genetické transformace. Vhodnou metodou transformace konopí je kokultivace s *Agrobacterium tumefaciens*.

Klíčová slova: *Cannabis sativa*, fytořemediace, mikropropagace, transformace, *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a multi-use crop, able to provide fibre cellulose and hurds for industrial treatment biomass for energy conversion and produces secondary metabolites useful for pharmaceutical application. For its resistance to stress and ability to accumulate high concentration of heavy metals it can be potentially used for phytoremediation. The aim of current research is the development of new strains, with specially improved qualities and the enhancement of its applicability. Besides traditional breeding methods, genetic manipulation might be the possible tool. What is currently discussed is finding optimal conditions allowing effective *in vitro* cultivation as a basic assumption of genetic manipulation. Hemp transformation via *Agrobacterium tumefaciens* co-cultivation might be the appropriate technic.

Keywords: *Cannabis sativa*, phytoremediation, micropropagation, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

Seznam zkratk

2,4-D - 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

CBC - kanabichromen

CBD - kanabidiol

CBG - kanabigerol

DNA - deoxyribonukleová kyselina

GA - kyselina giberelinová

ITIS - Integrated Taxonomic Information System

KIN - kinetin

MS - Murashige a Skoog

NAA - α -naftyloctová kyselina

PCA - Principal component analysis

SNP - Single nukleotid polymorphism

TDZ - thidiazuron

THC - delta-9-tetrahydrokanabinol

1. Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je celosvětově rozšířená kulturní plodina využívaná lidmi již od starověku. Míra jeho rozšíření i intenzita jeho využívání se v průběhu dějin lišila, podle potřeb tehdejších společností. Nyní nachází uplatnění v rozličných oborech lidských činností, ceněno je zejména pro svou všestrannost. Stonky rostlin poskytují vlákno využitelné v textilním průmyslu, pro vysoký obsah celulózy je lze využít i při výrobě papíru, kompozitních materiálů a ve stavebnictví. Semena konopí jsou využitelná jako krmivo pro zvířata a jejich lisováním je získáván olej pro další zpracování. Rostliny konopí jsou v příznivých podmínkách schopny rychlého růstu, lze je tedy využít pro produkci biomasy k energetickým účelům a spolu se zvýšenou odolností vůči toxicitě některých těžkých kovů i využívat pro fytoremediace. Květenství některých odrůd jsou pro obsah metabolických látek využívána ve farmaceutickém průmyslu, je možné konopí použít i pro výrobu drog.

Podobně jako jiné plodiny využívané lidmi bylo i konopí podrobeno intenzivnímu šlechtění ve prospěch požadovaných znaků. Užitím postupů tradičního zemědělství s pomocí moderních šlechtitelských metod bylo dosaženo elitních kultivarů konopí setého, cílených na další zpracování v průmyslu dle požadovaných vlastností. Nyní převládá názor, že zapojení biotechnologických metod do dalšího zlepšování vlastností konopí by mohlo být přínosné. Cílem této práce je shrnout dostupné poznatky o těchto metodách a možnostech jejich praktického využití.

1. Botanika konopí setého

Konopí je jednou z nejstarších lidmi využívaných plodin vůbec. Jeho původ je odhadován do Centrální Asie, zde je také pozorován jeho přirozený výskyt. Odtud bylo pravděpodobně v souvislosti s domestikací rozšířeno do celého světa.

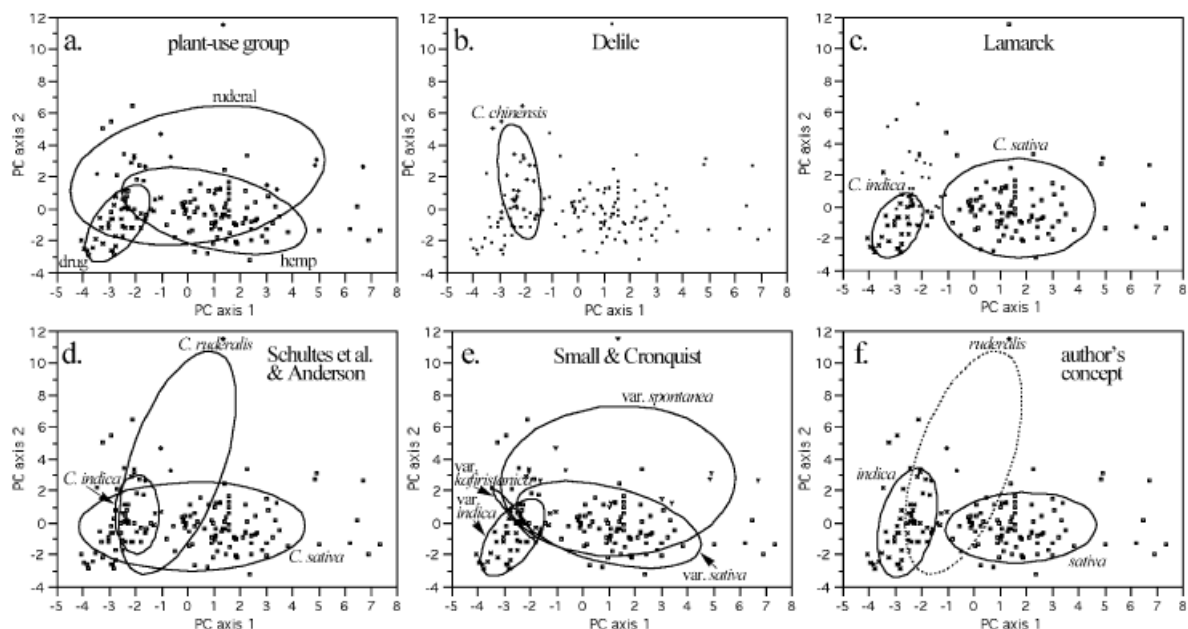
Počátky jeho využívání se dle různých literárních odkazů datují do Číny až 10000 let před naším letopočtem, a to v medicíně. Předpokládá se, že o konopí se jako o léčivé rostlině zmiňují i texty z ostatních dávných civilizací (Mezopotámie 5000 let př.n.l.), většinou ovšem pod jiným názvem. V Egyptě bylo využíváno v medicíně a pro přípravu papíru cca 2350 let př.n.l. (Russo, 2007). Na základě pylových analýz z geologického profilu lze doložit přítomnost konopí v Itálii již 3000 př.n.l, významný nárůst množství pylu se časově shoduje

s nárůstem pylu jiných ruderálních rostlin i obilovin (Mercuri et al., 2002) Lze tedy předpokládat, že konopí v Evropě jako první znali již Římané.

Taxonomické zařazení konopí je problematické. Jako první je popsal Linné (1753) a určil jej jako jediný dále nedělený druh *Cannabis sativa* L. To modifikoval Lamarck (1875), když na základě rozdílných vlastností kultivarů z Indie, rozlišil *Cannabis sativa* a *Cannabis indica* jako dva různé druhy. Následovala řada více či méně odlišných konceptů od několika autorů, uvažující různé vztahy mezi variantami konopí, mnohdy určené i jako samostatné druhy. Základními parametry pro rozlišování byly většinou geografický původ a vnější morfologické znaky. Mezi pěstiteli konopí po celém světě je rozšířená laická terminologie rozlišující konopí seté, poskytující vlákno a konopí indické, obsahující psychoaktivní látky, pěstované převážně k výrobě drogy. Skutečnost, že držení a produkce sušených květenství samičích rostlin s vysokým obsahem THC, označovaných jako marihuana, je ve většině zemí protizákonné, vedlo k vytvoření alternativního názvosloví pro konopí využívané pro průmyslové účely. Takzvané technické konopí je netaxonomický pojem vymezující odrůdy konopí, jež mají obsah psychoaktivních látek nižší než zákonem stanovená hranice a je tedy možná jejich legální kultivace. V rámci Evropské Unie je tato hranice stanovena čl. 5a nařízení Rady (ES) č. 1251/1999, ve znění nařízení Rady (ES) č. 1672/2000 na 0,2% THC v sušině.

Současné taxonomické řazení dle ITIS (Integrated Taxonomic Information System) určuje *Cannabis sativa* L. jako samostatný druh, se dvěma poddruhy *Cannabis sativa* ssp. *indica* a *Cannabis sativa* ssp. *sativa*. Toto řazení je však stále diskutováno. V současnosti je velmi respektován názor, že rod *Cannabis* zahrnuje více vysoce hybridizovaných, introgresních, panmiktických a velmi variabilních druhů (Small and Cronquist, 1976). Na základě toho je stále zkoumáno postavení jednotlivých variant uvnitř rodu pomocí molekulárních markerů. Ve velmi obsáhlé studii podrobil Hillig (2005) zkoumání 157 různých vzorků konopí známého geografického původu. Z PCA analýzy frekvence alozymů v 17 různých genových lokusech velmi jasně vyplývají dvě centra diverzity, která odpovídají tradičnímu rozdělení na dva druhy *sativa/indica* (viz. Obr.č. 1). Genofond označovaný jako *Sativa* zahrnoval vzorky divoce rostoucího konopí z východní Evropy a odrůdy pěstované na vlákno a semena v Evropě a Střední Asii. Genofond *Indica* byl tvořen vzorky z dálného východu, odrůd pěstovaných pro vlákno v Jižní Asii a Číně, zástupce z Afriky a jižní Ameriky, odrůdy z Afghánistánu a Pákistánu využívané k přípravě drog a rostliny z divoce rostoucích populací v Indii a Nepálu. Zároveň lze odvodit, že je velmi pravděpodobná existence třetího centra

diverzity odpovídající druhu *Cannabis ruderalis* (Hillig, 2005). Obdobných výsledků bylo dosaženo i srovnáním chloroplastové a mitochondriální DNA 188 vzorků ze 76 různých populací metodou SNP (Gilmore et al., 2007). Lze tedy předpokládat, že taxonomické členění dle ITIS není definitivní a pravděpodobně dozná změn.

