

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra speciální produkce rostlinné

Diplomová práce

Studium biologické aktivity konopí setého

(Biological study of hemp activity)

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.

Autor:

Bc. et Bc. Šárka Vlachová

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 24.4.2015

.....

(Šárka Vlachová)

Poděkování

Z celého srdce bych chtěla poděkovat rodičům zejména za jejich psychickou podporu, dále Petru Kohoutovi a Jihočeské agentuře pro podporu inovačního podnikání o.p.s, za poskytnutí prostor a přístrojů na zpracování vzorků. Kolektivitu z katedry Speciální produkce rostlinné zejména panu inženýru Josefu Švajnerovi a panu docentu Jiřímu Divišovi za pomoc na pozemku a poskytnutí informací. Můj velký dík patří mé školitelce paní docentce Janě Kalinové Pexové za její cenné rady a pomoc se zpracováním dat. Dále vedení Ústavu komplexních systémů za poskytnutí zázemí a možnosti experimentálního výzkumu. Na závěr bych chtěla poděkovat kolektivitu laboratoře tkáňových kultur v Nových Hradech, za jejich pomoc při organizaci experimentů s tkáňovými kulturami a magistru Jiřímu Hellerovi, za kultivaci políček v Poněšicích, pomoc se sběrem vzorků a psychickou podporu.

Abstrakt:

Cílem práce bylo vyhodnotit vliv hustoty výsevu na výnosové parametry konopí setého a následně vyhodnotit biologickou účinnost výluhu lyofilizovaných květů a listů odebraných v různé fázi vývoje z různých hustot výsevu a obou lokalit.

Konopí seté (odrůda Tiborszállási) byla zasetá na stanovišti v Českých Budějovicích a v Poněšicích u Hluboké nad Vltavou při třech hustotách výsevu a to: 100, 200 a 300 rostlin na m². U porostu byly sledovány následující parametry: výška rostlin, sušina listů, stonku, květů, případně počet a hmotnost semen, celkový výnos sušiny a výnos semen. Byl sestaven specifický postup přípravy a aplikace výluhu na konopí pro test citlivosti na fibroblastoidní linii savčích buněk L929.

Jako výnosově vhodnější se jevílo stanoviště Ponešice s průměrem 5 t/ha sušiny biomasy a 2,1 t/ha semen. Vliv hustoty výsevu byl průkazný pro všechny parametry ve fázi zrání semen v Poněšicích, kde byly u variant dosaženy plánované počty rostlin. Biologický test výluhu konopí setého jednoznačně prokázal závislost mezi ředěním výluhu (dávku) a účinkem na fibroblastoidní buněčnou linii L929 pro průměrnou dobu zdvojení, byl zaznamenán stimulační efekt a z výsledků se dá usuzovat na rozdílnou reakci buněčné kultury v rámci pozorovaných parametrů.

Klíčová slova: Konopí seté, hustota výsevu, sekundární metabolity, savčí tkáňové kultury, buněčný růst

Abstract:

The aim of this thesis was to find out how the density of seeds affects the yield parameters of hemp and subsequently to evaluate biological efficiency of infusions from lyophilized flowers and leaves that were sampled in different developmental stages from different densities of both areas.

Hemp (*Cannabis sativa*), Tiborszallási variety was used for a small area experiment, which was seeded in České Budějovice and Poněšice. For our research we chose three densities of plants, 100, 200 and 300 plants per one square meter.

We assembled a specific procedure of infusion preparation and its application on fibroblastoid line of mammalian cells L929 to be able to carry out tests of sensitivity of these cells in presence with this infusion.

The place Poněšice had higher yields than České Budějovice with average the biological yield 5 t/ha of dry biomass and the yield of seeds 2,1 t/ha. The effect of seed density on all parameters at stage of seed maturation was statistically significant in Poněšice, where all variants of plant density achieved planned numbers of plants.

The biological test of hemp infusion clearly proved dependency between infusion dilution and its impact on fibroblastoidal cells line L929 for the average period of duplication. The stimulative effect was observed and from the results we can deduce different reactions of cell culture in case of observed parameters.

Key words: hemp, sowing density, secondary metabolites, mammalian tissue cultures, cell proliferation

SEZNAM ZKRATEK

AM-57-TS- stabilizovaná buněčná linie (epiteloidní buňky) derivovaná z lidského amniové tkáně.

BHK-21 (C13)- stabilizovaná buněčná linie (fibroblastoidní buňky) derivované z ledvin jednodenního syrského křečka.

DETROIT 6 - stabilizovaná buněčné linie (epiteloidní buňky) derivovaná ze staré kostní dřeně punkcí pacienta s rakovinou plic.

GMK- stabilizovaná buněčná linie (epiteloidní buňky) derivované z primokultury ledvinových buněk opice (*Cercopithecus aethiops*).

HeLa- stabilizovaná buněčná linie (epiteloidní buňky) derivované z lidského karcinomu křečka.

L- stabilizovaná buněčná linie derivovaná z myší pojivové tkáně.

VERO- stabilizovaná buněčná linie (fibroblastoidní buňky) derivovaná z ledvin opice (*Cercopithecus aethiops*).

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EBS- Epidermolysis Bullosa Simplex

ALS- Amyotrophic Lateral Sclerosis.

ECACC- European Collection of Cell Cultures

PBS -(Phosphate Buffer Saline) pufr používaný k oplachování buněk během pasážování, případně před fixací.

SRR- specifická růstová rychlost

PDZ- průměrná doba zdvojení

MTT- (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) test

Obsah

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ REŠERŠE	2
2.1 Botanická charakteristika	2
2.2 Růst a vývoj konopí setého	5
2.3 Pěstování konopí setého	6
2.3.1 Historie pěstování ve světě	6
2.3.2 Historie pěstování v České Republice	7
2.3.3 Produktivita konopí setého	9
2.3.4 Bioaktivní látky konopí setého	9
2.4 Biologické testy	12
2.4.1 Tkáňové kultury	13
2.4.2 Tkáňové kultury v kinematografii	19
3. CÍLE PRÁCE	21
4. MATERIÁL A METODY	22
4.1 Použitý materiál	22
4.2 Založení maloparcelového polního pokusu	22
4.2.1 Stanoviště pozemek České Budějovice	23
4.2.2 Stanoviště pozemek Poněšice	24
4.3 Sledování v průběhu vegetace	25
4.4 Zpracování vzorků	27
4.5 Experimentální kultivace na fibroblastoidní buněčné linii L929	28
5. VÝSLEDKY	32
5.1 Výsledky z odběrů biomasy	32
5.2 Výsledky ze zpracování výluhů	37
5.2.1 Pozemek České Budějovice	38

5.2.2 Pozemek Poněšice.....	44
5.2.3 Souhrnné porovnání.....	50
6. DISKUZE.....	52
7. ZÁVĚR	54
8. LITERATURA.....	56
9. PŘÍLOHY	62

1. ÚVOD

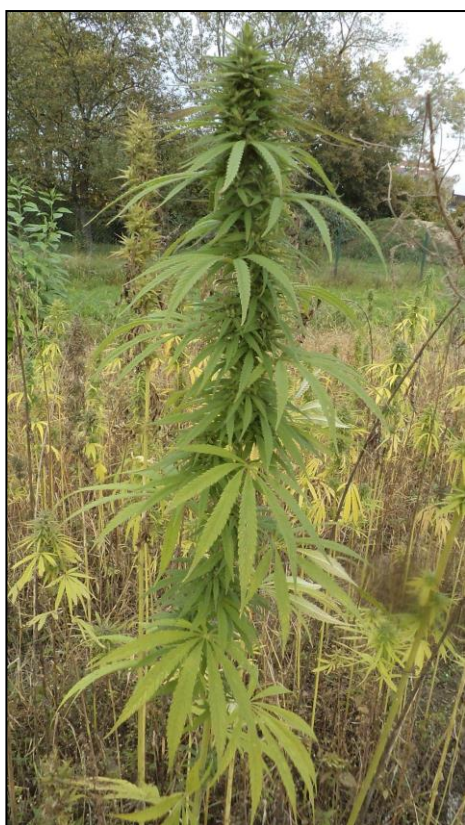
Konopí a jeho produkty jsou v dnešní době velice aktuálním tématem. Diskuse probíhají v různých rovinách, jednak ve vztahu k léčebnému potenciálu rostliny a jednak z hlediska jeho širokého spektra využití. Z tohoto důvodu jsem si konopí seté (*Cannabis sativa* L.) vybrala pro svou diplomovou práci, nic na tom nemění ani fakt, že se odrůda Tiborszallasi, kterou jsem zvolila, byla vyšlechtěna za účelem pěstování pro získání vlákniny, s nízkým obsahem THC (psychoaktivní složky). Získávání extraktů různého charakteru a jejich biologické testování, je základem pro uvádění řady farmaceutických či kosmetických produktů na trh. V České republice má pěstování konopí mnohaletou tradici. V minulém století došlo sice k úpadku jeho pěstování a využití, v dnešní době se nicméně setkáváme s renesancí a se snahou využít potenciál rostliny v širokém odvětví zpracování. Konopí pěstované v Čechách produkuje kvalitní vlákno i semena. Zároveň je prosazované jako rostlina vhodná pro ekologické zemědělství z důvodu dobré odolnosti proti chorobám a škůdcům, z důvodu fyto-sanitární funkce a prevence proti zaplevelování pozemku. Z hlediska pěstování konopí existují v České republice vládní omezení zejména z důvodu obsahu biologicky aktivní složky, sekundárních metabolitů nazývaných tetrahydrokanabinoly. Povolené je pěstování konopí s obsahem účinné psychoaktivní složky menší než 0,3% a to pouze na základě ohlašovací povinnosti při ploše nad 100 m² porostu a je povoleno pěstovat pouze odrůdy certifikované, uvedené na seznamu povolených odrůd, přičemž nesmí být získávány pryskyřice a látky ze skupiny tetrahydrokanabinolů. Pěstování konopí setého může být podporováno dotačním titulem a to pouze pokud není obsah tetrahydrokanabinolů vyšší než 0,2%. Od 1. ledna 2014 je možné pěstovat konopí s vyšším než výše uvedeným množstvím psychoaktivní aktivní látky pro lékařské účely a to pouze na základě udělené licence.

Konopí obsahuje široké spektrum sekundárních metabolitů, které mohou mít případný terapeutický účinek. Největší pozornost je věnována pro konopí typickým kanabinoidům, do které spadají i výše zmíněné tetrahydrokanabinoly. Zjišťování obsahu a účinku aktivních složek v rostlinách předchází biologické testy, které si kladou za cíl prokázat závislost mezi jejich dávkou a účinkem.

2. LITERÁRNÍ REŠERŠE

2.1 Botanická charakteristika

Taxonomicky spadá konopí seté (*Cannabis sativa* L.) do říše cévnatých rostlin, oddělení krytosemenných, třídy dvouděložných, řádu růžovitých (*Rosaceae*). Samotná čeleď konopovitých rostlin (*Cannabaceae*) obsahuje dva rody a to rod *Cannabis* a *Humulus*, známý jako chmel. Studie Mukherjee et al. (2008) na základě fylogenetického výzkumu uvádí, že v dávné minulosti mohlo docházet k určitému



křížení mezi *Cannabis sativa* L. a *Humulus japonicus* Sieb. et Zucc. (chmel japonský) viz obrázek č. 2.

Dle botanického členění rozdělujeme rod konopí (*Cannabis*) nejméně na 3 druhy. *Cannabis sativa* L. konopí seté (obrázek č. 1), které popsal v 18. století švédský botanik Carl Linné, dále na *Cannabis indica* L.- konopí indické, popsané biologem Janem Baptistou o dvě století později a konopí ruderální *Cannabis ruderalis*, popsané D.E. Janischewskym (Hejný a Slavík 1997).

Obrázek č.1: Rostlina konopí setého, foto Šárka Vlachová

Rod *Cannabis* L.-konopí

Jsou jednoleté byliny s přímou tuhou lodyhou, která je hranatá a drsná, zejména v horní polovině žláznatě chlupatá. Listy jsou řapíkaté, v dolní části lodyhy zpravidla vstřícné, v horní nejčastěji střídavé, vzácněji všechny listy střídavé, ve střední části

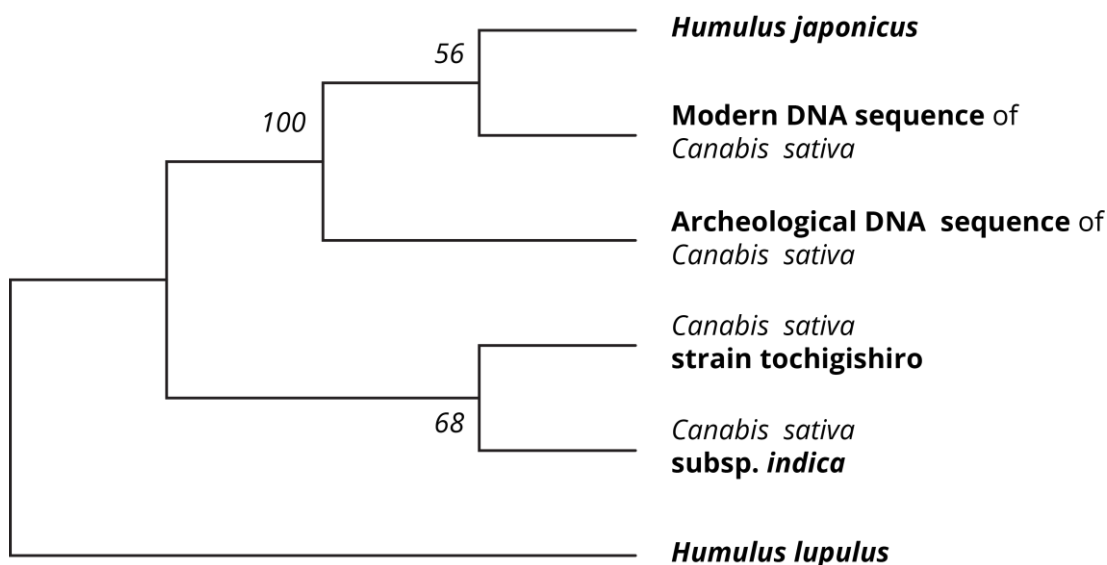
lodyhy 5-7 čtené, palistnaté, květy jsou jednopohlavné, dvoudomé, vzácněji jednodomé, prašnikové květy v řídkých úžlabních nebo koncových vrcholičnatých latách, pestíkové květy ve velmi redukovaných vrcholičnatých květenstvích (často jen jeden květ), skládající husté, bohatě olistěné klasy. Nažky vejcovité až elipsoidní, slabě zploštělé, se dvěma nevýraznými kýly, hladké, obalené chrupavčitými, dlouze zašpičatělými, na vnější straně krátce chlupatými listeny. Semena se srpovitě zahnutým zárodkem (Hejný a Slavík 1997).

Rostliny konopí jsou větrosnubné a rozšiřují se anemogamií. Pro území České republiky (ČR) je zplanělé konopí nepůvodním druhem označované jako adventivní archeotyp s centrem rozšíření ze střední Asie (Hejný a Slavík 1997).

Druh konopí seté (*Cannabis sativa* L.)

Konopí seté lze dále členit ve dva podstatně odlišné poddruhy, a to konopí plané (*Cannabis sativa* ssp. *spontanea*) a konopí kulturní (*Cannabis sativa* ssp. *culta*). Konopí plané zplaňuje a má nízký silně větvený stonek s krátkými internodii, malými listy a plody dosahují hmotnosti tisíci zrn (HTS) 5-10g (Miovský et al. 2008). Kulturní konopí dosahuje HTS až dvakrát větší.

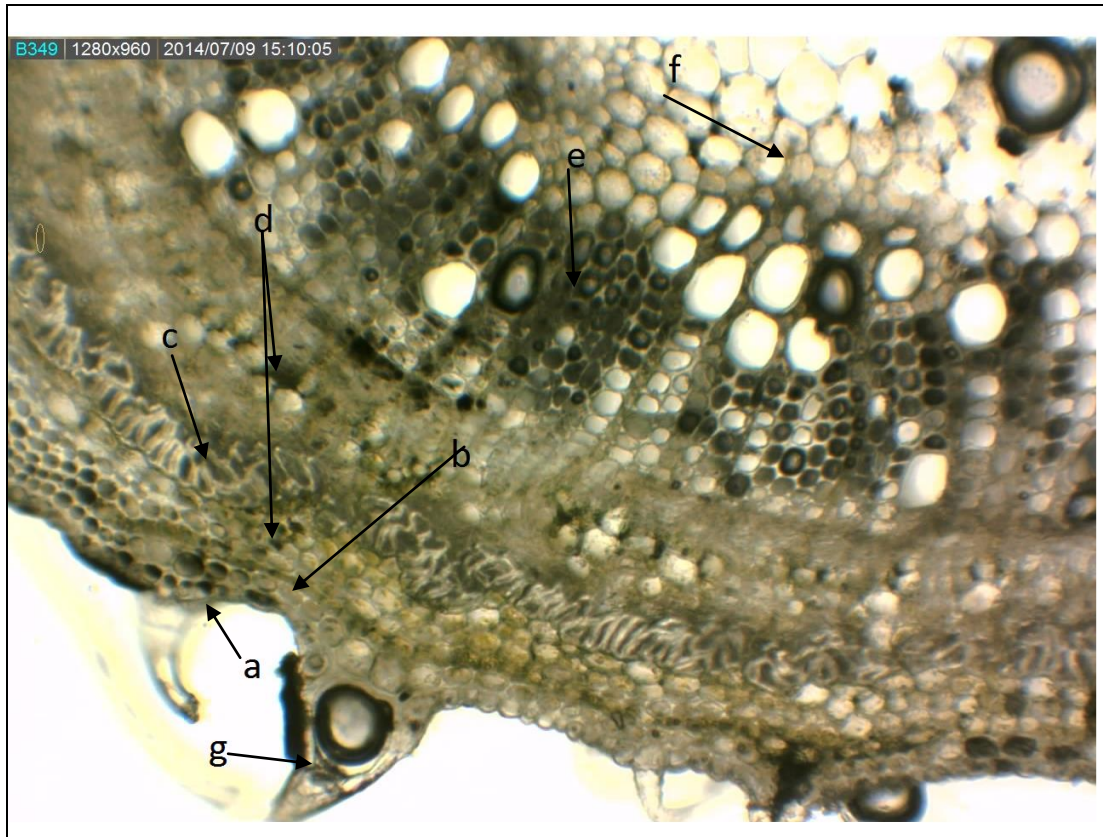
Konopí je charakteristické svou plasticitou, tedy reakcí na rozličné způsoby a podmínky pěstování. Konopí kulturní je podle starší literatury dále rozdělováno podle Rybáčka et al. (1965) na 4 geografické skupiny a to na jižní, středoruské, severní a asijské. V dostupné literatuře se ale setkáme i s členěním na temperátní a tropický ekotyp, nebo dokonce s názorem autorů ElSholy, Slade (2005), že rod konopí zahrnuje pouze jeden vysoce variabilní druh a to konopí seté (*C. sativa*). Naopak studie Mukherjee et al. (2008) usuzuje na základě analýzy jaderné ribosomální a chloroplastové DNA (deoxyribonukleové kyseliny) porovnané s recentními sekvencemi DNA konopí setého, konopí indického (*Cannabis sativa* subsp. *indica* (Lam.)), chmele otáčivého (*Humulus lupulus* L.) a chmele japonského (*Humulus japonicus* Sieb. et Zucc.), na dvě možná centra vzniku rodu *Cannabis* (obr. 2). Tento předpoklad uvádí i studie allozymů 157 vzorků konopí rozdílného geografického původu (Hillg 2005).



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom, znázorňující podobnost sekvencí za použití metody maximální parsimonie. Přejato od (Mukherjee et al. 2008).

Biologická charakteristika konopí setého

Kořen kolmý, kulovitý, kořinky vlásečnicové, stonek je přímý délky až 6 m, silný 3 až 60 mm, mladý stonek kulatý a dužnatý, starší dřevnatý a je 6 nebo 4 hraný, někdy rýhovaný a v dolní části zůstává kulatý. Částmi stonku jsou lýko, dřevovina a dřeň. Lýková část je tvořena různými pletivy. Některé z buněk pokožky rostliny jsou přeměněny na žláznaté chlupy viz. obrázek č. 3., parenchym obsahuje průduchy (10-18/cm²), kolenchym zvyšuje pružnost a pevnost stonku a sklerenchymem vede rostlina asimiláty z listů do nižších částí rostliny. Dřevovina tvoří 1/2 až 2/3 objemu stonku, dřeň je sestavena z parenchymatických buněk. Listy jsou dlanité, vícesečné, mají kopinatý tvar s pilovitým okrajem, krátké až středně dlouhé řapíky na vrcholu rostliny hustěji osazené v horní části střídavě posazené ve střední vstřícné. Květenství samčí rostliny vyrůstá z úžlabních listů v latách s dlouhými stopkami, květ s 5-6 květními šupinkami a 5 tyčinkami, vytváří velké množství pylu. Samičí květy mají svrchní semeník s jedním vysunutým vajíčkem a dvěma nitkovitými dlouhými bliznami, tvoří hustě olistěné, ±krátké složité hrozny v několika vrstvách. Plodem je vejčitá jednosemenná nažka s jemným šedo-černým mramorováním s velikostí a barvou závislou na typu a odrůdě (Miovský et al. 2008).



