

Středoškolská odborná činnost

Studium genetické variability technického
konopí

Michaela Slánská

Brno 2016

Středoškolská odborná činnost

Studium genetické variability technického konopí

Genetic variability of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.)

Autor: Michaela Slánská
Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice, příspěvková organizace,
Terezy Novákové 2, Brno, 621 00
Kraj: Jihomoravský
Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vyhnánek, Ph.D.
Obor: 7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Brno 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením svého konzultanta, Ing. Tomáše Vyhnánka, Ph.D., a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou uvedeny na konci práce. Postup vypracování a dalšího nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 16. 2. 2016

Podpis



Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému externímu konzultantovi, Ing. Tomáši Vyhnánkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za pomoc a cenné rady týkající se jejího experimentálního i teoretického provedení. Také děkuji Ing. Marii Bjelkové, Ph.D. za poskytnutí informací a materiálů. Dále bych chtěla poděkovat Jihomoravskému centru pro mezinárodní mobilitu za finanční podporu.

Anotace

Konopí je výjimečná rostlina, které se v poslední době dostává velké pozornosti, a to především díky jejímu neobyčejnému potenciálu v potravinářství, stavebnictví a v dalších způsobech zpracování, ale také díky využití v mnoha oblastech medicíny. Pro identifikaci a hledání souvislostí mezi genotypy této rostliny slouží polymerázová řetězová reakce za použití různých SSR markerů a následná gelová elektroforéza. V teoretické části je zpracována rešerše o konopí, jeho botanické charakteristice, složení, dělení a využití. Dále je zde popsána metoda polymerázové řetězové reakce a gelové elektroforézy. Praktická část se zabývá samotnou izolací DNA ze vzorků, tvorbou mastermixu, následnou PCR reakcí a gelovou elektroforézou včetně vyhodnocení výsledků.

Klíčová slova: konopí, technické konopí, zemědělství, genetika, PCR, polymerázová řetězová reakce, gelová elektroforéza, SSR marker, dendrogram

Abstract

Cannabis L. is an exceptional plant that has been the centre of attention lately, especially thanks to its extraordinary potential as a material suitable for food, construction and many other methods of processing, but also thanks to its substances useful in many fields of medicine. For identification and searching connections between genotypes of this plant is used polymerase chain reaction using various SSR markers and gel electrophoresis. In the theoretical part the research about *Cannabis* L., its botanical characteristics, composition, division and use is elaborated. Further, the method of polymerase chain reaction and gel electrophoresis are described. The practical part deals with the isolation of DNA from the samples, mastermix preparation, PCR reaction and gel electrophoresis itself including the evaluation of the results.

Keywords: *Cannabis sativa* L., hemp, agriculture, genetics, PCR, polymerase chain reaction, gel electrophoresis, SSR marker, dendrogram

Seznam zkratek

bp - párů bazí (angl. „*base pair*“)

CBD - kanabidiol

CBN - kanabinol

DI - index diverzity

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EDTA - kyselina diethylendiamintetraoctová

F1 - první filiální generace

F2 - druhá filiální generace

NK - nukleová kyselina

PCR - polymerázová řetězová reakce

PI - pravděpodobnost identity

PIC - polymorfní informační obsah

RNA - ribonukleová kyselina

SM - velikostní marker (angl. „*size marker*“)

SSR marker - mikrosatelit (angl. „*simple sequence repeat*“ marker)

TAE - tris-acetát-EDTA pufr

TBE - tris-borát-EDTA pufr

THC - delta-9-trans-tetrahydrokanabinol

THCA - tetrahydrokanabinolová kyselina

TRIS - tris(hydroxymethyl)diaminomethan

Obsah

Úvod	9
Cíle práce	10
Teoretická část	11
1 Botanická charakteristika	11
1.1 Čeleď Cannabaceae	11
1.2 Rod <i>Cannabis</i> L.	11
2 Obsahové látky	12
2.1 Kanabinoidy	12
3 Dělení konopí	15
3.1 Konopí seté (<i>Cannabis sativa</i> L.)	15
3.2 Konopí indické (<i>Cannabis indica</i> Lam.)	15
3.3 Konopí rumištní (<i>Cannabis ruderalis</i> J.)	16
4 Využití konopí	16
4.1 Technické konopí	16
4.1.1 Potravinářství	17
4.1.2 Textilní průmysl	17
4.1.3 Papírenství	17
4.1.4 Stavebnictví	17
4.2 Medicinální konopí	18
5 Polymerázová řetězová reakce	19
5.1 SSR markery	20
6 Gelová elektroforéza	20
Praktická část	21
7 Metodika	21

7.1	Rostlinný materiál	21
7.1.1	Stručná charakteristika odrůd konopí	22
7.2	Izolace DNA	26
7.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
7.4	Gelová elektroforéza	32
7.4.1	Příprava gelů	32
7.4.2	Barvení gelů	33
7.5	Vyhodnocování výsledků	34
8	Výsledky a diskuze	36
8.1	Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů	36
8.2	Genetická podobnost vzorků konopí	38
	Závěr	40
	Seznam použité literatury	41
	Seznam obrázků	44
	Seznam tabulek	45

Úvod

Konopí je v dnešní době jednou z nejzajímavějších, a proto také velmi zkoumaných plodin. Všechna tato pozornost je způsobena jeho výhodnými vlastnostmi, které jsou využitelné v mnoha odvětvích, jako je textilní, papírenský, potravinářský průmysl a stavebnictví. Má také obrovský potenciál v medicíně.

Abychom mohli zkoumat genetické souvislosti, podobnosti a rozdílnosti mezi různými odrůdami této významné rostliny, je nutné postupovat podle určitých kroků. Nejdříve musí být z konopného materiálu, v našem případě ze semen, izolovaná DNA (deoxyribonukleová kyselina). Následně je potřeba z každého vzorku připravit mastermixy za použití různých SSR markerů a dalších komponent a podrobit je polymerázové řetězové reakci (PCR). Dalším klíčovým krokem je poté gelová elektroforéza, která odděluje, díky jejich zápornému náboji, jednotlivé molekuly DNA na základě jejich velikosti. [1]

Z celkového počtu a zastoupení alel na jednotlivých gelech je možné stanovit vhodnost jednotlivých SSR markerů pro vyhodnocování genetické variability daného vzorku, tedy technického konopí. Podle výskytu alel u jednotlivých vzorků při použití všech zvolených SSR markerů (mikrosatelitů) lze poté získat dendrogram znázorňující souvislosti a podobnosti mezi jednotlivými odrůdami. [2]

Práce se zabývá studiem genetické variability a podobností mezi 22 odrůdami konopí setého za použití 16 SSR markerů.

Cíle práce

Cílem bylo za pomoci polymerázové řetězové reakce a gelové elektroforézy popsat genetickou variabilitu 22 odrůd technického konopí setého z kolekce Agritec Plant Research s.r.o. Šumperk, které jsou nejvíce pěstovány v oblasti České republiky a porovnat tyto výsledky se zeměmi původu a vlastnostmi jednotlivých odrůd. Další část výzkumu se věnovala stanovení vhodnosti použitých SSR markerů pro určování genetické variability použitých odrůd technického konopí. Tyto informace budou sloužit při nastávajících výzkumech se stejnými odrůdami konopí tím, že usnadní výběr vhodných SSR markerů pro identifikaci odrůd.

Teoretická část

1 Botanická charakteristika

1.1 Čeleď Cannabaceae

Mezi konopovité rostliny (Cannabaceae) řadíme jednoleté až vytrvalé, převážně dvoudomé byliny. Jedná se o vyšší dvouděložné rostliny s řapíkatými, dlanitě složenými listy. Květy jsou drobné a zdržují se ve vrcholičnatých květenstvích. Prašnickové květy mají 5 okvětních lístků a 5 tyčinek, pestíkové květy jsou snadno rozpoznatelné díky nepatrnému srostlému okvětí. Plody jsou nažky. Mezi nejvýznamnější zástupce této čeledi patří konopí a chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.). [3]

1.2 Rod *Cannabis* L.

Konopí (*Cannabis*) (viz obr. 1) je jednoletá, větrem opylovaná rostlina s přímou, v horní polovině větvicí se lodyhou, která může při dostatečném vzrůstu zdřevnatět. Čepel listů je tří- až jedenáctičetná. Lístky jsou podlouhlé až kopinaté, k oběma koncům zúžené a zašpičatělé. Okraje listů jsou ostře zoubkované. Na rubové straně mají chlupaté trichomy, lícni strana je hladší a tmavší. Lodyžní listy jsou obvykle tříčetné nebo jednoduché. Charakteristické jsou dlouhé, rovné, ke koncům se zužující kořeny. V nažkách jsou zapouzdřena drobná černá semena. [4]

V případě dvoudomých odrůd jsou samčí (poskonné) rostliny typicky štíhlejší se světlejšími listy. Typické jsou pro ně dlouhé převislé lodyhy žlutavé barvy. Dozrávají o 4-6 týdnů dříve, následně usychají a odumírají ihned po odkvětu. Produkují obrovské množství pylu, a proto dochází k opylování prostřednictvím větru.