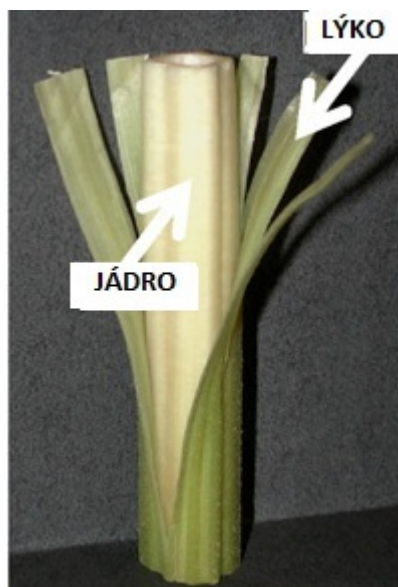


Obr.č. 1 Srovnání různých taxonomických konceptů s PCA analýzou molekulárních dat. Převzato z Hillig, 2005.

Konopí je typickým zástupcem čeledi *Cannabaceae*, jeho nejbližším příbuzným je tedy chmel (*Humulus*). Tradičně tuto čeleď tvoří pouze tyto dva rody, nicméně v nedávné době byly publikovány práce upravující taxonomii řádu *Urticales*, řadící k nim na základě molekulárních dat i rod *Celtis* (Sytsma et al., 2002). Tato genetická příbuznost může mít potenciální význam při genovém inženýrství.

1.1 Vlastnosti

Konopí seté je jednoletá rostlina dorůstající výšky 60 – 400 cm v závislosti na odrůdě a podmínkách. Rostliny odrůd technického konopí jsou většinou nepříliš větvené, s vstřícnými listy a dlouhým řapíkem. Odrůdy pěstované pro produkci drogy jsou většinou nižšího vzrůstu, s výrazným větvením spíše keřovitého charakteru. Listy jsou dlanitě složené z tří až mnoha užších kopinatých lístků s pilovitým okrajem. Stonek konopí je tvořen dřevnatým jádrem, v kterém se u starších částí rostliny tvoří středová dutina, obaleném vrstvou lýka (viz.Obr.č. 2).



Obr.č. 2 Stonek konopí, patrné je dřevnaté jádro obalené vrstvou lýka, zdrojem vlákn. Upraveno podle van den Broeck et al., 2008

Životní cyklus trvá zhruba 5-6 měsíců, vývoj květu začíná přibližně po 3-4 měsících (Moliterni et al., 2004). Konopí je krátkodenní rostlina, kvetení lze tedy v laboratorních podmínkách indukovat fotoperiodou kratší než 12 hodin. Toho je masivně využíváno při tzv. pěstování rostlin pod umělým osvětlením, techniky zaměřené především na výrobu marihuany (Knight et al., 2010).

Přírozně se konopí nachází ve dvoudomých populacích s poměrem pohlaví 1 : 1, kde je výskyt jednodomých jedinců malý, cca 10-20 rostlin na hektar (Ranalli, 2004). Jsou známy i čistě jednodomé varianty. Dvoudomé odrůdy se vyznačují výrazným pohlavním dimorfismem. Samčí rostliny jsou většinou vyšší, nenesou tolik listů a rychleji dozrávají.

Květenství samčí rostliny je převislá lata. Samičí rostlina má úžlabní květenství, vyvíjí se na vrcholku rostliny nebo jejích bočních větvích. Plodem je nažka. Konopí produkuje velké množství pylu, většinou rozšiřovaného větrem. U jednodomých rostlin jsou obě květenství přítomna na jedné rostlině, typicky je samičí květ umístěn výše (viz. Obr.č. 3).

Chromozomální sada obsahuje devět párů autozómů a jeden pár pohlavních chromozómů: X a Y. Samčí pohlaví je určeno kombinací XY a samičí kombinací XX, obdobně je tomu u blízké příbuzné rostliny chmele *Humulus Lupulus* (Moliterni et al., 2004). Výsledné pohlaví rostliny ale může být do značné míry ovlivněno i prostředím ve kterém se nachází. Porovnáním poměru pohlaví třech různých odrůd v kontrolním médiu a v médiích obohacených o soli těžkých kovů bylo zjištěno, že konopí je snadno ovlivnitelné k vychýlení rovnováhy ve prospěch jednoho pohlaví, tzv. feminizaci nebo maskulinizaci (Soldatova and Khryanin, 2010). Při obohacení média o soli CuSO_4 a ZnSO_4 převyšoval počet samičích rostlin zhruba o čtvrtinu (25-28%) v porovnání s kontrolním médiem. Použití $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ zase vedlo k maskulinizaci populace, poměr samců byl o více než 30 % vyšší než v kontrolním médiu. Mechanismus působení pravděpodobně souvisí se změnou fytohormonální rovnováhy v médiích s těžkými kovy. Soldatova a Khryanin (2010) naměřili výrazné změny v koncentracích zeatinu a GA. Lze tedy předpokládat, že tyto fytohormony ovlivňují výsledný pohlavní projev rostlin konopí.



Obr.č. 3 Samičí (a) a samčí (b) květenství *Cannabis Sativa* u dvoudomé a jednodomé varianty. Převzato a upraveno z Finta-Korpeřová and Berenji, 2007 a <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=185>

Konopí produkuje sekundární metabolity. Vzhledem k psychoaktivním účinkům některých z nich byly vždy v popředí výzkumu druhu *Cannabis sativa*. Jejich současné klinické využití je zejména v léčbě roztroušené sklerózy a využívají se také pro potlačení nevolnosti při chemoterapiích, potenciální využití se zkoumá pro léčbu Alzheimerovy choroby a rakoviny. Léky vyrobené z metabolitů konopí (Marinol, Bedrobinol, Sativex..) jsou již na předpis dostupné v USA a některých zemích Evropské Unie, od letošního roku je v ČR pro pacienty s roztroušenou sklerózou zaveden Sativex. U technického konopí převládá tendence syntézu některých metabolitů utlumit.

Na základě spektrometrických měření bylo z listů konopí izolováno přes 400 různých chemických metabolitů (Turner et al., 1980). Z tohoto počtu se jich přibližně 70 přirozeně vyskytuje pouze v konopí, odtud také jejich název: kanabinoidy (Turner et al., 1980, Mechoulam and Ben-Shabat, 1999). Chemicky se jedná o terpenofenolické látky, s 21 uhlíky, které se do svojí neutrální formy dostávají dekarboxylací kyseliny. Dekarboxylace může probíhat po určitém čase spontánně, může být indukována vyššími teplotami, UV zářením a zásaditým prostředím. (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008). Nejvýznamější co do četnosti výskytu jsou kanabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 - THC) jemuž je přičítána psychotropní aktivita, kanabigerol (CBG) a kanabichromen (CBC). Jejich vzájemný poměr také určuje chemotyp konkrétní rostliny konopí. Rozlišujeme tři základní chemotypy podle koncentrací dvou hlavních kannabinolů a jejich vzájemného poměru. Jsou to tzv. drug-type varianta s nízkým poměrem CBD/THC, vzhledem k vysokému obsahu THC, varianta

s vyváženým poměrem CBD/THC a varianta fibre-type s převahou CBD a hodnotami THC mnohdy nezaznamenanými pomocí analytických metod (de Meijer et al., 2003).

Biosyntéza kannabinolů je velmi dobře prozkoumána. Jejich prekurzorem je kanabinogerylová kyselina (CBGA), která může vzniknout více cestami, zmapována je její syntéza za pomoci polyketid syntázy (Raharjo et al., 2004). Z CBGA jsou pomocí příslušných syntáz odvozeny kannabinolové kyseliny THCA, CBDA nebo CBCA a z nich potom další metabolity (Taura et al., 2007). Obrázek biosyntézy a degradací kanabinoidů v příloze (viz. Příloha 1). Z výše uvedeného vyplývá, že rozdílem mezi drug-type a fibre-type kultivary konopí je aktivita THCA syntázy, jež zásadním způsobem ovlivňuje přítomnost psychoaktivního metabolitu Δ^9 -THC (Taura et al., 2007). Její činnost byla pomocí zobrazení její exprese lokalizována do žláznatých trichomů nacházejících se na květenství samičích rostlin, v menší míře i na listech a stonku. (Sirikantaramas et al., 2005). Jedná se o molekulární potvrzení běžně známého faktu. Velká pozornost byla věnována i genu pro THCA syntázu. Gen čítá 1635 nukleotidů a kóduje 545 aminokyselin, z nichž 28 je signálních, v knihovně GenBank je k dohledání pod kódem AB057805 (Sirikantaramas et al., 2004).

Příčina tvorby sekundárních metabolitů u konopí není doposud zcela objasněna. Pravděpodobně se jedná o schopnost umožňující rostlině vyrovnat se s různou stresovou zátěží. Je typické, že slunné počasí a tedy i zvýšená fotoradiace u rostlin konopí zvyšuje produkci kanabinoidních metabolitů, je tedy pravděpodobné, že kanabinoidy mohou fungovat jako pohlcovače UV záření (Pate, 1994) V pokusech s osvětlením rostlin UV-B zářením se podařilo prokázat, že drug-type odrůdy přirozeně produkující THC, reagují zvýšením jeho koncentrace, nezměněná však zůstává koncentrace ostatních kanabinoidů. U odrůd fiber-type, obsahující THC v malých koncentracích nebo vůbec, byly změny zanedbatelné. Následné měření stability kanabinoidů v pryskyřici sebrané z mladých listů rostlin, prokázalo stabilitu THC. Po sedmidenním osvětlení UV-B zářením byl naměřen úplný rozpad CBD, naproti tomu koncentrace CBC a THC zůstávaly neměnné (Lydon et al., 1987). Obecně známo je též, že odrůdy vyskytující se blíže rovníku, tedy míst s vyšším podílem UV-B záření, jsou bohatší na celkový obsah kanabinoidů než rostliny rostoucí ve vyšších zeměpisných šířkách. Výše uvedené patrně platí i pro vyšší nadmořské výšky.