Obrázek č.3: Příčný řez stonkem konopí setého, mikroskopický snímek z Motic Red Line, Red-233, objektiv 10, Dino Eye C-Mount Camera, Šárka Vlachová: a) kutikula, b) pokožka, c) svazky vláken, d) parenchymatické pletivo e), dřevovina f) dřeň, g) trichom, popsáno podle (Rybáček et al. 1965).

2.2 Růst a vývoj konopí setého

Studium fenologie rostliny konopí setého je mimo jiné důležité pro správné načasování sklizně. Při využití rostlin na vlákno je technologická zralost, tedy nejvyšší kvalita vlákna v době květu samčích rostlin. Pokud je rostlina konopí setého zpracovávána na semeno pro získání oleje, nejlepší doba pro sklizeň je jeden až dva týdny před plnou zralostí semene, kdy přibližně 50% rostlin v porostu dosahuje plné zralosti semen (Mediavilla et al. 1998).

Podle základního (primárního) členění růstových fází rozlišujeme následující hlavní fáze životního cyklu rostliny a to- klíčení a vzcházení, růst, kvetení a zrání semen a poslední fázi stárnutí (Rybáček et al. 1965). Toto základní členění je dále rozděleno kódovou stupnicí jako sekundární členění. Česká odborná literatura

zpravidla hodnotí životní cyklus rostliny, tedy růst a vývoji, podle makrofenologické (sledování růstového období) a mikrofenologické (sledování organogeneze) stupnice. Fáze vzcházení trvá 3-15 dní, v této fázi je důležité, aby byla půda správně upravena a nedocházelo k tvorbě tzv. škraloupu (Ruman 2014). Vegetační (růstová fáze) probíhá přibližně 80 dnů (Miovský et al. 2008). Rybáček et al. (1965) ji člení na fázi pozvolného a rychlého růstu. Pozvolný růst trvá od rozvinutí děložních lístků až po vytvoření třetího páru listů, při této fázi pomalu roste nadzemní část a rychle kořen. Pro fázi rychlého růstu je charakteristické zapojení porostu a rychlý růst stonku, tvoří 1/2 až 2/3 hmoty stonku a z hlediska výnosu stonku je tato fáze nejdůležitější. Nasazování pupat probíhá v období nejrychlejšího růstu a začínají se projevovat rozdíly mezi samčími a samičími rostlinami (Ruman 2014). Začátek květu značí změny postavení listů na rostlině (fylotaxe). Samčí květy se objevují na rostlině téměř o dva týdny dříve a převážně nepravidelně dozrávají. Samičí rostliny kvetou v průběhu celé fáze kvetení. Ve fázi zrání semen a stárnutí rostlinám začínají vadnout listy a stonky rovněž začínají usychat, rostlina se pomalu rozkládá a od stonku se začínají uvolňovat vlákna. Pro odběry rostlin ve správném stupni vývoje, se dle popisu na stupnici, musí většinou ve vzorcích populace vyskytovat 50% rostlin spadající charakteristikou k dané fázi (Mediavilla et al. 1998).

Konopí je relativně odolné k chladnějším podmínkám ve fázi vzcházení, a proto vytváří poměrně brzy dobře zapojený porost a tím rovněž zabraňuje rozvoji nežádoucích, konkurenčních rostlin. S teplotními požadavky souvisí vegetační perioda rostliny uváděná v rozmezí od 60 do 160 dnů v závislosti na podmínkách pěstování (Barron et al. 2003).

2.3 Pěstování konopí setého

2.3.1 Historie pěstování ve světě

Konopí je rostlina s velmi dlouhou historií pěstování, sahající k počátkům zemědělství, tedy okolo šesti až deseti tisíc let. Díky tak dlouhé době zkulturnování rostliny je složité určit její původní areál rozšíření, nicméně je všeobecně uváděn z

temperátních oblastí střední Asie, odkud se šíří do oblastí položených nízko i vysoko nad mořem například v pohoří Himaláji či v okolí Kaspického moře (Bazzaz 1975).

Z pohledu archeobotaniky byly na území Evropy datovány nálezy rostlinné části konopí až do dob neolitu (mladší doby kamenné). Tyto nálezy souvisejí především s rituály a životním stylem kmenů (Anonym 1. 2014, Ruman 2014).

Pěstování této plodiny se stalo populární hlavně díky jejímu průmyslovému zpracování pro výrobu kvalitního pevného vlákna. Pěstování konopí setého se rozšířilo prakticky do celého světa, vyjma oblastí extrémně nevhodných pro pěstování, jako jsou oblasti u polárního kruhu, či rozsáhlá území v Africe v povodí řeky Niger a v jižní Americe v povodí řeky Amazonky. Písemné zmínky o konopí sahající do dob římského přírodovědce Plinia, či důležitost konopných vláken používaných v mořeplavbě, písemnictví, při výrobě textilií a v neposlední řadě v lidovém léčení, svědčí o kulturním významu rostliny (Ruman 2014). Konopí seté se ve světě pěstuje především na získání vlákna a semene sekundárně se využívá konopný odpad, ten ovšem nabývá na významu, z důvodu zpracování pro stavební a energetický průmysl. Dnes je největším producentem konopí pěstovaného na vlákno Asie. V 50. letech minulého století tomu bylo naopak a dnes je Evropa největším producentem konopného semene v čele s Francií, s produkcí 50- ti tisíci tunami ročně. Amerika příliš v pěstování konopí nevyniká, uvádí se průměrně 2-3 % z celkové světové produkce (Faostat 2015),

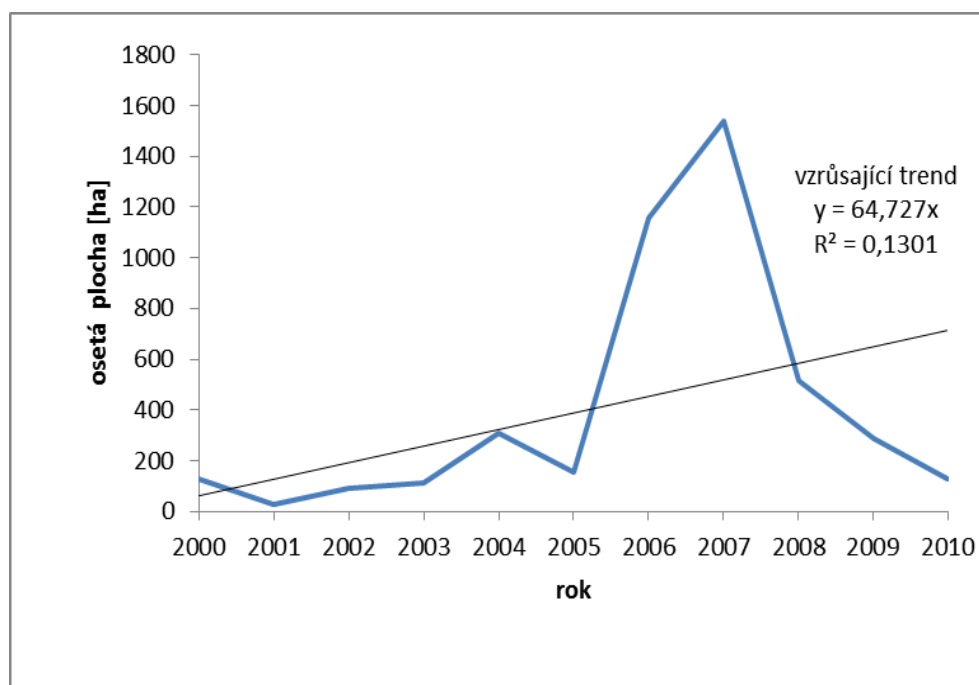
2.3.2 Historie pěstování v České Republice

Na území Čech byly doloženy nejstarší nálezy konopné suroviny z doby neolitické, starší doby bronzové či z doby laténské, kdy území osidlovaly kmeny keltské, jež záměrně vyráběly rozličné nástroje a tkaniny (Anonym 1. 2014, Ruman 2014).

O využívání konopné suroviny v Čechách a o zvycích s tím spojených je možné se dovědět především z různých expozic v muzeích, jako například v Netolicích na jihu Čech, na výstavách a v soukromích skanzenech, zaměřených na tradiční zpracování konopí na vlákno a na semeno. V dnešní průmyslové či technologické

době se setkáváme s dalšími způsoby využití například v automobilovém průmyslu, při výrobě fermeží, aj.

V České Republice se po zhruba padesátileté odmlce znovu setkáváme s renesancí v pěstování a využívání konopí jako plodiny s mnohostranným využitím. V Čechách je konopí pěstováno jako okrajová plodina. Průměrná osevní plocha v období mezi roky 2000-2010 činila přibližně 400 ha s minimálním osevem 29 ha v roce 2001 a maximálním osevem 1538 ha v roce 2007. Mezi roky 2010 a 2013 činila plocha osetí přibližně 200 ha. Z obr. č. 4 je patrný vzrůstající trend, nicméně střední hodnota (medián) osevní plochy v České Republice je přibližně 220 ha (Anonym 8. 2015).



Obrázek č.4: Osevní plocha konopí setého v ČR. Přejato od (Anonym 8. 2015)

U semene dosahují výnosy konopí rozmezí 0,6-0,8 t/ha, u stonku 6-9 t/ha. Výnos vlákná činil od roku 2003 v průměru 1,6 t/ha. V porovnání s roky 2000-2002 kdy výnos činil průměrně 2,3 t/ha jsou výnosy vlákná tedy o něco menší (Anonym 8. 2015). Zajímavé je, že zvýšení osevních ploch mezi roky 2005 a 2008 koreluje s celosvětově zvýšenou produkcí konopí, zřejmě z důvodu vyšší poptávky na trhu. Česká Republika je řazena mezi prvních 5 producentů konopného vlákná s největším výnosem (Anonym 6. 2015).

2.3.3 Produktivita konopí setého

Výnos dané plodiny je hlavním cílem pro šlechtitele nových odrůd i farmáře. Výnos je ovlivněn mnoha faktory, zejména klimatickými a dostupností živin. Biologický i hospodářský výnos je mimo jiné dán účinností využití sluneční energie při tvorbě biomasy. Celkový výnos zrna je kontrolován mnoha tisíci geny a proto záleží i na odrůdě rostliny. Předpokládá se, že konopí je schopné se vzrůstajícím množstvím oxidu uhličitého zvyšovat množství fixovaného oxidu uhličitého za zvýšené produkce biomasy.

Konopí seté může být pěstováno v mnoha typech půdy, uvádí se, že konopí nejlépe reaguje na hluboké, provzdušněné (kypré), humusem dobře zásobené půdy spíše hlinité, dobře zásobené vodou, nikoli ale s vysokou hladinou spodní vody. Optimální hodnota 6-7,5 pH. V závislosti na hloubce půdy a půdním druhu může být ovlivněna kvalita vláknů (Barron et al. 2003). Reakce na klima je u konopí rovněž velmi široká v závislosti na odrůdě, může dobře růst při vysokých i nižších průměrných teplotách, konopí ale obecně vyhovuje mírné klima s průměrnými denními teplotami 14-27 °C. Při nepříliš vhodných podmínkách, může porost dříve přecházet do fáze tvorby květů a ovlivnit produkci stonků a kvalitu vláknů. Produktivita porostu může být ovlivněna určitými druhy plevelů, které se přizpůsobí při dobrém zapojení porostu nižší intenzitě ozáření. Pro konopí seté bylo charakterizováno mnoho škůdců (přibližně 300) a chorob (přibližně 100), nicméně nebyly pozorovány velké ztráty produkce z důvodu napadení porostu a je tedy k výskytu škůdců tolerantní a k chorobám více či méně rezistentní. Významné ztráty ve výnosu semen mohou být způsobeny konzumací semen ptactvem. Rovněž přemnožení slimáci mohou způsobovat vyšší ztráty. Významný vliv na množství sklizených semen a kvalitu konopných produktů (vláken, květenství, semen) má sklizeň a její zpracování (Barron et al. 2003).

2.3.4 Bioaktivní látky konopí setého

Biologicky aktivní látky získávané z rostlinného materiálu vznikají převážně v rámci takzvaného sekundárního metabolismu rostlin, kdy z látek zásobních,

jednoduchých, vznikají látky složitější, které rostlina používá především za účelem obranného mechanismu nebo určitého způsobu zvýhodnění (zvýšení Fitness).

Chemické složení konopí setého je velmi komplexní a obsahuje široké spektrum primárních (aminokyseliny, mastné kyseliny a steroidy) i sekundárních metabolitů (mono a sesqui terpeny, flavonoidy, stilbenoidy, ligandy, alkaloidy a vitamíny), které se mohou navzájem ovlivňovat (Flores-Sanchez, Verpoorte 2008, ElSholy, Slade 2005).

Konopí je známé především obsahem C_{21} terpenofenolických kanabinoidů, sekundárních metabolitů, jejichž deriváty jsou považovány za nejúčinnější bioaktivní složku. Od roku 1840, kdy byly poprvé zaznamenány pokusy o získání extraktu z listů a květů konopí *Cannabis sativa* (Mechoulam 2000), bylo izolováno a popsáno mnoho terpenofenolických analogů a transforerů kanabinoidů. Prvotně jsou členěny na 5 skupin kanabinoidů (dibenzopyrany, difenyly, monoterpeny založené na p-cymenu a další deriváty monoterpeny) které jsou dále podle ElSholy, Slade (2005) řazeny do 10 typů:

1. Kanabigerol (CBG)
2. Kanabichromen (CBC)
3. Kanabidol (CBD)
4. (-)- Δ^9 - trans- Tetrahydrokanabinol (Δ^9 - THC)
5. (-)- Δ^8 - trans- Tetrahydrokanabinol (Δ^8 - THC)
6. Kanabicyklol (CBL)
7. Kanabielsion (CBE)
8. Kanabinol (CBN)
9. Kanabitriol (CBT)
10. Typy s neobvyklou strukturou

Biogenezi kanabinoidních sloučenin předchází kanabinoidní kyseliny, které mají zásadní význam pro pochopení syntézy kanabinoidů. V průběhu 80. let se z konopí izolovaly a určily mnohé kanabinoidy a byla sestavena předpokládaná dráha jejich syntézy, která je katalyzovaná mnoha enzymy. Jako prekursori syntézy jsou označovány pyrofosfát a olivetolová kyselina, ze kterých vzniká kyselina

kanabigerolová. Kanabigerolová kyselina (CBGA) je prekurzorem pro syntézu kyseliny kanabidolové, kyseliny (-)- Δ^9 - trans - tetrahydrokanabinolové a kyseliny kanabichromenové. Je předpokládáno, že za působení tepla, světla a dlouhodobého skladování mohou být kyselin přeměněny v dekarboxylované analogy (neutrální formy kanabinoidů), které jsou farmakologicky aktivnější. Doposud ale není zcela zřejmé, jakou roli hraje možná fotochemická cyklizace, oxidace či izomerace (Hazekamp 2007)

Základní schéma procesu nazývaného uzrávání pryskyřice konopí setého uvádí Hazekamp (2007):

Kyselina kanabidiolová je přeměněna v kanabidiol (CBD) tetrahydrokanabidiol (THC) a následně v kanabinol (CBN).

Koncentrace metabolitů záleží na typu pletiva, věku, varietě, růstových podmínkách (výživě, vlhkosti a ozáření porostu), době sklizně a skladování.

Mnoho látek ze skupiny sekundárních metabolitů má léčebný potenciál, který byl dokázán například v bakteriologických experimentech (Kabelík, Krejčí, Šantavý 1960). Podle obsahu účinných látek jsou kanabinoidy rozlišovány na typy aktivní (pryskyřičné) a průmyslové, pěstované na získávání vlákna s nízkým obsahem psychoaktivní složky (Δ^9 - THC). Efekt kanabinoidů je zkoumán mnoho let, z počátku byly sledovány antibakteriální účinky například v surovém extraktu z listů konopí (Krejčí, Šťastný 1955). Nedlouho poté byl objeven endokanabinoidní systém u člověka. Díky objevení endokanabinoidního systému se stalo konopí rostlinou široce používanou pro různé experimenty v souvislosti s nádorovým bujením a výzkumem psychických či fyzických chorob.

Fetterman et al. (1971) ve své práci rozděluje konopí z hlediska poměru obsahových látek na dvě skupiny a to fenotyp I, do kterého spadají, rostlin které vykazují poměr (tetrahydrocannabinol + cannabiol)/(kyselina canabidiolová + cannabidiol) větší než 1,0 a reprezentují biologicky aktivnější typy konopí. Do druhého typu (fenotyp II) jsou v práci řazeny rostliny pěstované na vlákno a mají výše zmíněný poměr menší než 1,0. V práci dokazuje, že obsah (Δ^9 - THC) stoupá ve směru semeno, kořen, delší stonek, kratší stonek, list, samčí květ, samičí květní plátek a z předběžných výsledů růstové periody (8-19 týdnů) usuzuje na obsah kanabinoidů v mladých rostlinách, které dosahují až 0,87 % v 18. týdnu růstu.

V navazujících studiích jsou chemotypy rozděleny i do více tříd například podle Small, Beckstead (1973) do 5 chemotypů.

2.4 Biologické testy

Při zkoumání biologické aktivity látek vychází mnohé experimenty z tvrzení známého předchůdce novodobého lékařství oslovovaného Paracelsa:

„Dosis sola facit ut venenum not sit“. Každá biologická či chemická substance je v podstatě jed a to, zda se účinek projeví, záleží jen na dávce (Prokeš et al. 2005).

Z tohoto předpokladu vychází i hodnocení účinků látek rozličného charakteru. Odvětví toxikologie používá řadu principů při zkoumání dané látky označované jako potenciální škodlivina (nox). Podle náležitosti k příslušnému oboru sleduje účinky, synergismu a antagonismu, potenciaci, mechanismy účinků látky na molekulární úrovni a metabolismu noxu, stanovuje maximálně přípustné koncentrace a dávky noxu, v rámci toxikologických principů provádí expoziční testy a řeší otázky spojené s výrobními technologiemi. Pro posouzení „bezpečnosti“ látky se hodnotí řada parametrů. Nejčastěji využívanými jsou terapeutický index (poměr mezi dávkou toxickou LD_{50} a terapeutickou ED_{50}), terapeutická šíře (aritmetický rozdíl mezi ED_{50} a LD_{50}). Zajímavým projevem noxu (zkoumané látky) může být takzvaný hormetický efekt, kdy účinek látky, který by byl za vyšších koncentrací toxický, může mít v malé koncentraci stimulační efekt na metabolismus organismu a jeho projevy. V rámci tohoto efektu je rozlišován vliv expozice sloučeniny vlastní a cizorodé. Musí být brána v úvahu možnost reakce spojená se snahou odolávat útoku cizorodé látky (obraně schopnosti) v návaznosti na zpětnou restituci (vrácení se do původního stavu) nebo reparaci (vyrovnání s následky), (Prokeš et al. 2005).

V provozech, které zpracovávají látky rostlinného původu pro výrobu léčiv, je velmi složité nahlížet na rostlinný materiál jako na vzájemně propojený a komplexně působící celek, nicméně výzkum synergických vlastností má ve fytoterapii velký význam (Wanger 2011). Podle Peče et al. (2012) je na snaze vytvořit jednoduché analytické nástroje ke zhodnocení obsahových látek a agrotechnické odlišnosti pro netechnický způsob využití rostliny. A to zejména z toho důvodu, že nelze určit množství všech obsahových látek v rostlině, jejich vzájemné působení, mnohdy ani původ rostlinného materiálu a podmínky pěstování. Pro účely farmaceutického

průmyslu se zpracovávají rostlinné metabolity do formy extraktů, například pro konopí preparát zvaný Sativex (standardizovaný extrakt z konopí), u kterých lze přesně určit obsah účinných látek (drogy), jejich chemické složení a strukturu. Dále v rámci výrobního cyklu lékové aj. formy, přicházejí na řadu metody umělé syntézy sloučeniny pro efektivnější výrobu léku a výše zmíněné testy toxicity (toxikologie farmaceutická) v prvopočátku na tkáňových kulturách a posléze na vyšších organismech (Farnsworth et.al 1985)

Tkáňové kultury se nejčastěji uplatňují v primárním výzkumu a farmakologii. Biologické testy na tkáňových kulturách mají povahu primárních zkoušek (Farnsworth 1985) . Uplatnění tkáňových kultur je podporováno v oborech, které testují chemické či biologické látky na vyšších organismech. Snahou Evropského centra pro validaci alternativních metod je minimalizace používání počtu jedinců a jejich částí k experimentálním účelům jako je expozice s cizorodými látkami nebo hodnocení rizik (Anonym 3. 2014).

