

METODE ŽLAHTNENJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)Marko FLAJŠMAN¹

Pregledni članek / review article

Prispelo / received: 24. 10. 2019

Sprejeto / accepted: 5. 10. 2019

Izveček

Navadna konoplja ima zaradi široke uporabnosti vseh rastlinskih delov veliko različnih žlahtniteljskih ciljev, npr. višja vsebnost vlaken v stebelu z izboljšano kakovostjo, velik pridelek semena in njegova izboljšana hranilna sestava, specifičen profil kanabinoidov v ženskih cvetovih, idr., toda vsebnost Δ^9 -THC pod 0,2 % je skupen cilj vsem starejšim in novejšim sortam. Tujeprašnost, dvodomnost in velika genetska raznolikost navadne konoplje so razlogi za težave pri žlahtnjenju, ko je npr. nujnost gojenja v izolaciji zaradi prenašanja peloda z vetrom na dolge razdalje, težavna odbira moških rastlin pred cvetenjem in možnost medsebojnega opravevanja med vsemi rastlinami konoplje ter nerazvitost molekulskih metod žlahtnjenja (npr. žlahtnjenje s pomočjo molekulskih markerjev). Kljub vsem oviram je žlahtnjenje industrijske konoplje v Evropi zelo intenzivno, kar dokazuje vedno večje število sort vpisanih na evropsko sortno listo. V uporabi so klasični pristopi, ki se uporabljajo pri žlahtnjenju tujeprašnic, to so medsebojno opravevanje oz. križanje, samoopravevanje in pridobivanje hibridov s križanjem različnih sort. V prihodnosti čaka žlahtnitelje več izzivov, kot je npr. vzgoja sort z ustreznim kanabinoidnim profilom za uporabo v medicinske namene in pridelava takih sort preko feminiziranih semen ter pridobitev hibridov iz homozigotnih linij.

Ključne besede: industrijska konoplja, *Cannabis sativa* L., žlahtnjenje, enodomna sorta, dvodomna sorta

BREEDING METHODS IN HEMP (*Cannabis sativa* L.)**Abstract**

Hemp has a wide applicability therefore there are many objectives of hemp breeding, e.g. higher fiber content in stem with increased quality, high seed yield with improved nutritional composition, specific cannabinoid profile, etc., but Δ^9 -THC content below 0.2% is common to all old and new hemp varieties. Hemp is open-pollinated and dioecious plant with high genetic variability, what leads to many breeding problems, such as it needs to be maintained in isolation due to the

¹ Asist. dr., Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-pošta: marko.flajsman@bf.uni-lj.si

strictly open pollinated plant species; the selection of male plants before flowering is difficult; cross-pollination among all cannabis plants exist and there is a lack of molecular breeding methods (e.g. marker-assisted selection). Despite all the obstacles, plant breeding is intensive in Europe, as evidenced by the increasing number of varieties listed on the Common catalogue of EU varieties. Breeding of hemp is caring on by using classical approaches, which are used for open-pollinated species, such as mass selection, cross-pollination, self-fertilization and hybrid breeding by crossing different varieties. In the future, breeders will be probably challenged by creation of varieties with the appropriate cannabinoid profile for medical use and cultivating such varieties through feminized seeds and obtaining hybrids from homozygous lines.

Key words: hemp, *Cannabis sativa* L., breeding, dioecious variety, monoecious variety

1 UVOD

Navadna konoplja je enoletna zelnata rastlina, ki se v naravi pojavlja v dvodomni spolni obliki (ženski in moški cvetovi se pojavijo na ločenih rastlinah), majhen delež rastlin v populaciji (ena na tisoč do ena na milijon dvodomnih rastlin) je enodomnih (moški in ženski cvetovi so na isti rastlini) (Berenji in sod., 2013). Je tujeprašnica (vetrocvetka) in kratkodnevnicna, ki je močno odvisna od fotoperiode; začetek cvetenja je močno odvisen tudi od temperature (Salentijn in sod., 2019).