Samičí (hlavaté) rostliny dvoudomých odrůd jsou robustnější, jsou více olistěné a většinou s tmavšími zelenými listy. Mají krátké úžlabní květenství šedo-zeleného zbarvení. Jsou významnější v hospodářství a obsahují větší množství kanabinoidních látek. [5, 6]



Obrázek 1: Rostlina medicijnálního konopí množená v minerální vatě (MENDELU, odrůda Bedropur)

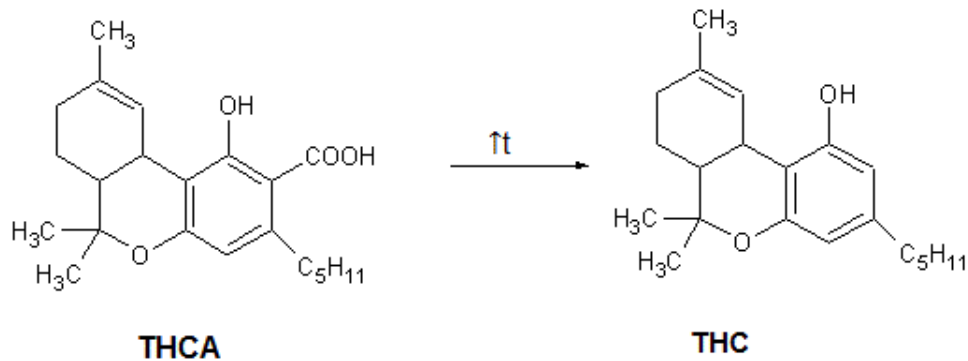
2 Obsahové látky

Zatím bylo objeveno 1031 přírodních látek v konopí [6]. Jsou zde obsaženy dusíkaté látky včetně alkaloidů, sacharidy a jejich polymery, mastné kyseliny, aminokyseliny, proteiny, glykoproteiny, enzymy, jednoduché alkoholy a kyseliny, karboxylové sloučeniny, vitamíny a další. Mezi sekundární metabolity produkované konopím patří kanabinoidy, flavonoidy, stilbenoidy, terpeny, alkaloidy a lignany. Naprostá většina těchto složek se vyskytuje i v jiných rostlinách mimo konopí. [7]

2.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou terpeno-fenolické látky, které jsou produkovány pouze rodem Cannabis [8]. Hlavním místem jejich produkce jsou žláznaté trichomy samičího květenství. Primárně jsou produkovány a skladovány ve formě karboxylových kysel-

lin (např. THCA - tetrahydrokanabinolová kyselina, 22 uhlíků), které jsou následně dekarboxylovány zahřátím (např. THC, 21 uhlíků). [9] Proces dekarboxylace je zobrazen na obrázku 2.

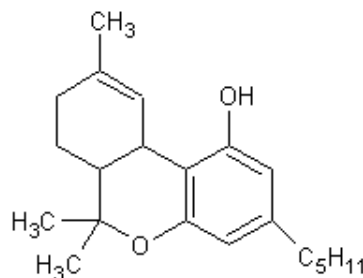


Obrázek 2: Dekarboxylace tetrahydrokanabinolové kyseliny

Funkce kanabinoidů v rostlině nebyla dodnes objasněna. Podle předpokladů slouží pro ochranu rostliny proti houbovým chorobám, UV záření, hmyzu a býložravcům. Biosyntéza a vylučování kanabinoidů je ovlivňována na základě genotypu rostliny, teploty, vlhkosti apod. [10]

THC (Delta-9-trans-tetrahydrokanabinol)

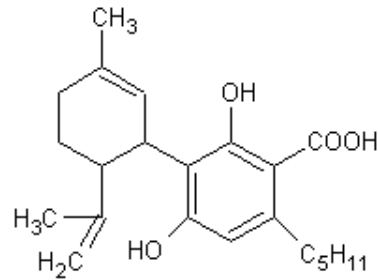
THC (viz obr. 3) je hlavní psychoaktivní složka konopí. Vyskytuje se v různém množství, někdy téměř nulovém, ve všech odrůdách a kultivarech konopí. Má analgetické účinky, pomáhá snížit pocety nevolnosti a zvyšuje chuť k jídlu. [5]



Obrázek 3: Struktura THC

CBD (Kanabidiol)

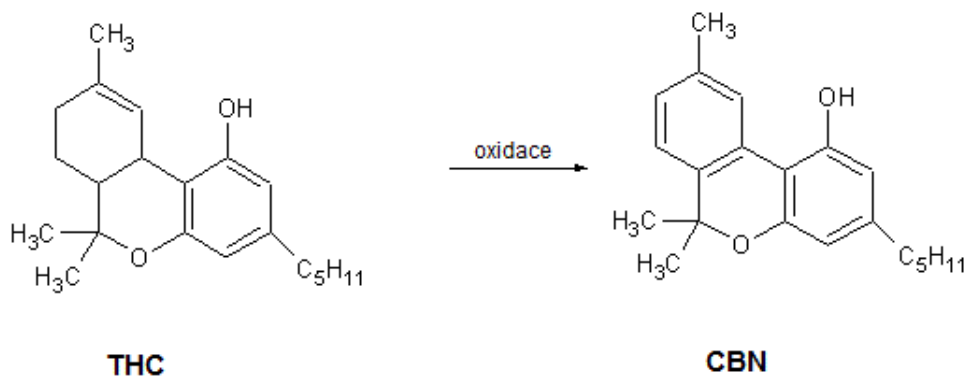
CBD (viz obr. 4) se vyskytuje téměř ve všech odrůdách. Nemá žádné psychoaktivní účinky, ale působí sedativně a antibakteriálně.



Obrázek 4: Struktura CBD

CBN (Kanabinol)

CBN je rostlinou produkován ve velmi malém množství, ale při přístupu vzduchu ke sklizenému konopí dochází k oxidaci THC za vzniku CBN (viz obr. 5). Je slabě psychoaktivní, působí jako agonista na stejné receptory jako THC, ale asi s 10% účinností. [11]



Obrázek 5: Vznik CBN oxidací THC

3 Dělení konopí

Termíny konopí a marihuana mohou být zaměňovány. Konopí je však název botanického rodu a marihuana reprezentuje pouze konopí s vysokým obsahem THC, které nachází využití založené na jeho psychoaktivních účincích. Ostatní konopí (angl. „*hemp*“) má nízký obsah THC. Historicky byly obecně známy 3 varianty konopí: *Cannabis sativa* L. (konopí seté), *Cannabis indica* Lam. (konopí indické) a *Cannabis ruderalis* J. (konopí rumištní). Po mnoho let je botanici považovali za odlišné druhy. Nicméně dnes většina botaniků souhlasí s tvrzením, že konopí je rod s jedním, velmi variabilním druhem (*Cannabis sativa*). [2]

3.1 Konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

Konopí seté objevil roku 1737 Carl Linné. Používá se pro něj označení NLD (Narrow-leafted drug). Je to vyšší, štíhlá rostlina s řídkým olistěním a nepříliš větveným stonkem. Listy jsou dlouhé a štíhlé. Lodyha je uvnitř dutá. Semena jsou hladká, světle šedá až hnědá bez skvrn a mramorování. Samičí květenství je prostorově větší, ale ne tak husté jako u konopí indického. Má často energetizující účinky, ale obsah účinných látek závisí na odrůdě a lokalitě. Je z něj možná výroba marihuany sušením samičího květenství. Z tohoto druhu konopí bylo vyšlechtěno konopí s téměř nulovým obsahem THC - technické konopí. [12]