2.4.1 Tkáňové kultury

Podle histologické charakterizace, může být tkáň chápána jako vyšší jednotka uspořádání diferenciované buňky. Tkáň může být složena pouze z buněk či z buněk a mezibuněčné hmoty. Tkáň je základně členěna na epitelovou, pojivovou, svalovou, nervovou a krev (Vacek 1990). Není lehké sledovat individuální savčí buňky v živém organismu, proto je mnoho studií prováděno na buňkách, které byly izolovány z různých organismů (explantáty) a rostou v kultivačních baňkách za přítomnosti esenciálních živin a dalších faktorů. Zpravidla jsou explantáty považovány za in vitro kultury, pokud jsou udržované v in vitro podmínkách více než 24 hodin. Tkáňová kultura je, na rozdíl od buněčné kultury pěstovaná in vitro tak, aby byla umožněna diferenciace a zachovala se struktura a funkce tkáně (Leško, Veber, Hána 1957). V podmínkách in vitro kultivace můžeme rozlišit tři typy tkáňových kultur s určitými charakteristickými znaky a vlastnostmi (Činátl, Novák 1968):

1. Primokultury- jsou buňky různého charakteru odebrané z tkáně.
2. Buněčné kmeny- jsou jeden vyselektovaný typ buněk z primární kultury převedené tzv. pasážováním do nového média, charakteristická je omezená životnost daná počtem pasáží.
3. Buněčné linie- schopnost téměř nekonečného opakování pasáží in vitro, jsou označovány jako imortalizované, vytvořené cílenou selekcí z primárních kultur.

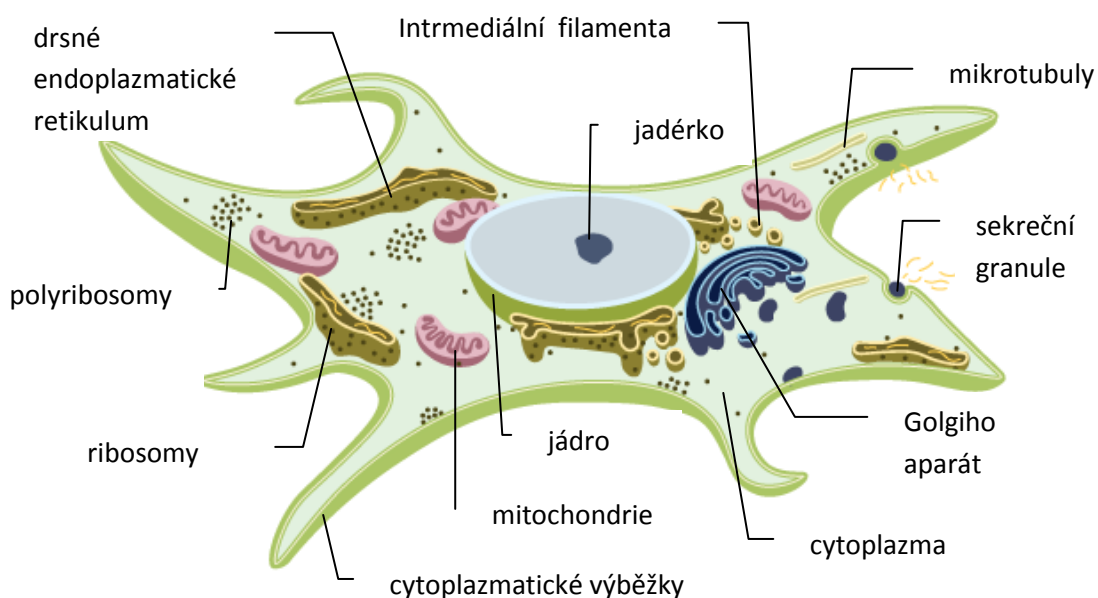
Buňky v primokulturách mají za normálních podmínek omezený počet dělení a hynou. Lidské fibroblasty hynou asi po 25-40 děleních. Má se za to, že tento efekt senescence souvisí se zkracováním telomer chromozomů, poškozením DNA, nebo se jedná o obranný mechanismus proti vzniku rakovinných onemocnění. Použití primárních kultur je praktické pro výzkumy, které se snaží o to, aby se experiment co nejvíce přiblížil fyziologickému stavu organismu například při výzkumu epigeneticky zaměřených terapií. Například ve studii Bernstein et al. (2015) byla, za použití primární kultury lidských fibroblastů, záměrně indukována genová exprese, pomocí umělého aktivátoru transkripce, pro usnadnění buněčného cyklu k možnému použití v regenerativní medicíně.

Buněčné kmeny se požívají například při zkoušení vakcín a vhodnosti kultivačních medií (Leško, Veber, Hána 1957).

Buněčné linie jsou charakteristické změnami v metabolismu a karyotypu (kontaminace, latentní kontaminace viry, přidání antibiotik, nevhodným kultivačním prostředím aj.) Klasické modely kultivace buněčných linií jsou převážně dvojího typu spojené buď s vytvořením jedné vrstvy buněk přichycené na podkladový materiál (plastová miska, sklo) tvořící takzvaný „monolayer“ nebo modely založené na kultivaci buněk v suspenzi. V minulosti či v současnosti používané stabilizované buněčné linie jsou například: AM-57-TS, BHK-21 (C13), DETROIT 6, GMK, HeLa, L, VERO (Leško, Veber, Hána 1957). Savčí buňky se mohou sami od sebe, např. při mutaci v DNA stát nádorovými a proliferovat (dělit se) bez příslušných stimulů do nekonečna jako tzv. nesmrtelné buněčné linie. Přestože nejsou považovány za klasické (zdravé) buňky, jsou široce používány, protože poskytují zdroj geneticky homogenních buněk, který může být bez potíží udržován a používán. Někdy se tohoto stavu dosahuje záměrně fúzí rakovinné buňky s normálním žádaným typem buňky za vzniku tzv. hybridomu (Alberts et al. 2002).

V práci se zabývám fibroblastoidní linií, a proto budou dále rozvedena pouze související témata.

V histologickém členění řadí Vacek (1990) fibroblasy (fibrocyty) mezi buňky řídkého vaziva pojivové tkáně (intersticiální). Toto vazivo je označováno jako vmezeřené, vyplňuje štěrby mezi orgány, spojuje jejich části a skládá se ze sítě převážně nepravidelně uspořádaných kolagenních vláken, mezi kterými se nachází tkáňová tekutina a buňky (fibrocyty, histiocyty a plazmatické, žírné pigmentové či tukové buňky). Jednoduchá pojivová tkáň vzniká převážně ze středního zárodečného listu (mezenchymu), z kterého se později vyvíjí různé druhy pojiv, hladké svalstvo či cévní systém. Fibrocytů je ve vazivu nejvíce, mají oválné jádro s řídkce rozptýlenými zrnky chromatinu, jsou ploché, nepravidelného tvaru, často s výběžky (Vacek 1961) viz obrázek č.5.



Obrázek č.5: Živočišná buňka fibroblastu: Upraveno podle (ANONYM 5. 2015).

Hlavním produktem a aktivitou fibroblastu je syntéza kolagenního, retikulárního i elastického vlákna a glykosaminoglykanů a glykoproteinů amorfní mezibuněčné hmoty, tedy produkce vláken a základní hmoty buňky (Junqueira, Carneiro, Kelley 1995). Fibroblast má v organismu, strukturální funkci a je nejčastější vazivovou buňkou v organismu. Podle syntetické aktivity je fibroblast dělen na aktivní a neaktivní, ten je poté mnohdy označován jako fibrocyt (starší, méně aktivní buňka), rozdíly mezi aktivní a neaktivní formou fibroblastu ukazuje tabulka č. 1. Dospělé fibroblasty se ve vazivové tkáni dělí jen výjimečně. Při procesu hojení ran se fibrocyt

může navrátit do stádia fibroblastu a může dojít i k reaktivaci (restituci) jeho funkcí (Vacek 1990; Junqueira, Carneiro, Kelley 1997).

Tabulka č.1: Rozdíl mezi aktivní a neaktivní formou fibroblastu, upraveno podle Vacek (1990).

AKTIVNÍ	NEAKTIVNÍ
<p>nepravidelně větvená cytoplazma, jádra oválná, velká, slabě se barvící, jemná chromatinová struktura, zřetelný nukleolus, hodně drsného endoplazmatického retikula, dobře vyvinutý Golgiho komplex</p>	<p>menší buňka, vřetenovitý tvar s méně početnými výběžky, menší tmavší protáhlé jádro, acidofilní cytoplazma s malým množstvím drsného endoplazmatického retikula</p>

Na rozdíl od základních histologických charakteristik fibroblastu jsou pro tkáňové kultury používány fibroblastoidní linie, které se svým tvarem podobají fibroblastům (vřetenovitý tvar), jejich původ a schopnosti mohou být ale odlišné (Leško, Veber, Hána 1957).

Buňka je základní stavební jednotka organismu a vzniká pouze z buňky, jak prokázal v 19. století německý lékař a zároveň politik Rudolf Virchow. Tímto v návaznosti na Jana Evangelistu Purkyněho, Matthiase Jacoba Schleidena a Theodora Schwana, dal průchod buněčné teorii (Fendrich 1947). Základní funkcí buňky je příjem živin a rozmnožování. Děje se tak na základě buněčného cyklu. Podstatou buněčného cyklu je přesná duplikace DNA v chromosomech a jejich přesná segregace do dvou identických dceřiných buněk. V systému tkáňových kultur se ale můžeme běžně setkat i se vznikem několika jaderné buňky, nápadně odlišné svou velikostí, kdy se jádro rozdělí, aniž by se společně rozdělila i cytoplazma buňky (viz obr č. 6).

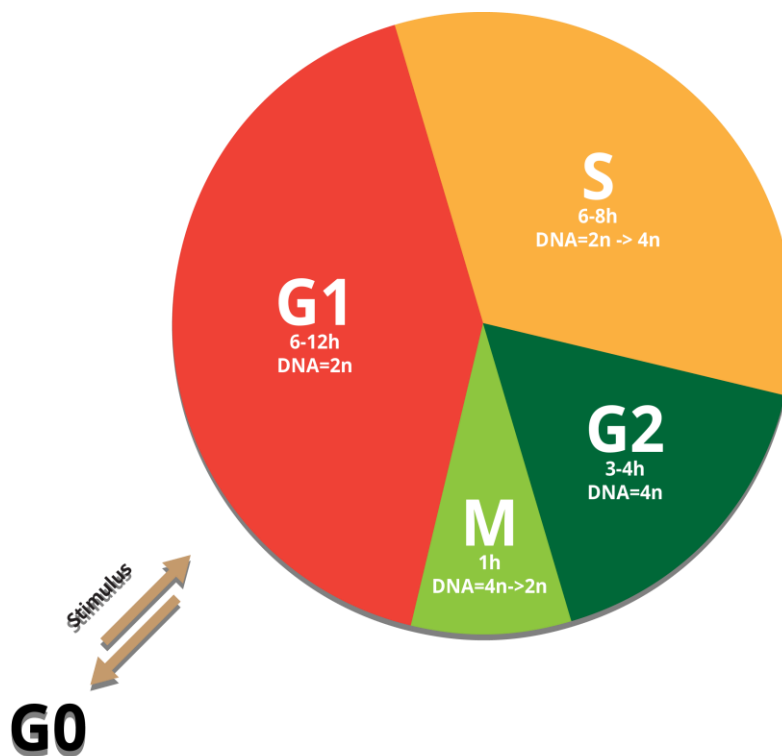


Obrázek č.6: In vitro kultivované savčí buňky. Modře zakroužkovaná dvoujaderná buňka fibroblastoidní linie myšičího původu. Foto BioStation: Šárka Vlachová.

Nepřímé dělení buňky má dvě hlavní fáze označované jako S a M: S (syntetickou) fází, která potřebuje průměrně 6-12 hodin a v typické savčí buňce trvá asi polovinu buněčného cyklu viz obr č. 7. Během S fáze dochází k syntéze všech důležitých molekul potřebných pro zdárnou duplikaci buňky. Po ní následuje M (mitotická) fáze, ve které dochází k segregaci chromozomů a buněčnému dělení, tato fáze je mnohem kratší a vyžaduje přibližně necelou 1 hodinu. Základní organizace buněčného cyklu je velmi konzervovaná u všech eukaryotických buněk. Molekuly zodpovědné za přechod z jedné fáze buněčného cyklu do druhé se nazývají cyklin dependentní kinázy a cykliny, které spolu tvoří komplexy, které fosforylují a tím aktivují jiné proteiny (Alberts et al. 2002).

Většina buněk vyžaduje o hodně více času k růstu a zdvojnásobení množství stavebních látek a organel, než je potřeba k replikaci DNA a dělení. Proto jsou do buněčného cyklu vloženy tzv. G fáze (z anglického gap = mezera), které jsou ve většině buněčných cyklů vloženy mezi M a S fází (G1 fáze) a mezi S a M fází (G2 fáze). Z tohoto důvodu je eukaryotický buněčný cyklus tradičně rozdělen do 4 po sobě jdoucích fází. G1,S,G2 a M. G1,S a G2 jsou dohromady označovány jako

interfáze a v typické lidské buňce množící se v kultuře zabírají 23h z 24 cyklu. G fáze kromě více času na syntézu důležitých látek také poskytují buňce možnost zjistit, zda jsou příznivé vnitřní a vnější podmínky, nebo např. zda DNA není poškozena. Jestliže jsou okolní podmínky nepříznivé, buňky mohou vstoupit z G1 fáze do tzv. G₀ fáze, ve které mohou přežít i několik let (Alberts et al. 2002).



Obrázek č.7: Buněčný cyklus: Uvnitř grafu jsou znázorněny fáze buněčného cyklu, přibližná doba fází, vlevo dole je znázorněna fáze tzv. stagnace. Upraveno podle (Anonym 7. 2014).

Po nasazení procházejí buňky v in vitro tkáňové kultuře fází disperze, uchycení, množení, a fází degenerace (Činátl, Novák 1968). Mezi sledované ukazatelé účinku biologicky aktivních látek při aplikaci na tkáňové kultury patří například:

- a) rekonstrukce cytoskeletu – spreading (dilatace) ukazuje rychlost populace buněk adherovat k substrátu (dno pokusné misky) a tím i rychlost reparace cytoskeletu po inokulaci v buňkách ošetřených enzymaticky (Abercombie, Heaysman, Karthaus 1957, LaFlamme et al. 1994).
- b) růstová rychlost vyjádřená jako specifická růstová rychlost nebo průměrná doba zdvojení (Půža 1976).
- c) změna morfologie buněk a výskyt atypických dělení, nebo zpětných buněčných fúzí (Michl 1997).

2.4.2 Tkáňové kultury v kinematografii

Eukaryotní buňky tkáňových kultur mají velikost přibližně 17-150 μm . Jsou tedy pro lidské oko, které je schopno zaznamenat obraz ne menší než 0,1 mm příliš malé na to, aby se daly pozorovat přirozeně. Důkladně pozorovat (zkoumat) stavbu a funkci buněk je pro daný účel možné pouze ve správně funkčně a technicky sestaveném mikroskopu (Stanley 2008).

V současné době je pro pozorování buněk používána mikroskopie v temném poli kde, podstatná část procházejícího světla je pohlcena kondenzorem s centrální clonou, přičemž číselná aparatura objektivu musí být vždy menší, než aparatura použitého kondenzoru. Převrácený a zdánlivý obraz je tedy znázorněn v tmavém poli, na objekt dopadá difraktované světlo a pozorovaný objekt je zářivě osvětlen, iluminován a tedy v kontrastu s tmavým polem (Stanley 2008).

Při aplikaci fázového kontrastu dochází k lomu světla na rozhraní dvou rozlišných struktur (materiálů) s rozdílným refrakčním indexem definovaným pomocí rozdílu mezi jasem pozorovaného objektu a jasem pozadí. K takovému zobrazení, je používán speciální fázový kontrastní objektiv a fázový kontrastní kondenzor (Stanley 2008).

Pro pozorování v reálném čase, se v rámci dlouhodobého mikroskopického pozorování řádově v 1-5 dnech, používá technika časosběrného snímání v určitých časových intervalech (například v mé práci používám rytmus 1 obrázku po 2 minutách). Na mikrokinematografických záznamech je možné pozorování aktivního pohybu buňky v rámci buněčné kultury. Buňky vnímají vnější podněty (dotyk, světlo, teplo, elektrický proud či různé látky) a zároveň na podněty reagují, nejčastěji pohybem (lokomocí) či energetickými změnami (vytvářením tepla nebo světla). Pokud jsou podněty nepřiměřené, dochází k jejich poškození, až smrti (Fendrich 1947). Počátky výzkumu funkce cytoskeletu buněčného pohybu v rámci mikrokinematografie odkazují na autory Gail (1973) a Abercombie, Dunn, Heath (1977). Ti sledovali především možnosti odlišit transformované či maligní buňky v tkáňové kultuře a charakterizovat možné dynamické morfologické markery. Význam takovýchto studií například potvrzuje a v dalších souvislostech doplňuje například výzkum Kim et al. (2015) který dokazuje spojení mezi aktinovou dynamikou a tvorbou cilií.

Lokomoce je pro eukaryotické buňky zcela přirozený děj, vyskytuje se v mnoha podobách jako komplexní systém představující migrace, tvorbu pseudopodií, endocytózu zahrnující fagocytózu (pohlcení a rozklad pevných částic) a pinocytózu (přijímání rozpuštěných látek), hadovitý pohyb mitochondrií, rotace jádra a mnohé další pohyby, které jsou charakteristické pro jednotlivé typy buněk (Činátl, Novák 1968.

Lawson 1997). Pohyb buňky je zprostředkován především takzvaným cytoskeletem. Trojrozměrnou sítí proteinových vláken na povrchu (i uvnitř) eukaryotické buňky, která je velmi dynamická a v rámci fylogeneze i konzervativní. V cytoskeletonu jsou obsaženy 3 hlavní funkční proteiny pro systém filament, jsou jimi mikrotubuly, intermediární filamenta a filamenta aktinu (mikrofilamenta). Společně tento systém tvoří síť, která je schopná reagovat na podněty ve vnějším i vnitřním prostředí buňky a podílí se například na imunitní reakci, vývoji embrya či na obnově tkání po zranění. Základní funkce cytoskeletu jsou v podstatě pro buňku zásadní, stejně jako příjem potravy a rozmnožování a s tímto také úzce souvisejí. Například cytoskelet udržuje tvar buňky a vnitřní architekturu, účastní se jaderného a buněčného dělení, pohybů organel a dalších buněčných struktur, či přenosu signálů a dalších funkcí spojenými s ribosomy, vesikuly a bičíky (Lawson 1997).

Lawson (1997) zdůrazňuje význam cytoskeletu při invazi mnoha druhů bakterií a virů do buňky, při migraci nádorových buněk a dokonce i v souvislosti s některými chorobami jako je EBS, ALS aj. Například Talman et al. (2014) studoval šíření vnitrobuněčného patogena a úlohu aktinových vláken a zjistil, že defekt v rozkládání vláken aktinu má zásadní význam při šíření bakterie, ale neovlivňuje rychlost bakterie v cytosolu. Pro studium biologicky aktivních látek rostlin nejsou podobné testy reakce cytoskeletu, lokomočních aktivit či přenosu signálů zatím příliš používány. Hojně se využívají například takzvané MTT testy ve spojení s fluorescenční mikroskopií (Soares et al. 2014, Veleva et al. 2015).

3. CÍLE PRÁCE

1. Vyhodnotit vliv hustoty výsevu jako jednoho faktoru na výnosové prvky konopí setého.
2. Vyhodnotit jaký vliv má určitá koncentrace výluhu rostlinného materiálu na růst buněčné populace savčí fibroblastoidní linie L929.
3. Vyhodnotit změny biologické aktivity mezi různými částmi rostliny a různými variantami výsevu.