Ne glede na to, da genetske in morfološke razlike med številnimi skupinami konoplje otežujejo taksonomsko opredelitev in da klasifikacija vrste ni poenotena, se je v zakonodaji in nato v vsakdanji rabi uveljavila laična delitev na dve skupini konoplje, in sicer glede na vsebnost psihoaktivnega kanabinoida Δ^9 -THC (delta-9-tetrahidrokanabinol); rastline (sorte, populacije, linije, genotipi, ekotipi), ki vsebujejo Δ^9 -THC nad 0,2 % v suhi snovi (v Kanadi in nekaterih EU državah je ta meja 0,3 % ali več), so uvrščene v t. i. medicinsko konopljo. Vse ostale skupine konoplje z vsebnostjo Δ^9 -THC pod 0,2 % pa spadajo med industrijsko konopljo in so dovoljene za pridelavo na prostem kot poljščina (Small in Cronquist, 1976; Fike, 2016). To ni delitev glede na uporabo, kot ime nakazuje, saj se v zadnjem času tudi industrijska konoplja (ki vsebuje Δ^9 -THC < 0,2 % in več CBD (kanabidiol) ali katerega drugega kanabinoida), uporablja v medicinske namene in se iz suhih socvetij v postopku ekstrakcije pridobiva fitokanabinoide z namenom uporabe proti različnim obolenjem in bolezenskim stanjem. Medicinska konoplja pa se uporablja izključno v medicinske namene (Janatova in sod., 2018).

Klasifikacija vrste navadna konoplja je težavna, saj nekateri raziskovalci vse rastline konoplje uvrščajo v eno vrsto z več podvrstami in varietetami, drugi pa v več vrst (Fike, 2016). Ne glede na težave pri taksonomski razvrstitvi konoplje pa

ostaja dejstvo, da se lahko rastline iz vseh pod/vrst in skupin med sabo prosto oprašujejo (Small, 1972). Pri medicinski konoplji je v novejši zgodovini prihajalo do načrtnih križanj med številnimi različnimi populacijami in sortami, zato se je genetska raznolikost močno povečala (Onofri in Mandolino, 2017). Vendar pa novi trendi gojenja rastlin medicinske konoplje iz potaknjencev (kloni) starševskih rastlin zmanjšujejo pomen klasičnega križanja in gojenja iz semen, kar omejuje tvorbo novih alelnih kombinacij in na ta način močno zmanjšuje genetsko variabilnost sort medicinske konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Na drugi strani pa poteka žlahtnjenje industrijske konoplje izključno preko semen, t.j. s križanjem različnih sort in skupin konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Primarni cilj žlahtniteljev je fiksacija željenih lastnosti preko povečevanja homozigotnosti na lokusu oz. lokusih za določeno lastnost, a hkrati ohranjati heterozigotnost na ostalih lokusih v genomu in s tem vigor take sorte (Clarke in Merlin, 2017). Žlahtnjenje industrijske konoplje v Evropi je v zadnjih letih intenzivno, kar dokazuje vedno več sort, ki so registrirane na EU sortni listi; leta 1995 je bilo registriranih 12 sort, leta 2004 45 sort in leta 2008 46 sort, 51 sort je bilo na evropski sortni listi leta 2013, trenutno pa je registriranih 72 sort navadne konoplje (Plant variety database ..., 2019).

V prispevku je prikazan pregled žlahtnjenja izključno industrijske konoplje s poudarkom na predstavitvi žlahtniteljskih ciljev in metod žlahtnjenja industrijske konoplje, ki so danes v uporabi in vodijo do pridobitve novih sort.

2 ŽLAHTNITELJSKI CILJI

Žlahtniteljski cilj je najbolj pomembno izhodišče v procesu žlahtnjenja kulturnih rastlin. Pri industrijski konoplji so zaradi specifičnosti uporabe različnih delov rastline žlahtniteljski cilji zelo različni. Ker se je skozi zgodovino uporaba konoplje spreminjala, so se skladno s potrebami spreminjali tudi žlahtniteljski cilji. Skupni in glavni cilj pri žlahtnjenju vseh sort industrijske konoplje, ne glede na namen uporabe, je nizka stopnja Δ^9 -THC, ki mora biti v Sloveniji pod zakonsko predpisano mejo 0,2 %. Pomembna skupna cilja sta še čim večja odpornost na bolezni in škodljivce ter čim večja stabilnost pridelka v različnih rastnih pogojih. Ostale morfološke in fiziološke lastnosti, npr. dolžina rastne dobe, dolžina cvetenja, stopnja enodomnosti ali dvodomnost, višina rastlin, vsebnost in sestava kanabinoidov, pridelek semena in vlaken, ipd., pa so lastne sortam, ki jih žlahtnimo glede na namen uporabe (Salentijn in sod., 2015).

