

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin



Studijní program: Anatomie a Fyziologie Rostlin

Studijní obor: Anatomie a Fyziologie Rostlin



Bc. Marek Širl

**STUDIUM FAKTORŮ OVLIVŇUJÍCÍCH ÚČINNOST
TRANSFORMACE KONOPÍ SETÉHO (*Cannabis sativa* L.)**

**STUDY OF FACTORS INFLUENCING EFFICIENCY OF
Cannabis sativa TRANSFORMATION**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc.RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MZE RO0414 - Udržitelné systémy a technologie pěstování zemědělských plodin pro zlepšení a zkvalitnění produkce potravin, krmiv a surovin v podmínkách měnícího se klimatu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. srpna 2014

Děkuji vedoucí své diplomové práce doc.RNDr. Jaroslavě Ovesné CSc. za citlivé vedení práce přizpůsobené mým individuálním potřebám, svému konzultantu RNDr. Lukáši Fisherovi PhD. za poskytnutí agrobakterií a slova poradní, Ing. Ladislavu Kučerovi za pomoc s kultivací konopí, RNDr. Miroslavu Srbovi za pomoc se statistickým zpracováním dat, Mgr. Zuzaně Krejčové za cenné rady a věcné připomínky provázející vznik této práce, své rodině a blízkým za podporu duševní i materiální. Děkuji i všem ostatním na které se v tomto poděkování nedostalo

Abstrakt

Konopí seté (*Cannabis sativa L.*) je všestranně využitelná rostlina, která poskytuje vlákno, celulózu, pazdeří pro průmyslové zpracování, semena pro přípravu olejů, biomasu pro přeměnu na energeticky využitelné suroviny a produkuje sekundární metabolity využitelné ve farmaceutickém průmyslu. Pro celkovou odolnost vůči stresům, schopnost akumulace těžkých kovů a nízké nároky na kultivaci je potencionálně využitelná pro fytoextrakce. Současný výzkum směřuje k zpracování účinného kultivačního protokolu, který by umožňoval transformaci kalusových kultur následovanou regenerací celistvé rostliny. V této práci bylo několik odrůd konopí setého převedeno do *in vitro* a byla testována jejich schopnost tvořit kalus. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím hypokotylových segmentů na živném médiu obohaceném o 1 mg/L kyseliny naftyloctové a jednoho ze dvou syntetických cytokininů 0,5 mg/L thidiazuronu nebo 5 mg/L 6-benzylaminopurinu. Žádný průkazný rozdíl v použití těchto dvou cytokininů nebyl pozorován. Žádný z explantátů na čtyřech různých testovaných médiích pro regeneraci prýtů se nepodařilo úspěšně zregenerovat. Transformace konopí byla testována pomocí dvou metod. Podařilo se izolovat transformované protoplasty z listů konopí po agroinfiltraci, tato metoda však pro konopí nemá příliš využití. U explantátů transformovaných kokultivací s *Agrobacterium tumefaciens* se transformaci nepodařila prokázat.

Klíčová slova: *Cannabis sativa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformace, mikropropagace, kalus, *in vitro*

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a multi-use crop, able to provide fibre cellulose a hurds for industrial treatment seeds for oil preparation biomass for energy conversion and produces secondary metabolites useful for pharmaceutical application. For its resistance to stress ability to accumulate high concentration of heavy metals and low cultivations demands, it can also be used for phytoextractions. Current research is focused on establishment of cultivation protocol, which allows transformation of callus cultures, and their regeneration with high efficiency. In this thesis, several varieties of hemp were transferred to *in vitro* conditions and were tested for their ability to form callus. The best results were achieved using the hypocotyl segments in a nutrient medium supplemented with 1 mg/L of naphthylacetic acid and one of these two synthetic cytokinins 0,5 mg/L of thidiazuron or 5 mg/L of 6-benzylaminopurine. No significant difference in the use of these two cytokinins were observed. None of the explants on four different test media for regeneration of shoots were able to succesfully regenerate. Transformation of hemp was tested using two different methods. Transformed protoplasts from hemp leafs after agroinfiltration were isolated. This method turn out to be unsuitable for use with hemp due to its problematical application. For explants co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens*, no succesfful transformation were revealed.

Keywords: *Cannabis sativa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation, micropropagation, callus, *in vitro*

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk.....	7
1.Úvod.....	9
2.Cíle práce.....	10
3.Literární přehled.....	11
3.1.Konopí seté – modelový organismus.....	11
3.1.1.Botanický popis rostliny.....	11
3.1.2.Taxonomické řazení.....	12
3.1.3.Vlastnosti a využití.....	14
3.2.Předpoklady biotechnologických aplikací.....	16
3.2.1.Tkáňové kultury konopí.....	16
3.2.2.Transformační metody.....	19
4.Metody a materiál.....	22
4.1.Rostlinný materiál.....	22
4.1.1.Přehled použitých odrůd a výchozích explantátů.....	22
4.1.2.Příprava kultivačních médií.....	23
4.1.3.Kultivace konopí.....	25
4.1.3.1.Klíčení.....	26
4.1.3.2.Mikropropagace z nodálních segmentů.....	26
4.1.3.3.Indukce růstu nediferencovaných buněk.....	26
4.1.3.4.Organogeneze.....	27
4.2.Agrobacterium tumefaciens.....	27
4.3.Transformace rostlin konopí.....	29
4.3.1.Transformace kokultivací.....	29
4.3.2.Transformace agroinfiltrací.....	30
4.3.3.Izolace protoplastů konopí.....	31
5.Výsledky.....	32
5.1.Tkáňové kultury.....	32
5.1.1.Založení in vitro kultury.....	32
5.1.2.Odvození kultur nediferencovaných buněk.....	33
5.1.3.Odvození suspenzních kultur konopí.....	37
5.1.4.Regenerace prýtů z nediferencovaných buněčných kultur.....	38
5.2.Transformace konopí setého.....	38
5.2.1.Transformace konopí kokultivací s A. tumefaciens.....	38
5.2.2.Transformace konopí agroinfiltrací.....	40
6.Diskuze.....	42
7.Závěry.....	46
8.Seznam literárních zdrojů.....	47

Seznam zkratek

- LB – Luria-Bertani, médium pro kultivaci bakterií
- YEB – yeast extract broth, médium pro kultivaci bakterií
- MS – Murashige-Skoog, médium pro kultivaci rostlin
- NAA – kyselina naftyloctová
- IAA – kyselina indol-3-octová
- TDZ – thidiazuron
- KIN – kinetin
- BAP – 6-benzylaminopurin
- 2,4 -D – kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
- GA₃ – kyselina gibberelová
- RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
- AC – activated charcoal, živočišné uhlí
- IBA – kyselina indol-3-butyrtová
- DICAMBA – kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová
- GFP – green fluorescet protein, zeleně fluoreskující protein
- MADC – male associated DNA from *Cannabis*, marker samčí DNA z konopí
- CBD – kanabidiol
- THC – Δ^9 -tetrahydrocannabinol
- CBG – kanabigerol
- CBC – kanabichromen
- GMO - geneticky modifikované organismy
- FDA - fluorescein diacetát
- TrM – transformační médium
- TrBM – transformační bakteriostatické médium
- SIM – selekční médium
- ITIS – Integrated Taxonomic Information System
- PCA- Principal Coordinate Analasis

AMOVA – Analasis of Molecular Variance

SNR – Single Nucleotid Polymorphism

DNA – deoxyribonukleová kyselina

1. Úvod

Tato práce se věnuje možnostem genetické transformace konopí setého (*Cannabis sativa* L.) cílené na zlepšení jeho užitých vlastností a tématicky tak zapadá do výzkumných směrů současně řešených ve Výzkumné ústavu rostlinné výroby v.v.i., kde byla zpracovávána. Práce navazuje na předcházející práci bakalářskou. Přináší vhled do problematiky kultivace tkáňových kultur konopí v podmínkách *in vitro*, přehled možností jeho využití a současný stav poznání faktorů ovlivňující jeho genetickou transformaci. Experimentální část je věnována optimalizaci kultivačního protokolu v podmínkách *in vitro* a zahrnuje hodnocení vlivu různých výchozích genotypů, použitých explantátů a kultivačních médií. Součástí práce je i transformace konopí setého pomocí dvou metod a hodnocení jejich úspěšnosti.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je přispět k poznání, které usnadní zavádění biotechnologických metod do pěstování zemědělských a průmyslově využívaných plodin. Práce je zaměřena na studium faktorů ovlivňujících proces transformace konopí setého.

Dílčí cíle jsou zejména:

1. Ustanovení *in vitro* kultur několika odrůd konopí setého (*Cannabis sativa* L.).
2. Snaha o optimalizaci jejich kultivačního protokolu umožňující regeneraci celistvých rostlin z kultur nediferencovaných buněk.
3. Zhodnocení možností transformace explantátů a regenerace celistvých rostlin.

3. Literární přehled

3.1. Konopí seté – modelový organismus

3.1.1. Botanický popis rostliny

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je jednoletá bylina dosahující vzrůstu 60 – 200 cm, výjimečně až 400 cm, v závislosti na podmínkách, pohlaví a konkrétní odrůdě. Odrůdy technického konopí jsou většinou bez výrazného postranního větvení. Vstřícné listy jsou dlanitě složené ze tří až devíti užších kopinatých čepelí s pilovitým okrajem. První pravé listy mívají čepel pouze jednu, u dalších pravých listů jejich počet stoupá, velmi dobře vzrostlé rostliny mohou v plném růstu dosahovat až dvanácti čepelí na list. Během květu se počet čepelí nově tvořených listů opět snižuje. V úžlabí každého listu se tvoří postranní pupen. Stonek je v prvních fázích růstu měkký a dužnatý, později dřevnatí a tvoří středovou dutinu. Dřevnaté jádro je obaleno silnou vrstvou lýka. Samčím květenstvím je převislá lata, samičí rostlina má úžlabní květenství, plodem je vejčitá jednosemenná nažka. Konopí je typická krátkodenní rostlina, kvetení lze tedy v laboratorních podmínkách vyvolat změnou fotoperiody a nastavením střídání světla a tmy po dvanácti hodinách. Vegetační doba trvá 5-6 měsíců s maximem růstu v červnu a červenci, kvést začíná v srpnu.

Konopí seté je zpravidla uváděno jako dvoudomá rostlina s poměrem samčích a samičích rostlin zhruba 1:1. Rostliny samčí bývají vyšší, s tenčími stonky, s nižším počtem listů a v průběhu roku dříve kvetou. V přirozeně rostoucích populacích tento popis odpovídá, ale i v těchto populacích lze nalézt určitý počet jednodomých jedinců a to přibližně deset až dvacet rostlin na hektar (Ranalli, 2004). Obdobně jako většina kulturních plodin i konopí od domestikace podléhalo intenzivnímu šlechtění jehož výsledkem jsou moderní odrůdy konopí určené pro produkci vlákna, ve kterých podíl jednodomých jedinců dosahuje sta procent. V populacích jednodomých odrůd konopí došlo ke sjednocení vzhledu a vlastností rostlin a byl tak odstraněn výrazný pohlavní dimorfismus dvoudomých rostlin, což usnadňuje průmyslové zpracování.

Určení pohlaví u dvoudomých odrůd konopí pohlédá přítomnosti pohlavních chromosomů: X a Y. Samčí pohlaví je určeno kombinací XY a samičí přítomností páru XX. Kromě tohoto páru obsahuje genom konopí dalších devět párů chromosomů. Hlavním rozdílem mezi oběma pohlavními chromozomy je velikost, Y je přibližně dvakrát větší. (Moliteri et al., 2004). Odlišnosti mezi pohlavními chromozomy na molekulární úrovni byly stanoveny pomocí RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) metody identifikací molekulárních markerů MADC (male-specific DNA from Cannabis) vyskytujících se pouze u samčích rostlin a lokalizovaných na chromozomu Y, což bylo potvrzeno *in situ* hybridizací (Sakamoto et al., 1995). Z jejich dalšího zkoumání vyplynula přítomnost velkého množství retrotranspozibilních elementů na

koncové části Y chromozomu, zodpovědných za jeho velikost a pravděpodobně i za celkový samčí projev (Sakamoto et al., 2005). S využitím MADC byly optimalizovány metody pro rychlé stanovení pohlaví rostlin ještě v růstové fázi, což je v tradičním šlechtitelství nesporně výhodou (Techen et al., 2010)

Výsledné pohlaví rostliny ovšem může být do určité míry ovlivněno i pěstebními podmínkami a chemickým složením kultivačního média, resp. substrátu. 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 třicet procent vyšší než v kontrolním médiu. Zároveň probíhalo měření koncentrací fytohormonů, které ukázalo změny v koncentracích zeatinu a kyseliny gibberelové v rostlinách pěstovaných na médiích s těžkými kovy.

Z výše uvedeného je zjevné, že výsledné pohlaví rostliny konopí je během jejího vývoje ovlivněno více faktory, což částečně vysvětluje spontánní výskyty samčích rostlin v jednodomých odrůdách i hermafroditní rostliny u odrůd dvoudomých (Ranalli, 2004).

Charakteristickým znakem rostlin konopí je tvorba sekundárních metabolitů. Pomocí spektrometrických metod bylo určeno více než 70 terpenofenolických sekundární metabolitů typických pouze pro rostliny rodu *Cannabaceae* zvaných cannabinoidy, které jsou akumulovány a vylučovány hlavně v glandulárních trichomech nadzemní části rostliny soustředěných hlavně v květních listenech (ElSohly and Slade, 2005). Přesná příčina jejich tvorby není zatím známa. Pravděpodobně jejich přítomnost pomáhá rostlině vyrovnat se se stresovou situací, jak dokládají analýzy jejich koncentrací v závislosti na lokalitě. Byl pozorován trend vzrůstu tvorby kanabinoidů při zvyšující se nehostinnosti dané lokality, která byla hodnocena podle dostupné vlhkosti, obsahu živin v půdě a její kvality (Latta and Eaton, 1975). Slunné počasí a tedy i zvýšená fotoradiace jsou další vlivy, které u rostlin konopí zvyšují produkci kanabinoidů, je tedy pravděpodobné, že některé kanabinoidy mohou fungovat jako pohlcovače UV záření (Lydon et al., 1987). Schopnost pohlcovat UV záření mají i složky oleje lisovaného z konopných semen (Oomah et al., 2002).