Předpoklady:

- a) Vliv hustoty výsevu na výnosové prvky dané odrůdy.
- b) Výluh konopí setého ovlivní růstovou rychlost buněčné populace v tkáňové kultuře, jako specifickou, nebo průměrnou dobu zdvojení buněk.
- c) Vliv hustoty porostu a části rostliny na biologickou aktivitu extraktu.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Použitý materiál

Pro pokus byla použita certifikovaná odrůda konopí setého Tiborszallási, původem z Maďarska. Je to středně pozdní varieta s kvalitou osiva C1, bez chemického ošetření. Odrůda je dvoudomá s příměsí samčích rostlin v rozmezí 51-52%, charakteristická včasným vzcházením a dobrou konkurenceschopností s průměrnou výškou 2,5-5 m a HTS 18-22g. Číslo zahraniční partie a země původu osiva: H-4-096/0116. Číslo přidělené tuzemské partii 4-2434-29001/01. Hmotnost tisíce semen ze vzorku zakoupeného osiva byla 17,739 g. Klíčivost semen osiva pro založení polního pokusu byla stanovena na 96 % (stanovena za použití filtračního papíru).

4.2 Založení maloparcelového polního pokusu

Stanovení produkčních parametrů v závislosti na hustotě výsevu výše zmíněné odrůdy bylo zkoumáno na 2 lokalitách. Obě lokality byly založeny v Českobudějovické pánvi zhruba 20 km od sebe. Lokality se mírně liší v hydrometeorologických podmínkách, jak znázorňuje tabulka č. 2. Pokus byl sestaven z dílců o velikosti 6 m², ve znárodněném uspořádání. Byly zvoleny 3 hustoty výsevu a to 100, 200 a 300 rostlin na m². Semena byla zaseta do hloubky 5-6 centimetrů a následně zaválen. Řádky byly 25 cm vzdálené. Lokality nebyly předem vyhnojeny a nebylo použito žádné jiné dodatečné živiny. Na lokalitě v Českých Budějovicích byl předchozí rok 2014 úhor. Parcely v Poněšicích byly připraveny z čerstvé zorané mezofilní louky.

Tabulka č. 2: Hydrometeorologické záznamy pro pokusné lokality pro rok 2014.

měsíc/lokality	úhrn srážek [mm]		teplota průměr [°C]	sluneční svit [hod]
	Hluboká nad Vltavou	České Budějovice	České Budějovice	České Budějovice
duben	25,2	21,9	6,8	166,5
květen	105,8	116,2	10,6	170,9
červen	32,8	32,2	12,8	262
července	128,6	115,3	17,6	233
srpen	87,9	112,4	19,7	134,9
září	75,4	75	16,4	115,8
říjen	50,1	43,7	14,4	94,3
listopad	9,8	12,6	11,1	39,4
průměr za rok	601	620,9	10,3	1596,5

4.2.1 Stanoviště pozemek České Budějovice

Územní charakteristika a podmínky

Území patří do mírně teplé, mírně vlhké oblasti s mírnou zimou. Klima je relativně kontinentální, srážkově nedostatkové. Průměrná roční teplota činí 7-8°C s průměrnou teplotou za vegetační období 13°C. Roční srážkový úhrn činí 550-700 mm s průměrem srážek za vegetační období 400-500 mm. Roční suma teplot nad 10°C je cca 2200-2500 hod. Pravděpodobnost suchých vegetačních období je 15-30% s vláhovou jistotou 4-10%. České Budějovice leží v říční nivě Vltavy a Malše, na terasovitých plošinách, tvořených nezpevněnými neogenními sedimenty nadmořské výšce přibližně 400 m. Na nevápnitých písčitéch půdách sedimentů teras se vytvořily hnědé půdy, místy hnědé půdy kyselé a hnědé půdy oglejené, jen lokálně černice. Substrát je častěji jílovitý než písčitý (Hrůša, Peláček 2000).

Z akreditovaného laboratorního půdního rozboru bylo stanoveno pH (KCl) pro půdní blok 6,77. Obsah fosforu 91 mg/kg, obsah draslíku v půdě 144 mg/kg, hořčíku 125 mg/kg a vápníku 1 056 mg/kg. Kationtová výměnná kapacita byla stanovena na 89 mmol /kg.

Příprava pozemku a výsevu

Zaseto 22. května 2014 maloparcelovým secím strojem Hege 80, pro hustotu 100 rostlin/m² bylo použito 14,2 g, pro 200 rostlin/m² 28,3g a pro 300 rostlin/m² 42,3g osiva.

Plán dílců (zdola vchod na pozemek):

100 (40)	200 (40)	300 (30)
300 (100)	100 (40)	200 (30)
200 (70)	300 (40)	100 (30)

V rámečku jsou označené hustoty výsevu na 1 m² s plánovanou a v závorce se skutečnou hustotou po vzejití porostu (dílece byly 1 m široké a 6 m dlouhé).

4.2.2 Stanoviště pozemek Poněšice

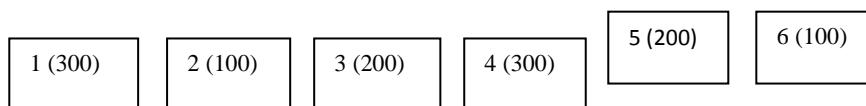
Územní charakteristika a podmínky

Území je řazeno do klimatického regionu MT2 s mírným klimatem. Průměrná roční teplota činí 7-8°C s průměrnou teplotou za vegetační období 13°C. Suma teplot nad 10°C činí 2200-2500. Počet dnů s teplotou alespoň 10°C je 140-150. Počet zatažených dnů je průměrně 120-150, počet jasných dnů 40-50. Ročním srážkovým úhrn činí 550-700 mm. Za vegetační období průměrně spadne 400-550 mm srážek. Počet dní se srážkami alespoň 1mm je 100-120. Průměrný roční počet dní s mlhou je 83-110. Vláhová jistota činí 4-10%. Pokusná plocha leží na pozemku se středním svahem 7-12° a severní expozicí. Půda je charakterizována jako středně skeletovitá a středně hluboká až hluboká. Geneticky spadá půda na lokalitě pod hnědé a kyselé půdy, druh půdy je středně těžký, na substrátu z kyselých metamorfovaných hornin. Půda může být místy slabě oglejená (Anonym 4. 2014).

Příprava pozemku a výsevu

Ručně zaseto 8. května 2014, vzešla pouze parcela č. 2, pozemek proto povrchově upraven lesní hrabankou viz obrázek č.31 v příloze a zaseto znovu 30. května 2014.

Plán dílců (zprava na jihozápad):



V rámečku jsou označené hustoty výsevu na 1 m² (závorce) spolu s číslem dílce (dílce byly 2 m široké a 3 m dlouhé).

4.3 Sledování v průběhu vegetace

Na pozemku v Českých Budějovicích porost nevzešel pro zvolené varianty podle očekávání. Špatná předseťová příprava, z důvodu deštivého počasí, způsobila nerovnoměrné upravení půdy s nemožností následného utužení lůžka. Po vyhodnocení hustoty porostu, byly pro stanovení produkčních parametrů zvoleny hustoty 100, 70 a 40 rostlin na m².

Na pozemku v Poněšicích byl porost po předchozí úpravě secího lůžka vyset v hustotě 300 rostlin m² na všechna políčka, následně byla hustota porostu ručně upravena na požadovanou hustotu ve vegetativní fázi 1008 dle tabulky č. 3.

Tabulka č.3: Klíč k určení růstové fáze konopí setého dvoudomého, přejato od (Mediavilla et al. 1998).

stupně růstové fáze	Kód	definice	poznámka
klíčení a vzcházení	000	suchá semena	
	0001	objevení kořínku	
	0002	tvorba hypokotylu	
	0003	rozvoj děložních lístků	
vegetativní fáze	1002	první pár listů	
	1004	druhý pár listů	
	1006	třetí pár listů	
	1008	čtvrtý pár listů	
	1010	pátý pár listů	
	10xx	n-tý párů listů	
kvetení a tvorba semen	2000	změna postavení listů na hlavním stonku	
	2001	tvorba květního primordia	
samci	2100	tvorba květů	první zavřené samčí květy
	2101	začátek kvetení	první otevřené samčí květy
	2102	kvetení	je vytvořeno 50% samčích květů
	2103	konec kvetení	je vytvořeno 95% samčích květů
samice	2200	tvorba květů	první samičí květy bez čnělky
	2201	začátek kvetení	okvětní plátky s čnělkou
	2202	kvetení	je vytvořeno 50% květů
	2203	zrání semen	první zralá semena
	2204	dozrávání semen	je zralých 50% semen
	2205	konec dozrávání semen	je zralých 95% semen
stárnutí	3001	vadnutí listů	listy jsou suché
	3002	vadnutí stonku	listy opadávají
	3003	rozklad stonku	volná lýková vlákna

Odběry vzorků probíhaly ve 3 fázích, podle stupně růstové fáze určené dle klíče v tabulce č. 3. a to ve fázi značené číslem 2201 začátek kvetení, 2203 zrání semen a 2205 konec dozrávání semen.

V rámci lokalit a u jednotlivých hustot výsevu byly sledovány následující produkční parametry konopí setého odrůdy Tiborszallasi: výška, produkce sušiny i čerstvé hmoty stonků, listů a květů pro fázi 2201 a 2203, a dále počet primárních větví, počet květů na květenství, počet semen na květenství a hmotnost tisíce zrn (HTZ) pro 2203 fázi viz tabulka č. 3. Byla stanovena produkce jednotlivých částí a celková produkce porostu v kg/m^2 a přepočtena v t/ha. Výška rostliny byla měřena z nadzemní části rostliny tj. bez kořene, listy byly váženy společně s řapíky. Primární větví květenství je označena první větev složitého hroznu, větvená od lodyhy (stonku) rostliny.

Z důvodu silného zaplevelení variant pokusu s nízkým počtem rostlin byla na pozemku v Českých Budějovicích navíc stanovena čerstvá biomasa z nadzemní části plevelů na jednotce plochy v kg/m^2 .

4.4 Zpracování vzorků

Stanovení produkčních parametrů porostu konopí setého a úprava vzorků pro laboratorní analýzu byly zpracovány v Jihočeském vědeckotechnickém parku v Českých Budějovicích (JVTP).

Sušina listů a květů byla vážena z lyofilizátu, sušina stonků byla stanovena z laboratorní sušiny a převedena přepočtem na lyofilizovanou viz tabulka č. 4:

Tabulka č. 4: Stanovení rozdílů mezi sušenými a lyofilizovnými stonky konopí.

Vzorek č. /hmotnost	stonky před lyofilizací [g]	stonky po lyofilizaci [g]	rozdíl[g]	Rozdíl [%]
1	93,69	88,48	5,21	5,56
2	8,925	8,3	0,625	7,00
3	20,056	19,003	1,053	5,25
4	11,977	11,218	0,759	6,34
5	19,695	18,33	1,365	6,93
6	23,344	22	1,344	5,76
PRŮMĚR				6,14
SD				0,73

Přístroje a technika:

Laboratorní váhy Scout Pro od firmy Vitrum, analytické váhy Redwag AS60/C/2, Lyofilizátor TRIGON PLUS.

4.5 Experimentální kultivace na fibroblastoidní buněčné linii L929

Pokusy biologické aktivity lyofilizovaného materiálu byly uskutečněny v Ústavu komplexních systémů FROV JU v Nových Hradech v průběhu od 18. listopadu 2014 do 6. února 2015. V mé práci používám pro mikrokineatografické záznamy buněk v kultuře techniky založené na principech světelného mikroskopu v temném poli v zobrazení s fázovým kontrastem na mikroskopu v BioStation (Anonym 2. 2014). Pro biologický test byl sestaven a aplikován specifický postup přípravy výluhu a proveden test citlivosti na savčí tkáňovou kulturu, který byl vyhodnocen pomocí techniky sběrné kinematografie (time-lapse) a interpretován specifickou růstovou rychlostí buněk v tkáňové kultuře. Výluh byl připraven z květenství odebraných na začátku kvetení, listů na začátku kvetení, a z květenství odebraných ve fázi počátku zrání semen.

Jako modelový organismus byla použita fibroblastoidní linie myšního původu L929 získaná z katalogu ECACC viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5: Popis heteronukleární buněčné linie L929 dle katalogu ECACC:

Název buněčné linie	L929
katalogové číslo	85011425
popis	myš C34/pojivová tkáň
morfologie	fibroblast
číslo pasáže	P+7
způsob růstu	adherentní

1) Příprava výluhu konopí setého:

Lyofilizovaný materiál byl zbaven semen a za pomoci třecí misky částečně zhomogenizován na 1mm (zůstaly pouze části větviček o délce cca 0,2-0,5 cm). Rozmělněný materiál byl převeden do výluhového media DMEM High Glucose w/o L-Glutamin w/o, Na Pyruvate (LM-D1108) od firmy Biosera v poměru 1/10 tj. 5g sušiny do 50 ml media. Takto připravený výluh byl umístěn na 24 hodin do inkubační laboratorní třepačky při teplotě 37°C při otáčkách 100 PRM.

Dále byl aplikován šesti stupňový systém filtrace: 1. filtrace přes filtr ze směsi netkaných textilních vláken (Pervin 40 MF), 2. filtrace přes filtrační papír, 3. filtrace přes filtrační aparaturu s vývěvou přes 1,2 µm filtr 4. filtrace přes injekční filtr 0,45 µm v nesterilním prostředí, 5. filtrace injekčním filtrem 0,22 µm rovněž v nesterilním prostředí, 6. filtrace injekčním filtrem 0,20 µm ve sterilním kultivačním boxu. Takto upravený, přefiltrovaný vzorek byl následně uložen do laboratorní ledničky při 5°C a pokud možno co nejdříve aplikován k interakci s buněčnou linií v logaritmické koncentrační řadě.

2) Příprava pokusu pro BioStatin

Kultivační média a chemikálie:

- Syntetické kultivační médium DMEM High Glucose (4,5g/l), w/o L-Glutamin w/o, Na Pyruvate od firmy Biosera LM-D1108.
- Fetální bovinní sérum (FBS) South America od firmy Biosera FB-1001 (testované na sterilitu, mycoplasmata, specifické viry, testováno na schopnost podpory růstu v *in vitro* buněčných kultur, na schopnost buněk tvořit kolonie (PE- plating efficiency) a na schopnost buněk množit se (CE-cloning efficiency).
- L-Glutamin PM-P1410 od firmy Biosera
- Antibiotikum a antimykotikum 100X (zamražené) XC-A4110 od firmy Biosera.
- PBS fyziologický roztok pro oplachování buněčných linií s pH 7,3. Připravený z NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄.
- VT-verzen trypsin-roztok, Trypsinu EDTA (10x) a PBS- pro uvolňování „pouštění“ ze dna kultivační nádoby.

Postup přípravy koncentrační řady

Jako kultivační prostředí byly použity Hi-Q4 kultivační misky viz obrázek č. 8. Pro potřebný počet buněk k nasazení bylo připraveno inokulum pomocí nápočtu buněk v Bürkerově komůrce. Takto připravené inokulum bylo nasazeno do kultivační misky, a byly přidány doplňky s výluhem, viz tabulka č. 6 :



Obrázek č. 8: Kultivační miska Hi-Q4 od firmy Nikon. Foto: Šárka Vlachová

Tabulka č. 6: Postup přípravy média s výluhem na kultivaci v BioStation.

ředění výluh	kontrola	ředění A	ředění B	ředění C
			0,01	0,001
DMEM [μl]	1052,4	946,8	1041,84	1051,04
VÝLUH [μl]		105,6	10,56	1,06
VÝLUH [g/ml]	0	0,01003421	0,00100342	0,00010072
Bofes [μl]	120	120	120	120
ATB [μl]	12	12	12	12
L-Glutamin [μl]	12	12	12	12
Gentamicin [μl]	3,6	3,6	3,6	3,6
CELKEM VÝLUHU V BUNĚČNÉ KULTUŘE				
VÝLUHU g/ml		0,0088	0,00088	8,8333E-05
VÝLUHU g/l		8,8	0,88	0,088

Kultivační miska byla vložena do BioStation na dobu 72 hodin, při teplotě 37°C a při 5% CO₂, snímáno objektivem 20 PH2 při intervalu snímání 2 minuty a rozlišení 1280x960.

Pro každé ředění byly nastaveny 2 body snímání. Přičemž pro kontrolu byl použit pouze 1 bod snímání.

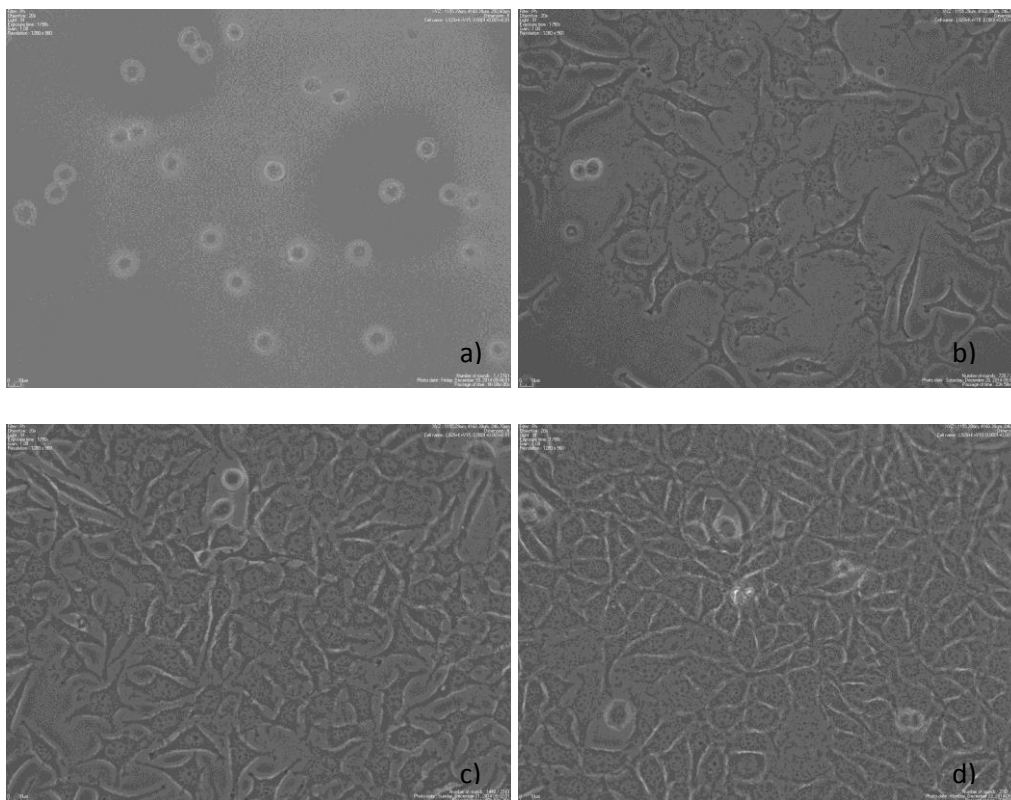
3) Vyhodnocení pokusu záznamu z BioStation.

Pro vyhodnocení specifické rychlosti růstu, byly počítány buňky ze 4 intervalů z celkového počtu snímků v programu ImageJ. A to ze snímku číslo 1, 720, 1440, 2161 (viz obrázek č. 9) pro každý bod snímání v ředění a v kontrole. Ze dvou bodů pro každé snímání byl vyhodnocen průměr, který byl použit pro výpočet specifické růstové rychlosti a průměrné doby zdvojení. Následně byla průměrná doba zdvojení přepočítána na procenta růstu populace dle následujících vzorců:

$$\text{SRR} = \ln(\text{počet buněk v posledním snímku}) - \ln(\text{počet buněk v prvním snímku})$$

$$\text{PDZ} = (\ln 2 / \text{SRR})$$

% růstu: počet buněk na začátku/ počet buněk na konci *100 (pro kontrolu = 100% a danou koncentraci); % růstu = kontrola 100% *100 / % růstu v dané koncentraci.



Obrázek č. 9: Na obrázcích jsou znázorněny snímky z BioStation a) 1. snímání b) 720. snímání c) 1440. snímání d) 2161. snímání fibroblastoidní linie buněk L929.