Ve studii na 10 různých stanovištích v Kansasu byla zaznamenána změna koncentrace THC v závislosti na lokalitě. U nehostinných stanovišť, na kterých se musely rostliny vyrovnávat

s větší stresovou zátěží, byla i koncentrace THC vyšší (v rozmezí od 0.012 do 0.49%). Stanoviště byla hodnocena podle dostupné vlhkosti, obsahu živin a celkového charakteru půdy. Byla pozorována také zajímavá pozitivní korelace mezi kompeticí rostlin na stanovišti a vzrůstající koncentrací THC (Latta and Eaton, 1975).

Zvýšení produkce THC je tedy univerzální odpovědí rostlin na stresové podmínky. Lze předpokládat, že mutace umožňující rostlině vytvářet THCA syntázu poskytovala dané rostlině výhodu ve vnitropopulační kompetici a byla tedy fixována. K vývoji variant s různými obsahy jednotlivých kanabinoidů tedy nejspíš vedla schopnost rostlin produkující THC lépe se přizpůsobit prostředí a přenést své vlohy na potomstvo. Teorii, že jednotlivé chemotypy konopí vznikly nezávisle na lidské činnosti a pravděpodobně ještě dříve, než je lidstvo začalo intenzivně šlechtit, vyslovil i Karl W. Hillig (2005).

1.2 Využití

Konopí je spolu s lnem hlavní rostlinou pěstovanou v Evropské Unii pro využití v průmyslu. Pro srovnání uvádím pěstební plochy lnu a konopí, v roce 2004 byl len pěstován přibližně na 125000 ha a konopí zhruba na 15500 ha, v roce 2006 len obsáhl plochu 105025 ha a konopí 14577 ha (Karus and Vogt, 2004, KES, 2008). V ČR bylo v roce 2008 oseto 1530 ha v roce 2010 pouze 142ha. Pěstování konopí je finančně dotováno Evropskou Unií.

Mezi hlavní přednosti konopí patří rychlý a efektivní nárůst rostlinné hmoty v relativně krátkém čase. Kombinací pěstebních podmínek a vhodně zvolené odrůdy lze docílit výnosu až 25 t suché nadzemní hmoty na jeden hektar, z které je možné získat až 12 t celulózy (Struik et al., 2000). To je samozřejmě ovlivněno aktuálním počasím daného roku. V ČR je statistický výnos kolem 10 t suché hmotnosti na hektar (Tošovská and Buchtová, 2010).

Vlákno je většinou cílový produkt pěstování konopí, dále zpracováván pro výrobu textilu a lan nebo může být přidáváno jako pojivový prvek do kompozitních materiálů. Hlavní přednosti jsou velice malý průměr a zároveň velmi vysoká pevnost v tahu ($44 \text{ kN} \cdot \text{tex}^{-1}$ při průměru 0.25 mm) a také velmi nízká hmotnost (Khan et al., 2011). Uvedených hodnot bylo dosaženo při hustotě pěstovaných rostlin $350 \text{ ks} \cdot \text{m}^{-2}$. Hustota pěstovaných rostlin je vedle vhodně zvolené odrůdy dalším faktorem ovlivňujícím kvalitu vlákna. Rostliny více seskupené tvoří delší a tenčí vlákna při zachování dostatečné pevnosti v tahu. Ideální pěstební hustota se jeví zhruba 300 rostlin na m^2 (Schäfer and Honermeier, 2006). Vlákna konopného lýka jsou

odvozena od cévních svazků stonku a jsou tvořena množstvím elementárních vláken. Elementární vlákno je tvořeno jednotlivými pericyklickými floémovými buňkami délky 20-50 mm. Jejich buněčná stěna je složena z rozdílných vrstev tvořených celulózu, hemicelulózu, ligninem a pektinem. Sekundární buněčná stěna, která tvoří většinu z buněčné stěny těchto buněk, je složena převážně z celulózy a hemicelulózy a pouze z malého množství ligninu a pektinu (van den Broeck et al., 2008, Schäfer and Honermeier, 2006, Bonatti et al., 2004). Proces tvorby primárního vlákna u konopí je nyní intenzivně zkoumán pro svůj potenciál ve zlepšování užitých vlastností konopí pomocí biotechnologických metod.

Zbytkovým produktem při extrakci vlákna je pazdeří, drť dřevnatého jádra stonku. Pazdeří z konopí je lehčí než podobný materiál z jiných přírodních látek, je velmi porézní a má vysokou izolační účinnost. Lisované desky z pazdeří jsou využívány jako tepelná izolace ve stavebnictví, je i součástí tzv. konopného betonu, lehkého stavebního materiálu.

Polní rotace plodin je další významná oblast využití konopí. Při polních pokusech bylo zaznamenáno úplné potlačení růstu patogenní houby *Verticillium dahliae* a také stagnace populací půdních nematod druhu *Meloidogyne chitwoodi* (Kok et al., 1994). Za předpokladu možnosti následného zpracování je konopí ideální rostlina pro polní rotace ozdravující půdu.

Produkce energie získaná spalováním biomasy rostlin konopí je další potencionální oblast využití. Vzhledem ke svým vlastnostem (rychlý nárůst hmoty, odolnost vůči prostředí, vysoká výhřevnost) je takřka ideální jednoletou energetickou plodinou (Rice, 2008). Technika pěstování konopí na spalitelnou biomasu zahrnuje dřívější setí (březen) a nižší hustotu rostlin na hektar, je tedy odlišná od metod používaných při pěstování na vlákno. Vysoce efektivní se také jeví přeměna konopné biomasy na etanol a metan. Použitím optimalizovaného postupu výroby lze dosáhnout produkce 2600-3000 litrů etanolu a zhruba 3000 m³ metanu z jednoho hektaru osetého konopím, další optimalizace postupu jsou intenzivně zkoumány (Kreuger et al., 2011).

Olej získaný lisováním konopných semen má uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Využívány jsou také extrakty z konopných květenství. Obsahují totiž některé látky výrazně potlačující mikrobiální aktivitu, například účinně inhibují růst gram pozitivních bakterií s patogenním působením v trávicím traktu (Nissen et al., 2010).

Fytoremediace je velmi aktuální téma uvažované při uplatnění technického konopí. Experimentálně bylo zjištěno, že konopí snese vysoké koncentrace některých těžkých kovů,

aniž by to výrazněji ovlivňovalo jeho růst. Také stavba rostliny je takřka ideální pro fytoremediace. Relativně snadno sklíditelná nadzemní část rostliny, má dostatečnou hmotu schopnou hromadit těžké kovy. Kořenový systém zase obsáhne poměrně velkou plochu, ze které může těžké kovy čerpat. V polních podmínkách může dorůst až 2 m hluboko, běžně dorůstá hloubky kolem 130 cm. Většina hmoty kořenového systému se však nachází v hloubce do 50 cm, odkud je tedy sání polutantů neúčinnější (Amaducci et al., 2008) Další výhodou konopí je odolnost vůči více těžkým kovům. Půdy v průmyslových oblastech totiž většinou bývají zamořeny více polutanty zároveň. Konopí relativně dobře akumuluje olovo (Pb) kadmium (Cd) a nikl (Ni) (Linger et al., 2002, Shi and Cai, 2009) a je schopno vyrovnat se s jejich vysokými koncentracemi v kořeni, bez zaznamenaných změn snese 800 mg Cd na kg suché hmotnosti. Naproti tomu je znát pokles vitality rostliny při koncentracích 50 - 100 mg Cd na kg suché hmotnosti v nadzemních částech (Linger et al., 2005). U konopí nebyla pozorována akumulace chromu (Cr) přítomného v půdě v rostlinných částech (Citterio et al., 2003). Schopnost konopí akumulovat kadmium je 126 g Cd za vegetační sezónu na jeden hektar půdy, zůstává tak přibližně 16krát nižší než u hyperakumulátoru *Thlaspi caerulescens* (Linger et al., 2002). Výhodou konopí ovšem je další využitelnost produkovaného rostlinného materiálu. Konopí se, podobně jako ostatní potenciálně fytoremediální rostliny, potýká s problémem akumulace těžkých kovů převážně v kořeni rostliny. Vysledování drah vedoucí k transportu těžkých kovů do nadzemních částí je nyní předmětem výzkumu u mnoha rostlin. Vhodná genetická manipulace může zahrnovat overexpresi genů pro syntézu transportérů kovů přes membrány a jejich případnou lokalizaci do jiných částí rostliny než se přirozeně vyskytují, nebo vnesení genů pro produkci specifických fytochelatinů, látek vážících těžké kovy v jejich netoxické formě (Kotrba et al., 2009).

Droga. Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1, z konopných metabolitů se vyrábějí léky běžně využívané v klinické praxi při léčbě těžce nemocných. Nicméně další nezanedbatelný podíl na celosvětové produkci konopí mají komerční firmy, tzv. seedbanky, produkující semena odrůd s vysokým obsahem kanabinoidů v zemích, kde je to zákonem umožněno (Nizozemí, Švýcarsko). Tyto odrůdy poskytují květenství s obsahem až 40% THC v sušině. Metody šlechtění jsou většinou předmětem firemního tajemství, ale předpokládá se, že se jedná o tradiční šlechtitelské metody bez genetických manipulací.

2. Přehled využívaných biotechnologických metod

2.1 Mikropropagace

Základním předpokladem většiny biotechnologických metod uplatňovaných v rostlinném výzkumu i praxi je optimalizovaný protokol umožňující *in vitro* kultivaci dané rostliny. Odvozením různých typů tkáňových kultur odpadá nutnost pracovat s celou rostlinou, což podstatně rozšiřuje možnosti experimentů. Buněčné kultury zase poskytují možnost produkce různých metabolitů a též jsou vhodné pro genové transformace. Zvládnutý mikropropagační protokol poté umožňuje ověření životaschopnosti transformanta a jeho další masovou klonální produkci.