2.1 Vlakena

Pri pridelavi konoplje za vlakna je cilj čim višja vsebnost vlaken. Genetski potencial dvodomnih sort glede na delež vlaken je ocenjen na 38 do 40 % vlaken v

stebelu, v praksi pa je mogoče realno pridobiti 28 do 30 % vlaken iz stebela dvodomne konoplje (Bócsa in Karus, 1998).

Pomembna je tudi ustrezna kakovost vlaken, kjer je cilj čim boljše razmerje med primarnimi in sekundarnimi vlakni v korist prvih. Za uporabo v papirni in tekstilni industriji so zaželena vlakna z visoko vsebnostjo celuloze, nizko stopnjo lignifikacije in z maloštevilni prečnimi povezavami pektinov in ostalih strukturnih elementov v celični steni celic, ki tvorijo vlakna (Mandolino in Carboni, 2004). Pri pripravi biokompozitov, ko se vlakna vmešajo v nek umetni nosilec, so zelo pomembne površinske lastnosti vlaken, njihova finost in natezna trdnost (Placet, 2009; Gamelas, 2013).

Pokazalo se je, da imajo vremenske in rastne razmere ter procesiranje stebel in ekstrakcija večji vpliv na kakovost vlaken kot pa sam genotip (Müssig, 2003). Zato imata način pridelave konoplje in ekstrakcija vlaken večji potencial za izboljšanje kakovosti pridobljenih vlaken konoplje kot pa žlahtnjenje novih sort (Finta-Korpelova in Berenji, 2007). Kljub temu je bilo na Nizozemskem pridobljenih nekaj sort, katerih vlakna so bolj odporna na mehansko procesiranje stebel pred in pri ekstrakciji, t.j. pri godenju in trenju, kar lahko vodi k izboljšani kakovosti vlaken in k enostavnejši ter cenejši ekstrakciji (Salentijn in sod., 2015).

2.2 Seme

Pridelek semena je pri konoplji nizek, od nekaj 100 kg/ha pa do največ 1,5 t/ha (Flajšman in sod., 2018), zato je eden izmed bolj pomembnih ciljev pri žlahtnjenju konoplje povečati pridelek semena. Ta cilj je bil delno dosežen s pridobitvijo enodomnih sort, ki imajo običajno večji pridelek semena od dvodomnih sort (Berenji in sod., 2013). Ker je pridelek semena kvantitativna lastnost, dedovana s številnimi geni na več lokusih, je napredek pri žlahtnjenju z uporabo tradicionalnih metod žlahtnjenja počasen (Clarke in Merlin, 2017). Zato ostaja konoplja glede količine pridelka semena nekonkurenčna drugim poljščinam, npr. žitom.

Drug vidik izboljšave vsebnosti semena je njegova hranilna sestava. Seme konoplje ima ugodno prehransko sestavo, saj je bogat vir beljakovin, nenasičenih maščobnih kislin, vlaknin ter posameznih vitaminov in mineralov (Kušar in sod., 2018). Pri žlahtnjenju konoplje za uporabo v prehrani se stremi predvsem k dvigu deleža proteinov in olja v semenih kot tudi izboljšanju maščobno kislinске (MK) sestave olja. Konopljino olje vsebuje okoli 80 % nenasičenih MK, zaradi česar ima nizko oksidativno stabilnost in je zaradi tega hitro kvarljivo na sobni temperaturi, kar bi radi z žlahtnjenjem izboljšali (Bielecka in sod., 2014). Cilj žlahtnjenja je tudi izboljšati sicer že ugodno razmerje med linolno in α -linolensko kislino (Ranalli, 2004) ter zvišati vsebnost gama linolenske kisline (Berenji in sod., 2013). Sintezna pot proteinov in MK je kodirana z manj geni, zato je selekcija primernih linij in

žlahtnjenje sort nekoliko manj zahtevno kot v primeru zviševanja pridelka (Clarke in Merlin, 2017).