3.1.2. Taxonomické řazení

Současné taxonomické řazení dle ITIS (Integrated Taxonomic Information System) uvádí pro čeleď *Cannabaceae*, do které patří konopí seté, jeden samostatný druh *Cannabis sativa* L. s dvěma poddruhy *Cannabis sativa* ssp. *indica* a *Cannabis sativa* ssp. *sativa*, zahrnující i variantu *spontanea*. Toto rozdělení vychází z historického vnímání všech kultivarů konopí pouze jako jednoho druhu vzhledem k jejich shodným

základním morfologickým znakům a zahrnuje i odlišnosti chemických složení různých sekundárních metabolitů. Odpovídá též široce rozšířenému laickému rozdělení konopí na dva typy: konopí indické, tzv. typ odrůd produkujících drogu, zahrnující kultivary produkující psychoaktivní látky a využívané v medicíně nebo při výrobě drog a konopí seté tzv. typ odrůd produkujících vlákno, což jsou rostliny pěstované pro průmyslové zpracování produkovaných surovin zejména vlákna a olejů, někdy též nazývané konopí technické. Technické konopí je hojně využíváný netaxonomický pojem vymezující odrůdy splňující zákonem stanovený maximální obsah psychoaktivních látek. 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.

Rozdělení na dva poddruhy též připisuje jejich vznik rozpadem jednoho druhu vlivem selekce ve prospěch konkrétních znaků během domestikace. Tomu by odpovídalo i rozšíření a současný výskyt obou variant, kdy v předpokládaném místě původu, Centrální Asii, a v rovníkových oblastech zbytku světa volně roste konopí indické, zatímco na východ do Evropy a na sever Asie rozšířené odrůdy byly zpracovávány na vlákno. Tento koncept však pravděpodobně neodpovídá skutečnosti a spíše než jedním je rod *Cannabis* tvořen souborem více vysoce hybridizovaných druhů vykazujících schopnost se navzájem volně křížit a velkou míru introgrese (Small and Cronquist, 1976). Hypotézu, že význam rozdílů mezi oběma variantami konopí přesahuje rozdíly mezi poddruhy a jedná se o dva samostatné druhy velmi dobře podporují studie molekulárních markerů konopí na vzorcích známého geografického původu. Z PCA (Principal Coordinate Analysis) analýzy frekvence alozymů v 17 různých genových lokusech ve 157 těchto vzorcích velmi jasně vyplývají dvě centra diverzity, která odpovídají tradičnímu rozdělení na dva druhy *sativa/indica* (Hillig, 2005). 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*, konopí rumištního v současném taxonomickém systému zaneseném jako *Cannabis sativa* ssp *sativa* var. *spontanea*. Diskutována je též míra rozdílů mezi jednotlivými genofondy a vyslovena hypotéza, že ke speciaci jednotlivých druhů došlo dříve než šlechtitelským zásahem během domestikace. Obdobných výsledků bylo dosaženo i použitím jiných metod, zhodnocením různorodosti chloroplastové a mitochondriální DNA pomocí metody SNR (Single Nucleotid Polymorphism) (Gilmore et al., 2007) a porovnáním rozdílů v genomu v rámci populace i mezi populacemi navzájem pomocí metody AMOVA (Analysis of molecular variance) (Piluzza et al., 2013).

Alternativní členění jednotlivých odrůd konopí v rámci čeledi je možné dle tzv. chemotypů. Ty jsou charakterizovány obsahem jednotlivých kanabinoidů v rostlině.

Nejvíce zastoupeny jsou kanabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) nebo jeho méně častý izomer Δ^8 -tetrahydrocannabinol, obojí látky s psychoaktivní aktivitou, kanabigerol (CBG) a kanabichromen (CBC). Jejich vzájemný poměr určuje nejen chemotyp konkrétní rostliny konopí. Rozlišujeme tři základní chemotypy podle koncentrací dvou hlavních kannabinolů a jejich vzájemného poměru. Jsou to chemotyp I s nízkým poměrem CBD/THC, vzhledem k vysokému obsahu THC, chemotyp II s vyváženým poměrem CBD/THC a chemotyp III s převahou CBD a velmi nízkými až nulovými hodnotami THC (de Meijer et al., 2003). Běžně pěstované odrůdy technického konopí odpovídají chemotypu III. Chemotypy kromě obsahu konkrétních kanabinoidů určují i další vlastnosti rostliny.

3.1.3. Vlastnosti a využití

Konopí je jednou z nejstarších lidmi využívaných technických plodin s počátky pěstování sahajícími až do starověku. První zmínky jej uvádějí většinou pouze jako medicínální rostlinu, pro vysoký obsah celulózy jej však k výrobě papíru využívali již v Egyptě 2350 let př.n.l (Russo et al., 2008). V současnosti se pěstuje takřka po celém světě a jeho využití zahrnuje zpracování stonků rostlin a sklizení semen. Ze stonků se izoluje vlákno pro textilní průmysl a zbytková stonková hmota slouží k výrobě různých materiálů pro stavebnictví. Semena se přidávají do krmných směsí nebo je z nich lisován olej. Rostliny chemotypů I produkují sekundární metabolity pro farmaceutický průmysl nebo jsou využívány k výrobě drog. V rámci Evropské Unie je konopí pěstováno dlouhodobě na stejných osevních plochách, okolo patnácti tisíc hektarů. Největší pěstitel Francie osevní plochu pravidelně rozšiřuje narozdíl od České republiky, kde se vlivem uzavření většiny přidružených zpracovatelských provozů pěstební plocha výrazně zredukovala až na 142 ha oseté plochy v roce 2010, od té doby zůstává na stejné hranici (Tošovská and Buchtová, 2010).

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). V České republice se hranice možného výnosu pohybuje okolo 10 t suché hmotnosti na hektar (Tošovská and Buchtová, 2010). To umožňuje využít konopí jako obnovitelný zdroj energie ať již pro produkci suché spalitelné biomasy, tuhých paliv či jako surovinu pro produkci bioplynu. Oproti silážované kukuřici, která je hlavní výchozí surovinou pro výrobu bioplynu, jsou konopné porosty mnohem kompaktnější a hustěji sazené, nedochází tak k vyplavování orné půdy mimo pěstební plochy, což je při pěstování kukuřice závažný problém (Prade et al., 2011). Použitím optimalizovaného postupu výroby lze dosáhnout produkce 2600-3000 litrů ethanolu a zhruba 3000 m³ metanu z jednoho hektaru osetého konopím, další optimalizace postupu jsou zkoumány (Kreuger et al., 2011).

Nejvíce využívanou surovinou z rostlin konopí je vlákno, které 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). Je ceněno zejména pro svůj velice malý průměr a zároveň velmi vysokou pevnost v tahu ($44 \text{ kN} \cdot \text{tex}^{-1}$ při průměru 0.25 mm) a také velmi nízkou hmotnost (Khan et al., 2011). Vlastnosti vlákna lze ovlivnit zvolením vhodné metody pěstování podle požadavků na jeho šířku a pevnost. Využívá se velmi husté výsadby, která rostliny nutí omezit energetické investice do stavby stonku a stimuluje růst do výšky. Optimální hustota výsadby není příliš odrůdově specifická, v rámci odrůd šlechtěných pro produkci vlákna, a byla stanovena na zhruba 300 rostlin na m^2 (Schafer and Honermeier, 2006). Kromě textilního průmyslu se stále více začíná konopné vlákno využívat při tvorbě kompozitních materiálů ve stavebnictví nebo třeba automobilovém průmyslu při tvorbě nárazníků a jiných výplňových hmot.

Pro své vlastnosti je též velmi ceněn konopný olej využitelný v potravinářství nebo farmaceutickém či chemickém odvětví. Některé jeho složky potlačují mikrobiální aktivitu, například účinně inhibují růst gram pozitivních bakterií s patogenním účinkem v trávicím traktu (Nissen et al., 2010) (Novak et al., 2001). Antimikrobiální aktivitu projevují i některé další metabolity izolované z rostlin konopí, které účinně potlačují růst různých druhů kvasinek (Ahmed et al., 2008).

Pro úplnost je též nutné uvést farmaceutický význam rostlin *Cannabis indica* odpovídající chemotypu III. Metabolity z těchto rostlin se využívají k tvorbě syntetických léčiv s obsahem kanabinoidů (Sativex, Marinol ..) jejichž klinické studie prokazují odstranění některých projevů roztroušené sklerózy a zmírňují průběh onemocnění (Wade et al., 2004). Pro klinické studie se též využívají sušená samičí květenství těchto rostlin, tzv. marihuana.

Konopí patří mezi rostliny odolné vůči znečištění půdy těžkými kovy bylo tedy vyprofilováno jako jedna z možných rostlin využitelných pro fytoextrakce. 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 průmyslem znečištěných 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 též 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). Počáteční velká očekávání ze slibných předpokladů pro praktické využití pro fytoremediace však zatím zůstávají nenaplněna a větší polní pokusy v

současné době publikují pouze čínští vědci (Shi et al., 2012).

Ve stádiu pokusů jsou zatím i biotechnologické metody pracující s rostlinami konopí nebo jejich buněčnými kulturami. Kanabinoidy pro farmaceutický průmysl se prozatím získávají separací, jsou však testovány metody umožňující jejich produkci pomocí buněčných kultur (Flores-Sanchez et al., 2009). Zajímavá je i myšlenka využít rychlého znásobení hmoty růstem a velkou listovou plochu rostlin konopí k produkci proteinů pomocí transienční exprese pro biochemické nebo farmaceutické využití.

Tento výčet příkladů využití konopních surovin nebo samotných vlastností rostliny je pouze orientační a rozhodně ne úplný, alespoň částečně však vykresluje potenciál pro budoucí rozvoj. Zároveň je nutné zdůraznit, že pěstování konopí přináší i určité obtíže. Samotný fakt, že konopné vlákno je vysoce pevné velmi znesnadňuje sklizeň rostlin. Potřeba jsou speciálně upravené a úzce specializované zemědělské stroje což prodražuje počáteční investici. Zároveň následné zpracování vlákna je vázáno na provoz tíren. Tento fakt stojí za postupným snižováním oseté plochy v České republice, kdy se po počátečním nárůstu produkce zjistilo, že následné zpracování neúměrně prodražuje nedostatek tírenských kapacit na našem území, mnohdy suroviny musel být zpracovávány v zahraničí a i samotná sklizeň je problematická. Jedním z řešení by mohla být i produkce geneticky modifikovaných odrůd u kterých by byly doprovodné problémy omezeny. Současně studovaná témata se věnují tvorbě sekundární buněčné stěny s mapováním jednotlivých proteinů i jejich genů a mírou exprese v jednotlivých částech rostliny, je tedy možnost těchto znalostí využít při tvorbě odrůd s omezením její tvorby a produkci lépe sklíditelných rostlin nižšího vzrůstu (van den Broeck et al., 2008).

3.2. Předpoklady biotechnologických aplikací

Uvažujeme-li možnost stabilní genetické transformace konopí cílenou na zlepšení jeho užitých vlastností nebo využití jiných biotechnologických metod, narazíme na nutnost splnění předpokladů, z nichž nejpodstatnější je funkční protokol umožňující práci s rostlinami v podmínkách *in vitro*. Jedná se o jejich kultivaci ve sterilních podmínkách s nepřítomností jiných organismů s kontrolovaným příjmem živin z živných médií i ostatními vlivy jako jsou teplota a světelné podmínky. Při omezení vlivu vnějších podmínek lze navodit optimální prostředí k růstu, který je možné ovlivňovat podle potřeb růstovými regulátory. Optimalizace transformační metody s vysokou úspěšností přenosu DNA je další nezbytnou podmínkou.

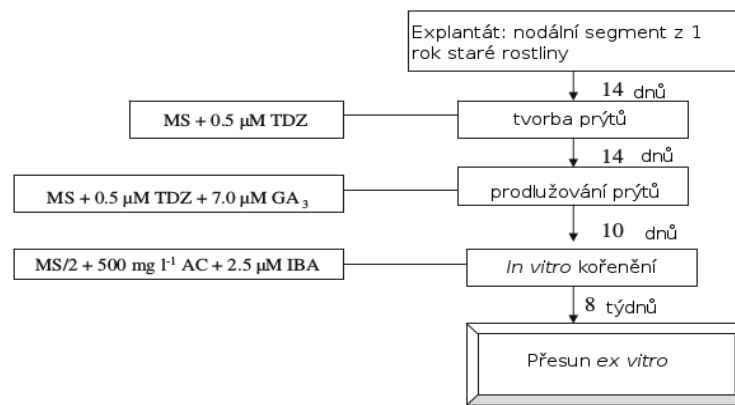
3.2.1. Tkáňové kultury konopí

Konopí je v *in vitro* kultuře považováno za obtížně kultivovatelnou rostlinu. Navzdory jeho kulturnímu významu neexistuje příliš mnoho prací týkajících se ustanovení konopných tkáňových kultur. Více informací lze nalézt k suspenzním

buněčným kulturám sloužícím jako prostředek pro produkci sekundárních metabolitů (Turner et al., 1980) (Flores-Sanchez et al., 2009). Ojediněle byly zpracovány protokoly pro mikropropagaci *in vitro* množených rostlin pomocí apikálních nebo axilárních pupenů bez mezistupně kalusu (Wang et al., 2009) (Lata et al., 2009). V *in vitro* regeneraci rostlin je nejpodstatnější vytvoření takového kultivačního protokolu, který zahrnuje mezistupeň kalusové kultury nebo nediferencované buněčné kultury z výchozího explantátu a následnou tvorbu somatických embryí, nebo prýtů schopných tvorby celistvé rostliny a přesunu *ex vitro*. Takový protokol umožňuje vložit transformační krok s vnesením požadovaného genu a odvození celistvé rostliny z jedné nebo několika málo transformovaných buněk. Jakkoliv je zřejmé, že spolehlivé kultivační protokoly jsou v tomto směru potřeba, existuje jen velmi málo prací na téma regenerace z nediferencovaných tkáňových kultur, jejichž výsledky navíc nelze označit za příliš uspokojivé (Lata et al., 2010a) (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005).