Jedná se o sled kroků umožňující vypěstování rostliny ze semene nebo z její části na živném médiu ve sterilních podmínkách, odvození kultury nediferencovaných buněk, jež je možné transformovat a opětovné získání celistvé rostliny.

Pokusy s *in vitro* pěstováním konopí probíhají již od 70. let, kdy převládala snaha o odvození buněčné kultury pro produkci charakteristických sekundárních metabolitů (Turner et al., 1980). Později bylo, v souvislosti s využíváním konopí na vlákno, publikováno několik studií zabývajících se regenerací různých explantátů (Mandolino and Ranalli, 1999), podle (Ranalli, 2004), odvozením kalusové kultury (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005) nebo transformací pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Feeney and Punja, 2003). V současnosti se intenzivně studuje zejména řízená organogeneze konopí za použití různých růstových regulátorů a vývoj systémů pro produkci rostlin regenerovaných z nodálních segmentů (Lata et al., 2009b, Lata et al., 2010a, Wang et al., 2009).

V následujícím textu jsou za použití dostupných dat shrnuty jednotlivé kroky umožňující *in vitro* kultivaci konopí.

2.1.1 Sterilizace

Výchozím materiálem pro většinu experimentů nebo průmyslovou produkci jsou semena nebo rostlinné explantáty obsahující na svém povrchu spory hub, bakterie či jiné nežádoucí organismy. Tyto je třeba odstranit sterilizací. Běžně užívané sterilizační postupy zahrnují opláchnutí vodou s přidaným detergentem, opláchnutí alkoholem, působení sterilizačního činidla a omytí sterilní vodou. Doba působení jednotlivých složek se liší dle odolnosti a

pevnosti semene. Semena konopí lze sterilizovat opláchnutím ve vodě s přidanými průmyslovými detergenty APSA80 nebo Tween 20 po dobu jedné hodiny, ponořením do 70% etanolu po dobu 30 s, působením 0,1% HgCl₂ po dobu 10-15min a opláchnutí sterilní vodou (Wang et al., 2009). Pro různé rostlinné explantáty je možné použít sterilizační činidla 0,5% NaOCl po dobu 20min nebo 5% CaOCl po dobu 15min (Feeney and Punja, 2003, Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005).

2.1.2 Klíčení

Pro klíčení semen konopí je vhodné použít ½MS médium (10 g.l⁻¹ sacharózy, 5,5 g.l⁻¹ agaru, pH 6,8) při periodě 16h světla 8h tmy. Přesazení nodálního segmentu na další médium je vhodné při výšce zhruba 10 cm u rostliny s vyvinutým listy druhého patra. Toho dosáhne rostlina po zhruba 20 dnech růstu (Wang et al., 2009).

2.1.3 Produkce vzrostných vrcholů

Produkce vzrostných vrcholů rostlin probíhá na médiu obohaceném o cytokininy nebo jejich kombinace. To ovlivní rostlinu k tvorbě výhonů a růstu prýtu, jež mohou sloužit jako výchozí materiál k další práci. Odvození kultury je možné přesazením nodálního segmentu nebo regenerací z kalusu. Bylo popsáno několik různých typů médií lišících se použitím různých cytokininů. Růstové regulátory v dané studii vyhodnoceny jako nejlepší jsou shrnuty v přehledové tabulce níže (viz. Tab.č. 1). Všichni autoři se shodují v použití základního média MS (30g.l⁻¹ sacharózy, 6,8 g.l⁻¹ agaru a pH 5,8) a pěstebních podmínek s osvětlením simulujícím dlouhý den (16 h světla).

Autor	Růstový regulátor	Koncentrace (mg.l ⁻¹)
Wang et al., 2009	TDZ	0,1
Lata et al., 2009b	TDZ + GA3	0,5 + 7,0
Lata et al., 2010a	TDZ	0,5

Tab.č. 1 Příklady růstových regulátorů a jejich koncentrací užívaných pro indukci růstu vzrostných vrcholů.

2.1.4 Tvorba kalusu

Odvození kultury nediferencovaných buněk je zcela zásadním krokem, chceme-li pracovat s jednotlivými buňkami dané rostliny. Pro jejich následnou transformaci je také důležitá jejich kvalita, soudržnost a životaschopnost. U konopí vedla snaha o odvození kvalitního kalusu, umožňujícího další experimenty, k vyzkoušení různých kombinací médií a růstových

regulátorů. U konopí tvoří kalus takřka všechny rostlinné části, odvození úspěšně proběhlo z mladých listů, řapíků, internodií a vrcholků rostlin. Výsledné kalusy byly ovšem rozdílných vlastností a kvalit (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). Nejlepším výchozím explantátem pro tvorbu kalusu u konopí byly v uvedené studii části mladých listů a řapíky, na MS médiu obohaceném o syntetický přípravek DICAMBA nebo 2 mg.l^{-1} KIN + $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA. Vhodné kultivační podmínky jsou tma a teplota $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Kalusové kultury konopí lze též převést do suspenzní podoby vložением malého množství buněk do tekutého MB média obohaceného o $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ 2,4-D s 3% sacharózy a pH 5,8 (Feeney and Punja, 2003).

2.1.5 Kořenění

Přesazením vzrostných vrcholů na médium obohacené auxiny je možné stimulovat tvorbu kořenů. Vytvoření funkčního kořenového systému schopného zajistit rostlině přísun živin, je předpokladem pro přesun *ex vitro*. Wang et al., 2009 popsali úspěšné kořenění vrcholových segmentů rostlin po přesazení na MS médium s $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA + $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA. V jiném kultivačním protokolu bylo zaznamenáno kořenění na $\frac{1}{2}$ MS s 500 mg/L živočišného uhlí a $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ IBA (Lata et al., 2009b). Obecně nebyly u zakořeňování explantátů konopí pozorovány potíže. Omezení zdrojů polysacharidů přímo dostupných z média použitím MS média s polovičními koncentracemi živin i sacharózy může být stimulována fotosyntéza a rostlina by tak mohla být lépe připravena na stres z *ex vitro* přesunu. To již v dané studii nebylo hodnoceno.

2.1.6 Kultivace pomocí umělých semen

Lata et al., 2009a popsali tvorbu umělých semen obalením úžlabních pupenů konopí do gelu alginátu sodného. Umělá semena úspěšně regenerovala na různých substrátech, včetně MS média nebo kokosové drtě s přidanými antibakteriálním činidlem.

Konopí je alogamní rostlina jevící občasnou nestálostí pohlaví u které byly popsány spontánní přechody z dvoudomých do jednodomých variant (Moliteri et al., 2004, de Meijer et al., 2003). S tím souvisí i možná změna typických znaků rostliny a požadovaných vlastností. Produkci umělých semen lze v relativně krátkém čase dosáhnout uniformní populace rostlin vykazující stejné znaky. U konopí nebyla dosud popsána somatická embryogeneze, jejímž použitím by mohla být metoda tvorby syntetických semen zefektivněna.

2.2 Genetická transformace

Výzkum umožňující genetické modifikace kulturních plodin je jedním z pilířů současné vědy. Neustálé rozšiřování obzorů tohoto odvětví přináší nové teoretické poznatky a možnosti jejich praktické aplikace. Využití biotechnologických metod umožňuje zlepšení konkrétních vlastností rostlin tam, kde jsou tradiční šlechtitelské postupy časově nevýhodné, nebo kde již dosáhly svých limitů vyplývajících z jejich podstaty. Nejinak je tomu i u konopí. Optimalizovaný transformační protokol by umožnil vytvářet nové odrůdy konopí se specifickými vlastnostmi a podstatně by rozšířil možnosti jeho uplatnění. Jednou z metod využitelných při genetické modifikaci je transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Zástupci rodu *Agrobacterium* jsou gramnegativní půdní bakterie, patogeny dvouděložných rostlin, s charakteristickou schopností vnášet specifické geny do buněk hostitelské rostliny. Vnesené geny jsou dvou typů. První zvyšují hladiny auxinů a cytokininů v napadené buňce. Rostlinou odpovědí na expresi těchto genů je nekontrolované buněčné dělení a tvorba typického tumoru. Geny druhého typu nutí hostitelskou buňku produkovat tzv. opiny, látky odvozené od aminokyselin, které bakterie využívá jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Vzniklý útvar, masa nediferencovaných buněk produkujících opiny, se nazývá crown-gall, do češtiny překládaný jako krčkový nádor.

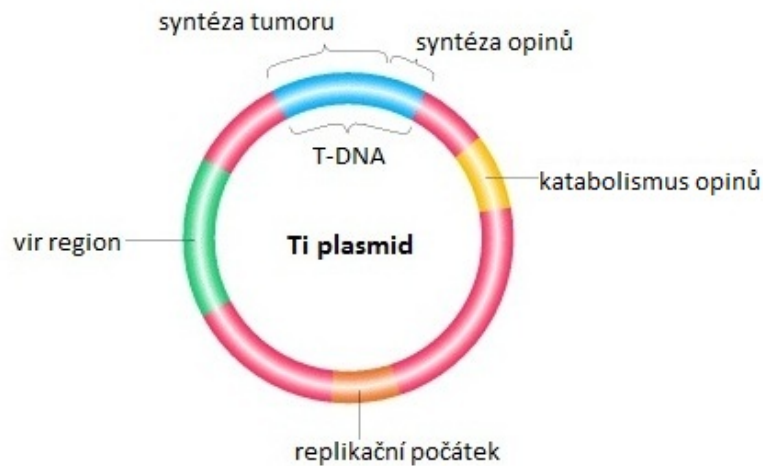
Typickým zástupcem tohoto rodu je bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, od osmdesátých let široce využívaná v genovém inženýrství. Tento druh se dále rozděluje na několik kmenů, které se liší podle typu syntetizovaných opinů. Rozeznáváme dva základní typy opinů, oktopiny a nopaliny a několik dalších. Pro genetickou transformaci jsou většinou využívány kmene produkující nopaliny.