5. VÝSLEDKY

5.1 Výsledky z odběrů biomasy

Tabulka č. 7: Produkční parametry konopí setého odrůdy Tiborszallasi ve fázi začátek květu.

hustota	počet	délka	jednotky	výnos	výnos	výnos	výnos	výnos
výsevu	ks	stonek		květů	listů	stonku	celkem	celkem
m ²	m ²	cm		suché	suché	suché	suché	čerstvé
České Budějovice								
samice								
100	66	101,6	kg/ m ²	0,0	0,1	0,2	0,3	1,0
			t/ha	0,1	0,9	2,3	3,4	10,5
70	40	116,2	kg/ m ²	0,0	0,1	0,2	0,3	1,0
			t/ha	0,1	1,1	2,2	3,4	10,0
40	28	74,6	kg/ m ²	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3
			t/ha	0,1	0,4	0,6	1,1	3,0
samci								
100	30	143,6	kg/ m ²	0,0	0,0	0,1	0,1	0,4
			t/ha	0,2	0,3	1,0	1,4	3,8
70	32	137,2	kg/ m ²	0,0	0,0	0,1	0,2	0,5
			t/ha	0,1	0,4	1,2	1,7	4,6
40	14	113	kg/ m ²	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
			t/ha	0,1	0,1	0,3	0,5	1,3
Poněšice								
samice								
100	54	116,6	kg/ m ²	0,0	0,1	0,2	0,3	1,0
			t/ha	0,2	1,0	2,0	3,1	9,5
200	100	90,5	kg/ m ²	0,0	0,0	0,2	0,2	0,5
			t/ha	0,2	0,4	1,6	2,2	5,2
300	156	99,6	kg/ m ²	0,0	0,1	0,2	0,3	0,9
			t/ha	0,2	0,6	2,5	3,3	8,6
samci								
100	46	151,1	kg/ m ²	0,0	0,0	0,2	0,2	0,6
			t/ha	0,1	0,2	1,6	1,9	5,6
200	106	112	kg/ m ²	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3
			t/ha	0,1	0,1	1,1	1,3	3,4
300	134	142,0	kg/ m ²	0,0	0,0	0,3	0,3	0,8
			t/ha	0,2	0,2	2,7	3,0	8,3

Na fakultním pozemku byl zaznamenán výrazný okrajový efekt, kdy v prvním řádku rostli rostliny přibližně o 1/3 vyšší a silnější, a to zřejmě z důvodu vyšší kompakce půdy v meziřádcích, kdy může docházet k lepšímu nasycení půdy kapilární vodou či také z důvodu možného efektu více dostupných živin na vedlejší parcele.

Ve výše uvedené tabulce č. 7 jsou uvedena data z odběrů biomasy ve fázi začátku květu. V Českých Budějovicích dosáhl nejvyšší výnos celkové suché biomasy 3,4 t/ha samičích a 1,7 t/ha samčích rostlin, přičemž samčí rostliny dosáhli většího výnosu při hustotě výsevu 70 rostlin na m². Z tabulky je také patrně vidět, že při hustotě 40 rostlin na m² dosáhli výnosy zhruba 1/3 v porovnání s vyššími hustotami výsevu.

V rámci obou lokalit, dosáhl výnos jinak nevyužitě biomasy listů zhruba 0,5-1 t/ha pro samičí a 0,1-0,4 t/ha pro samčí rostliny.

Výnos samičích květenství na začátku květu byl vyšší na lokalitě v Poněšicích. Výnos samčího květenství byl pro obě lokality podobný a to mezi 0,1-0,2 t/ha, přičemž se výhodněji jevila vyšší hustota výsevu.

Výška rostlin se na obou lokalitách pohybovala okolo 100-150 cm.

Tabulka č. 8: Produkční parametry konopí setého, odrůdy Tiborszallasi ve fázi zrání semen.

	délka	jednotky	výnos	výnos	výnos	výnos	výnos	výnos	g	počet	počet	počet
výsevu	stonek		květů	listů	stonku	celkem	celkem	celkem	HTZ	ks/ m ²	ks/ m ²	ks/ m ²
m ²	cm		suché	suché	suché	suché	čerstvé	semen	*	primární	květenství	květenství
České Budějovice												
100	113,4	kg/ m ²	0,3	0,1	0,5	0,9	2,3	0,1	18,9	1344	34376	89945
		t/ha	3,0	1,0	5,3	9,2	23,1	1,3				
70	116,1	kg/ m ²	0,3	0,1	0,5	0,9	2,5	0,04	18,4	1211	6642	2746
		t/ha	3,3	0,8	4,9	9,0	24,7	0,37				
Poněšice												
100	129,9	kg/ m ²	0,4	0,0	0,4	0,6	1,3	0,2	**	1040	19653	12480
		t/ha	3,8	0,5	3,9	6,2	13,5	2,1				
200	104,4	kg/ m ²	0,2	0,0	0,5	0,7	1,5	***	**	1400	***	***
		t/ha	1,7	0,4	4,9	7,0	15,2					
300	108,1	kg/ m ²	0,22	0,10	0,52	0,84	1,85	0,04	**	814	5700	2600
		t/ha	2,24	0,97	5,18	8,39	18,47	0,44				

*HTZ vypočtena pro odběr na konci dozrání semen

** hodnota nebyla stanovena z důvodu špatného dozrání semen v květu a vypadávání semen.

***hodnota nebyla stanovena z důvodu poškození (rozmělnění) lyofilizovaného vzorku.

Pro hustotu 40 rostlin/m² nebyl stanoven výnos ve fázi zrání semen z důvodu časnějšího vývoje porostu.

Na stanovišti České Budějovice byl ve fázi začátku květu stanoven stav zaplevelení pro hustoty výsevu 100, 70 a 4 rostlin/m². Pro hustotu 40 rostlin/ m² činilo zaplevelení 0,6 kg/ m² čerstvé biomasy, pro hustotu 70 rostlin/ m² činilo zaplevelení 0,98 kg/ m² čerstvé biomasy a pro hustotu 100 rostlin/ m² činilo zaplevelení 0,96 kg/ m² čerstvé biomasy. Nejvíce zastoupeným druhem plevele byla *Echinochloa crus-galli* (L.) BEAUV., *Thlaspi arvense* L., *Amaranthus retroflexus* L., dále *Galium* sp., *Geranium* sp., *Veronica* sp., *Vicia* sp., *Taraxacum* sp. *Galinsoga* sp.

Tabulka č. 9: Statistické vyhodnocení vlivu proměnných parametrů na výnosové prvky odrůdy Tiborszallasi ve fázi začátek květu.

Analýza rozptylu	vliv stanoviště a pohlaví na hustotu 100 ks/ m ²			vliv hustoty a pohlaví v Českých Budějovicích			vliv hustoty a pohlaví v Poněšicích		
	n	F	p	n	F	p	n	F	p
	výška rostliny								
intercept	1	2351,027	0,000000	1	1536,427	0,000000	1	2245784	0,000000
pohlaví	1	45,273	0,000000	1	29,141	0,000000	1	38986	0,000000
stanoviště	1	5,426	0,011447	2	10,935	0,000052	2	11360	0,000000
error	1	0,577	0,448768	98			208	535	
	125								
	sušina květenství								
intercept	1	88,04125	0,000000	1	108,3448	0,000000	1	7,804668	0,000000
pohlaví	1	2,27894	0,134327	1	8,8492	0,003692	1	0,060937	0,274512
stanoviště	1	0,18961	0,664186	2	1,7636	0,176832	2	0,918175	0,000000
error	99			98			210	0,050767	
	sušina listů								
intercept	1	113,3955	0,000000	1	108,3448	0,000000	1	75,94402	0,000000
pohlaví	1	17,8822	0,000052	1	8,8492	0,003692	1	8,77476	0,000005
stanoviště	1	0,8678	0,353822	2	1,7636	0,176832	2	29,31097	0,000000
error	99			98			210	0,39764	
	sušina stonků								
intercept	1	148,5224	0,000000	1	112,4574	0,000000	1	790,9597	0,000000
pohlaví	1	0,5273	0,469264	1	16,2278	0,000111	1	2,4074	0,393433
stanoviště	1	0,2474	0,619878	2	6,1596	0,003021	2	93,1024	0,000000
error	113			98			201	3,2912	

Tabulka č.10: Statistické vyhodnocení vlivu proměnných parametrů na výnosové prvky odrůdy Tiborszallasi ve fázi zrání semen.

Analýza rozptylu	vliv stanoviště při hustotě 100			vliv hustoty v Českých Budějovicích			vliv hustoty v Poněšicích		
	n	F	p	n	F	p	n	F	p
sušina listů									
intercept	1	75,80474	0,000000	1	114,2419	0,000000	1	218,2623	0,000000
stanoviště	1	8,38987	0,010036	1	1,3942	0,253962	2	10,0889	0,000226
error	17			17			47		
počet primárních větviček									
intercept	1	421,4961	0,000000	1	422,1063	0,000000	1	316,5900	0,000000
stanoviště	1	6,8712	0,017874	1	6,6384	0,019609	2	5,4759	0,008679
error	17			17			34		
sušina květenství									
intercept	1	92,11624	0,000000	1	118,9054	0,000000	1	177,0681	0,000000
stanoviště	1	6,46920	0,020990	1	5,7391	0,028375	2	11,3718	0,000097
error	17			17			46		
sušina stonků									
intercept	1	118,0754	0,000000	1	99,66540	0,000000	1	231,1259	0,000000
stanoviště	1	0,4924	0,493592	1	2,19378	0,162396	2	9,1339	0,000509
error	15			13			42		
délka stonků									
intercept	1	3855,544	0,000000	1	2078,863	0,000000	1	3126,182	0,000000
stanoviště	1	17,647	0,000677	1	0,285	0,601868	2	12,371	0,000050
error	16			14			46		
počet květů na květenství									
intercept	1	15,25639	0,002088	1	20,36723	0,000354	1	25,78535	0,000665
stanoviště	1	1,13287	0,308114	1	6,55601	0,020955	1	7,80991	0,020895
error	12			16			9		
počet semenek na květenství									
intercept	1	80,59561	0,000001	1	161,5780	0,000000	1	35,20550	0,000220
stanoviště	1	2,12370	0,170702	1	24,9164	0,000133	1	15,11250	0,003689
error	12			16			9		

V tabulce č. 9 a 10 jsou uvedeny výsledky ze statistického zpracování analýzou rozptylu pro 5 % hladinu významnosti.

V tabulce č. 9 jsou uvedeny výsledky v rámci odběrů biomasy ve fázi zrání semen. Významně se projeví vliv lokality a pohlaví při výsevu 100 rostlin/ m² na výšku rostliny a vliv pohlaví na sušinu listů.

Pro lokalitu v Českých Budějovicích byl zaznamenán významný vliv hustoty výsevu a pohlaví na výšku rostli, vliv pohlaví na sušinu květů, listů a stonků a vliv hustoty výsevu na sušinu stonků.

Pro lokalitu v Poněšicích se projevil významný vliv hustoty výsevu na všechny sledované parametry (výška rostliny a sušina květů, listů a stonků). Dále se projevil vliv pohlaví na výšku rostliny a sušinu listů.

V tabulce č. 10 jsou uvedeny výsledky ze statistického zpracování analýzou rozptylu pro 5 % hladinu významnosti v rámci odběrů biomasy ve fázi zrání semen.

Pro lokalitu Poněšice vyšel průkazný vliv hustoty výsevu na všechny sledované parametry (počet primárních větviček, sušina květenství, sušina stonků, délka stonků, počet květů na květenství, počet semínek na květenství).

Pro lokalitu v Českých Budějovicích byl zaznamenán patrný vliv hustoty výsevu na počet primárních větviček, sušinu květenství, počet květů na květenství a počet semínek na květenství.

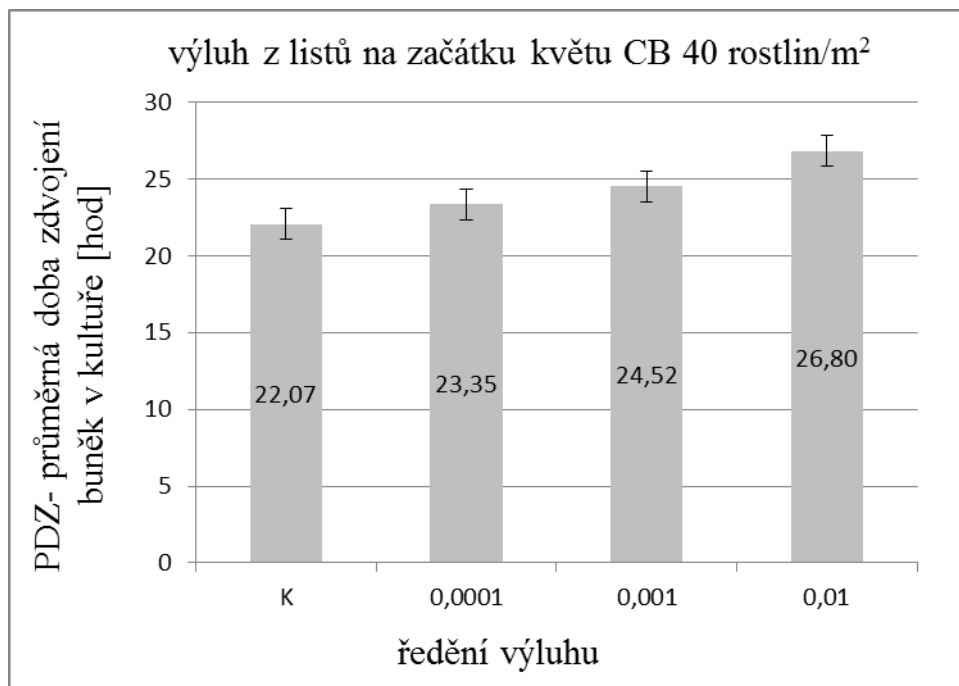
Průkazný vlivu stanoviště na hustotu výsevu 100 rostlin/ m² byl zaznamenán u sušiny listů, sušiny květenství, pro počet primárních větviček a pro délku stonků.

5.2 Výsledky ze zpracování výluhů

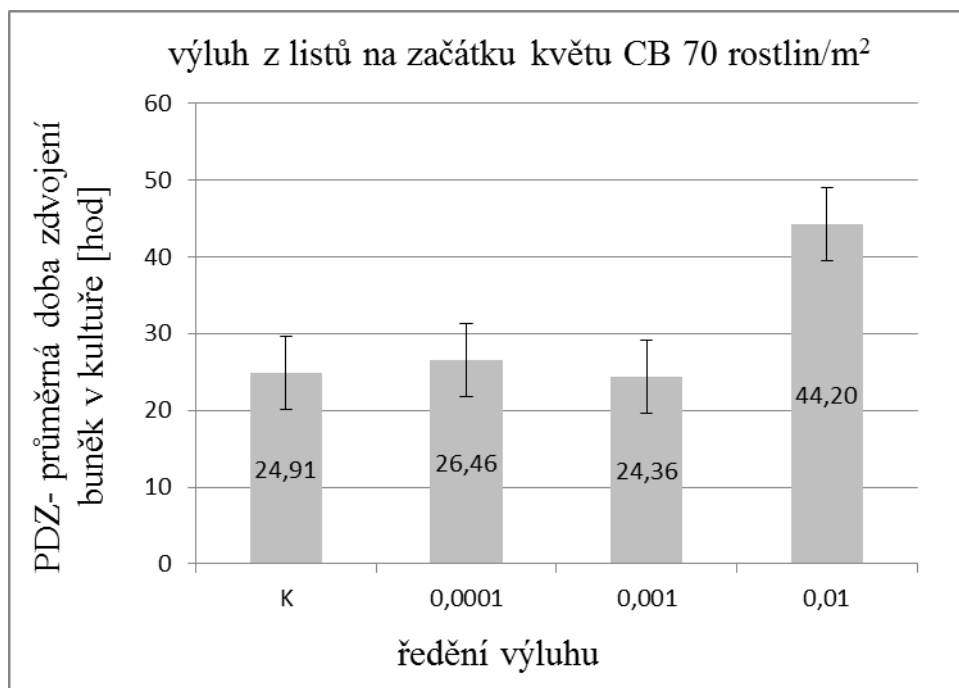
Následně jsou uvedeny výsledky ze zpracování výluhu a získání dat z BioStation.

Výsledky jsou rozděleny do 3 částí. Nejprve jsou uvedeny výsledky z odběrů v Českých Budějovicích (CB) a následně výsledky z odběrů v Poněšicích (PO). Zde jsou uvedeny grafy (obrázek č. 10-27) a tabulky (tabulka č. 11, 12) z výpočtu průměrné doby zdvojení buněčné populace (PDZ) po aplikaci výluhu, společně s kontrolou bez aplikace výluhu. V třetí části jsou zpracovány výsledky z prvních dvou částí jako procenta růstu populace. Výsledky z obou lokalit jsou zde společně znázorněny graficky pro lepší porovnání výsledků (obrázek č. 28-30).

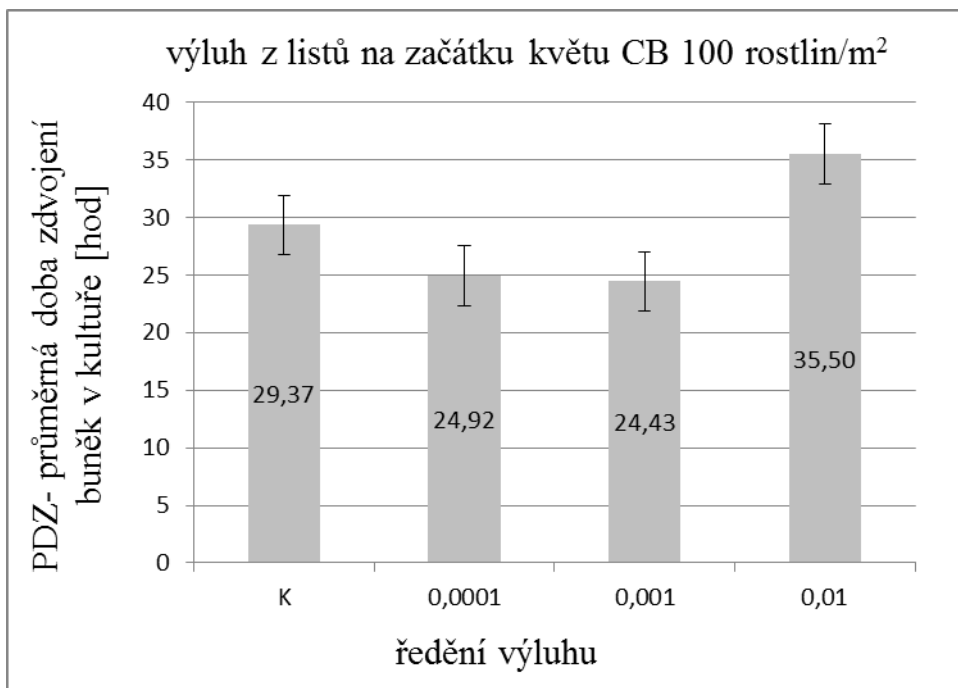
5.2.1 Pozemek České Budějovice



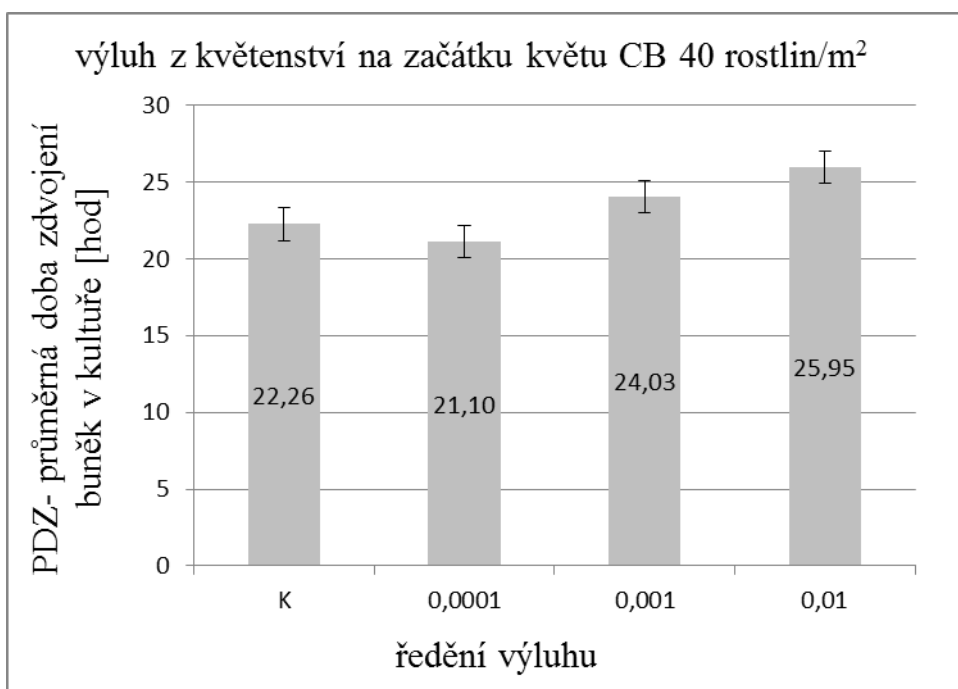
Obrázek č. 10: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 40 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