Obecně u konopí není příliš problém se založením *in vitro* kultury. Nejjednodušší cestou je klíčení povrchově sterilizovaných semen, která ochotně klíčí na různých typech médií a substátů. Poměrně tvrdé a kompaktní osemení neposkytuje na svém povrchu příliš míst na kterých by se mohly zachytit a usadit spory hub bakterie nebo plísně a zvládne i vyšší koncentrace běžně užívaných sterilizačních činidel, příkladem může být pěti procentní roztok chloridu vápenatého. Vzhledem k jejich hydrofobnímu povrchu je dobré nechat semena před samotnou sterilizací promývat vodovodní vodou s přidaným detergentem pro lepší smáčivost (Wang et al., 2009). Již zmíněné antimikrobiální vlastnosti některých konopných metabolitů se pravděpodobně projevují i při navozování *in vitro* kultur z explantátů odebíraných z rostlin ze skleníků nebo přírodních podmínek, míry kontaminací u kultur z povrchově sterilizovaných segmentů těchto rostlin jsou spíše nízké.

In vitro klonální množení rostlin pomocí nodálních segmentů umožňuje v relativně krátkém čase dosáhnout velkého počtu geneticky uniformních rostlin. U konopí byly popsány systémy stanovující optimální podmínky a média pro všechny dílčí kroky, který mi jsou vývoj klíčící rostliny ze semene, přesazení nodálního segmentu na médium podporující jeho další růst a následné přesazení na médium podporující tvorbu kořenů. Tím vznikne nová celistvá rostlina s vyvinutými všemi orgány, schopná poskytnout další nodální segmenty pro zmnožení nebo pro přesun *ex vitro*. Protokol s velkou mírou úspěšnosti přežití takových rostlin s využitím syntetického cytokininu thidiazuronu navrhli (Lata et al., 2009), obdobných výsledků dosáhli i (Wang et al., 2009). V obou studiích bylo zkoumáno více růstových regulátorů a jejich koncentrací, optimální podmínky jsou přehledně vykresleny v Ilustrace 1. Genetická uniformita takto množených rostlin byla též potvrzena pomocí analýzy molekulárních markerů (Lata et al., 2010b).



Ilustrace 1: Protokol pro klonální množení rostlin konopí z nodálních segmentů. AC – activated charcoal/živočišné uhlí. Převzato a upraveno podle (Lata et. al., 2009)

Zajímavá metoda, využívaná pro celou paletu rostlinných druhů, pěstování rostlin ze syntetických semen, byla též úspěšně otestována pro konopí chemotypu I. Úžlabní pupeny rostlin byly obaleny v gelu alginátu sodného. Takto připravené segmenty rostlin, skladované v chladu a temnu, byly schopny růstu i po šesti měsících (Lata et al., 2011).

Přehlednou studii vlivu médií a výchozího explantátu na tvorbu kalusu a jeho vlastnosti zpracovali (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). Mladé listy, řapíky, internodální segmenty a úžlabní pupeny pěti různých kultivarů konopí chemotypu III byly použity jako výchozí explantát na média obohacená o kombinace následujících fytohormonů : KIN (kinetin), NAA (kyselina naftyloctová), 2,4-D (kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová), DICAMBA (kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová). Z výsledků vyplývá snadná tvorba kalusu ze všech výchozích explantátů i s minimálními přísadkami hormonů, ovšem kalusy se značně lišily ve svých vlastnostech a možnostech následného použití. Regenerace prýtů z kalusů již měla poměrně nízkou účinnost, poměrně často byly místo prýtů tvořeny kořeny. Nejlepší zaznamenaná odpověď na růstové regulátory odpovídala jejich koncentracím obvykle v médiích používaných (0,5 mg/L NAA, 2,0 mg/L 2,4-D).

O něco lepších výsledků regenerace prýtů z kalusových kultur bylo dosaženo při experimentech na odrůdách chemotypu I, naznačující, že přítomnost rozdílných sekundárních metabolitů má vliv na schopnost regenerace (Lata et al., 2010a). Koncentrace růstových regulátorů byly obdobné. Pravděpodobné vysvětlení je v hypotetické účasti těchto látek v reakci na stres, kterým nucená tvorba nediferencovaných buněk bezesporu je a schopnosti se s ním vyrovnávat. Jak bylo dříve uvedeno v kapitole 3.1.1. kanabinoidy mohou být univerzální stresovou odpovědí nejen v celistvé rostlině, ale zřejmě i v buněčných kulturách.

Vliv nejen chemotypu ale i konkrétní odrůdy na ochotu tvořit kultury

nediferencovaných buněk byl pozorován u kalusů z různých výchozích explantátů i u suspenzních buněčných kultur (Feeney and Punja, 2003) (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). Vytipování vhodné odrůdy tak může mít rozhodující vliv na úspěšnost celého experimentu.

Z publikovaných prací vyplývá, že konopí lze s úspěchem kultivovat na obvyklých médiích vycházející z MS média (Murashige and Skoog, 1962). Cukerná složka může být obvyklých hodnot 20-30 gramů sacharózy na litr média, případně může být u citlivějších kalusových kultur a snaze o somatickou embryogenezi nahrazena maltózou ve výrazně vyšší koncentraci 90 nebo až 120 gramů na litr média. Na těchto médiích kalusové kultury lépe prosperují (Kučera L., *nepublikovaná data*). To může být způsobeno pomalejším metabolismem maltózy a rozdílným osmotickým účinkem. Vliv maltózy na efektivita média při somatické embryogenezi byl pozorován také u *Pinus tadea* (Li et al., 1998) nebo u *Prunus avium*, kde autoři předpokládají, že výrazně rychlejší metabolismus sacharózy vede v buňkách k tvorbě hypoxického prostředí a akumulaci ethanolu, což při použití maltózy nenastává (Reidiboy-Talleux et al., 1998).

Konopí v tkáňových kulturách reaguje na růstové regulátory v médiích dle jejich koncentrace podobně jako jiné plodiny. Použité koncentrace, při kterých byla zaznamenána největší míra požadované reakce odpovídají koncentracím pro danou odpověď využívaných i u jiných plodin, příkladem může být blízce příbuzný chmel, řazený do stejné čeledi (Roy et al., 2001). Síla odpovědi se však liší. To může být částečně kompenzováno využitím účinnějšího syntetického fytohormonu thidiazuronu místo běžně užívaných 6-benzylaminopurinu nebo kinetinu, částečně vytipováním konkrétní vhodné odrůdy pro experimenty.

3.2.2. Transformační metody

Genetická transformace, vnesení cizorodého genu do buňky a jeho začlenění do jeho genomu, je v současnosti široce využívaná biotechnologická metoda. Umožňuje nejen zkoumání projevu genů, od úrovně molekulární až po fenotypový projev mutantního jedince, ale zejména přípravu rostlin schopných daný gen přenést do další generace. Přípravou odrůd rostlin nesoucí geny běžně se v jejich genofondu nevyskytujících se zabývá genové šlechtitelství.

Pro vnesení genu do buňky existují dvě základní metody. Biolistická metoda využívá zmnožení zvoleného konstruktů, jeho přichycení k malé částici inertního kovu který je do buněk vstřelen pomocí proudu vzduchu. Hlavní nevýhodou je takřka nemožné cílení místa vnesení DNA do buňky, pro šanci na stabilní transformaci je nutné kovovou částicí s připojenou DNA trefit jádro. Metoda s sebou nese také velkou míru transientní exprese. Druhou možností je využití přirozené schopnosti bakterií rodu *Agrobacterium* transformovat rostlinné buňky. Rod *Agrobacterium* zahrnuje více druhů, z nichž biotechnologicky významné jsou především *A. tumefaciens* a *A. rhizogenes*. Tyto gramnegativní půdní bakterie jsou patogeny dvouděložných rostlin se schopností vnášet

své geny do hostitelských buněk pomocí plazmidů. Geny nutí hostitelskou buňku produkovat tzv. opiny, látky odvozené od aminokyselin, které bakterie využívá jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Pro potřeby genového inženýrství byly tyto plazmidy upraveny, původní geny odebrány a mohou sloužit jako vektor nesoucí takřka libovolný úsek DNA. Transformace pak probíhá společnou kultivací rostlinného explantátu nebo buněčné kultury a bakteriální suspenze.

Za přenos genů v interakci bakteriální-rostlinná buňka je zodpovědný Ti respektive Ri-plasmid (tumour/roots inducing), zhruba 200 kb dlouhá kruhová molekula DNA schopná samostatné replikace. Obsahuje T-DNA, oblast přenesenou do genomu hostitelské buňky, vymezenou 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. Přirozeně obsahuje též vir region, úsek genů, které kódují proteiny umožňující přenos DNA (Wood et al., 2001). Upravené Ti/Ri plasmidy slouží jako binární vektory a mezi hraničními oblastmi zpravidla obsahují pouze gen nesoucí rezistenci vůči antibiotiku sloužící jako selekční marker při ověření funkčnosti a specifická místa umožňující snadné klonování úseku DNA, příkladem může být systém GATEWAY, umožňující snadné klonování i velkých úseků DNA (Karimi et al., 2002). Vir region většinou bývá obsažen v doprovodném plasmidu bez transferové DNA. Běžně užívané kmeny bakterií rodu *Agrobacterium* též bývají stabilně transformovány genem nesoucím rezistenci vůči antibiotiku. Jejich kultivace v médiu s přidanými kmenově a vektorově specifickými antibiotiky slouží k eliminaci spontánních mutací v kultuře. Přehledný souhrn běžně užívaných kmenů, vektorů a jejich selekčních markerů i s kontakty pro jejich získání byl publikován (Hellens et al., 2000). Do transferového úseku je kromě genu selekčního markeru vhodné zakomponovat reportérový gen sloužící k rychlé identifikaci transformovaných buněk, příkladem může být gen pro produkci GFP (green fluorescent protein) (Chalfie et al., 1994).

Samotný přenos T-DNA a její začlenění do genomu rostlinné buňky probíhá v několika krocích. Prvním je zachycení chemického signálu produkovaného poraněnou rostlinou. Fenolické látky z poškozených buněk rostliny jsou rozpoznány transmembránovými proteiny bakterie a spouští expresi vir regionu. Následně endonukleázový komplex vyštěpí T-DNA z plazmidu a s pomocnými stabilizačními proteiny vytvoří T-komplex, který je transportován ven z buňky proteinovým přenosovým kanálem. Posledním krokem je lokalizace z cytoplazmy hostitelské rostlinné buňky do jejího jádra. Proteiny T-komplexu 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, kde je celý komplex odbourán a T-DNA je nehomologní rekombinací začleněna do genomu hostitelské buňky. Celý proces byl pro *A. tumefaciens* velmi detailně popsán (Zupan et al., 2000) (Gelvin, 2000).

U konopí dosud nebylo dosaženo úspěšně transformované celistvé rostliny schopné generativního rozmnožení. Ve dvou studiích se podařilo prokázat úspěšnou transformaci buněčných kultur úsekem obsahující reportérový gen, dané kultury se však

nepodařilo zregenerovat (Feeney and Punja, 2003) (Wahby et al., 2013). V první byly buňčné suspenzní kultury čtyř různých odrůd technického konopí transformovány kmenem *A. tumefaciens* EHA101 obsahující vektor pNOV3635, který do transformovaných buněk vnáší gen kódující PMI (fosfomanosaisomerasu). Ten umožňuje selekci transformovaných buněk na médiu obsahující manosu jako hlavní zdroj sacharidů, neboť jeho nositelům umožní její metabolický rozklad. V druhé bylo pět odrůd konopí transformováno celkem osmi kmeny *A. rhizogenes* a šesti kmeny *A. tumefaciens*. Transformovány byly klíčnicí rostliny v *in vitro* podmínkách bez ambice odvození tkáňových kultur a regenerace explantátů. Vnesení genu pro beta-glukuronidázu rozkládající glukuronidy bylo potvrzeno vznikem specifického zabarvení.

Transformační proces u obou studií probíhal obdobně, třicetiminutovou kultivací s bakteriální suspenzí následovanou třídenní kultivací před přesunem na bakteriostatické médium.

Byla zjištěna rozdílná míra účinnosti transformace závislá na použitém bakteriálním kmenu v rozmezí 43 – 98 % (Wahby et al., 2013). Transformovány byly hypokotyly klíčnicích rostlin a hodnocena byla tvorba charakteristického tumoru nebo indukce kořenů. Z výsledků dále vyplývá, že při použití bakteriálního kmene s nejvyšší účinností transformace bylo dosaženo nejhorších výsledků v přežívání kultury. Popsaný vliv výchozího explantátu, kdy se nepodařilo transformovat ani jeden listový segment, zatímco hypokotyly a děložní nodální segmenty měly výrazně vyšší míru účinné transformace, patrně odpovídá zvolené metodě. Transformovány byly povrchově poraněné části rostlin bez odebrání explantátu a pokusu o odvození kultury transformovaných buněk a hodnocena byla pouze přítomnost tumoru způsobeného napadením *Agrobacteriem*. Lze předpokládat, že listy konopí nebo jejich části mohou být vhodným explantátem pro transformaci kokultivací, neboť velmi ochotně tvoří kalus (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). U buňčných suspenzních kultur se pohybovala míra úspěšnosti transformace kolem 30 % (Feeney and Punja, 2003). Celkově konopí vykazuje vyšší míry úspěšnosti transformace než blízce příbuzný chmel, patřící do stejné čeledi. Zde byla za srovnatelných podmínek úspěšnost transformace 1,5 %, bylo však dosaženo výrazně lepší regenerace rostlin (Horlemann et al., 2003).

Transformace odrůd konopí chemotypu I dosud nebyla popsána. Dostupné zdroje však uvádějí mnohem menší obtíže při práci s tkáňovými kulturami, které vykazovaly úspěšnější regeneraci celistvých rostlin z dediferencovaných buněk než odrůdy chemotypu III (Lata et al., 2010a). Vliv transformace *Agrobacteriem* na schopnost regenerace tkáňových kultur lze jen obtížně hodnotit, vzhledem k nedostatku kvalitních dat, dá se však předpokládat, že míra ovlivnění je malá a problémem je spíše samotná regenerace. Lépe regenerující odrůdy chemotypu I by tak mohly být pro genetickou transformaci vhodnější.

4. Metody a materiál

Veškeré experimenty byly prováděny v laboratořích a kultivačních místnostech Výzkumného ústavu rostlinné výroby v.v.i.. Skladování, kultivace a manipulace s GMO (geneticky modifikované organismy) probíhala v prostorách k tomu určených a patřičně označených a pracovní postup odpovídal platným pokynů pro nakládání s GMO.