3.2 Konopí indické (*Cannabis indica* Lam.)

Konopí indické objevil roku 1783 Jean-Baptiste Lamarck. Bývá označováno jako WLD (Wide-leafted drug). Je nižší a robustnější než konopí seté. Listy jsou širší a tmavší. Semena jsou hladká, tmavá a mramorovaná. Samičí květenství je velmi husté a přisedlé. Účinky jsou uklidňující, sedativní. Z tohoto konopí se dá vyrobit hašiš, což je koncentrovaná forma získaná oddělením a stlačováním pryskyřičných trichomů. Při vysokém obsahu kanabinoidů je tato rostlina považována za vhodnou pro farmaceutické účely. [13]

3.3 Konopí rumištní (*Cannabis ruderalis* J.)

Konopí rumištní objevil roku 1924 Dmitrij Erastovich Janischewsky. Je velmi nízkého vzrůstu s řídkým olistěním. Stonek je velmi tenký a téměř se nevětví. Semena jsou nepravidelně tmavě mozaikovitá. Obsah psychoaktivních látek je nízký až středně vysoký. Kvete nezávisle na světelné periodě, proto je vhodné ke šlechtění brzy kvetoucích hybridů. [12, 13]

4 Využití konopí

Konopí je jedna z nejstarších kultivovaných rostlin, která se odedávna používala po celém světě pro různé aplikace. Historicky se konopné stonky používaly jako zdroj vláken pro výrobu látek a lan, semena sloužila jako jídlo a k výrobě oleje, ale bylo také časté využití květů a listů této rostliny jako zdroj psychoaktivních látek. [14]

Navzdory významu konopí v textilním i výrobním průmyslu rapidně klesla jeho kultivace během 60. let minulého století. Důvodem byla silná konkurence ze strany bavlny a syntetických vláken, ale také zneužívání ve formě marihuany. V poslední době potřeba alternativních plodin obnovila zájem o pěstování konopí. Příčinami je relativně nízké množství chemických hnojiv potřebných pro kultivaci, výjimečná odolnost proti nemocem a zvýšení zájmu společnosti o přírodní vlákna v porovnání se syntetickými. [15]

4.1 Technické konopí

Technické konopí je takové, které obsahuje velmi nízké množství psychoaktivní látky THC. Maximální obsah tohoto kanabinoidu je 0,2% sušiny. Množství odrůd bylo schváleno Evropskou unií a od roku 1998 se tato plodina začala znovu využívat skoro v celé Evropě. Nachází využití v textilním, papírenském a potravinářském průmyslu nebo také ve stavebnictví. [15]

4.1.1 Potravinářství

Konopí obsahuje asi 30 % tuků bohatých na omega-3, mono- a vícenasycené mastné kyseliny. Oleje získané ze semen studeným lisováním jsou používány při přípravě pomazánek, marinád nebo jako přísada do salátů. Jedná se o zdroj kyseliny linolové a linolenové pro tělo. Rozemletím surových semen vzniká konopná mouka. [16]

4.1.2 Textilní průmysl

V textilním průmyslu se využívá pevnosti, vzdušnosti a trvanlivosti konopných vláken. Materiál vyrobený z těchto vláken může napodobit bavlnu, která je při pěstování náročnější na pesticidy a závlahu. Při patřičných úpravách je konopný textil měkčí než bavlna a díky dlouhým vláknům mnohem pevnější v tahu. Zároveň má mnohem vyšší trvanlivost. Konopné oděvy odvádí pot, zadržují UV záření, jsou dobře barvitelné a odolné proti hnilobě. [17, 18]

4.1.3 Papírenství

Konopná vlákna se používají spolu s lněným vláknem a bavlnou při výrobě bankovek, jako materiál pro tvorbu velmi kvalitních papírů nebo také pro výrobu cigaretového papíru. Výhodami jsou vysoká pevnost a relativní ekologická čistota. [19]

4.1.4 Stavebnictví

Díky svým vynikajícím izolačním vlastnostem se konopí využívá pro výrobu plně recyklovatelných izolačních rohoží pro izolaci zdí, podlah a střech. Většinou se jedná o vícesložkové výrobky s obsahem polyesterových vláken a sody. Další možnosti využití konopí ve stavebnictví jsou ohnivzdorné panely nebo přísady do betonu pro odlehčení a zvětšení pružnosti. Konopný olej slouží k výrobě laků a barev. [20]

4.2 Medicinální konopí

V lidském těle se nachází kanabinoidní receptory CB1 a CB2, na které působí kanabinoidy. Spolu tvoří endokanabinoidní systém, který je lokalizován napříč celým tělem a je důležitý při fyziologických funkcích jako vnímání bolesti, nálada, imunita, paměť, odpovědi na stresové podněty a další. THC má vedle psychoaktivních účinků také účinky antibakteriální, analgetické, protizánětlivé a antibiotické. Slouží k léčbě, popřípadě zmírnění příznaků rakoviny, AIDS, epilepsie, roztroušené sklerózy, Parkinsonovy nemoci a projevů bolesti. Předepisuje se v případě chronické bolesti, ztráty chuti k jídlu, úzkosti a deprese nebo spánkových poruch. [5, 6]

5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda replikace DNA. Je založena na opakující se enzymové syntéze podle určitých úseků původní, tzn. templátové DNA, čímž umožňuje rychle a snadno namnožit vybraný úsek DNA.

Důležitými složkami k provedení PCR jsou primery, v tomto případě SSR markery. K průběhu reakce je nutné použít dva: začínající (angl. „*forward*“) a končící (angl. „*reverse*“) primer. Ty jsou odvozeny od koncových sekvencí DNA určených k amplifikaci. Nasedají na komplementární místa na templátové DNA a vymezují tak úsek k množení. Další důležitou složkou je DNA polymeráza, která umožňuje růst nových řetězců připojováním jednotlivých nukleotidů na 3'OH konec primerů. [21]

PCR probíhá ve formě cyklů, které jsou tvořeny třemi základními kroky:

Denaturace

Během denaturace dojde k porušení vodíkových můstků mezi bázemi v molekule DNA a tím pádem k rozdělení dvoušroubovice DNA na dva samostatné řetězce. Tento krok probíhá při teplotě 93-98 °C.

Annealing

V důsledku ochlazení na teplotu 30-65 °C dojde k nasednutí primerů na komplementární místa templátové DNA.

Elongace

Při elongaci dochází za teploty 65-75 °C k syntéze nových vláken působením DNA polymerázy, která umožní zabudování volných nukleotidů do nově vznikajícího řetězce. [22]

5.1 SSR markery

Genetická variabilita může být detekována různými molekulárními markery, jako například RFLP markery (angl. „*Restriction Fragment Length Polymorphism*“), RAPD markery (angl. „*Random Amplified Polymorphic DNA*“) nebo AFLP markery (angl. „*Amplified Fragment Length Polymorphism*“). Jedny z nejpoužívanějších v praxi jsou SSR markery.

Mikrosatelity, známé jako SSR (angl. *Simple Sequence Repeat*) markery jsou opakující se krátké (1 až 6 bp) sekvence DNA. Opakující se sekvence zvýrazňují vysoké úrovně polymorfismu mezi jednotlivci. [23]

Nachází využití v DNA fingerprintingu, genetickém mapování, studiích genetické diverzity nebo v populačních studiích. Výhodou je jejich četný výskyt, vysoký polymorfismus, kodominance, schopnost rozlišovat více alel a reprodukovatelnost. [24]

6 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je separační metoda založená na pohybu záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě. Na základě jejich velikosti potom dochází k oddělování jednotlivých molekul DNA podle jejich rozdílných rychlostí pohybu v gelu.

Elektroforéza může být prováděna na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu v závislosti na rozsahu velikostí částí nukleových kyselin. Tyto gely jsou používány díky jejich síťovité struktuře tvořené polymerními molekulami s póry, kterou se různé velké molekuly DNA pohybují různou rychlostí.