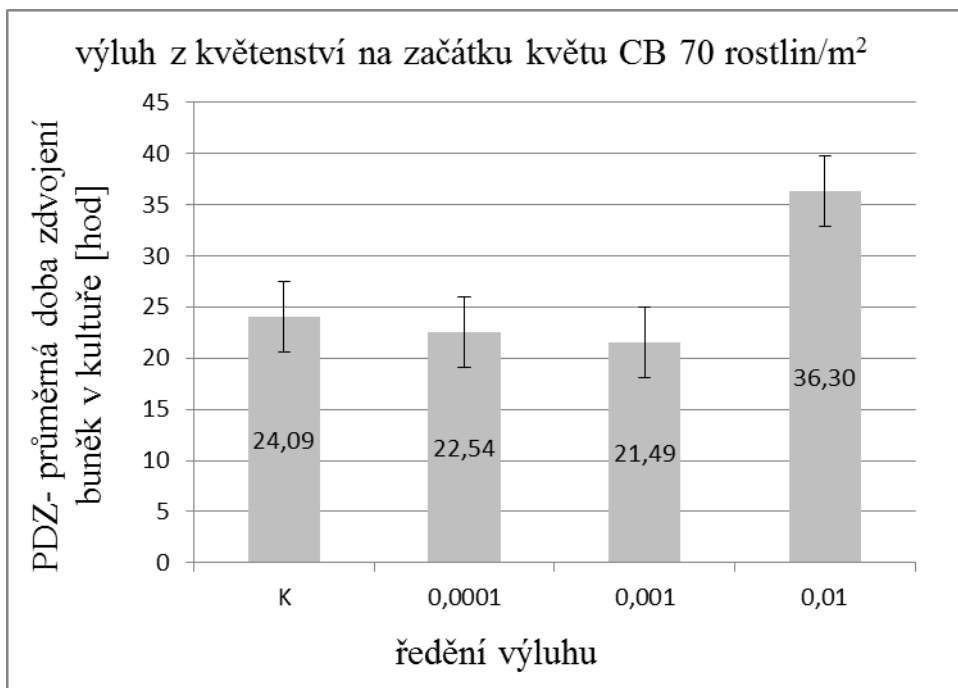
Obrázek č. 11: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 70 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



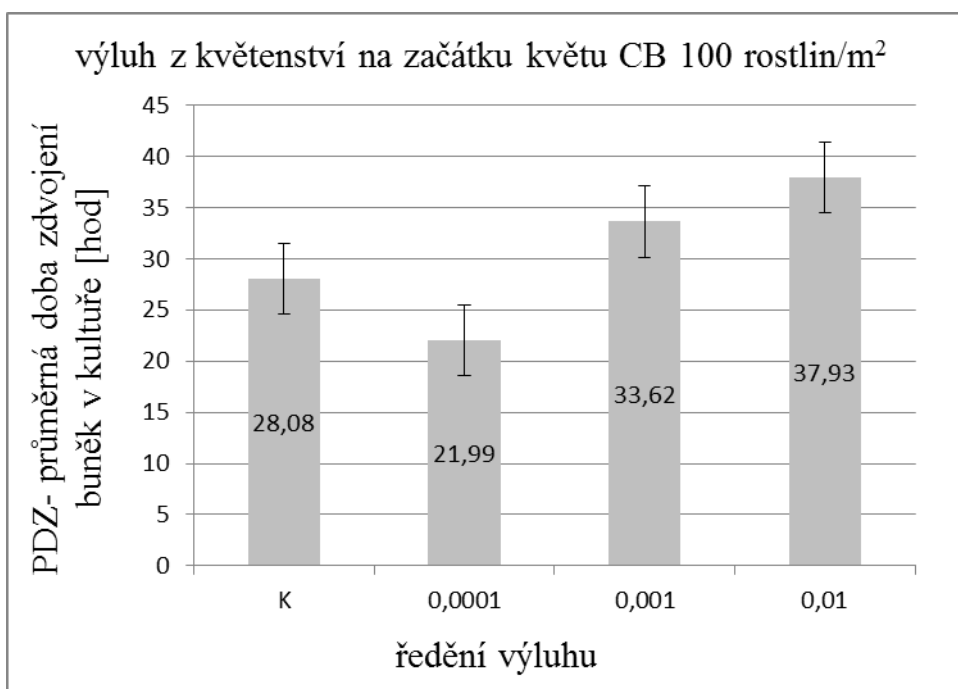
Obrázek č. 12: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



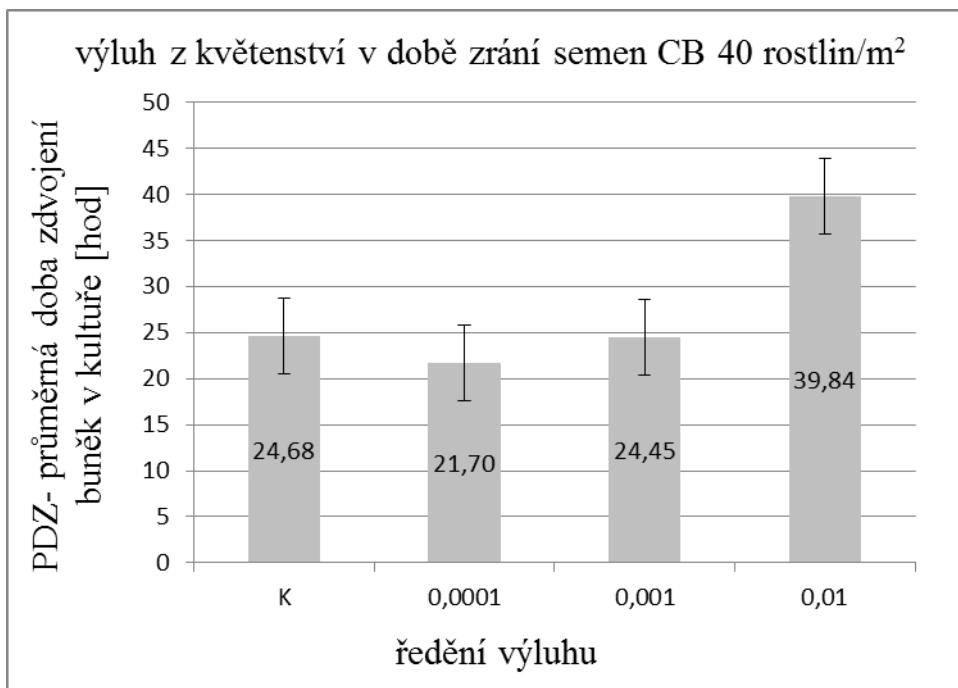
Obrázek č. 13: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 40 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



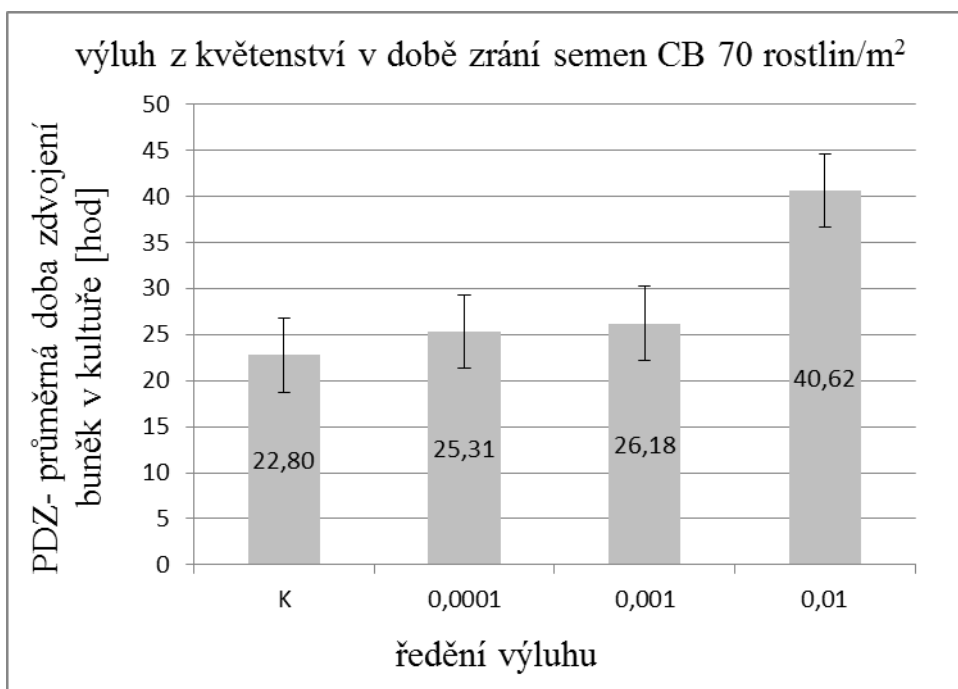
Obrázek č.14: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 70 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



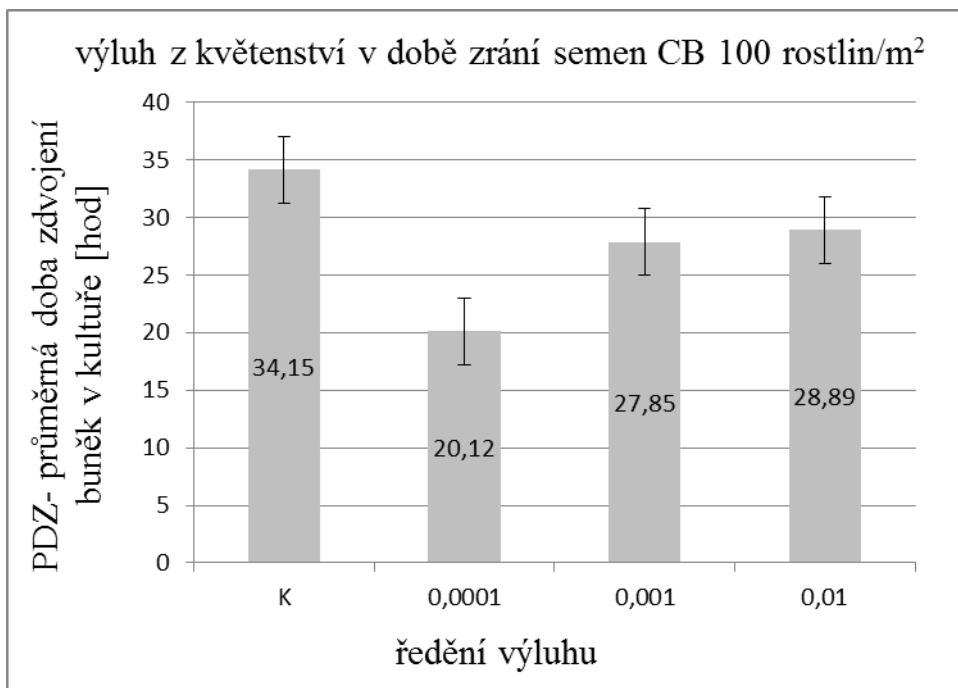
Obrázek č. 15: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB na začátku květu rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



Obrázek č.16: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB v době zrání semen rostliny pro hustotu 40 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



Obrázek č. 17: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB v době zrání semen rostliny pro hustotu 70 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



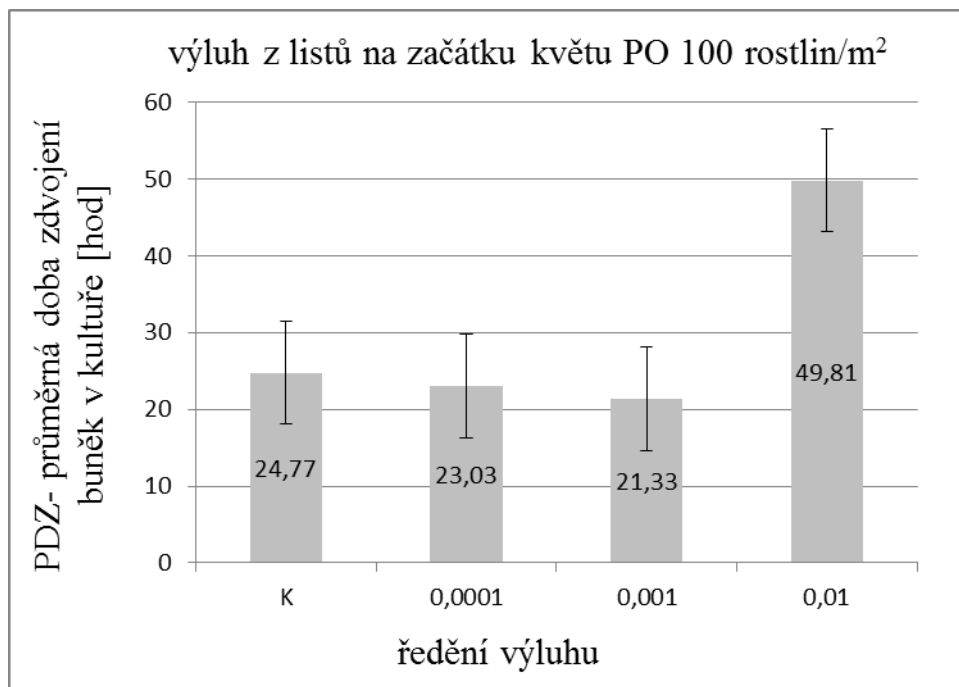
Obrázek č. 18: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v CB v době zrání semen rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).

Tabulka č.11: Výpočty pro specifické růstové rychlosti fibroblastoidní linie buněk L929 při aplikaci výluhů s kontrolou pro odběr sušiny z Českých Budějovic (CB).

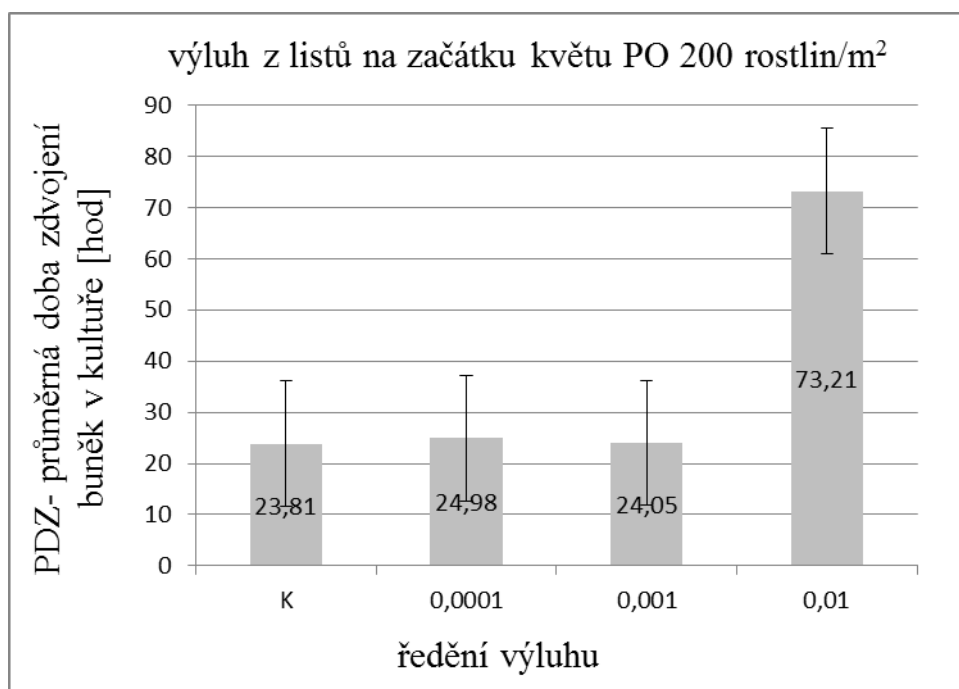
varianta ředění	listy fáze začátek květu			květenství fáze začátek květu			květenství fáze zrání semen		
	POČET BUNĚK		index	POČET BUNĚK		index	POČET BUNĚK		index
	START	KONEC	SRR	START	KONEC	SRR	START	KONEC	SRR
40 rostlin/m ²									
K	22	211	0,031	29	273	0,031	27	204	0,028
0,0001	19	161	0,030	19,5	207,5	0,033	19,5	194,5	0,032
0,001	19	145,5	0,028	23,5	187,5	0,029	15	115,5	0,028
0,01	16	103	0,026	16	109,5	0,027	15	52,5	0,017
70 rostlin/m ²									
K	29	215	0,028	32	254	0,029	27	241	0,030
0,0001	29,5	194,5	0,026	32	293	0,031	27,5	197,5	0,027
0,001	16,5	128	0,028	25,5	260	0,032	18,5	124,5	0,026
0,01	21,5	66,5	0,016	22	87	0,019	24	82	0,017
100 rostlin/m ²									
K	34	186	0,024	46	272	0,025	32	138	0,020
0,0001	29,5	218,5	0,028	20	193,5	0,032	19,5	233	0,034
0,001	22,5	173,5	0,028	17	75	0,021	20,5	123	0,025
0,01	25,5	104	0,020	16,5	61,5	0,018	16	90	0,024

Start značí počet buněk v prvním snímku po nasazení do BioStation, konec značí počet buněk na posledním 2161. snímku. Data jsou získána z průměru dvou snímaných bodů v rámci jedné koncentrace.

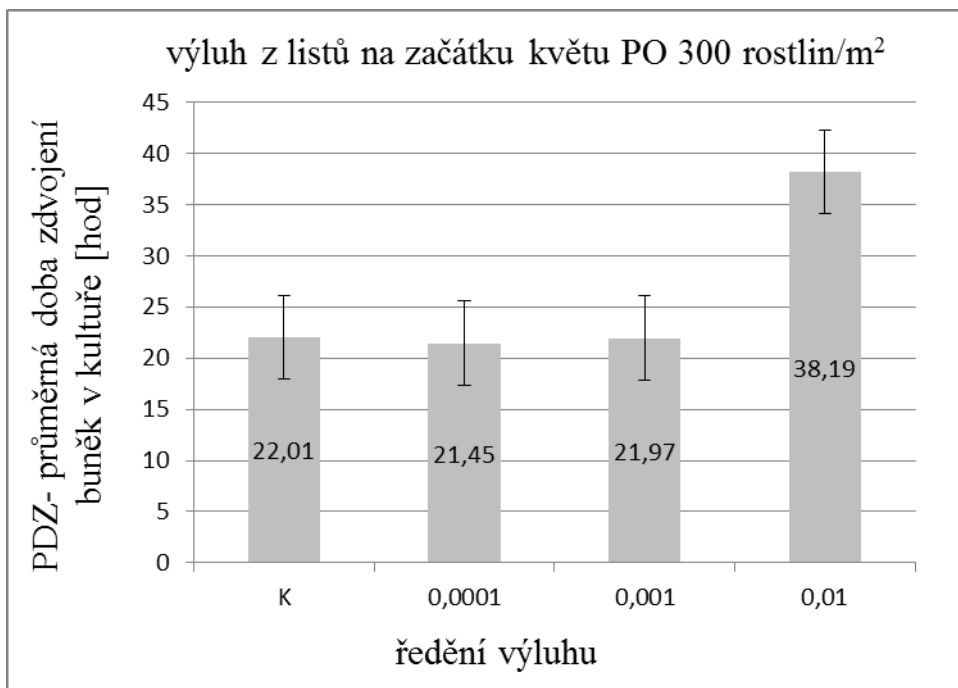
5.2.2 Pozemek Poněšice



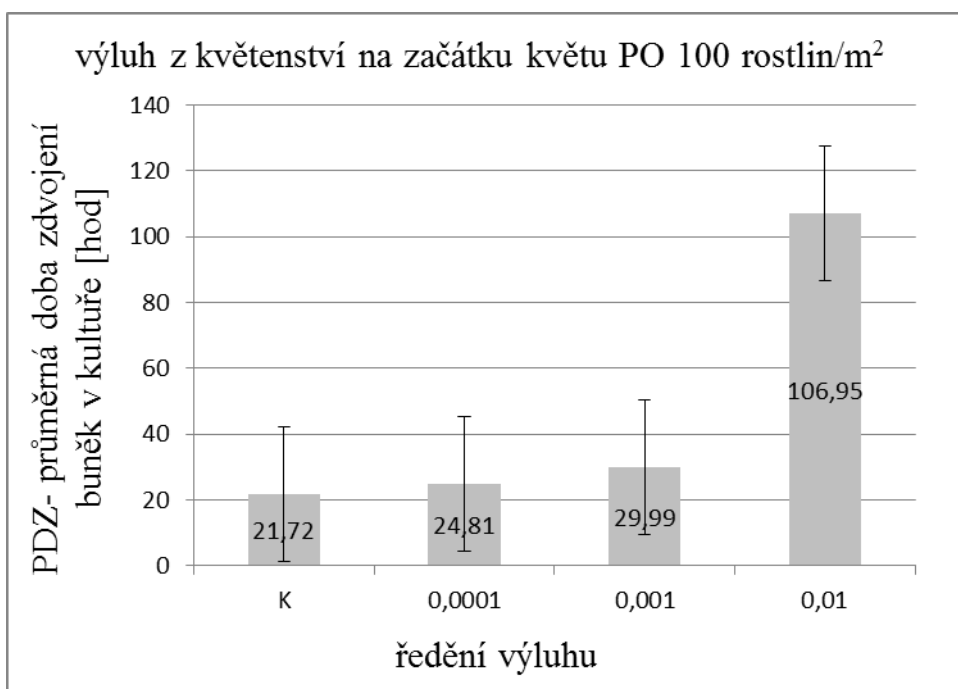
Obrázek č. 19: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0,0001) společně s kontrolou (K).