Pro práci ve sterilním prostředí byl využíván laminární flow-box. Nástroje pro práci s rostlinným materiálem byly sterilizovány ponořením do ethanolu a opálením. Sterilizace roztoků a médií, nástavců pro automatické pipety a nádobek Eppendorf probíhala párou v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 120°C a tlaku 100 kPa. Roztoky termolabilních látek byly sterilizovány filtrací přes sterilizační filtry 0,22 µm. Ke sterilizaci skleněných nádob, nástrojů a filtračního papíru byla použita horkovzdušná sušička. Ty byly vkládány dvojité obalené hliníkovou fólií. Doba sterilizace byla 60 minut při 160 °C.

Veškeré použité chemikálie pocházely ze zásob VÚRV v.v.i. Ke stanovení hmotnosti byly využívány analytické váhy HA-180m. Pro pozorování objektů mimo vnímání lidského oka byla použita binokulární lupa nebo fluorescenční mikroskop Olympus CKX 41.

4.1. Rostlinný materiál

4.1.1. Přehled použitých odrůd a výchozích explantátů

Pro veškeré experimenty bylo použito rostlinného materiálu z osiva odrůd technického konopí poskytnuté firmou Agritec Šumperk s.r.o.. Toho bylo využito pro vytvoření kolekcí rostlin pěstovaných *in vitro* z povrchově sterilizovaných semen a množených odříznutím a přesazením části obsahující laterální nebo apikální pupen, ze kterých byl poté odebírán materiál pro další experimenty. Užito bylo celkem patnáct kultivarů, jmenný seznam odrůd uveden v Tabulka 1. Část semen byla též využita pro pěstování rostlin v tzv. indoor podmínkách, v pěstebním boxu na kokosovém substrátu a rašelinových kostkách pod umělým osvětlením. Tyto rostliny byly použity pro transformaci agroinfiltrací. Z Agritecu Šumperk též pocházelo osivo použité v polních pokusech s touto prací nesouvisejících. Z těchto rostlin byla odebrána embrya z nezralých semen pro přesun *in vitro* a následné odvození tkáňové kultury.

Pro většinu experimentů byla důležitá možnost porovnání vlivu různých faktorů na velmi podobném, ideálně totožném, výchozím rostlinném materiálu, stejného genotypu, stáří a pod vlivem stejných kultivačních podmínek. Bylo využito přirozené

vlastnosti konopí zakládat orgány párově a proto, není-li uvedeno jinak, byly vždy z jedné rostliny protilehlé listy děložní i pravé rozdělovány na různá média, případně sloužily jako kontrola.

Tabulka 1: Jmenný seznam odrůd využitých pro experimenty v této práci.

Fedora 77	USO 31	Ferimon
Fibrol	Monoica	Beniko
Felina 32	Tygra	Carmagnola
Futura 75	KC-Dora	Finola
Epsilon	Bialobrzeskie	Santhica

Bylo rozlišováno a použito několik typů výchozích explantátů. Hypokotylové segmenty délky přibližně 0,5 cm, děložní listy klíčnicích rostlin, děložní listy z nezralých embryí, čepele z prvního páru listů tvořené pouze jednou listovou čepelí, čepele další pravých listů a řapíky.

4.1.2. Příprava kultivačních médií

Pro *in vitro* kultivaci rostlin konopí a z nich odvozených explantátů a tkáňových kultur byly použity média odvozená od základního MS média dle (Murashige and Skoog, 1962). Celkový postup přípravy médií byl usnadněn použitím zásobních roztoků. Ty byly rozděleny na jednotlivé roztoky tak, aby bylo zabráněno vysrážení některých solí, které by mohly narušit jejich optimální příjem živin rostlinou. Po namíchání byly roztoky zkládvány a uchovávány v lednici při 4°C. K přípravě MS média bylo použito následujících dílčích roztoků.

Makroelementy. Roztok byl namíchán dvacetkrát koncentrovaný. Chemikálie uvedené v Tabulka 2 byly rozpuštěny v 1 l sterilní destilované vody. Roztoku bylo dávkováno 50 ml do 1 l připravovaného média.

Tabulka 2: Chemikálie pro přípravu zásobního roztoku makroelementů pro MS médium.

Látka	Hmotnost (g)
NH ₄ NO ₃	33,00
KNO ₃	38,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,40
KH ₂ PO ₄	3,40

Roztok chloridu vápenatého. Roztok byl namíchán padesátkrát koncentrovaný. 22,00 gramů krystalického CaCl₂ bylo rozpuštěno v 500 ml sterilní destilované vody. Roztoku bylo dávkováno 10 ml do 1 l připravovaného média.

Mikroelementy. Roztok byl namíchán padesátkrát koncentrovaný. Chemikálie uvedené v Tabulka 3 byly rozpuštěny v 250 ml sterilní destilované vody. Roztoku bylo dávkováno 5 ml do 1 l připravovaného média.

Tabulka 3: Chemikálie pro přípravu zásobního roztoku mikroelementů pro MS médium.

Látka	Hmotnost (mg)
MnSO ₄ · 7H ₂ O	845,00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	430,00
H ₃ BO ₃	310,00
KI	41,50
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	12,50
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,25

Vitamíny. Roztok byl namíchán dvacetpětkrát koncentrovaný. Chemikálie uvedené v Tabulka 4 byly rozpuštěny v 250 ml sterilní destilované vody. Roztoku bylo dávkováno 10 ml do 1 l média.

Tabulka 4: Chemikálie pro přípravu zásobního roztoku vitamínů pro MS médium.

Látka	Hmotnost (mg)
thiamin	10,00
pyridoxin	50,00
kyselina nikotinová	50,00
glycin	200,00

Fytohormony. Zásobní roztoky růstových regulátorů byly připravovány dle Tabulka 5 a do médií dávkovány podle konkrétní potřebné koncentrace.

Tabulka 5: Chemikálie a rozpouštědla pro přípravu zásobních roztoků fytohormonů pro MS média.

Látka	Rozpouštědlo	Koncentrace (mg/ml)
thidiazuron	3% KOH + dest. voda	0,11
kyselina naftyloctová	5% NaOH + dest. voda	0,10
kyselina indol-3-octová	95% ethanol + dest. voda	0,10
kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová	95% ethanol + dest. voda	2,50
benzylaminopurin	5% NaOH + dest. voda	1,00
kyselina gibberelová	95% ethanol + dest. voda	0,10

Celkové složení základního MS média pro kultivaci konopí bez přidání

růstových regulátorů odpovídalo obsahu uvedeném v Tabulka 6. Příprava probíhala nejprve rozvařením agaru v přibližně jedné čtvrtině celkového objemu destilované vody s následným přidáním příslušných množství jednotlivých zásobních roztoků a předvážených množství zbylých látek dle Tabulka 6. Podle typu média bylo přidáno požadované množství růstových regulátorů nebo antibiotik. Před přidáním další látky bylo vyčkáno úplného rozpuštění každé jedné látky. pH bylo upraveno 5% vodným roztokem NaOH na hodnotu 5,8 a médium bylo sterilizováno párou v autoklávu 20 minut při teplotě 120°C a tlaku 100 kPa.

Tabulka 6: Složení základního MS média pro konopí. Jednotlivé reagensie byly rozpuštěny v destilované vodě celkového objemu 1 l.

Látka	Množství na 1 l
makroelementy ze zás. roztoku	50,00 ml
CaCl ₂ ze zás. roztoku	10,00 ml
mikroelementy ze zás. roztoku	5,00 ml
vitamíny ze zás. roztoku	10,00 ml
agar	7,00 g
EDTA	37,00 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,00 mg
myo-inositol	100,00 mg
kasein	1,00 g
maltóza	90,00 g

4.1.3. Kultivace konopí

Kultivace rostlin konopí nebo jejich částí v *in vitro* podmínkách proběhla v několika na sebe vzájemně navazujících krocích. V každém bylo v rámci optimalizace postupu použito vícero typů médií.

4.1.3.1. Klíčení

Sterilizace semen pro výsev *in vitro* proběhla dle následujícího postupu. Semena byla nejprve promývána v sítku v kádince pod slabě proudící vodou z kohoutku po dobu jedné hodiny. Pro lepší smáčivost bylo přidáno pár kapek detergentu. Poté na třicet sekund ponořena do 70% ethanolu a promíchávána v 5% roztoku CaCl₂ po dobu 20 minut. Následně, již ve sterilních podmínkách, byla třikrát promyta sterilní destilovanou vodou, pokaždé po dobu 5 minut. Po usušení na filtračním papíru ve flow-boxu byla přesazena na MS médium s polovičním obsahem živin. Alternativně byla semena nechána klíčit na vlhčeném sterilní filtračním papíře nebo sterilních kosmetických vatových tampónech.

4.1.3.2. Mikropropagace z nodálních segmentů

Nodální segmenty z klíčnicích rostlin nebo z rostlin pěstovaných in vitro a obsahující úžlabní nebo apikální pupen byly množeny přesazením na MS médium s obsahem TDZ v koncentraci 0,5 mg/L. Narostlé explantáty byly nechány kořenit na MS médiu bez přidávaných růstových regulátorů. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16 hodin světla, 8 hodin tmy, teplotě 22°C a ozáření 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.

4.1.3.3. Indukce růstu nediferencovaných buněk

Rostliny vyklíčené ze semen byly sklizeny po 14 dnech a segmenty hypokotylů, děloh a listů použity jako primární explantát pro indukci kalusu. Obdobně byly v některých experimentech využity děložní listy z nezralých semen polních rostlin.

5-10 mm dlouhé segmenty rostlinného materiálu byly umístěny na Petriho misky na MS médium dle Tabulka 6 obohacené o různé koncentrace růstových regulátorů a jejich kombinace. Detaily uvádí Tabulka 7. Užity byly TDZ, NAA, 2,4-D, BAP.

Kultivace probíhala na světle v 22°C, ozáření 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ a s fotoperiodou 16 hodin světla, 8 hodin tmy. Po zhruba 8-10 týdnech, kdy se vytvořil kalus, byla část kultur přenesena na médium pro indukci růstu prýtlů. Kultury byly pasážovány na čerstvé médium každé dva týdny.

Část kalusových kultur byla využita pro založení suspenzních kultur nediferencovaných buněk. Vybrány byly kalusy dobře rostoucí a rozpádné. Kultivovány byly v 50ml Ehrlenmayerových baňkách obsahující 12 ml tekutého MS média s vynecháním agaru coby želírující složky a přidáním růstových regulátorů TDZ v koncentraci 0,1 mg/L nebo 2,4-D v koncentraci 0,5 mg/L. Po prvotním nárůstu buněk po zaočkování média, bylo z kultury každý týden odebíráno vždy 5 ml roztoku čerstvých buněk pro zaočkování další kultury, a doplněno na původní objem přidáním čerstvého média. Kultivace probíhala na třepačce při 75 rpm, světle s fotoperiodou 16 hodin světla, 8 hodin tmy a v 22°C. Kultury byly průběžně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem a barveny pomocí FDA (fluorescein diacetát), který zvýraznil živé buňky. Přesazení suspenzních kultur na pevná média probíhalo přenesením požadovaného objemu na sterilní filtrační papír. Kultura tak byla zbavena přebytečné tekutiny a otočením filtračního papíru do Petriho misky byla obtisknutím přenesena na médium.

Tabulka 7: Typy růstových regulátorů a jejich koncentrace v jednotlivých variantách médií pro indukci kalusu.

Varianta média	Koncentrace (mg/L)			
	NAA	2,4 - D	BAP	TDZ
1.	0,1	-	-	-
2.	0,1	-	-	0,5
3.	0,1	-	5	-
4.	-	1	-	-
5.	-	1	-	0,5
6.	-	1	5	-

4.1.3.4. Organogeneze

Pro indukci prýtů z kultur nediferencovaných buněk byla použita základní MS média (Tabulka 6) obohacená o cytokininy uvedené v Tabulka 8. Cca 0,5 dlouhé segmenty nediferencovaných buněk nebo kupičky o objemu cca 0,5 cm³ či 5 ml suspenzní kultury z médií pro indukci tvorby nediferencovaných buněk byly použity jako výchozí explantát. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16 hodin světla 8 hodin tmy, teplotě 20°C a ozáření 300 μmol/(m²·s). Pro kultivaci suspenzních kultur byla použita tekutá MS média bez agaru.

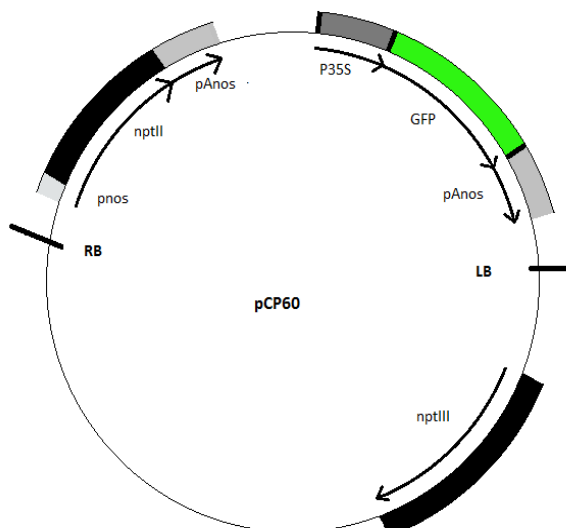
Tabulka 8: Typy růstových regulátorů a jejich koncentrace v médiích pro indukci růstu prýtů z nediferencovaných buněk

Varianta média	Koncentrace uvedených fytohormonů (mg/L)			
	TDZ	BAP	GA ₃	KIN
1.	0,5	-	-	-
2.	-	5	-	-
3.	0,5	-	7	-
4.	-	-	-	1

4.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Pro transformaci konopí byly používány bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (v textu *A. tumefaciens*) kmene C58C1 laskavě poskytnuté Dr. Lukášem Fisherem. Tento kmen nese gen rezistence vůči rifampicinu a obsahuje plazmid *pGV2260* s *vir* regionem, obsahující geny jejichž produkty zprostředkovávají přenos T-DNA (Deblaere et al., 1985). Bakterie též obsahovaly binární vektor *pCP60* pro množení v *E. coli* a *A. tumefaciens* nesoucí T-DNA s genem pro GFP mezi 35S promotorem (z viru kvěťákové mozaiky) a *pAnos* (nopalín syntázovým terminátorem z *A. tumefaciens*) a genem *nptII* (kódujícím neomycin fosfotransferázu) pro selekci transformovaných rostlinných buněk

umožněnou získanou rezistencí vůči kanamycinu. Vektor *pCP60* obsahuje také gen *nptIII*, který rezistenci vůči kanamycinu poskytuje bakteriím. Schematický náčrt vektoru *pCP60* je uveden v Ilustraci 2.