Vzorky jsou nanášeny do jamek v gelu spolu s tzv. nanášecím (loadovacím) pufrům, který zajistí zatížení molekul DNA a jejich migraci. Kromě samotných vzorků je do jedné nebo více jamek nanášen tzv. velikostní marker o známé velikosti jednotlivých fragmentů, který později slouží k určení velikosti úseků DNA. [25]

Praktická část

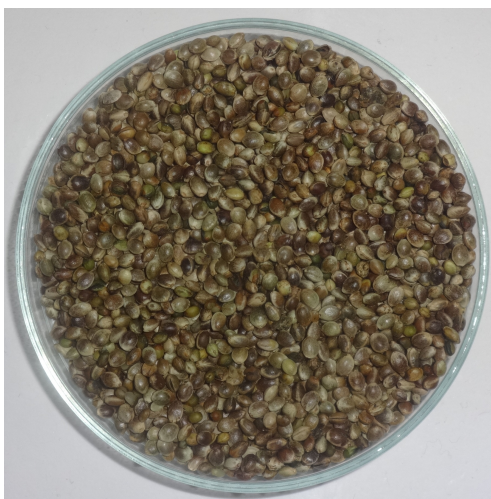
7 Metodika

7.1 Rostlinný materiál

Množství materiálu potřebného k izolaci DNA se liší v závislosti na zvolené metodice. V našem případě byla izolace prováděna pomocí izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit. Při použití této metodiky je předpokládána navážka 100mg čerstvého rostlinného materiálu, ale v případě semen bylo, vzhledem k nepřítomnosti vody, naváženo na analytických vahách 20 mg konopných semen (viz obr. 6) ze 22 odrůd (viz tab. 1). Navážená semena byla rozmělněna v třecí misce s tloučkem.

Tabulka 1: Vzorčky rostlinného materiálu

Č.	Zkratka	Název	Původ [26]	Č.	Zkratka	Název	Původ [26]
01	TIB	Tiborszálási	Maďarsko	12	MON	Monoica	Maďarsko
02	EPS	Epsilon 68	Francie	13	KCV	KC Virtus	Maďarsko
03	KCD	KC Dóra	Maďarsko	14	TYG	Tygra	Polsko
04	CARM	Carmagnola	Itálie	15	FUT	Futura 75	Francie
05	FIN	Finola	Finsko	16	ANT	Antal	Maďarsko
06	USO	USO 31	Ukrajina	17	KOMP	Kompolti	Maďarsko
07	SAN	Santhica 27	Francie	18	KCZ	KC Zuzana	Maďarsko
08	TIS	Tisza	Maďarsko	19	BIA	Bialobrzeskie	Polsko
09	FEL	Felina 32	Francie	20	UN	Uniko B	Maďarsko
10	FED	Fedora 17	Francie	21	WOJ	Wojko	Polsko
11	FIB	Fibrol	Maďarsko	22	CARM.L.	Carmaleonte	Itálie



Obrázek 6: Semena odrůdy Finola určená k izolaci DNA

7.1.1 Stručná charakteristika odrůd konopí

Francie

Futura 75 (1998)

Jednodomá, nejranější odrůda ze sortimentu francouzských odrůd, která byla vyšlechtěna z odrůdy Fibrimon 21. Výnos suché hmoty je střední, zatímco obsah vlákna vysoký, výnos semene je dobrý. Vegetační doba je 106 dnů.

Fedora 17 (1998)

Jednodomá odrůda, hybrid vzniklý křížením samičích rostlin ruské dvoudomé odrůdy JUSO - 9 a jednodomé odrůdy Fibrimon 21. Výnos suché hmoty a obsah vlákna je střední až vyšší. Dosahuje vysokého výnosu semene. Určena pro produkci semene i vlákna. Vegetační doba je 110 dní.

Felina 32 (1998)

Jednodomá, středně raná až pozdní odrůda, hybrid vzniklý křížením odrůdy Fibrimon 24 a německé dvoudomé odrůdy. Vysoký výnos suché hmoty a vlákna, výnos semene vyšší než u odrůdy Fedora. Vhodná především pro produkci vlákna. Vegetační doba je 115 dní.

Epsilon 68 (1998)

Jednodomá, pozdní odrůda.

Santhica 27 (2003)

Jednodomá odrůda, vhodná pro pěstování na vlákno. Vegetační doba je středně dlouhá.

Finsko

Finola (2003)

Dvoudomá odrůda, velmi raná (ze zkoušeného sortimentu odrůd dozrává o 3 týdny až měsíc dříve, tomu odpovídá i výška porostu). Technická délka stonku je velmi krátká. Kvůli extrémní ranosti určena především pro produkci semene.

Ukrajina

USO 31 (1997)

Jednodomá, raná odrůda. Střední až vyšší výnos suché hmoty, vhodná k pěstování pro semeno i vlákno. Odolná vůči plísni šedé a fuzarióznímu vadnutí. Odrůda ukrajinského původu, v současnosti je udržovatelem Nizozemsko.

Maďarsko

Kompolti (1955)

Nejstarší dvoudomá odrůda v Evropě. Má jemné a lehké listy a stonek, její vlastnosti splňují nenovější požadavky pěstování. Pokud je pěstovaná na vlákno, vegetační doba odpovídá 110-115 dnům. V případě pěstování pro semeno 160 dní.

Uniko B (1969)

Dvoudomá odrůda, hybrid vzniklý křížením dvoudomé odrůdy Kompolti a jednodomé odrůdy Fibrimon. Od ostatních odrůd se liší poměrem samčích a samičích

rostlin. Samičí rostliny jsou dominantní v F1¹ (vysoký výnos semene) a částečně dominantní v F2² (produkce jemného vlákna).

Monoica (2006)

Jednodomá, volně se opylující odrůda. Charakteristická středně tmavým zbarvením a širokými listy. Určení pro dvojí užití. Má středně dlouhou dobu vegetace.

Fibrol (2006)

Jednodomá, středně pozdní odrůda. Vysoký výnos semene, střední výnos neroseného stonku a obsah vlákna. Má dlouhou vegetační dobu.

KC Dóra (2009)

Jednodomá, středně pozdní odrůda. Nejpozdnější ze všech středně pozdních maďarských odrůd. Svou technickou zralostí dosahuje ve 105-110 dnech. Semena dozrávají za 140 dní.

Tiborszallasi (2000)

Dvoudomá, pozdní odrůda s nižším výnosem semene a nízkým obsahem oleje v semeni. Zralost semen je za 150 dní a více.

Tisza (2010)

Středně raný SC hybrid s dobrým výnosem semene. V F1 generaci se jedná o jednodomou odrůdu, v F2 je dvoudomá. Velmi dobrý výnos stonku, ale střední kvalita vlákna.

Antal (2013)

Středně pozdní až pozdní odrůda dvoudomého konopí setého. Rostliny vysoké. Výnos nemáčeného stonku velmi vysoký. Výnos celkového vlákna nízký až středně vysoký. Obsah celkového vlákna ve stonku nízký.

¹F1 - 1. filiální generace, první generace potomků

²F2 - 2. filiální generace, vzniklá zkřížením jedinců generace F1

KC Zuzana (2013)

Raná jednodomá odrůda s velmi dobrým výnosem semene. Průměrný výnos stonku a velmi dobrá kvalita vlákna.

KC Virtus (2013)

Hybrid s dobrým výnosem semene, velmi dobrým výnosem stonku a dobrou kvalitou vlákna.

Polsko

Bialobrzeskie (1968)

Jednodomá odrůda, hybrid vzniklý křížením dvoudomých a jednodomých kmenů. Využitelný pro svůj vysoký výnos vlákna.

Tygra (2009)

Jednodomá odrůda s vyšším výnosem vlákna a středním výnosem semene.

Wojko (2012)

Jednodomá odrůda s dobrým výnosem semene a středně vysokým výnosem stonku.

Itálie

Carmagnola (1960)

Dvoudomá odrůda ze severní Itálie.

Carmaleonte (2015)

Odrůda konopí pro vlákno, jednodomý typ odvozený od odrůdy Carmagnola. Produkuje nepсихоaktivní kanabinoid CBD. Respektuje evropský limit méně než 0,2 % THC. Zatím není zapsána ve skolečném katalogu EU. [26]

7.2 Izolace DNA

Cílem izolace DNA bylo získání této nukleové kyseliny v dostatečném množství a čistotě. Bylo nutné zbavit se nežádoucích látek, jako jsou polysacharidy, proteiny, RNA (ribonukleová kyselina), soli a další, které by poté mohly bránit v činnosti specifickým enzymům. Tento proces má tři fáze. V prvním kroku je cílem rozrušení struktur buněk, k čemuž slouží různé enzymy a detergenty. Následně dochází k odstranění kontaminantů (např.: proteiny - proteináza K, proteiáza E; kontaminující NK - DNáza, RNáza). Poslední fází jsou centrifugační kroky, které umožňují srážení nukleových kyselin.