Příkladem nopalinového typu může být kmen *A. tumefaciens* C58, jehož genom byl kompletně osekvenován (Goodner et al., 2001, Wood et al., 2001). Genom *A. tumefaciens* C58 je tvořen dvěma chromozomy, kruhovým a lineárním, a dvěma plazmidy, označovanými pTiC58 a pAtC58. Plazmid pTiC58 obsahuje T-DNA, úsek DNA vnášený do genomu hostitelské rostliny zodpovědný za produkci opinů, a *vir* oblast kódující proteiny účastnící se přenosu do buňky rostliny. Plazmid pAtC58 obsahuje charakteristický úsek zvaný AT island

oblast s malým výskytem nukleotidů guaninu a cytosinu, úsek pravděpodobně kódující proteiny umožňující začlenění T-DNA do genomu hostitelské rostliny (Wood et al., 2001).

2.2.2 Ti-plasmid

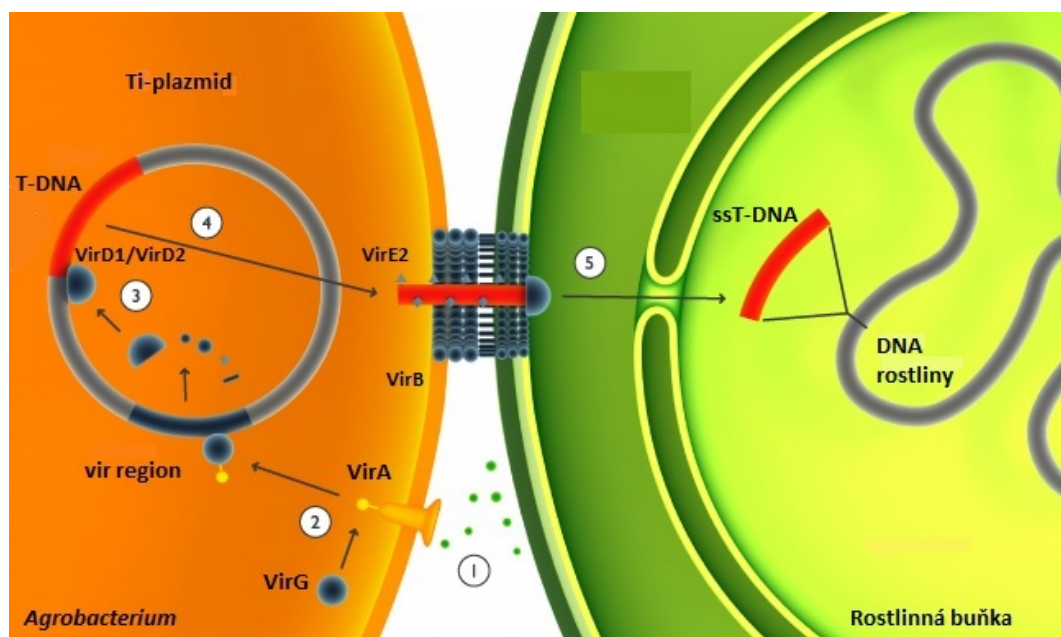
Ti- plasmid (tumour inducing) je kruhová molekula DNA, zodpovědná za horizontální genový přenos z bakterie do rostlinného genomu. V bakterii se nachází nezávisle a je schopna samostatné replikace. Je zhruba 200 kb dlouhá a má na sobě několik charakteristických oblastí (viz. Obr.č. 4).



Obr.č. 4 Obecná organizace Ti-plasmidu. Převzato a upraveno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21428/>

T-DNA je oblast přenesená do genomu hostitelské buňky, vymezená levou a pravou hraniční oblastí (left/right border sequence). Tyto poměrně malé oblasti (24 bp) zajišťují její správné vyštěpení a následný transport do jádra rostlinné buňky. Mezi nimi se nachází tzv. onkogeny, exprimující auxiny a cytokininy, které svou činností způsobují nádor. V genovém inženýrství je oblast způsobující nádor vyjmuta a nahrazena úsekem DNA, který chceme do rostliny vložit.

Další důležitou oblastí Ti-plasmidu je tzv. vir region. Obsahuje několik genů, které kódují proteiny vykonávající různé funkce a svou činností umožňují přenesení T-DNA do hostitelské buňky.



Obr.č. 5 Zjednodušený mechanismus přenosu T-DNA z *Agrobacteria* do rostlinné buňky. Převzato a upraveno z http://visualscience.ru/en/illustrations/general/agro_transformation/agrotransformation.jpg

Přenos T-DNA a její začlenění do genomu rostlinné buňky probíhá v několika krocích (viz. Obr.č. 5). Prvním je zachycení chemického signálu produkovaného poraněnou rostlinou. Fenolické látky z poškozených buněk rostliny jsou rozpoznány transmembránovými proteiny VirA, které pomocí transkripčních faktorů kódovaných genem *virG* spouští expresi všech ostatních genů *vir* regionu. Následuje vyštěpení jednovláknové T-DNA z plasmidu. Komplex s endonukleázovou aktivitou vytvořený z proteinů VirD1/VirD2 nalezne pravou hraniční oblast T-DNA, provede sestřih a odmotává jeden řetězec DNA. Protein VirD2 zůstává vázán na 5' konec tohoto vlákna DNA. V dalším kroku je vytvořen tzv. T-komplex. Jednovláknová T-DNA s proteinem VirD2 je obtočena stabilizačním proteinem VirE2 a v této podobě je transportována ven z buňky. Přenosový kanál je patrně tvořen různými proteiny z genu *virB*, proteinu VirD4 a podílí se na něm i VirE2. Posledním krokem je lokalizace z cytoplazmy hostitelské rostlinné buňky do jejího jádra. Proteiny VirE2 a VirD2 obsahují signální sekvence určující lokalizaci do rostlinného jádra, využívají tedy hostitelských proteinů, které se na ně váží a celý komplex je transportován skrz jaderný pór. VirE2 nejspíš též zajišťuje správnou konformaci T-DNA. V rostlinném jádře je proteinový komplex odbourán a T-DNA je nehomologní rekombinací začleněna do genomu hostitelské buňky (Slater et al., 2008, Ondřej, 1992, Zupan et al., 2000).

Samotná modifikace rostlin většinou probíhá s využitím tzv. binárních vektorů. Jedná se o uměle připravené bakteriální plazmidy, jejichž genetický obsah byl zredukován na minimum. Typické je odstranění onkogenů způsobujících tvorbu tumoru. Odstraněn může být též vir region a oblast, jejíž exprese umožňuje bakterii v přirozeném stavu zpracování opínů. Zůstane tedy jen velice malý plazmid obsahující hraniční oblasti vymezující redukovanou T-DNA do jejíž části se naklonuje požadovaná genetická informace, dále replikační počátky pro *E. Coli* a *A. tumefaciens* a potřebné selekční nebo reportérové geny (Chawla, 2009). Úspěšný přenos T-DNA je ovšem podmíněn existencí druhého tzv. pomocného plazmidu, jenž nese všechny ostatní geny pro úspěšný kontakt bakterie s rostlinou buňkou a syntézu transportního mechanismu.

2.2.3 Transformace kokultivací s *Agrobacteriem*

V současné době existuje několik různých metod, jak transformovat rostlinu pomocí *A. tumefaciens*. Výběr vhodné metody je ovlivněn celkovým designem experimentu nebo prakticky zaměřeného využití transformovaných rostlin. Je možné transformovat izolované protoplasty rostlin nebo celá rostlinná pletiva, případně jednotlivé buňky v suspenzní kultuře. Tyto metody se od sebe liší nejenom náročností postupu, ale i frekvencí úspěšné transformace a její stability. Transformace rostlinných pletiv kokultivací s *A. tumefaciens* se jeví jako nejvhodnější metoda pro následnou masovou produkci transformovaných rostlin.

Nejčastěji využívanou technikou je tzv. disková metoda transformace. Spočívá v tom, že se ze sterilně pěstovaných listů rostlin vyříznou terčíky, které se potom kokultivují s *Agrobacteriem*. Modifikací může být použití explantátů jiného než listového původu, případně kalusové nebo suspenzní kultury (Chawla, 2009). Výběr vhodného počátečního explantátu do značné míry ovlivňuje celkovou úspěšnost transformace. Limitujícím předpokladem je také zvládnutá mikropropagace a regenerace celistvé rostliny. U konopí byly úspěšně transformovány suspenzní kultury, odvozené ze stonkových a listových explantátů, nebyly ovšem schopny regenerace (Feeney and Punja, 2003).

Kokultivační protokol zahrnuje řadu po sobě jdoucích kroků. Prvním je společná kultivace části rostliny s *A. tumefaciens*, která trvá jeden až několik dní. Možné techniky pro odvození vhodného explantátu jsou nastíněny v kapitole 2.1. U konopí, vzhledem k relativně snadno odvoditelnému kalusu, bude nejspíš nejvhodnější použití nediferencovaných buněk suspenzní

kultury. Transformace jiných explantátů u konopí zatím nebyla popsána. U blízkce příbuzné rostliny *Humulus lupulus* L. ze stejné čeledi, byly transformovány úžlabní výhonky, z kterých byla úspěšně regenerována celá rostlina. Úspěšnost transformace byla 1,5% z celkového počtu rostlin (Horlemann et al., 2003). Na základě relativně blízké uváděné molekulární příbuznosti chmele a konopí (Mukherjee et al., 2008) a vzhledem k obdobným složení médií používaných v *in vitro* organogenezi u obou rostlin lze předpokládat, že i u konopí by mohla být transformace úžlabních výhonů úspěšná.