Ilustrace 2: Plasmid *pCP60* nesoucí gen pro GFP protein užitý pro transformaci rostlinných buněk.

Bakterie byly kultivovány na pevném LB (Luria-Bertani) médiu s přidanými antibiotiky ve tmě v 27°C. Bakteriální suspenze pro transformaci byla namnožena přenesením jedné kolonie do 50 ml Ehrlenmayerovy baňky s 15 ml tekutého YEB (Yeast Extract Broth) média a namnožením na třepačce při 150 rpm a 27 °C. Média vznikla rozpuštěním látek uvedených v Tabulka 9 v destilované vodě. Média byla sterilizována klávkováním. Antibiotika byla přidávána až po zchlazení zklávkovaného média na cca 50°C. Rifampicin byl rozpouštěn v DMSO (dimethylsulfoxid). pH nebylo upravováno.

Tabulka 9: Složení médií pro kultivaci *Agrobacteria*.

Látka pro LB	Koncentrace (g/L)	Látka pro YEB	Koncentrace (g/L)
trypton	10	hovězí extrakt	5
kvasinkový extrakt	2,5	kvasinkový extrakt	1
NaCl	5	trypton	5
agar	15	sacharóza	5
kanamycin	0,05	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,03
rifampicin	0,1	kanamycin	0,05
		rifampicin	0,1

4.3. Transformace rostlin konopí

4.3.1. Transformace kokultivací

Pro transformaci kokultivací byly použity tři typy výchozích explantátů. Listy z rostlin množených *in vitro* z vrcholových segmentů staré 4-6 týdnů, hypokotylы klíčnicích rostlin starých přibližně 2 týdny, odebírány byly z rostlin již nasazujících první pár pravých listů a narostlé kalusové kultury. Explantáty byly vloženy do Petriho misek o průměru 9 cm obsahujících 20 ml tekutého TrM (médiu pro transformaci) bez agaru (Tabulka 10). U listů byla skalpelem odstraněna báze listu s napojením řapíku i špička, zároveň byly provedeny dva nebo tři řezy přes střední žilku vedené ze spodní strany listu. Listy byly poté položeny na médium pro transformaci svou svrchní stranou. Z hypokotylů byly vyříznuty segmenty o velikosti cca 0,5 cm, dbáno bylo na čistotu řezu na obou stranách. Z kalusových kultur byly vybrány soudržné aktivně se dělicí kupy buněk, u kterých nehrozilo že se v tekutém transformačním médiu rozpadnou. Po přidání explantátů bylo do média v každé Petriho misce přidáno 100 μ l čerstvě narostlé suspenze *A. tumefaciens*. Kokultivace probíhala po dobu dvou dní ve tmě a při pokojové teplotě. Poté byly explantáty osušeny položením na sterilní filtrační papír a pinzetou přeneseny na TrBM (bakteriostatické médium s přidavkem růstových hormonů) a antibiotika (Tabulka 10). Kultivace probíhala v kultivační místnosti určené pro GMO při fotoperiodě 16 hodin světla 8 hodin tmy, teplotě 20°C a ozářenosti 300 μ mol/(m²·s). U kultur, kde byl pozorován výrazný nárůst bakterií během doby kokultivace, nebo u kalusových explantátů, kde byl v předchozích pokusech zaznamenán růst bakterií i na bakteriostatickém médiu, byl před přesazením zahrnut mezikrok promytí explantátů v 20 ml roztoku MS solí s přidavkem cefotaxinu v koncentraci 500 mg/L po dobu jedné hodiny.

Po čtrnácti dnech byly explantáty přeneseny na SIM (selekční médium) (Tabulka 10) a každých sedm dní přesazovány na další čerstvé selekční médium.

Tabulka 10: Množství jednotlivých růstových regulátorů a antibiotik o která byla obohazena základní MS média použitá při transformaci kokultivací.

Látka	Koncentrace v jednotlivých médiích (mg/L)		
	TrM	TrBM	SIM
acetosyringon	29,28	-	-
NAA	-	0,50	-
BAP	-	1,00	1,00
TDZ	-	-	0,50
cefotaxin	-	500,00	500,00
kanamycin	-	-	50,00

4.3.2. Transformace agroinfiltrací

Agroinfiltrace (infiltrace *A. tumefaciens*) se běžně využívá pro navození transienční transformace umožňující rychlou expresi vneseného genu. Pro transformaci byly použity rostliny staré 8 týdnů předpěstované v „indoor“ podmínkách pod 150 W HPS sodíkovou výbojkou. Bakterie pro transformaci byly namnoženy naočkováním 10ml tekutého YEB média s obsahem rifampicinu a kanamycinu přidáním jedné kolonie *A. tumefaciens* rostoucí na pevném LB médiu v Petriho misce. Kultivovány byly 24 h při 27°C na třepačce nastavené na 150 rpm. U dobře rostoucích kultur bakterií byla pomocí fluorescenčního mikroskopu zkontrolována schopnost tvorby GFP proteinu. 1 ml *A. tumefaciens* ze suspenze byl centrifugován při 4000 rpm 15 minut, promyt 1ml YEB média a opět centrifugován. Po odsátí supernatantu byl vzniklý pelet resuspendován v 1 ml AS média (Tabulka 11). Vzniklý roztok byl zředěn tak, aby optická denzita OD (600nm, kyveta 1 cm) odpovídala hodnotě přibližně 0,2. Po naředění byl roztok dvě hodiny kultivován při 27°C a poté dalším měřením optické density kontrolována životaschopnost bakterií. K transformaci byly zvoleny pouze aktivně se dělicí roztoky bakterií.

Agroinfiltrovány byly mladé listy rostlin, které však měly vyvinuté pět listových čepelí. Dobrým zavodněním před transformací bylo zajištěno otevření průduchů rostlin. Pomocí 1ml injekční stříkačky bez jehly byl transformační roztok zlehka vtlačěn do listu z jeho spodní strany. s protioporou ruky transformovatele opatřené ochrannou rukavicí. Fixou byl označen rozsah transformované plochy listu. Rostliny byly dále kultivovány a sběr transformovaných částí probíhal v intervalu 2 a 7 dní.

Tabulka 11: Složení AS média pro transformaci.

Látka	Koncentrace (mM)
MgCl ₂	10
MES-KOH buffer pH 5,6	10
acetosyringon	0,15

4.3.3. Izolace protoplastů konopí

Izolace protoplastů z buněk listů transformovaných *A. tumefaciens* pomocí agroinfiltrace byla zvolena jako metoda umožňující rychlé určení úspěšnosti transformace a zhodnocení míry exprese vneseného genu.

Protoplasty mezofylových buněk z rostlin druhý a sedmý den po transformaci byly izolovány v médiu pro izolaci protoplastů (Tabulka 12) a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Z označené části transformované listové plochy byly vyříznuty disky cca 1,5 cm², nastříhány na malé části a vloženy do 2ml nádobek Eppendorf obsahující 1,5 ml média pro izolaci protoplastů. Zakryté hliníkovou fólií

kvůli zatemnění byly kultivovány přes noc při pokojové teplotě. Po odstranění zbytků listové hmoty byly protoplasty ponechány dosednout na dno a byla odstraněna většina supernatantu tak, aby zůstalo přibližně 0,5 ml média. Roztok s protoplasty byl centrifugován 6 minut při 25 rpm, poté bylo přidáno 70 μ l 0,1% agarózy a pomocí protoplastových špiček byl vzniklý roztok přenesen na podložní skla s vybroušenou miskou určená k pozorování protoplastů.

Tabulka 12: Médium pro izolaci protoplastů. Jednotlivé látky rozpustíme v roztoku ½MS solí.

Látka	Koncentrace (mg/ml)
celuláza	10
macerozym	2,5
sorbitol	82
cefotaxine	0,5
roztok ½MS solí dle požadovaného objemu	

5. Výsledky

5.1. Tkáňové kultury

5.1.1. Založení *in vitro* kultury

V rámci experimentů byly založeny a pomocí nodálních segmentů množeny *in vitro* kultury odrůd konopí setého uvedené v Tabulka 13. Vzhledem k opakujícím se kontaminacím se nepodařilo *in vitro* vyklíčit a kultivovat rostliny odrůd Ferimon , Finola a Carmagnola.

Tabulka 13: Seznam odrůd konopí u nichž byla úspěšně založena in vitro kultura.

Fibrol	Santhica	Epsilon	Fedora 77
Felina 32	Futura 75	USO 31	Monoica
Beniko	Bialobrzeskie	Tygra	KC-Dora

U použitých semen pocházejících z Agritec Šumperk s.r.o. byla pozorována velmi dobrá klíčivost první rok po zakoupení, která se se stářím semen snižovala i přes skladování v suchu a temnu při 4°C. Tři roky stará semena již prakticky neklíčila. Obdobný stav byl pozorován i u semen samosprašných rostlin z polních experimentů ve VÚRV v.v.i., která však nesloužila jako výchozí materiál pro experimenty uvedené v této práci.

Kromě stáří nebyl pozorován žádný vliv vnějšího prostředí, který by schopnost semen klíčit výrazně ovlivňoval. Průměrná doba klíčení byla dva až tři týdny. Semena ochotně klíčila na světle i ve tmě i v různých teplotách. Konopí je možné s úspěchem klíčit na MS médiu s polovičním obsahem živin, praktičtější z hlediska manipulace i následné vitality rostlin se však jeví naklíčení na sterilních vlhčených kosmetických tampónech a následný přesun již vyklíčených rostlin na MS médium. Množení rostlin pomocí nodálních segmentů probíhalo s úspěchem na MS médiu s obsahem TDZ v koncentraci 0,5 mg/L. Uvedená data nebyla statisticky hodnocena.

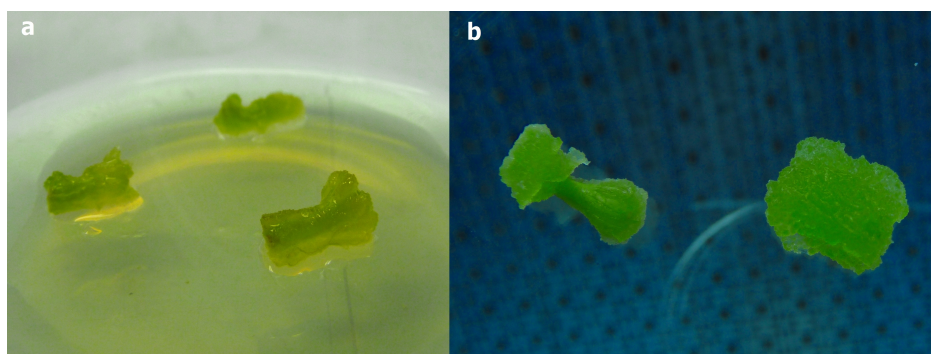
U výchozích explantátů odebíraných z rostlin v polních experimentech, dělohy nezralých semen, nebyly pozorovány kontaminace v míře větší než je obvyklé. Naopak konopí se zdá být rostlinou s dobrými předpoklady pro odběr explantátů z rostlin ze skleníkových nebo polních podmínek a jejich přesun do *in vitro* kultur. Jedním z důvodů je zmiňovaný antimikrobiální efekt některých sekundárních metabolitů (Ahmed et al., 2008).

5.1.2. Odvození kultur nediferencovaných buněk

Pro navození růstu nediferencovaných buněčných kultur byla použita média s obsahem auxinů nebo jejich kombinace s cytokininy. Pro optimalizaci podmínek bylo testováno celkem šest typů médií obsahující dva syntetické auxiny (NAA a 2,4-D) a dva syntetické cytokininy (TDZ a BAP). Výchozími explantáty pro indukci kalusu byly segmenty z párových orgánů *in vitro* pěstovaných rostlin. Pokus probíhal ve třech opakování. V prvním pro odrůdy Monoica a Felina v druhém pro odrůdy Felina a Beniko, ve třetím byly přidány odrůdy Fibrol Tygra a Bialobrzeskie. Jsou uvedena souhrnná data.

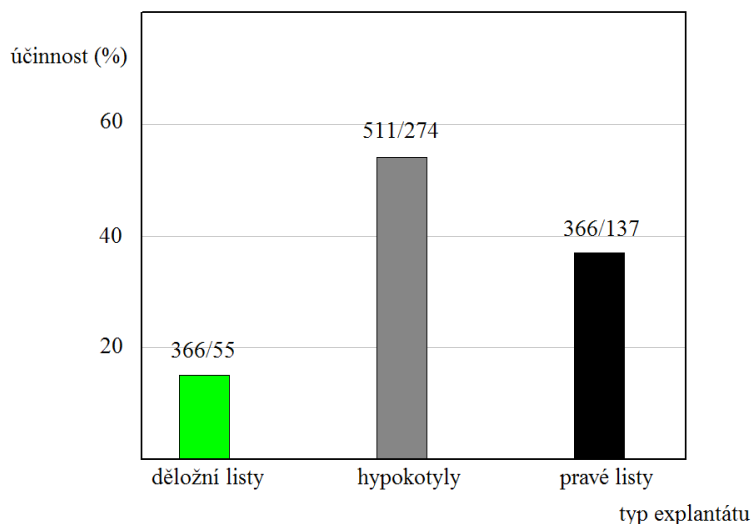
Děložní listy, první pár pravých listů a hypokotylové segmenty délky 5-10 mm byly rozsazeny na média tak, aby byla možná jejich vzájemná porovnatelnost a explantáty stejného genotypu pocházející ze stejné rostliny se očitly na médiu pod vlivem jiného auxinu. Kombinace cytokininů byly pro oba auxiny stejné. Média obsahující pouze auxin byla použita jako kontrola. Do pokusů byly zahrnuty i opakování některých odrůd bez založených médií sloužících jako kontrola. To bylo vedeno snahou šetřit rostlinný materiál a omezit jeho kultivaci na médiích s nízkou mírou tvorby kalusu, která již byla patrná z předchozích experimentů. Složení médií jest uvedeno v Tabulka 7 v kapitole 4.1.3.2. Získaná data byla podrobena statistickému hodnocení analýzy rozptylu (ANOVA GLM) pomocí programu NCSS.

Bylo zjištěno, že všechny typy výchozích explantátů jsou schopny tvořit kalus. Úspěšnost tvorby a jeho vlastnosti se lišily dle typu média i typu výchozího explantátu. Rychlost tvorby byla srovnatelná ve všech případech. Lze konstatovat velice nízkou rychlost růstu kalusových kultur, k vytvoření kalusu vhodného pro použití v dalších experimentech, nebo schopného rozdělení pro další namnožení, došlo až po 8 až 10 týdnech. V experimentech byla hodnocena schopnost tvořit kompaktní, fotosyntetizující, kontinuálně rostoucí kalus.