Byla provedena izolace rostlinné DNA formou bezfenolové extrakce pomocí kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Jedná se o adsorpční metodu, která je založena na schopnosti nukleových kyselin adsorbovat se na křemičité sklo za přítomnosti chaotropní soli (např. jodid sodný). Křemičité sklo je součástí membrán speciálních kolonek. Opakovaným přemýváním přes kolonky a centrifugačními kroky dochází k vymývání kontaminujících látek a lze tak získat DNA o velmi vysoké čistotě. Přidané složky a jejich význam při izolaci jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Přidané složky pro izolaci DNA

Přidaná složka	Význam
Pufr AP1	Pufr vyvolávající lýzu buněk
RNáza	Enzym degradující nežádoucí RNA
Pufr AP2	Deproteinizace DNA
Pufr AP3/E	Pro vysrážení DNA a její zachycení na membráně kolonky
Pufr AW	Promývací pufr
Pufr AE	Uchovávací pufr s nízkým obsahem solí

Postup při izolaci DNA

1. Ke zhomogenizovanému materiálu bylo přidáno 400 μl pufru AP1 a 2 μl RNázy. Obsah mikrozkušavky byl promíchán na vortexu.
2. Zkušavka byla vložena na 10 minut do vodní lázně o teplotě 65 °C.
3. Bylo přidáno 130 μl pufru AP2, směs byla promíchána na vortexu a ponechána 5 minut na ledu. Celý obsah původní mikrozkušavky byl přenesen na fialovou kolonku.
4. Mikrozkušavky byly centrifugovány 2 minuty při 18 000 ot./min.
5. Byla odstraněna kolonka a 400 μl tekuté frakce bylo přeneseno do nové mikrozkušavky. Bylo přidáno 600 μl pufru AP3/E a obsah byl jemně promíchán.
6. 650 μl této směsi bylo přeneseno na bílou kolonku nové mikrozkušavky (membrána je tvořena křemičitým sklem, na které se navazuje DNA). Proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 6 000 ot./min.
7. Byl odstraněn tekutý podíl z mikrozkušavky a do téže mikrozkušavky bylo napipetováno zbylých 350 μl připravené směsi (DNA je zachycena na membráně kolonky).
8. Znovu proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 6 000 ot./min.
9. Bílá kolonka byla umístěna do nové mikrozkušavky a bylo přidáno 400 μl pufru AW. Toto bylo centrifugováno 1 minutu při 6 000 ot./min. Následně byla odstraněna tekutá frakce a znovu přidáno 400 μl pufru AW.
10. Byla provedena centrifugace po dobu 2 minut při 18 000 ot./min.
11. Bílá kolonka byla umístěna do nové mikrozkušavky a k ní bylo přidáno 100 μl předeřátého pufru AE. Následovala inkubace po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugace 1 minutu při 6000 ot./min.
12. Bylo přidáno znovu 50 μl předeřátého pufru AE, proběhla inkubace a centrifugace.
13. Po centrifugaci byla odstraněna bílá kolonka a mikrozkušavka byla uzavřena.

Ověření kvality a kvantity izolované DNA bylo provedeno pomocí UV-spektrofotometru Picopet 1.0 (Picodrop), který je na obrázku 7. Pro kontrolu byly použity 2 μl od každého vzorku a jako slepý vzorek byl použit pufr, ve kterém byla izolovaná DNA rozpuštěna. Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorpance v oblasti vlnové délky 260 nm. Proteinům odpovídá vlnová délka 280 nm. Z poměru absorpance při vlnové délce 260 nm a 280 nm byla zjištěna vysoká kvalita i kvantita DNA.



Obrázek 7: Picodrop

7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byl připraven mastermix do 1,5ml zkumavky podle tabulky 3 [22]. Složky byly zastoupeny v poměru pro 23 vzorků a rozděleny do 22 0,2ml zkumavek po 24 μ l. Do každé zkumavky byl přidán 1 μ l templátové DNA a následně byly vzorky promíchány na vortexu.

Tabulka 3: Složky mastermixu

Složka reakce [μ l]	1 vzorek	23 vzorků
Deionizovaná H ₂ O	16,8	386,4
Pufr	5	115
dNTP	0,1	2,3
Primer začínající	1	23
Primer končící	1	23
DNA Taq polymeráza	0,1	2,3

Bylo použito 16 SSR markerů, které byly rozděleny do tří skupin podle jejich časového a teplotního nastavení v termocyleru (viz tab. 4).

22 vzorků konopí bylo v podobě mastermixů s příslušnými SSR markery umístěno do termocyleru T3 (Biometra), který je znázorněn na obrázku 8. Byl spuštěn program s přednastavenými teplotami a časovými úseky pro průběh PCR reakce (viz tab. 5, tab. 6, tab. 7). Kromě základních kroků PCR reakce proběhla také iniciační denaturace a terminační elongace, což jsou kroky, které zlepšují výsledky pro elektroforetickou separaci.

Tabulka 4: Sekvence použitých SSR markerů

Primer	Začínající (5' - 3')	Končící (5' - 3')	Skupina
CAN0039*	GCAGCCATAGTCATGGTGTA	GTCATTGGAAAGACCAGCTT	1
CAN0093*	CAGTCTCTCAGATCAGACTACC	AGCGGCTAGCGTAACAGTAT	
CAN0110*	GGGTAAAGCTTACGCAAAGT	AACAAACAGTTGGACACCCT	
CAN0126*	GAGTAAGAGAAGGCGAACCA	CCTGTGTAACAGAAAACCCC	
CAN0585	TCATCATCATCCCTCCCTAT	GGTCCATAGTTGGCTGATCT	
CAN1690B*	CAAACAGGGGAAAAGAGAGA	ATGAAGCGTTGGTACTAGGC	
CAN1347*	TGTTTCTAAGGCTCAGTCCC	GGCAAAGGTAAAGCAAGTGT	
CAN2913*	AGGAACACTTTGAAAGCGAG	CGGTCATCTACCTTGAGCTT	
ANUC201	GGTTCAATGGAGATTCTCGT	CCACTAAACCAAAAGTACTCTTC	2
ANUC202	AGGACCAATTTTGAATATGC	AGAGAGGGAAGGGCTAACTA	
ANUC301	ATATGGTTGAAATCCATTGC	TAACAAAGTTTCGTGAGGGT	
ANUC302	AACATAAACACCAACAACCTGC	ATGGTTGATGTTTTGATGGT	
ANUC203	GCTCTTCTTATTAATTCCTCCTT	GAATATGATAAGACACAACCTTCAT	3
ANUC204	TGGAAGATATGCAACTGGAG	AACGAAGATAAGCACGAACA	
ANUC205	TTGACTAACCGCAAAGATA	AAATTCAAACCGATTCTCAG	
ANUC304	TCTTCACTCACCTCCTCTCT	TCTTTAAGCGGGACTCGT	

Tabulka 5: Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 1

	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Iniciační denaturace	94	10 min.	35x
Denaturace	94	30 s	
Anneling	57	30 s	
Elongace	72	40 s	
Terminační elongace	72	10 min.	

Tabulka 6: Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 2

	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Iniciační denaturace	94	3 min.	35x
Denaturace	95	15 s	
Anneling	52	15 s	
Elongace	72	60 s	
Terminační elongace	72	5 min.	

Tabulka 7: Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 3

	Teplota (°C)	Čas	Počet opakování
Iniciační denaturace	94	3 min.	35x
Denaturace	95	15 s	
Anneling	54	15 s	
Elongace	72	60 s	
Terminační elongace	72	5 min.	