Po kokultivaci se části rostlin nebo samostatné buňky přenesou na médium obsahující antibiotikum k eliminaci *Agrobacteria*. To samé médium může obsahovat i látky zajišťující selekci transformovaných buněk. Široce rozšířená jsou selekční média obsahující antibiotikum kanamycin, ten inhibuje syntézu proteinů rostlinných buněk, zejména v protoplastech. Buňky vystavené jeho působení tedy po čase umírají. Selekcí procházejí pouze buňky obsahující geny pro tvorbu protilátek, u kanamycinu kódovaných genem *nptII*. Ten se v rostlinných buňkách přirozeně nevyskytuje, jeho exprese je důkazem, že byl do genomu rostliny vnesen pomocí T-DNA. Jiný systém může selektovat na základě schopnosti přijímat cukry z kultivačního média. Typické je použití manózy místo sacharózy, což umožní růst pouze buňkám s vneseným genem, jehož exprese ji umožní metabolizovat (Chawla, 2009).

Další složkou média jsou fytohormony iniciující proliferaci vzrostných vrcholů. Ve vhodném stádiu se výhony přepasážují na další médium, kde zakořeňují a poté jsou připraveny k přesunu *ex-vitro*. Podle zvoleného selekčního systému se liší počet nutných přesazení i jednotlivých médií.

Expresi genů vnesených do rostlinného genomu je možné ověřit různými technikami na třech základních úrovních. Pomocí metod založených na PCR lze sledovat transkripci a stabilitu RNA a translaci a stabilitu exprimovaných proteinů. Pro použití v sériových pokusech nebo masové produkci transformantů je vhodnější sledování enzymové aktivity proteinu exprimovaného reportérovým genem (Ondřej, 1992). Jeden z často používaných systémů je založen na schopnosti β -glukuronidázy (GUS) rozkládat glukuronidy za vzniku specifického barvení. Gen pro její expresi může být snadno vložen do T-DNA a transformované buňky s jeho aktivní expresí jsou v testovacích médiích velice snadno a jasně rozpoznatelné (Slater et al., 2008). Hlavní výhodou této techniky je prokázání funkčnosti vložených genů *in vivo*, bez časově náročné extrakce a analýzy DNA.

3. Výběr vhodného genotypu pro transformaci dle požadovaných vlastností

Uvažujeme-li o genetické transformaci konopí, je ideálem transformovat odrůdu, která má již ve svém přirozeném stavu vhodné vlastnosti podobné vlastnostem požadovaným. Například geny vylepšující kvalitu vlákna, by bylo vhodné vnášet do odrůdy, která je charakteristická svým vysokým vzrůstem a byla by tak schopna poskytnout kvalitní a dlouhé vlákno. Může se však stát, že daná odrůda nebude schopna vytvářet stabilní *in vitro* kultury a její transformace je tak dostupnými technikami znemožněna. Výběr vhodného genotypu pro transformace tedy musí jít opačným směrem, podle splnění transformačních předpokladů lze vytvořit kolekci potenciálně vhodných odrůd. Ty musí být schopny *in vitro* kultivace, odvození nediferencované buněčné kultury a opětovné regenerace. Klíčová je také stabilita uniformity genetické informace i přes opakované pasážování. Optimalizovaný výběr vhodné odrůdy by tedy měl zahrnovat nejen její testování v *in vitro* podmínkách, ale i prověření spontánních polymorfních změn v DNA. Příkladem systému pro kontrolu stability genetické informace je využití ISSR markerů, pomocí kterých byla prokázáno, že ani po třiceti pasážích vzrostných vrcholů THC produkující odrůdy MX-1 nevznikají žádné odchylky v její genetické výbavě (Lata et al., 2010b).

Současný výzkum konopí je stále ve stádiu hledání vhodné odrůdy pro transformaci, pro představu uvádím některé z výsledků experimentů.

Tvorba kalusu byla popsána u odrůd Silesia, Fimbrion-24, Novosadska, Juso-15 a Fedrina 74. Z nich nejlépe kalus produkovaly řapíky odrůdy Fimbrion-24 (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). Kalusové kultury byly též odvozeny u odrůd Uniko-B, Kompolti, Anka, Felina-34. Z nich pouze odrůda Uniko-B nebyla schopna vytvořit suspenzní kulturu. Úspěšná transformace pomocí *A. Tumefaciens* byla popsána pro odrůdu Anka, nicméně se transformované buňky nepovedlo zregenerovat (Feeney and Punja, 2003). Ze série pokusů s odrůdou MX-1 je patrné, že je schopna dlouhodobé *in vitro* kultivace, převedení do kalusové kultury a následné regenerace (Lata et al., 2009b, Lata et al., 2010a).

3.1.1 Přehled odrůd

V kapitole 1. je již zmíněna velká různorodost rodu *Cannabis*. Ta se projevuje i značným množstvím jednotlivých odrůd a variant uložených v genových bankách různě po světě.

Nejobsáhlejší kolekce odrůd se nachází ve Vavilově Rostlinném Institutu v Rusku a aktuálně čítá 525 různých vzorků (Grigoryev, 2011). Další poměrně rozsáhlá sbírka odrůd se nachází v Itálii v ISCI (Research Centre for Industrial Crop, www.isci.it) a obsahuje 98 odrůd. V České republice je kolekce 21 odrůd uložena ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (www.vurv.cz). Aktuálně pěstované odrůdy konopí pro průmyslové účely a vztahy mezi nimi jsou uvedeny v příloze (viz. Příloha 2). V zemích Evropské Unie jsou k pěstování povoleny pouze registrované odrůdy, k dohledání v Tošovská and Buchtová, 2010.

3.1.2 Přehled znaků pro potenciální transformaci

V následujícím textu jsou naznačeny oblasti, jejichž další zkoumání by mohlo přispět k vývoji specificky vylepšených kultivarů konopí pro průmyslové uplatnění.

Identifikace genů určující stavbu vlákna a chemické složení buněčné stěny by umožnila kontrolovat šíři vláken a obsah ligninu. Možné zvýšení obsahu celulózy by mělo pozitivní dopad na kvalitu pazdeří využívaného k výrobě papíru, v textilním průmyslu aj. Identifikace genů podílejících se na stavbě vláken by mohla vést k odvození kultivarů s vyšší pevností vlákna, výhodnou vlastností při výrobě kompozitních materiálů. Současný výzkum se již zaměřil na syntézu rozdílných proteinů v jádru a lýka. Pro jádro stonku byla zjištěna exprese 65 specifických proteinů podílejících se na biosyntéze ligninu, u lýka byla pozorována zvýšená exprese 44 proteinů, většinou určujících složení buněčné stěny (van den Broeck et al., 2008).

Další oblastí, jejíž prozkoumání by mohlo pomoci vytvořit kultivary s větším objemem biomasy a kvalitnějším stonkem, je odhalení mechanismů určujících počátek kvetení. Jeho oddálení by prodloužilo vegetační sezónu a umožnilo větší nárůst biomasy.

Velký potenciál konopí je i v genetické modifikaci kultivarů využitelných ve farmaceutickém průmyslu. Nutno podotknout, že výzkum kanabinoidů a jejich biosyntézy je v současnosti u konopí nejlépe probádanou oblastí, s poměrně jasným výhledem do budoucna. Převládá snaha odvodit odrůdy produkující nové kanabinoidy, jenž mohou být uplatněny v klinické medicíně. Oblastí zájmu výzkumníků je také vnášení genů produkujících kanabinoidy do jiných plodin, například do kořenů tabáku (Sirikantaramas et al., 2007).

Druhá v současnosti populární oblast zkoumání je využitelnost konopí pro fytořemediace. Konopí je v přirozeném stavu schopné snášet relativně vysoké koncentrace těžkých kovů, ale podobně jako ostatní rostliny s potenciálním využitím pro fytořemediace, konopí akumuluje těžké kovy převážně v kořenech, odkud se obtížně získávají. Popsáním konkrétních transportních systémů a jejich modifikací by tento problém mohl být odstraněn. Vhodnou genetickou modifikací, omezující toxicitu těžkých kovů, by též mohlo být rostlině umožněno vyrovnat se stresovou zátěží vzniklou jejich působením (Kotrba et al., 2009).

4. Závěr

Konopí seté je jednou z mála kulturních rostlin, které neslouží jako přímý zdroj potravin a jsou celosvětově rozšířeny a intenzivně využívány již tisíce let. Tradiční způsoby jeho využití mají své stálé místo v moderní společnosti třetího tisíciletí. I do budoucna se počítá s produkcí konopného vlákna a dalších primárních produktů, byť spíše pro vývoj lehkých a odolných materiálů než pro výrobu lan a textilu. Kromě průmyslu se o dříve spíše opomíjené technické konopí začíná zajímat i věda. Již publikované články a studie poskytují kvalitní základ pro přípravu dalších experimentů.

Jednotlivé odrůdy konopí jsou podrobně mapovány a zjištěná genetická příbuznost je využívána k detailnímu taxonomickému řazení.

Jsou ustanoveny první protokoly využívající řízenou organogenezi k masové produkci klonů a je zkoumáno chování jednotlivých explantátů v různých kultivačních podmínkách. Již také proběhla první úspěšná genetická transformace konopí.

V této práci jsou shrnuty poznatky o současném využití biotechnologických metod při pěstování (převážně) technického konopí. S jejich znalostí by mělo být možné vytvořit fungující in vitro kultivační proces cílený na transformaci *A. tumefaciens*. Nicméně pro optimalizovanou produkci transgenních rostlin konopí a jejich úspěšné zavedení v praxi je třeba více detailních informací. A ty lze získat jedině dalšími experimentálními studiemi.