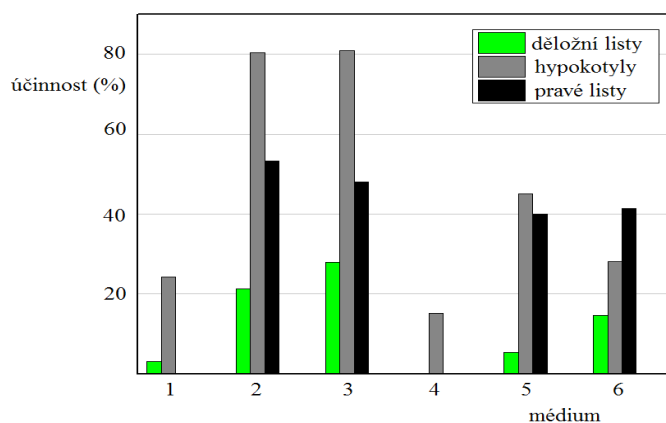
Ilustrace 3: Dvě fáze růstu kalusové kultury z hypokotylových segmentů a) zvětšování objemu buněk v časných fázích tvorby kalusu b) aktivně se dělící buňky rostoucí kultury.

Byl zaznamenán rozdílný vliv výchozího explantátu na tvorbu kalusu. Schopnost jednotlivých typů explantátů tvořit kalus je graficky vyjádřena v Ilustraci 4, která též obsahuje souhrnná data počtu použitých explantátů. Celkový vliv výchozího explantátu na schopnost tvorby kalusu byl pozorován statisticky průkazný s p-hodnotou 0,006. Nejlepším výchozím explantátem byly v daných podmínkách segmenty hypokotylů klíčnicích rostlin, které tvořily kalus v 54 % případů a byly tak v porovnání o 39 % úspěšnější než děložní listy (p-hodnota 0,003) a o 17 % úspěšnější než pravé listy (p-hodnota 0,009).



Ilustrace 4: Graf znázorňující celkovou účinnost tvorby kalusu z jednotlivých typů explantátů. Čísla nad jednotlivými sloupci vyjadřují celkový počet explantátů daného typu ku počtu explantátů vykazujících požadovanou tvorbu kalusu.

Přehledný souhrn zaznamenaného vlivu média a typu výchozího explantátu je graficky ztvárněn v Ilustraci 5. Média s obsahem auxinu a s přidávanými cytokininy lépe indukovala růst kalusu než média obsahující pouze auxin. Pozorovaný růst byl lepší na médiích obsahujících NAA než na médiích s obsahem 2,4-D (p-hodnota při porovnání hodnot pro všechny média 0,034, pouze pro média s kombinací auxin+cytokinin 0,003). Rozdílný vliv typu cytokininu se při použitých koncentracích prokázat nepodařilo.



Ilustrace 5: Graf znázorňující účinnost jednotlivých médií na tvorbu kalusu ze tří různých typů explantátů. U média číslo 1. byla zaznamenána nulová odpověď pro explantáty pravých listů, u média číslo 4. byla zaznamenána odpověď pouze u hypokotylů. Složení médií (koncentrace jsou uvedené v mg/L) : 1. 0,1 NAA 2. 0,1 NAA + 0,5 TDZ 3. 0,1 NAA + 5 BAP 4. 1 2,4-D 5. 1 2,4-D + 0,5 TDZ 6. 1 2,4-D + 5 BAP.

Ze souhrnných dat byl také zjevný (statisticky průkazný s p-hodnotou 0,006) vliv jednotlivých genotypů na schopnost explantátu tvořit kalus. Bohužel rozdílný vliv jednotlivých konkrétních odrůd nelze ze získaných dat spolehlivě prokázat. Účinnost tvorby kalusu jednotlivých odrůd je v závislosti na médiu uvedena pro hypokotylly v Tabulka 14 pro děložní listy v Tabulka 15 a pro pravé listy v Tabulka 16.

Tabulka 14: Účinnost tvorby kalusů z hypokotylových segmentů v závislosti na typu média a genotypu. Prázdná pole vysvětlena v textu.

Hypokotylly							
Typ média	Účinnost tvorby kalusu (%)						
	celková	Monoica	Felina	Beniko	Fibrol	Bialobrzeskie	Tygra
1.	24	25	27	21	-	-	-
2.	80	88	75	90	75	88	55
3.	81	73	74	90	83	75	100
4.	15	13	9	21	-	-	-
5.	45	27	38	64	50	50	36
6.	28	20	33	10	42	33	36

Tabulka 15: Účinnost tvorby kalusů z děložních listů v závislosti na typu média a genotypu. Prázdná pole vysvětlena v textu.

Děložní listy					
Typ média	Účinnost tvorby kalusu (%)				
	celková	Monoica	Felina	Beniko	Fibrol
1.	3	0	0	7	-
2.	21	20	30	24	33
3.	28	33	33	33	75
4.	0	0	0	0	-
5.	5	13	0	10	42
6.	15	20	10	14	50

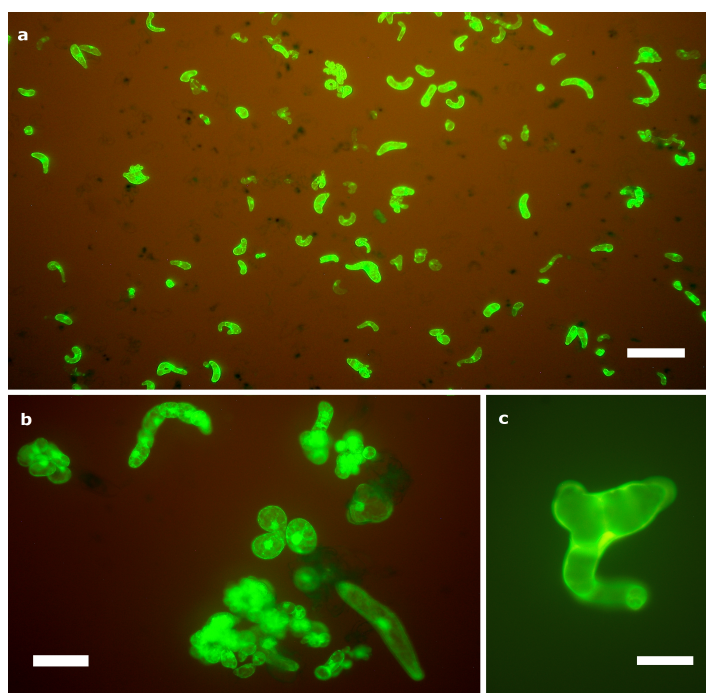
Tabulka 16: Účinnost tvorby kalusů z pravých listů v závislosti na typu média a genotypu. Prázdná pole vysvětlena v textu.

Pravé listy					
Typ média	Účinnost tvorby kalusu (%)				
	celková	Monoica	Felina	Beniko	Fibrol
1.	0	0	0	0	-
2.	53	33	56	48	83
3.	48	27	52	43	75
4.	0	0	0	0	-
5.	40	27	41	29	75
6.	41	27	37	48	58

V experimentu s přesunem děložních listů z nezralých embryí odrůd Beniko, Felina, Bialobrzeskie z rostlin pěstovaných na polích na média s obsahem 1 mg/L 2,4-D nebo 0,5 mg/L TDZ s očekávanou indukcí růstu kalusu nebyla pozorována jeho tvorba. Bylo pozorováno dozrávání děložních listů, rychlejší na médiu s obsahem cytokininu a následné odumření kultury. Data nebyla statisticky hodnocena.

5.1.3. Odvození suspenzních kultur konopí

Suspenzní kultury byly odvozeny z rozpadavých kalusů odrůd Fibrol, Santhica, Epsilon, Fedora, Felina, Futura, Monoica přesunem do tekutých MS médií obsahující 1 mg/L 2,4-D nebo 0,5 mg/L TDZ. Aktivně se dělicí suspenzní kulturu tvořily bez pozorovaného vlivu média odrůdy Fibrol, Epsilon, Felina, Monoica. Při přesunu kultur z tekutého média s obsahem 2,4-D do tekutého média s obsahem TDZ nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu ani po více než šesti týdnech ani při dvojnásobně zvýšené koncentraci růstového hormonu. V suspenzních kulturách byly pozorovány ojedinělé spontánní případy tvorby soudržných fotosyntetizujících shluků buněk v médiích s obsahem TDZ, fázi předcházející jejich tvorbě, soudržnost aktivně se dělicích buněk je možné vidět na fotce b) v Ilustrace 6. Při přesunu na pevná média s různým obsahem cytokininů kultury utvořily po zhruba šesti týdnech kompaktní fotosyntetizující kalusy, schopné dlouhého přežívání bez viditelných známek aktivního růstu nebo dalšího zvětšování objemu. Data nebyla statisticky hodnocena.



Ilustrace 6: Suspenzní kultury odrůdy Fibrol barvené roztokem fluorescein diacetátu. a) celkový pohled na kulturu rostoucí na médiu s obsahem 2,4-D b) kompaktní shluky buněk z kultury rostoucí na médiu s obsahem TDZ c) buňka s dlouhivými výběžky typickými pro přestálé kultury bez aktivního buněčného dělení. Úsečka reprezentuje c) 0,25 mm b) 0,5 mm a) 1 mm.

5.1.4. Regenerace prýtů z nediferencovaných buněčných kultur

Výchozím materiálem pro regeneraci prýtů byly kalusové kultury odvozené z *in vitro* pěstovaných rostlin nebo suspenzní kultury z těchto kalusů odvozené. Snaha o regeneraci proběhla u následujících odrůd konopí: Fibrol, Epsilon, Felina, Futura, Tygra, Beniko, Monoica, Bialobrzeskie.

U kalusových kultur odrůd Felina, Fibrol, Tygra, Benico Bialobrzeskie, Monoica přesun na médium probíhal vynecháním auxinu z média použitého pro iniciaci růstu kalusové kultury, explantát tedy nebyl vystaven změně cytokininu v médiu. Kalusy z médií s obsahem TDZ byly rozděleny a polovina byla přepasážována na médium s přídáním kyseliny giberelovou. Složení médií a koncentrace uvedených fytohormonů k vidění v Tabulka 8. Z celkového počtu 186 explantátů šesti různých odrůd na třech různých médiích nebyla regenerace prýtů z kultur nediferencovaných buněk pozorována ani v jednom případě. Po pasáži byl většinou pozorován pokračující růst buněk směřovaný do větší kompaktnosti explantátů, který však postupně ustal a kultura buď odumřela, nebo ustrnula v růstu. Buňkám takto ustrnulých kultur pravděpodobně zůstala zachována fotosyntetická funkce, většinou zůstaly zeleně zbarvené v celém svém objemu. Byla pozorována občasná tvorba kořenů, spontánně i po 10 týdnech bez viditelného růstu. Data nebyla statisticky hodnocena.

Suspenzní kultury odrůd Fibrol, Epsilon, Felina, Futura byly přesouvány na pevná média s obsahem TDZ nebo KIN v koncentracích uvedených v Tabulka 8 obtisknutím sterilního filtračního papíru, na který bylo pomocí pipety nalito 5 ml buněčné kultury z médií s obsahem 2,4-D nebo TDZ. Po zhruba čtyřech týdnech po přesunutí na pevná média se téměř ve všech případech vytvořil pevný fotosynteticky aktivní kalus. Pro každou odrůdu a variantu původního a nového média bylo vytvořeno nejméně patnáct jednotlivých přesazení. Regenerace prýtů nebyla pozorována v žádném z případů. Data nebyla statisticky hodnocena.

5.2. Transformace konopí setého

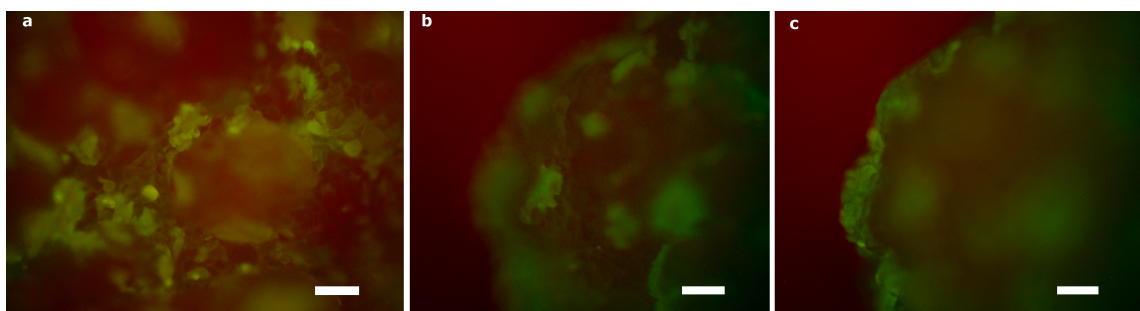
5.2.1. Transformace konopí kokultivací s *A. tumefaciens*

Transformace rostlinného materiálu s *A. tumefaciens* probíhala společnou kokultivací třech typů explantátů (kalusů, hypokotylových segmentů a listů) pěti různých odrůd (Tygra, Felina, Fibrol, Monoica, USO) v transformačním médiu s přidáním 100 µl čerstvě narostlé bakteriální suspenze po dobu dvou dní a následným přesazením na bakteriostatické médium s růstovými regulátory a antibiotikem k eliminaci *Agrobacteria*, které bylo zvoleno na základě pozorovaných výsledků uvedených v kapitole 5.1.2., přesné složení a koncentrace je uvedeno v Tabulka 10.

Byl pozorován výrazný vliv použitého výchozího explantátu na úspěšnost dalšího

růstu po proběhlé kokultivaci. Zcela nevhodné se ukázaly být kalusové kultury, u kterých se z celkového počtu 41 kokultivovaných kusů (17 Tygra, 24 Felina) ani v jednom případě nepodařilo eliminovat růst bakterií v míře nutné pro další přežití explantátu a ty nekrotizovaly již během prvního přesazení na bakteriostatické médium. Tento efekt se částečně podařilo zmírnit ve druhém opakování, kdy byl po kokultivaci zařazen hodinový oplach explantátů v roztoku MS solí s přídatkem cefotaxinu v koncentraci 500 mg/L na míchací desce s rychlostí otáčení 60 rpm. Nicméně i tak se nepodařilo úspěšně kultivovat ani jeden potencionálně transformovaný kalus. Podobná situace nastala u hypokotylových segmentů kdy z celkového množství 64 použitých explantátů tří různých odrůd (26 Monoica, 17 Fibrol, 21 USO) byly na bakteriostatickém médiu schopny růstu pouze tři explantáty odrůdy USO.