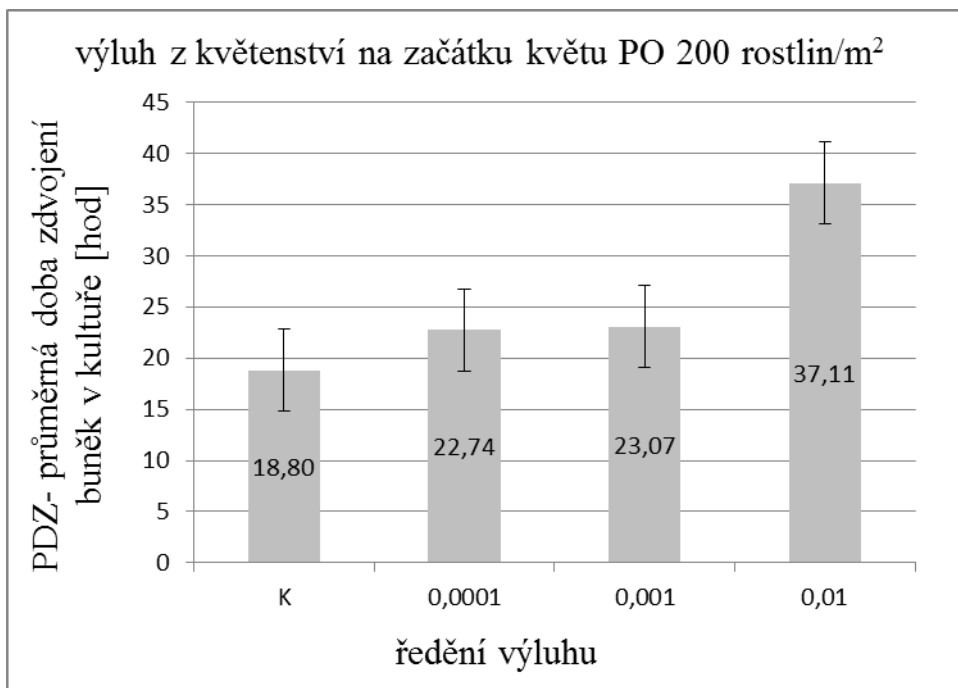
Obrázek č. 20: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 200 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0,0001) společně s kontrolou (K).



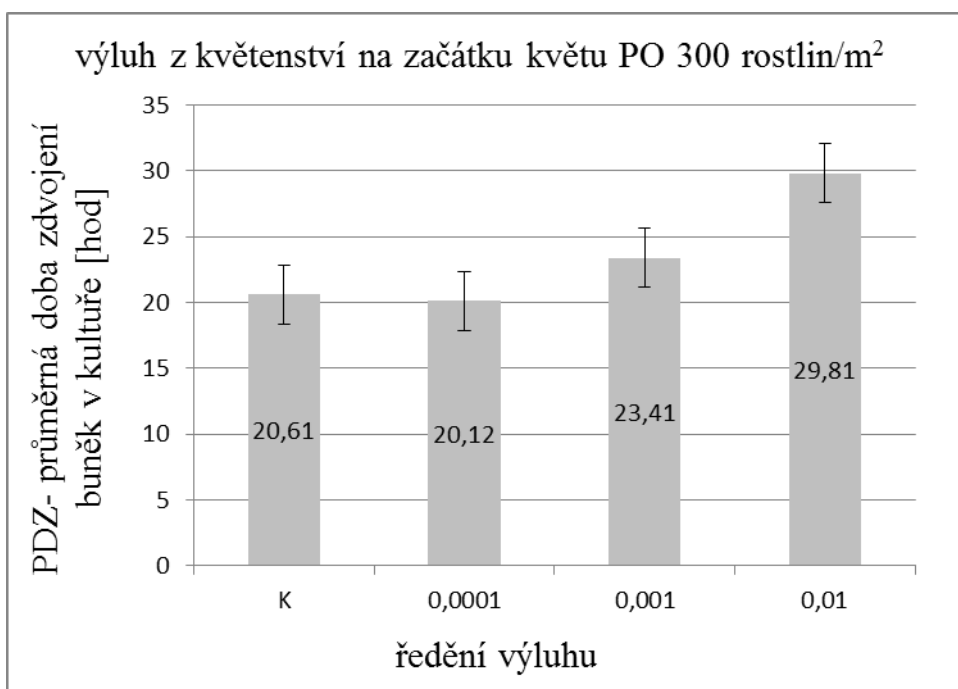
Obrázek č. 21: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z listů odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 300 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



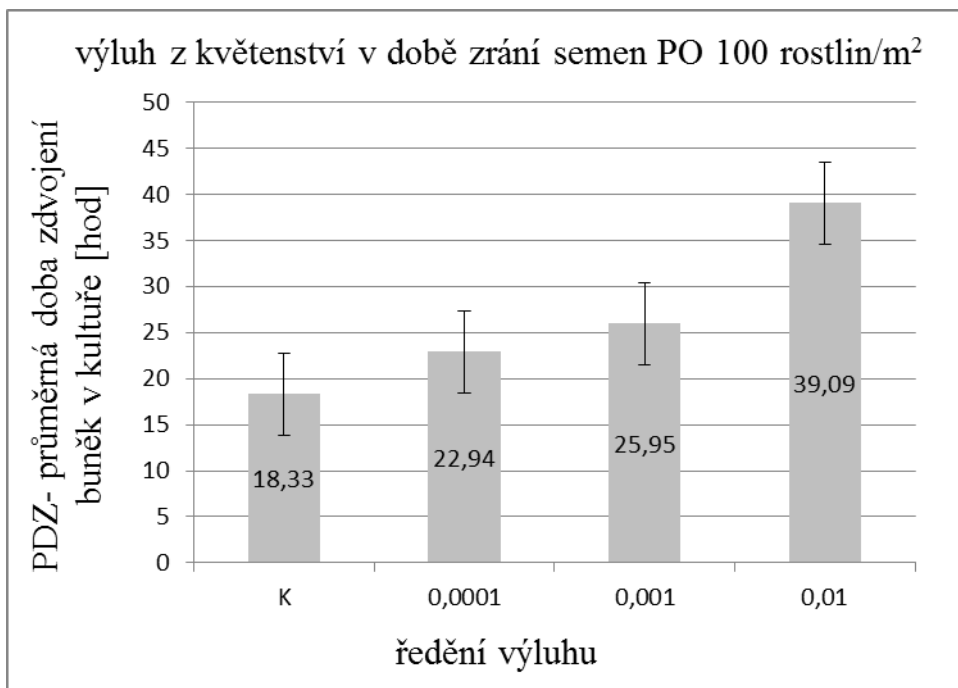
Obrázek č. 22: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



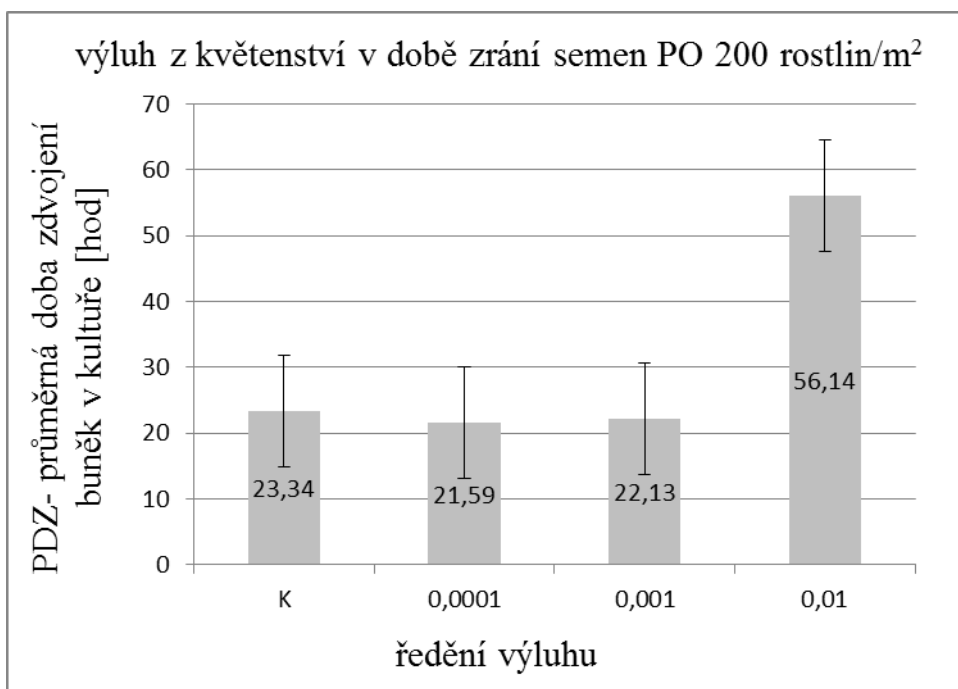
Obrázek č. 23: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 200 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



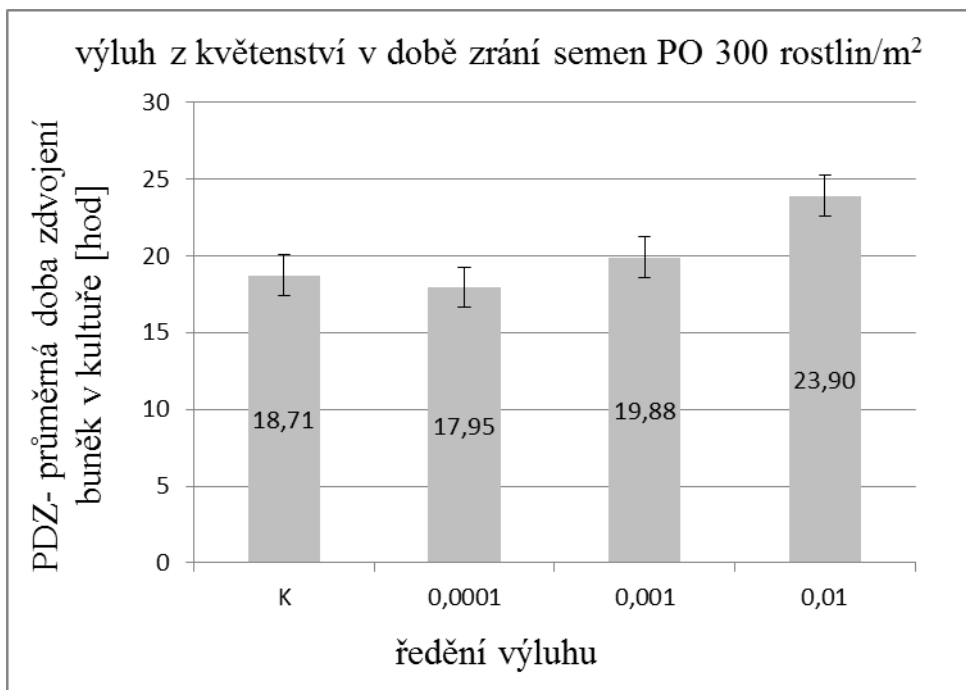
Obrázek č. 24: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO na začátku květu rostliny pro hustotu 300 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



Obrázek č. 25: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO v době zrání semen rostliny pro hustotu 100 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



Obrázek č. 26: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO v době zrání semen rostliny pro hustotu 200 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).



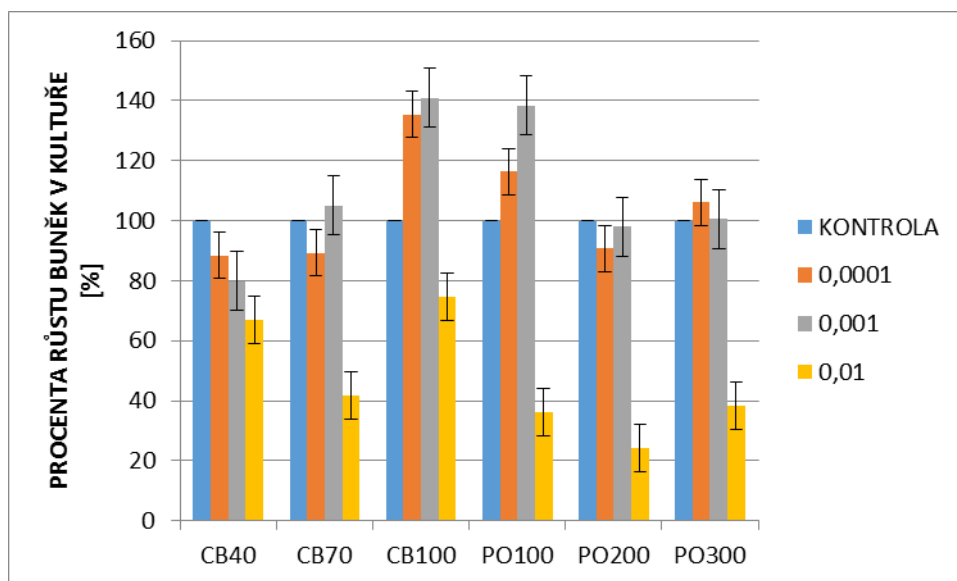
Obrázek č. 27: Na obrázku je graficky znázorněna průměrná doba zdvojení buněk v kultuře fibroblastoidní linie L929 po aplikaci výluhu z květenství odebraných v PO v době zrání semen rostliny pro hustotu 200 rostlin/m² ve třech ředěních výluhu (0,01;0,001;0.0001) společně s kontrolou (K).

Tabulka č. 12: Výpočty pro specifické růstové rychlosti fibroblastoidní linie buněk L929 při aplikaci výluhů s kontrolou pro odběr sušiny z Poněšic (PO).

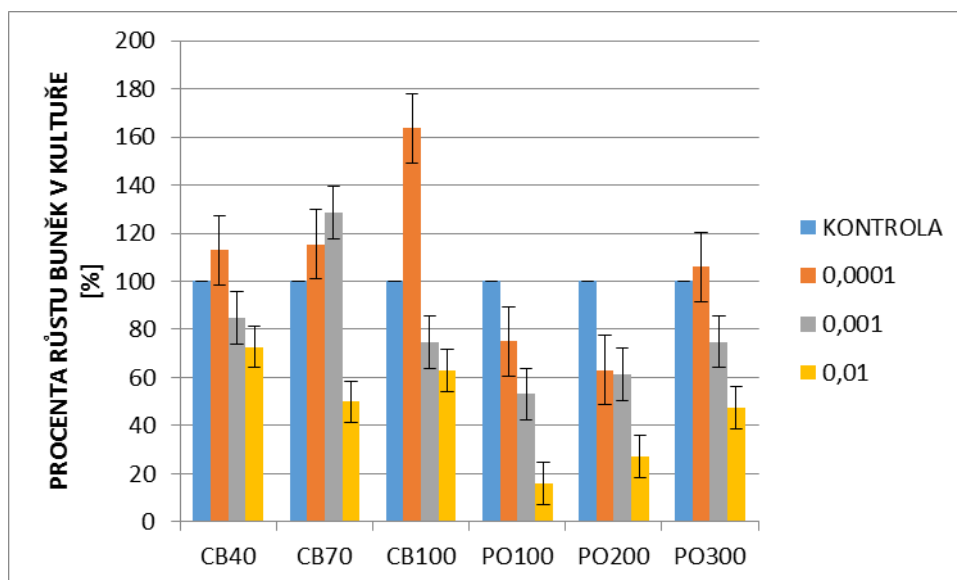
varianta	listy fáze začátek květu			květenství fáze začátek květu			květenství fáze zrání semen		
	POČET BUNĚK	index		POČET BUNĚK	index		POČET BUNĚK	index	
	START	KONEC	SRR	START	KONEC	SRR	START	KONEC	SRR
100 rostlin/m ²									
K	24	180	0,028	21	209	0,032	22	335,0	0,038
0,0001	17	148,5	0,030	21	157	0,028	29	255,5	0,030
0,001	14,5	150,5	0,032	16	84,5	0,023	22	150,5	0,027
0,01	23,5	64	0,014	18,5	29,5	0,006	20,5	73,5	0,018
200 rostlin/m ²									
K	23	187	0,029	18	256	0,037	31	263,0	0,030
0,0001	25,5	188	0,028	20,5	184	0,030	22,5	227,0	0,032
0,001	16	127,5	0,029	21,5	187	0,030	20,5	195,5	0,031
0,01	22	43,5	0,009	21,5	82,5	0,019	18,5	45,0	0,012
300 rostlin/m ²									
K	20	193	0,031	34	383	0,034	25	360,0	0,037
0,0001	16,5	169	0,032	18	215	0,034	16,5	266,0	0,039
0,001	16,5	160	0,032	18,5	156	0,030	16	197,0	0,035
0,01	18	66,5	0,018	22,5	120	0,023	14	113,0	0,029

Start značí počet buněk v prvním snímku po nasazení do BioStation, konec značí počet buněk na posledním 2161. snímku. Data jsou získána z průměru dvou snímaných bodů v rámci jedné koncentrace.

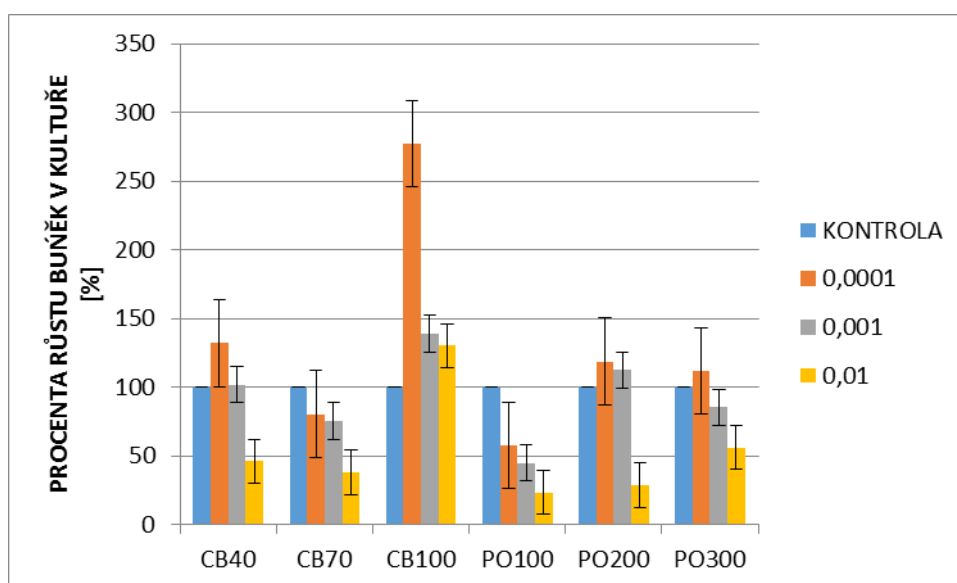
5.2.3 Souhrnné porovnání



Obrázek č. 28: Výluhy z listů na začátku květu rostliny konopí setého odrůdy Tiborszállási, aplikovaný na tkáňovou kulturu buněk fibroblastoidní linie L929 po 72. hodinovém snímání na BioStation. Na svislé ose jsou znázorněny lokality CB a PO, hustoty výsevu a ředění výluhu v logaritmické řadě (0,0001;0,001;0,01) společně s kontrolou. Na vodorovné ploše je uvedeno procento růstu buněčné populace vypočítané z PDZ (uvedené v metodice).



Obrázek č. 29: Výluhy z květenství na začátku květu rostliny konopí setého odrůdy Tiborszállási, aplikovaný na tkáňovou kulturu buněk fibroblastoidní linie L929 po 72. hodinovém snímání na BioStation. Na svislé ose jsou znázorněny lokality CB a PO, hustoty výsevu a ředění výluhu v logaritmické řadě (0,0001;0,001;0,01) společně s kontrolou. Na vodorovné ploše je uvedeno procento růstu buněčné populace vypočítané z PDZ (uvedené v metodice).



Obrázek č. 30: Výluhy z květenství v době zrání semen rostliny konopí setého odrůdy Tiborszállási, aplikovaný na tkáňovou kulturu buněk fibroblastoidní linie L929 po 72. hodinovém snímání na BioStation. Na svislé ose jsou znázorněny lokality CB a PO, hustoty výsevu a ředění výluhu v logaritmické řadě (0,0001;0,001;0,01) společně s kontrolou. Na vodorovné ploše je uvedenou procento růstu buněčné populace vypočítané z PDZ (uvedené v metodice).