Obrázek 8: Termocycler

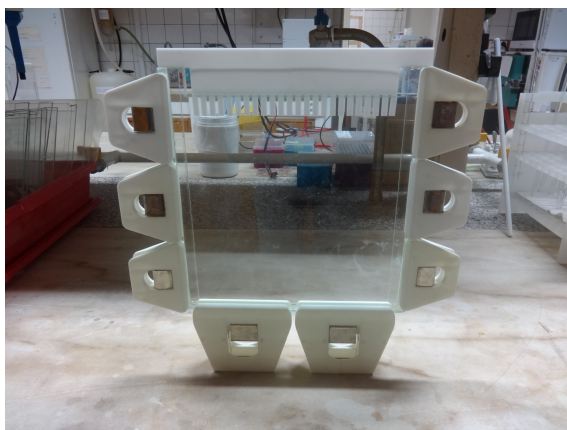
7.4 Gelová elektroforéza

7.4.1 Příprava gelů

Nejdříve byl připraven pufr 50x TAE (Tris-acetát-EDTA pufr), který byl později použit jako nanášecí (loadovací) pufr smícháním 200 ml destilované vody, 242 g tris(hydroxymethyl)diaminomethanu (TRIS), 57,1 ml ledové kyseliny octové a 37,2 g disodia (EDTA). Tyto chemikálie byly rozpuštěny na míchačce, doplněny destilovanou vodou na 1 l a upraveny na pH 8,5 roztokem NaOH (HCl).

Byla prováděna gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Gel byl připraven smícháním 27,3 ml destilované vody, 2,5 ml 10x TBE (tris-borát-EDTA pufr), 16,7 ml zásobního roztoku akrylamidu, 350 μ l 10% roztoku persíranu amonného a 40 μ l N,N,N,N - Tetramethylen diaminu (TEMED). Směs byla nalita do elektroforetické vany (viz obr. 9).

Před ztuhnutím gelu byl mezi desky elektroforetické vany umístěn hřebínek na jamky, do kterých byly později pipetovány vzorky jednotlivých DNA po proběhnuté PCR reakci spolu s loadovacím pufrem. Do dvou jamek byl místo vzorku DNA nanesen velikostní marker (angl. „*size marker*“, SM), který sloužil k identifikaci velikosti úseků DNA na gelu.



Obrázek 9: Elektroforetická vana

7.4.2 Barvení gelů

Po proběhnutí elektroforézy byl gel opatrně sejmут ze skleněných desek a přenesen do nádoby s fixačním roztokem, kde byl inkubován zhruba 5 minut za lehkého protřepávání. Poté byl asi 5 minut inkubován za mírného třepání v nádobě s roztokem 0,2% dusičnanu stříbrného. Následně byl 3x promyt destilovanou vodou a umístěn do nádoby s vývojkou a za lehkého třepání inkubován do objevení produktů na gelu. [1]

Příprava chemikálií a roztoků:

1. Fixační roztok

- 41,6 ml ethanolu
- 2,0 ml kyseliny octové
- 356,4 ml destilované H₂O

2. 0,2% roztok dusičnanu stříbrného

- 2 g AgNO₃
- Doplněno destilovanou H₂O na 1000 ml

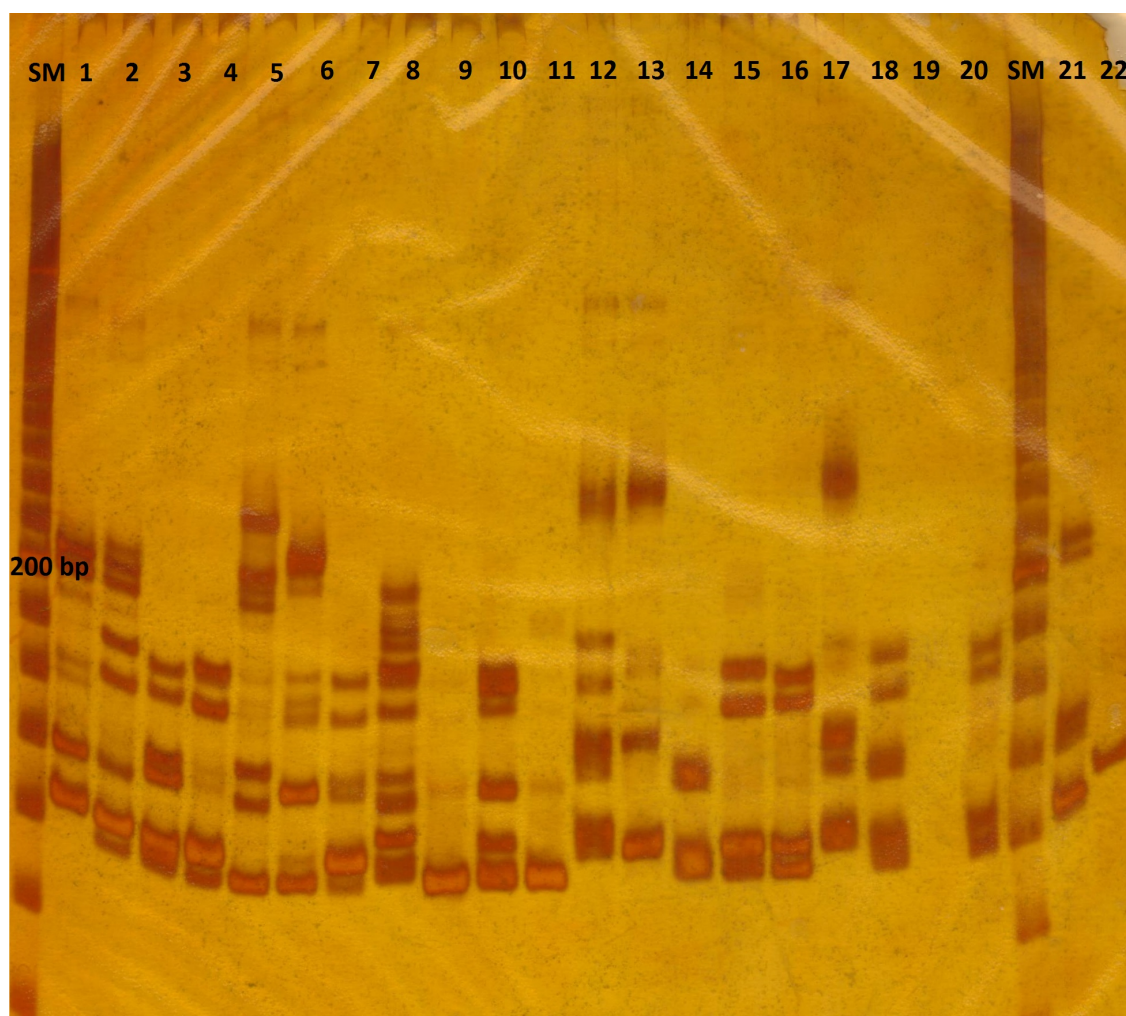
3. Vývojka

- 10 ml 37% formaldehydu
- 22,2 g NaOH
- 730 ml destilované H₂O

7.5 Vyhodnocování výsledků

Získané gely byly vyhodnocovány z hlediska velikosti úseků DNA a přítomnosti a počtu alel. Jako příklad je uveden gel odpovídající vzorkům konopí s SSR markerem CAN2913* (viz obr. 10)³.

Z důvodu snahy odseparování „ruchů“ od signálu, které mohou být způsobeny chybami PCR jako např. nespecifickou amplifikací nebo „sklouznutím“ polymerázy je hodnocena pouze ta část gelu, která odpovídá velikosti uvedené v literatuře.



Obrázek 10: Gel získaný elektroforézou vzorků s SSR markerem CAN2913*³

³SM - size marker; čísla odpovídají odrůdám konopí (viz tab. 1)

Na základě těchto poznatků byla vytvořena matice, která odpovídá tabulce 8⁴. [1]

Tabulka 8: Matice popisující dominantní alely odrůd s mikrosatelitem CAN2913*⁴

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0
1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Velikost (angl. „*range*“) úseků DNA byla odvozena od velikostního markeru (angl. „*size marker*“) s tím, že každá jeho alela odpovídá 20 bp (angl. *base pair* - párů bazí).