Vhodným explantátem pro transformaci kokultivací se zdají být listové segmenty s odříznutou špičkou a bází listu u řapíku a několika příčnými řezy přes střední žilku. Z celkového množství 50 použitých explantátů dvou různých odrůd (31 Monoica, 19 Beniko) pouze jeden nebyl schopen dalšího růstu na bakteriostatickém médiu s obsahem fytohormonů po absolvované kokultivaci. U některých listů byl pozorován vývoj kalusových struktur na řezných plochách vystavených působení *Agrobacteria* i růstových regulátorů média. V těchto dva týdny starých kalusech byl pod fluorescenčním mikroskopem pozorován signál odpovídající GFP fluorescenci, patně patřící na něm přežívajícím bakteriím (Ilustrace 7).



*Ilustrace 7: Kalusy vyvíjející se na řezných plochách listů po kokultivaci s *A. tumefaciens*. Červený signál podkladu je způsoben autofluorescencí fotosynteticky aktivní listové plochy, zeleně fluoreskující body jsou kolonie *Agrobacteria* přežívajícího mezi kalusovými buňkami. Dle síly signálu jednotlivé buňky zatím pravděpodobně transformovány nejsou. Úsečka reprezentuje 0,5 mm.*

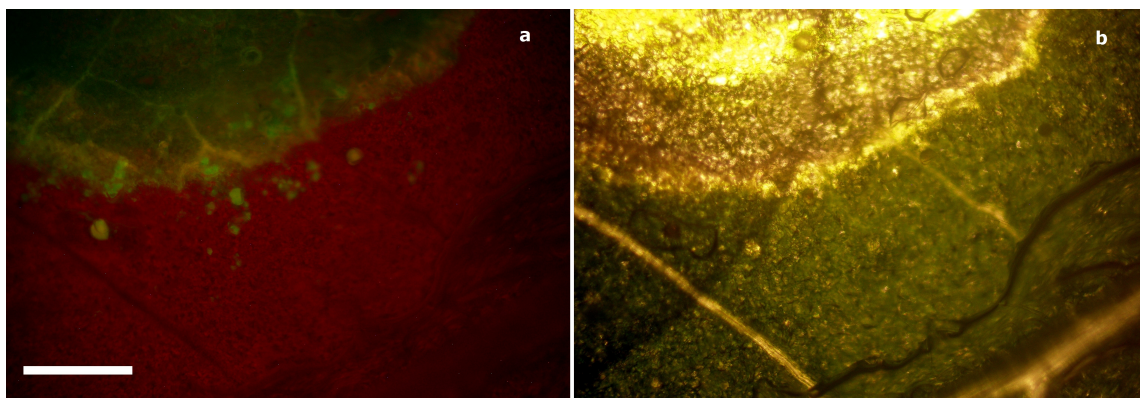
Po dvoutýdenní kultivaci na bakteriostatickém médiu s pozorovaným založením tvorby mladých kalusů na řezných plochách listů byly všechny explantáty přesunuty na selekční médium s obsahem kanamycinu (Tabulka 10) kde nebyl pozorován další růst. Po dalším dvoutýdenním přežívání explantátů následovala nekróza listové tkáně. Data nebyla statisticky hodnocena.

5.2.2. Transformace konopí agroinfiltrací

Přechodná transformace listů konopí s následnou izolací protoplastů z buněk transformované tkáně sloužila k ověření schopnosti *A. tumefaciens* transformovat konopné buňky. Izolace protoplastů proběhla po dvou a sedmi dnech od transformace v médiu s přítomností antibiotika k zahubení bakterií a sloužila jako metoda rychlého ověření účinnosti transformace.

Roztokem AS media (Tabulka 11) s přidanými bakteriemi *A. tumefaciens* byly infiltrovány listové čepele mladých listů 8 týdnů starých rostlin čtyř odrůd konopí (Beniko, Monoica, Felina, Bialobrzeskie). U všech rostlin byly pozorovány obtíže se samotnou aplikací transformačního roztoku do mezibuněčných prostor listu. Mladé listy konopí jsou velmi tenké a bylo třeba výrazně citlivější manipulace než u jiných rostlin, u kterých je agroinfiltrace běžně používána, například tabák. Rovněž celková struktura listu, který má úzkou čepel dělenou středovou žilkou a z ní vybíhajícími žilkami postranními na velmi malé oblasti s volně propojenými mezibuněčnými prostory, nečinní z konopí rostlinu, u které by byla agroinfiltrace snadno aplikovatelnou metodou.

Bylo pozorováno úspěšné přežívání bakterií v mezibuněčných prostorech listů s negativním vlivem na životnost transformované tkáně, ta po sedmi dnech jevila výrazný nárůst neživotaschopných buněk (Ilustrace 8). Byla též pozorována velmi dobrá distribuce bakterií a jejich migrace podél žilek i mimo původně transformací zasaženou oblast.



Ilustrace 8: Poškozená tkáň po sedmi dnech působení agrobacteria v mezibuněčných prostorech listu konopí. Červené zbarvení pochází z autofluorescence fotosynteticky aktivní tkáně. Zelený signál je přisuzován bakteriemi produkovanému GFP. Úsečka reprezentuje 1 mm.

Izolace protoplastů probíhala u všech odrůd s velmi nízkou úspěšností, v řádu jednotek protoplastů z odběru transformované tkáně. Rozhodující vliv na to měly zejména velice tuhé listy konopí. Po dvacetičtyřhodinové kultivaci v roztoku enzymů trávící buněčné stěny, nebylo téměř pozorováno narušení struktury listu a enzymy

natrávená tkáň musela být opatrně narušena mechanicky tak, aby došlo k uvolnění protoplastů do média. Izolované protoplasty také nebyly ideálního sférického tvaru, to bylo pravděpodobně zapříčiněno nedostatečným odbouráním buněčné stěny a jejími přetrvávajícími artefakty. Nebo jiným zcela neznámým vlivem.

Oproti listům transformovaných pouze AS mediem bez bakterií a jejichž listová hmota sloužila jako kontrola se podařilo již druhý den od transformace izolovat jednotlivé protoplasty se signálem odpovídajícím fluorescenci GFP u odrůd Beniko, Monoica, Bialobrzeskie Ilustrace 9. Vzhledem k spíše náhodnému odvozování jednotlivých protoplastů nebyla míra transformací nijak hodnocena.



Ilustrace 9: Izolovaný protoplast z mezofylových buněk listové hmoty odrůdy Beniko. Patrný je nepravidelný tvar patrně způsobený nedostatečným odbouráním buněčné stěny. Úsečka reprezentuje 0,25 mm.

6. Diskuze

Konopí seté je rostlina v minulosti i současnosti hojně využívaná v zemědělství i pro průmyslové zpracování pro jasné a dlouhodobě známé tradiční možnosti zpracování poskytovaných surovin, jako jsou vlákno, semena a zbytková biomasa. V nedávné době se dostala i do popředí zájmu farmaceutických firem pro možnosti využití jejích sekundárních metabolitů. To stimuluje i zájem výzkumníků zpracovávajících metodologii umožňující její využití pomocí aplikovaných biotechnologií. Obdobně jako u jiných plodin, pro které nejsou prozatím zpracovány odpovídající potřebné kultivační protokoly, je i práce s konopím v prostředí tkáňových kultur problematická.

V minulé dekádě bylo vypracováno několik studií věnující se snahám o transformaci konopných suspenzních buněčných kultur (Feeney and Punja, 2003), hypokotylů klíčnicích rostlin (Wahby et al., 2013) nebo mapující schopnosti různých výchozích explantátů na tvorbu kalusu a jejich následnou regeneraci (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005) (Lata et al., 2010a). Byly též zpracovány protokoly pro mikropropagaci rostlin (Lata et al., 2009) (Wang et al., 2009). Na jejich základě lze konopí vyhodnotit jako rostlinu obtížně regenerující s velkou variabilitou odpovědi na různé kultivační podmínky. Z nich také vycházel základní předpoklad pro téma této diplomové práce, že konopí seté lze transformovat ve formě kultury nediferencovaných buněk a z ní úspěšně regenerovat celistvou rostlinu. V této práci dosažené výsledky, kdy jediná statisticky významná data byla pozorována při zkoumání vlivu média a výchozích explantátů na tvorbu kalusu, navíc zmíněnou variabilitu odpovědi dále rozšiřují.

Dle očekávání nebyly pozorovány problémy při ustanovení *in vitro* kultur a jejich mikropropagaci pomocí nodálních segmentů. Zde byl modifikován postup při kořenění a nodální segmenty, kterým se během růstu začal na spodní části stonku tvořit kalusový bal, byly přesazeny na MS médium bez obsahu růstových regulátorů, kde úspěšně kořenily. V literatuře uváděné přidání IBA do médií nebylo shledáno nezbytným (Wang et al., 2009).

Výsledky dosažené v této práci při odvozování kalusových kultur respondují s výsledky studie uvádějící kombinaci fytohormonů NAA + TDZ nejefektivnější pro tvorbu kalusu rostlin chemotypu I (Lata et al., 2010a). Jsou tedy v mírném rozporu s daty zaznamenanými pro tvorbu kalusu dalšími členy oddělení Molekulární genetiky VÚRV v.v.i. v předchozích experimentech, které dokládaly nejlepší růst kalusu na médiu obsahující různé koncentrace 2,4-D (Kučera, *ústní sdělení* 2013) i s výsledky obsáhlé studie, ve které nejlépe vycházela média obohacená o přípravek DICAMBA případně NAA v kombinaci s IAA (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005). Tento rozdíl by mohl být způsoben třemi faktory. Hlavním je použití NAA v kombinaci se syntetickými cytokininy BAP a TDZ. Zejména TDZ v předchozích pracích nebyl používán a jeví se obecně účinnější pro široké spektrum rostlinných druhů, schopný nahradit dříve užívané

kombinace fytohormonů (Murthy et al., 1998) (Visser et al., 1992). Použité koncentrace se navíc mírně liší použitím nižších hodnot než v publikovaných pracích ve výsledné koncentraci 1 mg/L NAA + 0,5 mg/L TDZ. Zvláště nižší koncentrace NAA patrně tolik nestresovala explantáty a je tedy pravděpodobným faktorem, který v kombinaci s cytokininy zvyšoval účinnost tvorby kalusu. V této práci prokázaný shodný efekt BAP a TDZ v kombinaci s NAA v médiích pro tvorbu kalusu u konopí nebyl dříve pozorován. Dalším faktorem jsou data samotná. Byť hodnoty, které byly během této práce naměřeny vyhoví statistickému testování pomocí analýzy rozptylu (ANOVA GLM) a poměrně přesvědčivě demonstrují významný vliv média a typu explantátu na růst kalusu, vstupní počty použitých explantátů nedosahují počtům standardně užívaným v rozsáhlejších experimentech s optimalizací kultivačního protokolu tkáňových kultur. Třetím rozhodujícím faktorem jsou výchozí genotypy. Již zmíněná se stářím se snižující schopnost semen klíčit patrně souvisí i s kvalitou následně z daných rostlin odvozených explantátů. Rozdíly mezi původem semen stejných odrůd a kvalitou z nich odvozených explantátů byly publikovány (Ranalli, 2004). Tento jev pravděpodobně souvisí s určitou nestálostí fenotypového projevu zmíněnou v kapitole 3.1.1 strana 11. Též je problematické srovnávání výsledků dosažených pro odrůdy konopí odpovídající chemotypu I, které je při užití rostlin technického konopí nutno brát pouze jako hypoteticky dosažitelné.

Negativní výsledky pozorované při regeneraci prýtů částečně odpovídají nízkým regeneračním účinnostem uváděných pro regeneraci z kalusů nezávisle na vlivu výchozího explantátu a které se pohybují okolo 10 % regenerovaných výhonů z celkového počtu (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005) (Feeney and Punja, 2003) (Kučera, *nepublikovaná data*). Tento stav také odpovídá neexistujícímu spolehlivému protokolu pro indukci prýtů z kalusů pro odrůdy technického konopí. Pro rostliny chemotypu I byla popsána regenerace s účinností až 90 % (Lata et al., 2010a). V experimentech s očekávanou regenerací prýtů z kalusů bohužel nebyly statisticky hodnoceny vedlejší pozorované jevy jako jsou růstová dynamika suspenzních i kalusových kultur nebo počet zakládání jiných než očekávaných orgánů, pozorována byla tvorba kořenů, které mohly přinést data o vlivu jednotlivých hormonů na přežívání kultur.

Přestože v experimentech použité růstové regulátory a jejich koncentrace byly stanoveny na základě výsledků z publikovaných dat výběrem nejlepších možných, nebyly pozorovány očekávané výsledky. Experimenty, které by mohly pomoci stanovit jejich optimální koncentraci pro požadovanou růstovou odpověď, by tedy do budoucna mohly zahrnovat i stanovení hladin endogenně produkovaných fytohormonů ovlivňující vývojový stav jednotlivých explantátů a jejich vzájemné ovlivnění s exogenními regulátory přijatými z média. Pravděpodobné vysoké hladiny endogenních auxinů u konopí brání jeho regeneraci a naopak podporující pozorovanou tvorbu kořenů u kalusových explantátů (Slusarkiewicz-Jarzina et al., 2005) (Feeney and Punja, 2003), by poté mohly být sníženy ovlivněním auxinového toku v buňce. Jiným přístupem může být navýšení počtu výchozích explantátů a tím v ideálním případě vykompenzovat nízkou

úspěšnost regenerace. U chmele, blízké příbuzné rostliny, byla provedena úspěšná transformace reportérovým genem pro β -glukuronidázu a úspěšně regenerováno 21 transformovaných rostlin z celkového počtu výchozích 1440 explantátů, s úspěšností tvorby kalusu 5,7 % (Horlemann et al., 2003).