5. Seznam literatury

- AMADUCCI, S., ZATTA, A., RAFFANINI, M. & VENTURI, G. 2008. Characterisation of hemp (*Cannabis sativa* L.) roots under different growing conditions. *Plant and Soil*, 313, 227-235.
- BONATTI, P., FERRARI, C., FOCHER, B., GRIPPO, C., TORRI, G. & COSENTINO, C. 2004. Histochemical and supramolecular studies in determining quality of hemp fibres for textile applications. *Euphytica*, 140, 55-64.
- CHAWLA, H. S. 2009. Introduction to Plant Biotechnology, Third edition. *Science Publishers*.
- CITTERIO, S., SANTAGOSTINO, A., FUMAGALLI, P., PRATO, N., RANALLI, P. & SGORBATI, S. 2003. Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa*. *Plant and Soil*, 256, 243-252.
- DE MEIJER, E. P. M. 1995. Fibre hemp cultivars: A survey of origin, ancestry, availability and brief agronomic characteristics. *Journal of the International Hemp Association*, 2, 66-73.
- DE MEIJER, E. P. M., BAGATTA, M., CARBONI, A., CRUCITTI, P., MOLITERNI, V. M. C., RANALLI, P. & MANDOLINO, G. 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163, 335-346.
- FEENEY, M. & PUNJA, Z. K. 2003. Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 578-585.
- FINTA-KORPELOVÁ, Z. & BERENJI, J. 2007. Trends and achievements in industrial hemp (*Cannabis sativa* L) breeding. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*, 39, pp. 63-75.
- FLORES-SANCHEZ, I. & VERPOORTE, R. 2008. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry Reviews*, 7, 615-639.
- GILMORE, S., PEAKALL, R. & ROBERTSON, J. 2007. Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of *Cannabis sativa*. *Forensic Science International*, 172, 179-190.
- GOODNER, B., HINKLE, G., GATTUNG, S., MILLER, N., BLANCHARD, M., QUROLLO, B., GOLDMAN, B. S., CAO, Y., ASKENAZI, M., HALLING, C., MULLIN, L., HOUMIEL, K., GORDON, J., VAUDIN, M., IARTCHOUK, O., EPP, A., LIU, F., WOLLAM, C., ALLINGER, M., DOUGHTY, D., SCOTT, C., LAPPAS, C., MARKELZ, B., FLANAGAN, C., CROWELL, C., GURSON, J., LOMO, C., SEAR, C., STRUB, G., CIELO, C. & SLATER, S. 2001. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2323-2328.
- GRIGORYEV, S. 2011. Hemp (*Cannabis sativa* L.) genetic resources at the VIR: From the collection of seeds, through the collection of sources, towards the collection of donors of traits. <http://www.vir.nw.ru/hemp/hemp1.htm>.
- HILLIG, K. W. 2005. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 161-180.
- HORLEMANN, C., SCHWEKENDIEK, A., HÖHNLE, M. & WEBER, G. 2003. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 22, 210-217.
- KARUS, M. & VOGT, D. 2004. European hemp industry: Cultivation, processing and product lines. *Euphytica*, 140, 7-12.
- KES 2008. Zpráva komise Evropskému parlamentu a radě o odvětví lnu a konopí. {SEK(2008) 1905}.
- KHAN, R., MAJIBUR, M., CHEN, Y., BELSHAM, T., LAGUĚ, C., LANDRY, H., PENG, Q. & ZHONG, W. 2011. Fineness and tensile properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. *Biosystems Engineering*, 108, 9-17.
- KNIGHT, G., HANSEN, S., CONNOR, M., POULSEN, H., MCGOVERN, C. & STACEY, J. 2010. The results of an experimental indoor hydroponic *Cannabis* growing study, using the 'Screen of Green' (ScrOG) method-Yield, tetrahydrocannabinol (THC) and DNA analysis. *Forensic Science International*, 202, 36-44.
- KOK, C. J., COENEN, G. C. M. & A. DE HEIJ 1994. The effect of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) on selected soil-borne pathogens. *Journal of the International Hemp Association*, 1, 6-9.

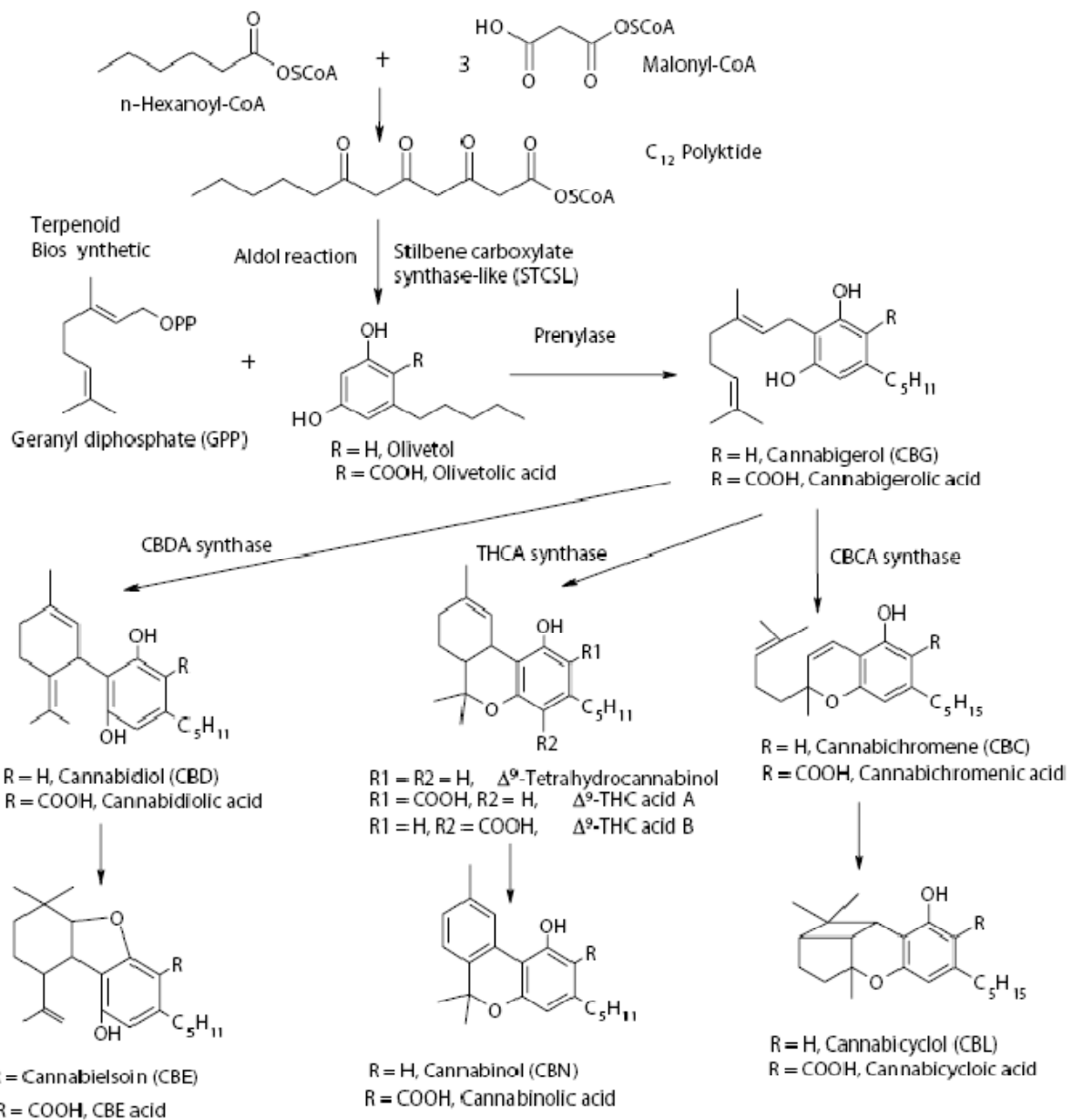
- KOTRBA, P., NAJMANOVA, J., MACEK, T., RUMIL, T. & MACKOVA, M. 2009. Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution. *Biotechnology Advances*, 27, 799-810.
- KREUGER, E., SIPOS, B., ZACCHI, G., SVENSSON, S.-E. & BJÖRNSSON, L. 2011. Bioconversion of industrial hemp to ethanol and methane: The benefits of steam pretreatment and co-production. *Bioresource Technology*, 102, 3457-3465.
- LATA, H., CHANDRA, S., KHAN, I. & ELSOHLY, M. 2009a. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. — an important medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15, 79-86.
- LATA, H., CHANDRA, S., KHAN, I. & ELSOHLY, M. 2009b. Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45, 12-19.
- LATA, H., CHANDRA, S., KHAN, I. A. & ELSOHLY, M. A. 2010a. High Frequency Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of High Delta(9)-Tetrahydrocannabinol Yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Medica*, 76, 1629-1633.
- LATA, H., CHANDRA, S., TECHEN, N., KHAN, I. A. & ELSOHLY, M. A. 2010b. Assessment of the Genetic Stability of Micropropagated Plants of *Cannabis sativa* by ISSR Markers. *Planta Medica*, 76, 97-100.
- LATTA, R. & EATON, B. 1975. Seasonal fluctuations in cannabinoid content of Kansas Marijuana. *Economic Botany*, 29, 153-163.
- LINGER, P., MÜSSIG, J., FISCHER, H. & KOBERT, J. 2002. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Industrial Crops and Products*, 16, 33-42.
- LINGER, P., OSTWALD, A. & HAENSLER, J. 2005. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum*, 49, 567-576.
- LYDON, J., TERAMURA, A. & COFFMAN, C. 1987. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes. *Photochemistry and Photobiology*, 46, 201-206.
- MANDOLINO, G. & RANALLI, P. 1999. Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. *Routledge*.
- MECHOULAM, R. & BEN-SHABAT, S. 1999. From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Natural Product Reports*, 16, 131-143.
- MERCURI, A., ACCORSI, C. & MAZZANTI, M. 2002. The long history of Cannabis and its cultivation by the Romans in central Italy, shown by pollen records from Lago Albano and Lago di Nemi. *Vegetation History and Archaeobotany*, 11, 263-276.
- MOLITERNI, V. M. C., CATTIVELLI, L., RANALLI, P. & MANDOLINO, G. 2004. The sexual differentiation of *Cannabis sativa* L.: A morphological and molecular study. *Euphytica*, 140, 95-106.
- MUKHERJEE, A., ROY, S., DE BERA, S., JIANG, H.-E., LI, X., LI, C.-S. & BERA, S. 2008. Results of molecular analysis of an archaeological hemp (*Cannabis sativa* L.) DNA sample from North West China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 481-485.
- NISSEN, L., ZATTA, A., STEFANINI, I., GRANDI, S., SGORBATI, B., BIAVATI, B. & MONTI, A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81, 413-419.
- ONDŘEJ, M. 1992. Genové inženýrství kulturních rostlin. *Academia*.
- PATE, D. W. 1994. Chemical ecology of Cannabis. *Journal of the International Hemp Association*, 1, 29-37.
- RAHARJO, T. J., CHANG, W.-T., VERBERNE, M. C., PELTENBURG-LOOMAN, A. M. G., LINTHORST, H. J. M. & VERPOORTE, R. 2004. Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from *Cannabis sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 291-297.
- RANALLI, P. 2004. Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*, 140, 121-131.