Další důležité faktory jsou index diverzity (DI), pravděpodobnost identity (PI) a polymorfní informační obsah (PIC), což jsou informace o SSR markeru, které vypovídají o jejich vhodnosti k identifikaci. Tyto údaje lze získat výpočtem z celkového počtu a zastoupení jednotlivých alel ve vzorcích [27]. Nejvhodnější jsou SSR markery s nejvyššími hodnotami DI a PIC a nejnižšími hodnotami PI. [2]

Velikost molekul DNA, počet alel, DI, PI a PIC pro vzorky DNA s SSR markerem CAN2913* jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Vypočítané hodnoty pro vzorky s SSR markerem CAN2913*

SSR marker	Velikost [bp]	Počet alel	DI	PI	PIC
CAN2913*	120-150	6	0,783	0,043	0,768

⁴1-22 - čísla odrůd; 1 - výskyt dominantní alely; 0 - nepřítomnost dominantní alely

8 Výsledky a diskuze

8.1 Vyhodnocení analýz jednotlivých SSR markerů

Celkem 16 SSR markerů bylo použito pro analýzu 22 vzorků konopí. V tabulce 10 jsou uvedeny informace o rozsahu velikostí alel a jejich počtu ve vzorcích. Také jsou zde uvedeny vypočítané hodnoty DI, PI a PIC, které vypovídají o vhodnosti využití těchto SSR markerů pro identifikaci genotypů technického konopí.

Tabulka 10: Informace o vhodnosti použitých SSR markerů

SSR marker	Velikost [bp]	Počet alel	DI	PI	PIC
CAN0039*	200-220	3	0,561	0,135	0,551
CAN0093*	200-260	5	0,698	0,065	0,685
CAN0110*	100-130	5	0,764	0,053	0,745
CAN0126*	160-190	3	0,659	0,151	0,604
CAN0585	180-240	5	0,670	0,152	0,617
CAN1690B*	220-260	2	0,500	0,375	0,375
CAN1347*	200-220	3	0,663	0,146	0,610
CAN2913*	120-150	6	0,783	0,043	0,768
ANUC202	160-220	11	0,883	0,008	0,881
ANUC201	140-220	10	0,871	0,011	0,867
ANUC302	140-180	7	0,797	0,042	0,783
ANUC304	140-210	8	0,781	0,030	0,776
ANUC203	140-200	10	0,870	0,009	0,867
ANUC204	120-190	8	0,852	0,013	0,847
ANUC205	140-200	7	0,811	0,032	0,799
ANUC301	220-280	5	0,703	0,112	0,670
	PRŮMĚR	6,125	0,742	0,086	0,715

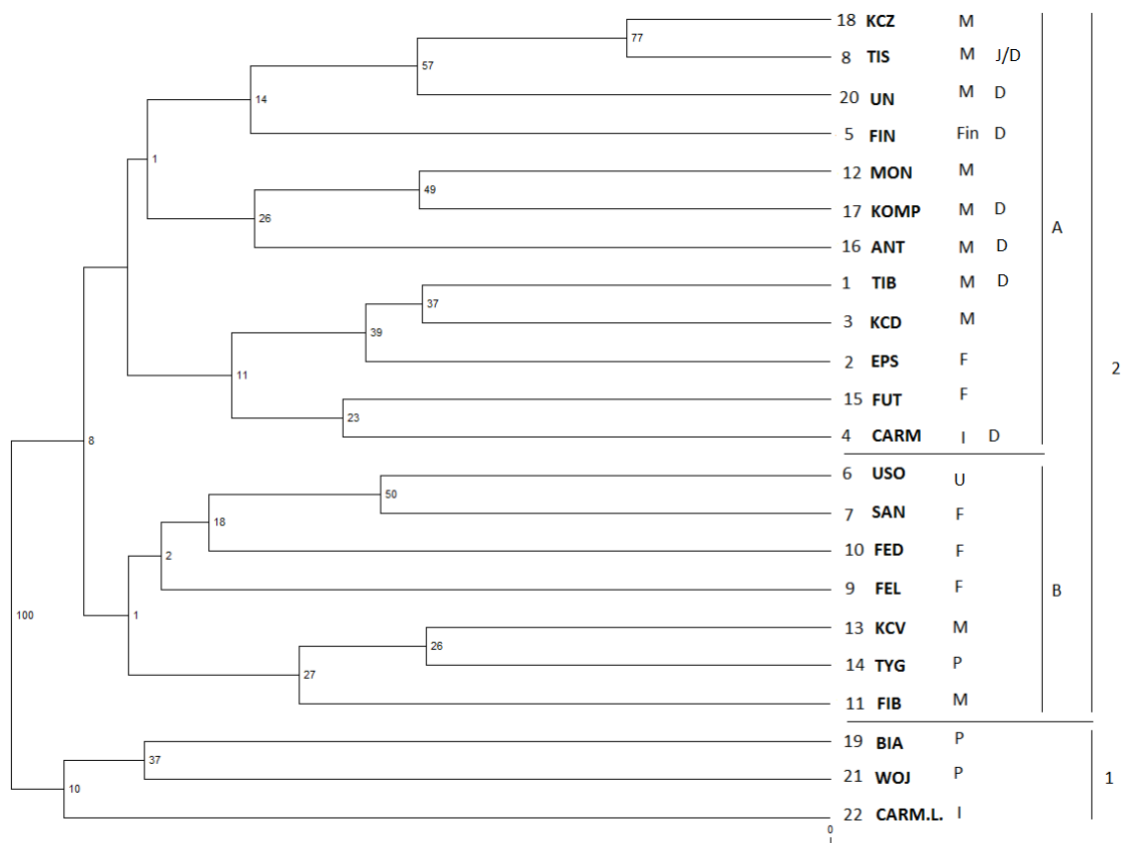
Bylo nalezeno celkem 98 různých alel. Průměrný výskyt alel při analýzách jednotlivými SSR markery je 6,125.

Byla vypočítána průměrná hodnota DI 0,742, průměrná hodnota PI 0,086 a průměrná hodnota PIC 0,715. Hodnoty DI a PIC větší než 0,8 a hodnota PI menší než 0,06 byly vypočítány pro čtyři SSR markery (ANUC202, ANUC201, ANUC203 a ANUC204). Ty jsou vhodné pro identifikaci genotypů těchto odrůd technického konopí a sestavení tzv. panelu mikrosatelitů pro jejich identifikaci. Jako nejlepší SSR marker s nejvyššími hodnotami DI a PIC a nejnižší hodnotou PI byl stanoven ANUC202. Jako nejhorší (s nejmenší variabilitou) SSR marker pro toto použití s nejnižší hodnotou DI a PIC a nejvyšší hodnotou PI byl stanoven CAN1690B*.

8.2 Genetická podobnost vzorků konopí

Pro popis genetických rozdílů mezi genotypy jsou vhodné dendrogramy genetické podobnosti. Výsledky analýz byly vyhodnocovány pomocí binární matice, kde 1 znamená přítomnost produktu a 0 jeho absenci. Tato matice byla zpracována statistickým softwarem FreeTree verze 9.1[28] pomocí UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) s využitím Jaccardova koeficientu podobnosti[29]. Do podoby dendrogramu byly výsledky přeneseny softwarem TreeView verze 1.6[30].

Pro znázornění genetických podobností mezi 22 vzorky konopí byl vytvořen příslušný dendrogram (viz obr. 11).



Obrázek 11: Dendrogram genetické podobnosti odrůd

M - Maďarsko; F - Francie, I - Itálie, P - Polsko, Fin - Finsko; U - Ukrajina; D - dvoudomá; 1,2 - shluky; A,B - podshluky; 1-22 (KCZ-CARM.L) - odrůdy (viz tab. 1)

Dendrogram byl rozdělen do dvou základních shluků 1 a 2. Do prvního shluku spadají genotypy Bialobrzeskie, Wojko a Carmaleonte, které se nejvíce odlišují od ostatních vzorků. Zbytek, označený jako skupina 2, byl rozdělen do dvou shluků A a B. Do shluku A spadají genotypy KC Zuzana, Tisza, Unico B, Finola, Monoica, Kompolti, Antal, Tiborszallasi, KC Dóra, Epsilon, Futura 75 a Carmagnola. Do shluku B patří USO 31, Santhica 27, Fedora 17, Felina 32, KC Virtus, Tygra a Fibrol.

Z dendrogramu lze také vyčíst, že kromě dvou výjimek spadají všechny odrůdy původem z Maďarska do shluku A. Většina francouzských odrůd naopak patří do shluku B. Je tedy možné říci, že se u francouzských a maďarských odrůd projevily vliv jejich původů (tzn. provenience) na rozdělení. Do shluku A patří kromě maďarských vzorků také 2 odrůdy francouzské (Epsilon 68, Futura 75), jedna finská (Finola) a jedna italská (Carmagnola). Do shluku B patří kromě francouzských vzorků dvě maďarské odrůdy (Fibrol, KC Virtus), jedna polská (Tygra) a jedna ukrajinská, jejímž udžovatelem je Nizozemsko (USO 31). Všechny polské odrůdy kromě jedné byly zařazeny do shluku 1. Kromě polských odrůd je v tomto shluku jedna italská (Carmaleonte). Tímto zařazením odrůd v dendrogramu podle podobnosti DNA ze stejných oblastí byl potvrzen fakt, že se během šlechtění materiály adaptují na místní klimatické podmínky.