Velmi významným faktorem ovlivňující všechny provedené experimenty byla zaznamenaná růstová rychlost *in vitro* kultur. Ta je pro druh *Cannabis* částečně specifická, částečně je možné ji kompenzovat optimalizací pěstebních podmínek. V experimentálních podmínkách byla zjištěna vyšší vitalita *in vitro* pěstovaných rostlin konopí chemotypu I korelující s nárůstem kvantové ozářenosti až do 2000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ s pozorovaným optimem zhruba 700 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, dále již nebyl vliv zvýšené ozářenosti tak výrazný (Chandra et al., 2008). Ve využívaných kultivačních prostorách byla ozářenost okolo 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ lze tedy usuzovat, že kultivační zázemí bylo jedním z faktorů ovlivňujících pozorovanou rychlost růstu.

Jedním z cílů této práce bylo navodit transientní a stabilní transformaci rostlin konopí pomocí dvou metod, transformace kokultivací s *A. tumefaciens* a agroinfiltrací. U izolovaných protoplastů z agroinfiltrovaných listů rostlin byl dva dny po transformaci pozorován fluorescenční signál pro GFP, který u kontrolních listů viditelný nebyl. U velmi pravděpodobně transientně transformovaných buněk však neproběhlo žádné další ověření přítomnosti vneseného úseku DNA. Celý proces byl provázen obtížemi. Již samotná aplikace transformačního roztoku do mezibuněčných prostor listů byla problematická a míra izolace protoplastů byla velmi nízká, v řádu jednotlivých protoplastů. Proces by šel dále optimalizovat vyzkoušením různých osmoticky aktivních látek v médiu a jiných enzymů a je možné že by byla nalezena kombinace lépe vyhovující. Uvažovaná možnost využití rostlin konopí jako rostliny pro produkci proteinů pomocí transientní exprese se ukázala být minimálně problematická ve srovnání s k tomu účelu běžně využívanými rostlinami, například tabákem.

Při kokultivaci explantátů s *A. tumefaciens* byl pozorován zcela zásadní problém při eliminaci bakterií. I při vysoké koncentraci bakteriostatického antibiotika (cefotaxine v koncentraci 500 mg/L) byl pozorován přetrvávající růst bakterií vedoucí k úhynu explantátu. Kokultivace byla dvakrát opakována s obdobným výsledkem, cefotaxine do bakteriostatického média byl použitý pokaždé z jiného zdroje. Bakteriální růst byl pozorován u kalusových explantátů a u hypokotylů, ne však u listových segmentů. Po kokultivaci byly explantáty přesunuty na bakteriostatické médium pro indukci kalusu, složení uvedeno v Tabulka 10, kde byl pozorován růst kalusů na řezných plochách některých listů, na těchto kalusech byl pozorován fluorescenční signál odpovídající GFP, patrně však patřící přežívajícím bakteriím. Po dvou týdnech růstu následovalo přesunutí na selekční médium. Zde se však nepodařilo zregenerovat ani jeden explantát. Pravděpodobnými důvody byly nízká růstová rychlost kalusů konopí pozorovaná v předcházejících experimentech a nižší úspěšnost tvorby kalusů z listů, která se pro použitou kombinaci růstových regulátorů pohybuje kolem 50 % jak uvádí Tabulka 16. S dalším stresovým faktorem, kterým byl vliv selekčního média kanamycinu, se již

potenciálně transformované buňky nedokázaly vyrovnat. Řešením by v případě konopí, mohla být kultivace kalusových kultur delší dobu pouze na bakteriostatickém médiu a selekci podrobit až narostlé kalusy.

Veškeré experimenty uváděné v této práci byly ovlivněny charakteristickou rychlostí růstu *in vitro* kultur konopí, která nezřídka dosahuje dvojnásobných hodnot při tvorbě požadovaných struktur či orgánů než většina v *in vitro* dobře zavedených rostlin. To ovlivňuje celkové plánování experimentů a činí ověřování získaných dat opakováním pokusů náročnější časově i z hlediska potřebného rostlinného materiálu. Tento fakt se projevil v plné míře při experimentech s kokultivací explantátů s *A. tumefaciens*, kdy byla veškerá předchozí snaha a objem rostlinného materiálu investován do pokusů s odvozením a následnou regenerací kalusové kultury jako hlavního faktoru nutného pro úspěšné odvození transformované rostliny a samotné transformační kroky byly provedeny s malým počtem explantátů a nízkou mírou opakování, nedovolující jejich věrohodné zhodnocení. Hlavním faktorem ovlivňujícím celkovou úspěšnost transformace rostlin konopí setého se však ukázala být zejména neexistence kultivačního protokolu, který by umožňoval regeneraci transformované tkáně a její přeměnu v celistvou rostlinu. Tento protokol nebyl optimalizován ani během experimentální části této práce.

7. Závěry

1. Byly vytvořeny *in vitro* kultury konopí setého odrůd Beniko, Bialobrzeskie, Epsilon, Fedora 77, Felina 32, Fibrol, Futura 75, Monoica, Santhica, USO 31, Tygra, KC-Dora.
2. Byl optimalizován protokol odvozování kultur nediferencovaných buněk a to zejména identifikováním složení média umožňující efektivní produkci kalusů z hypokotylových segmentů.
3. Byly vytvořeny suspenzní buněčné kultury konopí setého odrůd Fibrol, Epsilon, Felina, Futura.
4. Byly odvozeny protoplasty listového mezofylu transientně transformované genem pro expresi GFP.
5. Byla uskutečněna úspěšná kokultivace explantátů konopí setého s *Agrobacterium tumefaciens*, kokultivované explantáty se nepodařilo zregenerovat.

8. Seznam literárních zdrojů

- Ahmed, S.A., Ross, S.A., Slade, D., Radwan, M.M., Zulfiqar, F., and ElSohly, M.A. (2008) Cannabinoid ester constituents from high-potency Cannabis sativa. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 71, 536-542.
- Amaducci, S., Zatta, A., Raffanini, M., and Venturi, G. (2008) Characterisation of hemp (Cannabis sativa L.) roots under different growing conditions. PLANT AND SOIL, 313, 227-235.
- van den Broeck, H.C., Maliepaard, C., Ebskamp, M.J., Toonen, M.A., and 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.
- ChalfieE, M., Tu, Y., Euslirchen, G., Ward, W., and Prasher, D. (1994) green fluorescent protein as a marker for gene-expression. SCIENCE, 263, 802-805.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I., and Elsohly, M. (2008) Photosynthetic response of Cannabis sativa L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO2 conditions. Physiology and Molecular Biology of Plants, 14, 299-306.
- Deblaere, R., Byterie, B., Degreve, H., Deboeck, F., Schell, J., Vanmontagu, M., and Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid derived vectors for Agrobacterium mediated gene transfer to plants. NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 13, 4777-4788.
- ElSohly, M., and Slade, D. (2005) Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. LIFE SCIENCES, 78, 539-548.
- Feeney, M., and Punja, Z. (2003) Tissue culture and Agrobacterium-mediated transformation of hemp (Cannabis sativa L.). IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT, 39, 578-585.
- Flores-Sanchez, I.J., Pec, J., Fei, J., Choi, Y.H., Dusek, J., and Verpoorte, R. (2009) Elicitation studies in cell suspension cultures of Cannabis sativa L.. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, 143, 157-168.
- Gelvin, S. (2000) Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 51, 223-256.
- Gilmore, S., Peakall, R., and Robertson, J. (2007) Organelle DNA haplotypes reflect crop-use characteristics and geographic origins of Cannabis sativa. FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, 172, 179-190.
- Hellens, R., Mullineaux, P., and Klee, H. (2000) A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. TRENDS IN PLANT SCIENCE, 5, 446-451.

- Hillig, K. (2005) Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). GENETIC RESOURCES AND CROP EVOLUTION, 52, 161-180.
- Horlemann, C., Schwekendiek, A., Hohnle, M., and Weber, G. (2003) Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). PLANT CELL REPORTS, 22, 210-217.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A. (2002) GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. TRENDS IN PLANT SCIENCE, 7, 193-195.
- Khan, M.M.R., Chen, Y., Belsham, T., Lague, C., Landry, H., Peng, Q., and Zhong, W. (2011) Fineness and tensile properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibres. BIOSYSTEMS ENGINEERING, 108, 9-17.
- Kreuger, E., Sipos, B., Zacchi, G., Svensson, S.-E., and Bjornsson, 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.A., and 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., and ElSohly, M.A. (2010b) Assessment of the Genetic Stability of Micropropagated Plants of *Cannabis sativa* by ISSR Markers. PLANTA MEDICA, 76, 97-100.
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I.A., and ElSohly, M.A. (2011) Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following in vitro storage. BIOTECHNOLOGY LETTERS, 33, 2503-2508.
- Lata, H., Suman, C., Ikhlas, K., and A., E.M. (2009) Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L.. IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT, 45, 12-19.
- Latta, R., and Eaton, B. (1975) Seasonal fluctuations in cannabinoid content of Kansas Marijuana. Economic Botany, 29, 153-163.
- Li, X., Huang, F., Murphy, J., and Gbur, E. (1998) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 34, 22-26.
- Linger, P., Mussig, J., Fischer, H., and 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., and 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.H., and Coffman, C.B. (1987) UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two Cannabis sativa chemotypes. *Photochemistry and Photobiology*, 46, 201-206.
- de Meijer, E., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V., Ranalli, P., and Mandolino, G. (2003) The inheritance of chemical phenotype in Cannabis sativa L.. *GENETICS*, 163, 335-346.
- Moliterni, V., Cattivelli, L., Ranalli, P., and Mandolino, G. (2004) The sexual differentiation of Cannabis sativa L.: A morphological and molecular study. *EUPHYTICA*, 140, 95-106.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 15, 473-497.
- Murthy, B., Murch, S., and Saxena, P. (1998) Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT*, 34, 267-275.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., and Monti, A. (2010) Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (Cannabis sativa L.). *FITOTERAPIA*, 81, 413-419.
- Novak, J., Zitterl-Eglseer, K., Deans, S., and Franz, C. (2001) Essential oils of different cultivars of Cannabis sativa L. and their antimicrobial activity. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*, 16, 259-262.
- Oomah, B., Busson, M., Godfrey, D., and Drover, J. (2002) Characteristics of hemp (Cannabis sativa L.) seed oil. *FOOD CHEMISTRY*, 76, 33-43.
- Piluzza, G., Delogu, G., Cabras, A., Marceddu, S., and Bullitta, S. (2013) Differentiation between fiber and drug types of hemp (Cannabis sativa L.) from a collection of wild and domesticated accessions. *GENETIC RESOURCES AND CROP EVOLUTION*, 60, 2331-2342.
- Prade, T., Svensson, S.-E., Andersson, A., and Mattsson, J.E. (2011) Biomass and energy yield of industrial hemp grown for biogas and solid fuel. *BIOMASS & BIOENERGY*, 35, 3040-3049.
- Ranalli, P. (2004) Current status and future scenarios of hemp breeding. *EUPHYTICA*, 140, 121-131.
- Reidiboym-Talleux, L., Diemer, F., Sourdioux, M., Chapelain, K., and Grenier-De March, G. (1998) Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (Prunus avium). Effect of maltose and ABA supplements. *PLANT CELL TISSUE AND ORGAN CULTURE*, 55, 199-209.

- Roy, A., Leggett, G., and Koutoulis, A. (2001) Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). *IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-PLANT*, 37, 79-83.
- Russo, E.B., Jiang, H.-E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D.J., Zhao, Y.-X., Bera, S., Zhang, Y.-B., Lue, E.-G., Ferguson, D.K., Hueber, F., Zhao, L.-C., Liu, C.-J., Wang, Y.-F., and Li, C.-S. (2008) Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*, 59, 4171-4182.
- Sakamoto, K., Abe, T., Matsuyama, T., Yoshida, S., Ohmido, N., Fukui, K., and Satoh, S. (2005) RAPD markers encoding retrotransposable elements are linked to the male sex in *Cannabis sativa* L.. *Genome*, 48, 931-936.
- Sakamoto, K., Shimomura, K., Komeda, Y., Kamada, H., and Satoh, S. (1995) A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L.. *PLANT AND CELL PHYSIOLOGY*, 36, 1549-1554.
- Schafer, T., and 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., and Cai, Q. (2009) Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, 27, 555-561.
- Shi, G., Liu, C., Cui, M., Ma, Y., and Cai, Q. (2012) Cadmium tolerance and bioaccumulation of 18 hemp accessions. *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*, 168, 163-173.
- Slusarkiewicz-Jarzina, A., Ponitka, A., and 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., and Cronquist, A. (1976) Practical and natural taxonomy for cannabis. *TAXON*, 25, 405-435.
- Soldatova, N.A., and Khryanin, V.N. (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., Amaducci, S., Bullard, M., Stutterheim, N., Venturi, G., and Cromack, H. (2000) Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS*, 11, 107-118.
- Techen, N., Chandra, S., Lata, H., ElSohly, M.A., and Khan, I.A. (2010) Genetic identification of female *Cannabis sativa* plants at early developmental stage. *PLANTA MEDICA*, 76, 1938-1939.

- Tošovská, M., Buchtová, I., (2010) Situační a výhledová zpráva Len a Konopí ISBN 978-80-7084-900-7, ISSN 1211-7692, MK ČR E 11003
- Turner, C., ElSohly, M., and Boeren, E. (1980) Constituents of Cannabis Sativa L. 17. A review of the natural constituents. JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 43, 169-234.
- Visser, C., Qureshi, J., Gill, R., and Saxena, P. (1992) Morphoregulatory role of thidiazuron - substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in Geranium hypocotyl cultures. PLANT PHYSIOLOGY, 99, 1704-1707.
- Wade, D., Makela, P., Robson, P., House, H., and Bateman, C. (2004) Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients. MULTIPLE SCLEROSIS, 10, 434-441.
- Wahby, I., Caba, J.M., and Ligeró, F. (2013) Agrobacterium infection of hemp (Cannabis sativa L.): establishment of hairy root cultures. JOURNAL OF PLANT INTERACTIONS, 8, 312-320.
- Wang, R., He, L.-S., Xia, B., Tong, J.-F., Li, N., and Peng, F. (2009) A micropropagation system for cloning hemp (Cannabis sativa L.) by shoot tip culture. PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY, 41, 603-608.
- Wood, D., Setubal, J., Kaul, R., Monks, D., Kitajima, J., Okura, V., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G., Almeida, N., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I., Eisen, J., Karp, P., Bovee, D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, C., Kutuyavin, T., Levy, R., Li, M., 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., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S., Tomb, J., Gordon, M., Olson, M., and Nester, E. (2001) The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58. SCIENCE, 294, 2317-2323.
- Zupan, J., Muth, T., Draper, O., and Zambryski, P. (2000) The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. PLANT JOURNAL, 23, 11-28.