- RICE, B. 2008. Hemp as a Feedstock for Biomass-to-Energy Conversion. *Journal of Industrial Hemp*, 13, 145 - 156.
- RUSSO, E. B. 2007. History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. *Chemistry & Biodiversity*, 4, 1614-1648.
- SCHÄFER, T. & HONERMEIER, B. 2006. Effect of sowing date and plant density on the cell morphology of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 23, 88-98.
- SHI, G. & CAI, Q. 2009. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *Biotechnology Advances*, 27, 555-561.
- SIRIKANTARAMAS, S., MORIMOTO, S., SHOYAMA, Y., ISHIKAWA, Y., WADA, Y. & TAURA, F. 2004. The gene controlling marijuana psychoactivity - Molecular cloning and heterologous expression of Delta(1)-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39767-39774.
- SIRIKANTARAMAS, S., TAURA, F., MORIMOTO, S. & SHOYAMA, Y. 2007. Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current pharmaceutical biotechnology*, 8, 237-43.
- SIRIKANTARAMAS, S., TAURA, F., TANAKA, Y., ISHIKAWA, Y., MORIMOTO, S. & SHOYAMA, Y. 2005. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1578-1582.
- SLATER, A., SCOTT, N. & FOWLER, M. 2008. Plant Biotechnology - the genetic manipulation of plants. *Oxford University Press*.
- SLUSARKIEWICZ-JARZINA, A., PONITKA, A. & KACZMAREK, Z. 2005. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 145-151.
- SMALL, E. & CRONQUIST, A. 1976. PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY FOR CANNABIS. *Taxon*, 25, 405-435.
- SOLDATOVA, N. & KHRYANIN, V. 2010. The effects of heavy metal salts on the phytohormonal status and sex expression in marijuana. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 96-100.
- STRUIK, P. C., AMADUCCI, S., BULLARD, M. J., STUTTERHEIM, N. C., VENTURI, G. & CROMACK, H. T. H. 2000. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*, 11, 107-118.
- SYTSMA, K. J., MORAWETZ, J., PIRES, J. C., NEPOKROEFF, M., CONTI, E., ZJHRA, M., HALL, J. C. & CHASE, M. W. 2002. Urticalean rosids: Circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *rbcl*, *trnL-F*, and *ndhF* sequences. *American Journal of Botany*, 89, 1531-1546.
- TAURA, F., SIRIKANTARAMAS, S., SHOYAMA, Y., YOSHIKAI, K., SHOYAMA, Y. & MORIMOTO, S. 2007. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, 581, 2929-2934.
- TOŠOVSKÁ, M. & BUCHTOVÁ, I. 2010. Situační a výhledová zpráva: Len a konopí. *Ministerstvo zemědělství ČR*.
- TURNER, C. E., ELSOHLY, M. A. & BOEREN, E. G. 1980. CONSTITUENTS OF CANNABIS-SATIVA L. 17. A REVIEW OF THE NATURAL CONSTITUENTS. *Journal of Natural Products*, 43, 169-234.
- VAN DEN BROECK, H. C., MALIEPAARD, C., EBSKAMP, M. J. M., TOONEN, M. A. J. & KOOPS, A. J. 2008. Differential expression of genes involved in C1 metabolism and lignin biosynthesis in wooden core and bast tissues of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Science*, 174, 205-220.
- WANG, R., HE, L. S., XIA, B., TONG, J. F., LI, N. & PENG, F. 2009. A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis Sativa* L.) by shoot tip culture. *Pakistan Journal of Botany*, 41, 603-608.
- WOOD, D. W., SETUBAL, J. C., KAUL, R., MONKS, D. E., KITAJIMA, J. P., OKURA, V. K., ZHOU, Y., CHEN, L., WOOD, G. E., ALMEIDA, N. F., WOO, L., CHEN, Y., PAULSEN, I. T., EISEN, J. A., KARP, P. D., BOVEE, D., CHAPMAN, P., CLENDENNING, J., DEATHERAGE, G., GILLET, W., GRANT, C., KUTYAVIN, T., LEVY, R., LI, M.-J., MCCLELLAND, E., PALMIERI, A., RAYMOND, C., ROUSE, G.,

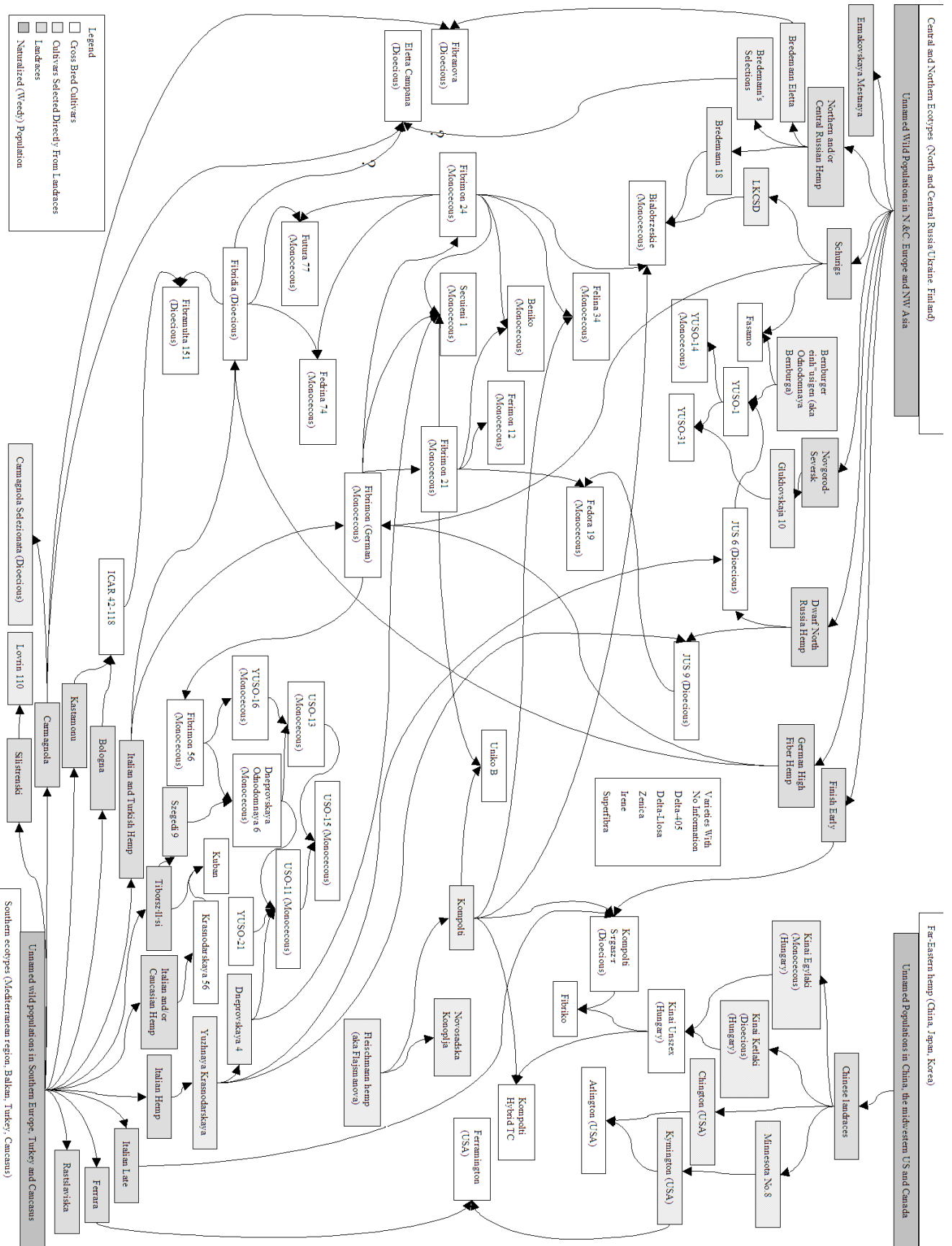
SAENPHIMMACHAK, C., WU, Z., ROMERO, P., GORDON, D., ZHANG, S., YOO, H., TAO, Y., BIDDLE, P., JUNG, M., KRESPAN, W., PERRY, M., GORDON-KAMM, B., LIAO, L., KIM, S., HENDRICK, C., ZHAO, Z.-Y., DOLAN, M., CHUMLEY, F., TINGEY, S. V., TOMB, J.-F., GORDON, M. P., OLSON, M. V. & NESTER, E. W. 2001. The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science*, 294, 2317-2323.

ZUPAN, J., MUTH, T. R., DRAPER, O. & ZAMBRYSKI, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23, 11-28.

6. Přílohy



Příloha 1 Znárodnění biosyntézy kanabinoidů v *Cannabis sativa*. Kanabinoidové kyseliny jsou přímo syntetizovány, z nich jsou dekarboxylací odvozeny kanabinoidy, které později degradují. Převzato z Raharjo et al., 2004.



Příloha 2 Schématické naznačení původu a příbuznosti mezi jednotlivými odrůdami konopí. Podle de Meijer, 1995 vytvořila Susan P. Koziel.