Dalším zajímavým poznatkem je fakt, že všechny dvoudomé odrůdy byly zařazeny do shluku A, z čehož plyne, že se tato skutečnost výrazně odráží na jejich genetické informaci, tzn. že některé námi analyzované SSR markery jsou s největší pravděpodobností ve vztahu právě k této vlastnosti konopí.

Závěr

Bylo zjištěno, že čtyři z 16 použitých SSR markerů jsou vhodné pro studium genetické variability zkoumaných 22 odrůd technického konopí (ANUC202, ANUC201, ANUC203 a ANUC204). Jako nejvíce vyhovující byl stanoven SSR marker ANUC202 a jako nejméně vyhovující CAN1690B*. Tyto informace mohou být využitelné v nadcházejících výzkumech zabývajících se stejnými odrůdami nebo při volení SSR markerů vhodných pro identifikaci země původu a rozdělení odrůd na jednodomé a dvou-domé.

V rámci samotného studia genetické variability daných odrůd bylo zjištěno, že odrůdy ze stejné země původu disponují podobnou genetickou výbavou. To je způsobeno jejich adaptací na místní klima při šlechtění. Většina odrůd byla maďarských, které se držely ve shluku A v dendrogramu, a francouzských, které se držely shluku B. Do shluku 1, jehož zástupci byli nejodlišnější od všech ostatních odrůd, byly zařazeny všechny polské odrůdy kromě jedné (Tygra). Tyto výsledky mohou být využity pro charakterizaci genetické diverzity mezi vzorky technického konopí, určování neznámých vzorků nebo při šlechtění odrůd nových.

Literatura

- [1] MUSILOVÁ, M., TROJAN, V., VYHNÁNEK, T., HAVEL, L.: Genetic Variability for Coloured Caryopses in Common Wheat Varieties Determined by Microsatellite Markers, *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2013, p. 116-122
- [2] PRESINSZKÁ, M., ŠTIASNA, K., VYHNÁNEK, T., TROJAN, V., MRKVICOVÁ, E., HŘIVNA, L., HAVEL, L.: Analysis of microsatellite markers in hemp (*Cannabis sativa* L.) , *MendelNet2015*, 2015, p. 434-438
- [3] KOCIÁN, P.: Cannabaceae - Konopovité, *Květena České republiky*, dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/celed.asp?IDceled=48> [Cit. 12. 11. 2015]
- [4] MAHLBERG, P., HAMMOND, C. T., TURNER, J. C. et al.: Structure, development and composition of glandular trichomes of *Cannabis sativa* L., *Biology and Chemistry of plant trichomes*, 1984
- [5] VOMÁČKA, V.: Pěstování a využití konopí setého (*Cannabis sativa* L.), *Bakalářská práce*, 2014
- [6] TEJKALOVÁ, K.: *Cannabis sativa* - objasnění vztahu mezi domnělými poddruhy, *Diplomová práce*, 2015
- [7] MECHOULAM, R.: Marihuana Chemistry, *Science*, 1970
- [8] TURNER, C. E., ELSOHLY, M. A., BOEREN, E. G.: Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII.: A Review of the natural constituents, *Journal of Natural Products*, 1980
- [9] RUSSO, E. B., MCPATLAND, J. M.: Cannabis is more than simply Delta(9)-tetrahydrocannabinol, *Psychopharmacology*, 2003, p. 431-432
- [10] CLARKE, R. C.: Marijuhana botany, an advanced study: The propagation and breeding of distinctive cannabis, *CA: Ronin Pub*, 1981
- [11] KING, L., CARPENTIER, C., GRIFFITHS, P.: An overview of cannabis potency in Europe, *Office for Official Publications of the European Communities*, 2004

- [12] MIOVSKÝ, M.: Konopí a konopné drogy: Adiktologické kompendium, 2008
- [13] ADAMS, P.: Weedology, *Positive Publishers*, 2012
- [14] ALGHANIM, H. J., ALMIRALL, J. R., Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, p. 1225-1233
- [15] FORAPANI, S., CARBONI, A., PAOLETTI, C., CRISTIANA MOLITEMI, V. M., RANALLI, P., MANDOLINO G.: Comparison of Hemp Varieties Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers, *Crop Science*, 2001
- [16] ŠMIROUS et al.: Zápisník Len a konopí, *AGRITEC s.r.o.*, 2013
- [17] HONG, S., CLARKE, R. C.: Taxonomic studies of Cannabis in China, 1996, dostupné z: <http://www.internationalhempassociation.org/jiha/iha03207.html> [Cit. 18. 12. 2015]
- [18] RUMAN, M., HAMŠÍK, P.: Konopí - biomasa pro život: Vlastnosti a použití v ekologickém kontextu, 2007
- [19] SLADKÝ, V.: Konopí, šance pro zemědělství a průmysl, *Ústav zemědělských a potravinářských informací*, 2004
- [20] MENOŠEK, J.: Využití konopí v současném stavebnictví, 2011, dostupné z: <http://www.enviweb.cz/clanek/staveni/85729/vyuziti-konopi-v-soucasnem-stavebnictvi> [Cit. 6. 1. 2016]
- [21] BAČOVSKÝ, V.: Studium genetické diverzity jírovce s rozdílnou rezistencí ke klíněnce jírovcové, *Bakalářská práce*, 2013
- [22] VYHNÁNEK, T., JEŽÍŠKOVÁ, I.: Genetika (úkoly do cvičení pro GENF), *Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně*, 2005
- [23] ZHANG D-X.: Lepidopteran Microsatellite DNA: Redundant but Promising, *Trends in Ecology and Evolution*, 2004, p. 507-509
- [24] ŠIMKOVÁ, H.: Genomika (KBB/GENOM): Genetické mapování, *Inovace studia molekulární a buňečné biologie*

- [25] Gelová elektroforéza, *VFU Brno, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat*, dostupné z: http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz [Cit. 30. 12. 2015]
- [26] BJELKOVÁ, M.: Přehled a stručná charakteristika odrůd konopí setého ze společného katalogu odrůd zemědělských plodin EU, *Zápisník Len a konopí 2016*, 2016
- [27] RUSSEL, J., FULLER, J., YOUNG, G., THOMAS, B., TARMINO, G., MACAULAY, M., WAUGH, R., POWELL, W.: Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers, *Genome*, roč. 40, 1997, p. 442-450
- [28] HAMPL, V., PAVLÍČEK, A., FLEGR, J.: Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program Free-Tree: Application to Trichomonad parasites, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, p. 731–735
- [29] JACCARD P.: Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin Del La Societé Vaudoise Des Scientes Naturelles*, 1908, p. 223–270
- [30] PAGE R.D.M.: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers, *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, p. 357–358

Seznam obrázků

1	Rostlina medicijnálního konopí množená v minerální vatě (MENDELU, odrůda Bedropur)	12
2	Dekarboxylace tetrahydrokanabinolové kyseliny	13
3	Struktura THC	13
4	Struktura CBD	14
5	Vznik CBN oxidací THC	14
6	Semena odrůdy Finola určená k izolaci DNA	22
7	Picodrop	28
8	Termocycler	31
9	Elektroforetická vana	32
10	Gel získaný elektroforézou vzorků s SSR markerem CAN2913* ³	34
11	Dendrogram genetické podobnosti odrůd	38

Seznam tabulek

1	Vzorky rostlinného materiálu	21
2	Přidané složky pro izolaci DNA	26
3	Složky mastermixu	29
4	Sekvence použitých SSR markerů	30
5	Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 1	30
6	Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 2	31
7	Nastavení termocycleru pro SSR markery ze skupiny 3	31
8	Matice popisující dominantní alely odrůd s mikrosatelitem CAN2913* ⁴	35
9	Vypočítané hodnoty pro vzorky s SSR markerem CAN2913*	35
10	Informace o vhodnosti použitých SSR markerů	36