Z graficky zpracovaných výsledků je patrný vliv dávky a účinku všech osmnácti analyzovaných extraktů. Rovněž je převážně u ředění výluhu 0,0001 zaznamenán stimulační efekt nejvíce patrný u hustoty 100 rostlin/m² na lokalitě České Budějovice (CB). Pro nejméně ředěné výluhy (0,01) jsou zaznamenány největší inhibiční účinky, které se blíží až k 85% v porovnání s kontrolou bez aplikace výluhu. Zajímavé může být srovnání výluhů z květenství na začátku květu a v době zrání semen na lokalitě v Poněšicích pro různé hustoty výsevu. Znázorňuje se nám podobný trend v reakci na ředí výluhu 0,01, kdy předpokládáme vyšší obsah sekundárních metabolitů v květenství.

6. DISKUZE

Odrůda konopí setého Tiborszallasi je charakterizovaná jako středně pozdní. Cosentino et al. (2012) uvádí, že vhodná doba pro její zasetí v mediteránních podmínkách je mezi koncem dubna a prvními třemi týdny v květnu. Proto se domnívám, že pro pokus byla vhodně zvolena doba výsevu a že pozorované parametry, nejsou ovlivněny týdenním rozestupem ve výsevu.

V období od zasetí do začátku květu dosahoval teplotní průměr měřený v Českých Budějovicích $15,7^{\circ}\text{C}$ z čehož může být na základě studie Cosentino et al. (2012) usuzováno na vhodné teplotní podmínky pro růst rostlin v pokusu. Cosentino et al. (2012) uvádí, že nejvyšší rychlosti růstu dosahovaly rostliny v rozmezí teplot $13,5^{\circ}\text{C}$ a $18,5^{\circ}\text{C}$.

V době, kdy rostliny procházely dlouhivým růstem, a to v období od 12. 7. 2014 do počátku kvetení 14.8.2014, byl průměrný úhrn srážek 83 mm pro Hluboku nad Vltavou a 87 mm pro České Budějovice. V červnu byl průměrný úhrn srážek na obou lokalitách pouze okolo 32 mm. Limitujícím faktorem pro růst rostlin konopí v podmínkách pěstování ve střední Evropě může být kromě celkové sumy teplot podle Sarsenbaev, Kozhamzharov, Bayteliev (2012) a Amaducciho et al. (2014) úhrn srážek. Dá se tedy předpokládat možný negativní vliv nedostatku srážek na produkci biomasy v rámci obou pokusných lokalit.

Nedostatek srážek se patrně projevil na dosažené výšce rostlin konopí. V porovnání s naměřenou průměrnou délkou rostlin přibližně 100 cm při hustotě výsevu 200 rostlin $/\text{m}^2$ dosahovala stejná odrůda vysetá v Itálii při hustotě rostlin $240/\text{m}^2$ průměrnou výšku 155 cm (Cosentino et al. 2012).

V práci bylo potvrzeno, že vyšší hustoty výsevu ($300/\text{m}^2$) zapříčiní nižší hmotnost stonků rostlin, a rovněž mají i vliv na velikost rostlin a variabilitu porostu, což rovněž zmiňuje Cosentino et al. (2012). Z výsledků produkce biomasy je zřejmé, že nižší produkci biomasy stonku u hustoty výsevu $44/\text{m}^2$ mohou zapříčinit i podmínky, kdy nedojde k dostatečnému zapojení porostu a konkurenční zapelevelení inhibuje růst rostliny.

V práci byl rovněž prokázán vliv hustoty výsevu na výnosové prvky květenství (počet primárních větvíček, počet květů na květenství, počet semen na

květenství a na sušinu celého květenství) a vliv stanoviště při hustotě 100 rostlin/ m² na počet primárních větví v květenství a sušinu květenství. V práci Peč et al. (2012) byly charakterizovány vhodné odrůdy pro potenciální farmaceutické využití. Byly porovnávány výnosové prvky květenství a listů odrůd a byly rovněž posuzovány z hlediska kompaktnosti květenství. V závislosti na tomto výzkumu, může být díky naší práci doplněna představa o vlivu nejen odrůdy ale i o vlivu stanovištních podmínek a hustotě výsevu na výnos květenství pro farmaceutické možnosti zpracování.

Kanabinoidním látkám v konopí byla doposud věnována velká pozornost zejména z toho důvodu, že se jedná o látky pro konopí typické s prokázanými biologickými účinky. Většina autorů se shodne na širokém rozsahu reakce konopí na změny v prostředí a pěstování jak z hlediska produkčních parametrů, tak z hlediska obsahových látek. Byly rovněž zkoumány i jiné sekundární metabolity konopí a to zejména flavonoidy, stilbenoidy a terpenoidy. Doposud, ale není posuzováno, jaký vliv mají na utváření celkových metabolických produktů environmentální podmínky či zpracování (Flores-Sanchez, Verpoorte 2008).

V práci uvedené výsledky výzkumu z výluhů konopí setého aplikované na fibroblastoidní linii L929 potvrzují nspecifické účinky v závislosti na koncentraci výluhu. Tímto se naskytá možnost dalšího širšího využití specifické metodiky přípravy a aplikace výluh k možnému širšímu využití jako jednoduchého analytického nástroj pro zhodnocení biologických vlastností v různých podmínkách pěstovaných rostlin. Existují vědecké experimenty, ve kterých není řešena pouze otázka škodlivosti látek na cílový organismus, ale které se zabývají spíše vlivem metabolitů rostlin na biologické projevy buněk v tkáňových kulturách s možností využití například ve fytoterapii. Snaží se pochopit mechanismus účinku a možné propojení s cílenou terapií (Wanger 2011). V práci Veleva (2015) je konstatováno, že extrakt v různých koncentracích z hluchavky bílé, ovlivňuje propustnost savčí buněčné membrány, adhezi buňky či morfologii buněk a blokuje buněčné mechanismy. Je proto oprávněné se domnívat že, další výzkum účinnosti a působení výluhu z rostlin bude mít význam pro širší pochopení mechanismu účinku a možného použití jednak ve fytoterapii a jednak bude aplikovatelný jako nástroj pro hodnocení obsahových látek a agrotechnické odlišnosti.

7. ZÁVĚR

Porost konopí setého o hustotě 100 rostlin na m² dosáhl v průměru v Českých Budějovicích 4,8 t/ha sušiny biomasy a 1,3 t/ha semen. Jako výnosově vhodnější se prokázalo stanoviště Poněšice s průměrem 5 t/ha sušiny biomasy a 2,1 t/ha semen.

Výnos biomasy je průkazně ovlivněn hustotou porostu. Patrný vliv hustoty výsevu byl jednoznačně pro všechny měřené parametry ve fázi zrání semen prokázán na lokalitě v Poněšicích, kde byly u variant dosaženy plánované počty rostlin.

Průkazně se potvrdil vliv stanoviště a pohlaví na výšku rostlin ($p=0.00115$) stanoveném ve fázi začátku květu.

Hustota výsevu při druhém odběru v Českých Budějovicích měla průkazně vliv na počet primárních větví v květenství ($p=0,019609$), sušinu květenství ($p=0,028375$), počet květů na květenství ($p=0,028375$) a počet semen v květenství ($p=0,000133$).

Vliv stanoviště na hustotu 100 rostlin na m² s stanoveném ve fázi zrání semen prokázal rozdíly mezi sušinou listů ($p=0,010036$) a květů ($p=0,020990$), délkou stonků ($p=0,000677$) a počtem primárních větví v květenství ($p=0,017874$).

Na pozemku v Poněšicích i v Českých Budějovicích odrůda Tiborszallási vyprodukovala v průměru 2 t semen /ha přičemž při větší hustotě rostlin vyprodukovala rostlina méně semen. Odrůda se v daných podmínkách pěstování příliš neosvědčila pro produkci semen.

Biologický test výluhu konopí setého jednoznačně prokázal závislost mezi ředěním výluhu (dávkou) a účinkem na fibroblastoidní buněčnou linii L929. Mimo jiné zaznamenal stimulační efekt pro růst buněk zejména při ředění 0,01.

Z výsledků provedeného biologického testu specifické růstové rychlosti se nedá přesně určit vliv stanoviště a hustoty výsevu, nicméně je z výsledku zřejmé, že buňky vykazují rozdílnou aktivitu dělení v závislosti na míře ředění výluhu a v závislosti na testované části rostliny. Na příklad pro výluhy z listů se u ředění výluhu 0,01 a 0,001 projevil menší vliv na průměrnou dobu zdvojení buněk v kultuře v porovnání s analýzou sušiny květenství ve fázi zrání semen. Můžeme se tedy domnívat, že buňky reagují na potenciální obsah sekundárních metabolitů, obsažených v rostlině.

Použitá metodika byla ověřena jako vhodná pro testování extraktů na tkáňových kulturách, a proto by bylo vhodné dále se podobnými pokusy zabývat a blíže specifikovat reakci buněk například vyhodnocením nejen průměrné doby zdvojení ale i vyhodnocení aktivity membránových přenašečů, lokomočních pohybů či mezibuněčných interakcí. Pro další testy lze tuto metoda jednoznačně doporučit.

8. LITERATURA

Abercombie M., Dunn G. A., Heath J. P. 1977: The shape and movement of fibroblast in culture. In: *Cell and tissue interaction*. Ed.: Lash J. W., Burger M. M. Raven Press. New York: 57-70.

Abercombie M., Heaysman J. E., Karthaus H. M. 1957: Social behavior of cells in tissue culture. *Experimental Cell Research*; 13:276-291.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002: Molecular biology of the cell.2. Garland Science. New York. 711 s.

Amaducci S., Scordia D., Liu F. H., Zhong Q., Guo H., Testa G., Cosentino S. L. 2014: Key cultivation for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*; 68:2-16.

Barron A., Coutinho J., English A., Gergely S., Lidouren E. 2003: Integrating hemp in organic farming systems. The Royal Agricultural and Veterinary University. Kobenhavn. 134 s.

Bazzaz F. A. Dusek D., Seigler D. S., Haney A. W. et al. 1975: Photosynthesis and cannabinoid content of temperate and tropical populations of *Cannabis sativa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 3:15-18.

Bernstein D. L., Le Lay J. E., G. Ruano E. G., Kaestner K.H. 2015: TALE-mediated epigenetic suppression of CDKN2A increases replication in human fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*; 17:1-9.

Cosentino S. L, Gorgio T., Scordia D., Copani V. 2012: Sowing time and prediction of flowering of different hemp (*Cannabis sativa* L.) genotypes in Southern Europe. *Industrial Crops and Products*; 37:20-33.

Činát J., Novák M. 1968: Tkáňové a buněčné kultury: příprava a pěstování.1. Státní zdravotnické nakladatelství. Praha. 253 s.

ElSholy M. A., Slade D. 2005: Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*; 78:539-548.

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., Guo Z. 1985: Medical plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organisation*. 63:965-981.

Fendrich M. 1947: Přehled biologie. 4. Grafie. Praha. 783 s.

Fetterman P. S. Keith E. S., Waller W., Guerrero O., Doorenbos N.J., Quimby W., et al. 1971: Mississippi-grown *Cannabis sativa* L.: Preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 60:1246-1249.

Flores-Sanchez I. J., Verpoorte R. 2008: Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry Reviews*; 7:615-639.

Gail M. 1973: Time-laps studies on the motility of fibrocytes in tissue cultures. In: Locomotion of tissue cells. *Ciba Foundation Symposium*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., North Holland. Amsterdam; 14:287-302.

Hazekamp A. Bastola K., Rashidi H., Bender J., Verpoorte R., et al. 2007: Cannabis tea revisited: A systematic evaluation of the cannabinoid composition of *Cannabis* tea. *Journal of Ethnopharmacology*; 113:85-95.

Hejny S., Slavík B. 1997: Květena České republiky. 1. Academia. Praha. 555 s.

Hillg K. V. 2005: Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (*Cannabaceae*), *Genetic Resources and Crop Evolution*; 52:161–180.

Hrůša P., Peláček P. 2000: Územní plán města České Budějovice, Ateliér Brno s.r.o.

Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. 1997: Základy histologie. Basic histology. 7. H&H; Jinočany. 501 s.

Kabelík J., Krejčí Z., Šantavý F. 1960: *Cannabis* as a medicament. *Buletin on Narcotics*; 12:5-23.

Kim J., Jo H., Hong H., Kim M. H., Kim J. M., Lee J., Heo W. D., Kim J. 2015: Actin remodelling factors control ciliogenesis by regulating YAP/TAZ activity vesicle trafficking. *Nature Communications*; 6:6781.

Krejčí Z., Šťastný F. 1955: Isolace dalších látek z listů indického konopí *Cannabis sativa* L. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis*; 6:59-66.

LaFlamme S. E., Thomas L. A., Yamada S. S., Yamada K. M. 1994: Single subunit chimeric integrins as mimics and inhibitors of endogenous integrin functions in receptor localization, cell spreading and migration, and matrix assembly. *Journal of Cell Biology*; 126:1285-1298.

Lawson D. 1997: Cytoskeleton and disease: in Latchman D. S. *Basic Molecular and Cell Biology*. 3. Plymouth. 127 s.

Leško J., Veber P., Hána L. 1957: Práce s tkániovými kulturami. Laboratorní příručka. 1. Veda. Vydavatelství akademie věd. Bratislava. 216 s.

Mediavilla V., Jonquera M., Schnid-Slembrouck I., Soldati A. 1998: Decimal code of growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of the International Hemp Association*; 5:68-74.

Michl J. 1997: Buněčné kultury. 1. Academia. Praha. 160 s.

Miovský M., Blaha T., Dědičová M. et al. 2008: Konopí a konopné drogy: Adiktologické kompendium. 1. Grada Publishing s.r.o. Praha. 544 s.

Mukherjee A., Roy S. CH., Bera S., Hong-En Jiang H.E., Li X., Cheng-Sen Li CH.S., Bera S. 2008: Results of molecular analysis of an archaeological hemp (*Cannabis sativa* L.) DNA sample from North West China. *Genetic resources and crop evolution*; 55:81-485.

Peč J., Jelínková M., Cenklová V., Dušková E., Dušek K. 2012: Trendy ve výzkumu rodu *Cannabis* pro léčebné účely a současný stav v České Republice. In: Aktuální otázky pěstování léčivých, aromatických a kořenových rostlin. Lednice. Mendelova univerzita v Brně; Brno; s. 132-138.

Prokeš J., Bartoníček F., Braniš M., Poučková P., Štablová R., Štambergrová A., Večerková J., Wenke M. 2005: Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie. Galén. Brno. 248 s.

Půža V. 1976: Mikrokinematografické sledování adheze a dilatace buněk pěstovaných in vitro. Sborník vědeckých prací LF. 19. Hradec Králové: s. 737-744.

Ruman M. 2014: *Cannabis*, konopí: Průvodce světem univerzální rostliny. 1. Malý princ. Praha. 304 s.

Rybáček V., Bechyně M., Belej J. et al. 1965: Rostlinná výroba 3. 1. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 604 s.

Sarsenbaev K. N., Kozhamzharova L. S., Baytelieva A. M. 2013: Influence high temperature, drought and long vegetation period on phenology and seed productivity European hemp cultivars in moniokum desert. *World Applied Sciences Journal*; 23:638-643.

Small E, Beckstead H. D. 1973. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. *Lloydia*; 36:144–165.

Soares C.P., Lemos V.R., Gaomes da Silva A., Campoy R. M., Priante de Silva C.A., Menegon R.F., Rojahn I., Joaquim W. M. 2014: Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. *Cell Biology International*; 38:131-135

Stanley S. A. 20086: Observation of cells- microscopy. In: Cell biology for biotechnologists.1. Alpha Science International LTD. Oxford. 182 s.

Talman A., Chong R., Chia J., Svitkina T., Aqaisse H. 2014: Actin network disassembly powers dissemination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Science*; 1:240-249.

Vacek Z. 1961: Histologie a histologická technika, Učební text pro zdravotnické školy obor zdravotních laborantů. 2. Státní zdravotnické nakladatelství Praha. 295 s.

Vacek Z. 1990: Histológia a histologická technika. 1. Osveta. 502 s.

Veleva R., Petkova B., Moskova-Doumanova V., Doumanov J., Dimitrovab M., Koleva B., Mladenova K., Petrova S., Yordanova Z., Yordanova V., Topouzova-Hristova T. 2015: Changes in the functional characteristics of tumor and normal cells

after treatment with extracts of white dead-nettle. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*; 29:181-188.

Wanger H. 2011: Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*; 82:34-7.

Internetové zdroje:

ANONYM 1. CZAD [online]. 2015 [cit. 2015-2-4]. Archeologická databáze České Republiky. Dostupné z WWW:

<<http://www.arup.cas.cz/czad/datasearchsites.php?l=cz>>.

ANONYM 2. NYKON [online]. 2014 BioStation-Time Lapse Imaging System [cit. 2014-1-12]. Dostupné z WWW:

<http://www.nikoninstruments.com/cz_CZ/Vyrobky/Mikroskopicke-systemy/Osservazione-Incbazione-Cellulare/BioStation-IM-Q>

ANONYM 3. EURL-ECVAM [online]. 2014 [cit. 2014-12-3]. European Union reference laboratory for alternatives to animal testing. Dostupné z WWW:

<<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance>>.

ANONYM 4. Mott MacDonald CZ spol. s.r.o. et al. Plán péče o EVL/ZCHÚ Hlubocké obory [online]. 2014 [cit. 2014-12-3]. Implementace a péče o území soustavy natura 2000 v Jihočeském kraji 2004-2013. Projekt č.

CZ.1.02/6.1.00/08.03027. Dostupné z WWW:

<https://portal.gov.cz/portal/publikujici/kdib3rr/informace/11812_p3.pdf>

ANONYM 5. 0614 Fibroblast biology. Medical images for powerpoint [online].

2015 [cit. 2015-11-3]. Dostupné z WWW:< <http://www.slideteam.net/0614-fibroblast-biology-medical-images-for-powerpoint.html>>

ANONYM 6. Food and agriculture organization of the United Nations. Statistics division [online]. 2015 [cit. 2015-1-4]. Dostupné z WWW:

<<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>>

ANONYM 7. Genetika-biologie. Buněčný cyklus[online]. 2014 [cit. 2014-12-1].

Dostupné z WWW:<<http://www.genetika-biologie.cz/bunecny-cyklus>>.

ANONYM 8. Situační a výhledová zpráva len a konopí 2010. Ministerstvo zemědělství. Praha. [online]. 2015 [cit. 2015-3-10]. Dostupné z WWW: <http://eagri.cz/public/web/file/56759/LEN_a_KONOPI_2010.pdf>

9. PŘÍLOHY



Foto: Šárka Vlachvoá Foto: Šárka Vlachvoá
Obrázek č. 31: Nalevo povrchové ošetření lesní hrabankou, napravo ukázka vzešlého porostu v Poněšicích.



Foto: Šárka Vlachová Foto: Šárka Vlachová
Obrázek č. 32: Zapojený porost, Poněšice 10. 7. 2014 Obrázek č. 33: Zapojený porost, Poněšice 13. 9. 2014



Foto: Šárka Vlachová



Foto: Šárka Vlachová

Obrázek č. 34: Výluh po 24 hodinách třepání. Obrázek č. 35: Filtrační aparatura pro 1. fázi filtrace.



Foto: Šárka Vlachová



Foto: Šárka Vlachová



Foto: Šárka Vlachová

Obrázek č. 36: Filtry použité při jednotlivých fázích filtrace řazeno z leva od 1. filtrace.



Foto: Šárka Vlachová



Foto: Šárka Vlachová

Obrázek č. 37: Filtrační injekční stříkačka. Obrázek č. 38: CO₂ termo inkubátor.

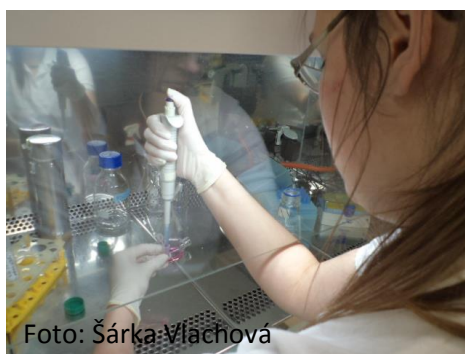


Foto: Šárka Vlachová

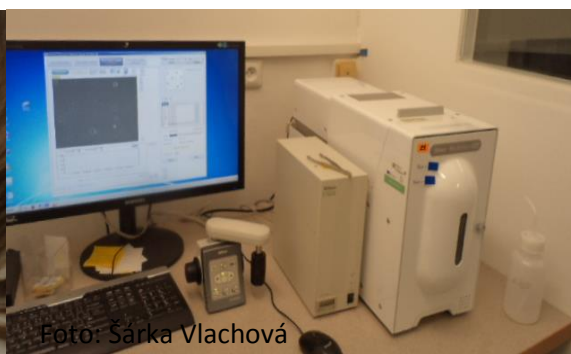


Foto: Šárka Vlachová

Obrázek č. 39: Příprava inokula (flow box). Obrázek č. 40: Nikon BioStation IMQ.