2.3 Socvetja za ekstrakcijo kanabinoidov

Leta 2001 je prišla v EU zakonodaja, s katero so v industrijski konoplji omejili zgornjo dovoljeno mejo Δ^9 -THC na 0,2 %. Od takrat se je žlahtnjenje konoplje intenzivneje usmerilo v linije z zelo malo ali nič Δ^9 -THC (Grassi in McPartland, 2017).

V zadnjem času postajajo zanimive sorte industrijske konoplje z visoko vsebnostjo kanabinoidov (razen Δ^9 -THC, katerega vsebnost mora ostati pod 0,2 % v suhi snovi), predvsem CBD. Ideja je tudi pridobiti sorte, ki bi imele visoko vsebnost samo določenega kanabinoida, npr. CBG (kanabigerol), THCV (tetrahidrokanabivarin) in CBC (kanabikromen) za uporabo v farmaceutiki za pripravo zdravilnih učinkovin (Mandolino in Carboni, 2004). Industrijska konoplja postaja privlačna za gojenje z namenom pridobivanja kanabinoidov, ker jo je dovoljeno gojiti na prostem, kjer lahko ob ugodnih vremenskih in rastnih pogojih doseže svoj potencial glede izražanja (kvantitativno in kvalitativno) sekundarnih metabolitov. Genetsko ozadje dedovanja kemotipov (kemotip je kanabinoidni profil rastline) je dobro pojasnjeno (de Meijer in sod., 2003; de Meijer, 2014; Weiblen in sod., 2015). Toda na količino nastalih kanabinoidov vpliva več različnih genov, okoljski dejavniki in spol rastline (Grassi in McPartland, 2017), kar otežuje žlahtnjenje in natančno odbiro rastlin z željenimi lastnostmi, ki so posledica izključno genotipa.

3 METODE ŽLAHTNJENJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE

3.1 Masovna selekcija

Masovna selekcija se izvaja tako, da se iz najboljših rastlin ohrani seme, ki se naslednje leto spet poseje, postopek pa se ponavlja leto za letom (Brown in sod., 2014). Z uporabo ponavljajoče se masovne selekcije so v preteklosti kmetje (nevede) iz divjih populacij ustvarili pokrajinske populacije (angl. landraces). Kmetje so povečevali homozigotnost populacij na lokusih za agronomsko pomembne lastnosti (npr. višina stebel, pridelek semena) s sejanjem semena iz rastlin z agronomsko željenimi lastnostmi, medtem ko sta se heterozigotnost na lokusih za odpornost in vigor rastlin krepila preko naravne selekcije (Clarke in Merlin, 2017). Masovna selekcija je učinkovita metoda pri izboljšavi enostavnih kvalitativnih lastnosti, ki imajo visoko dednost. Če se pa natančna masovna selekcija vrši dalj časa, lahko pride tudi do napredka pri bolj kompleksnih kvantitativnih lastnostih, ki imajo nizko stopnjo dednosti. Pri konoplji se masovna

selekcija uspešno uporablja za izboljšanje visoko dednih lastnosti, kot sta npr. delež vlaken v stebli in kanabinoidov v žlezah trihomov (Hennink, 1994).

Masovna selekcija se lahko izvaja iz rastlin, ki so zrasle iz mešanice semena več starševskih genotipov kot tudi na rastlinah, ki so potomke semena ene same starševske rastline, kar na koncu privede do genetsko bolj homogene žlahtniteljske linije. Masovna selekcija pri konoplji je bolj učinkovita, če samo odbranim moškim rastlinam pustimo, da cvetijo in oprašijo ženske rastline, nato pa samo iz odbranih ženskih rastlin shranimo seme. Na ta način so bile požlahtnjene in so še danes vzdrževane nekatere evropske dvodomne sorte (npr. Carmagnola, Kompolti, Lovrin in Novosadska konoplja) (Clarke in Merlin, 2017).

3.2 Medsebojno križanje (cross-breeding)

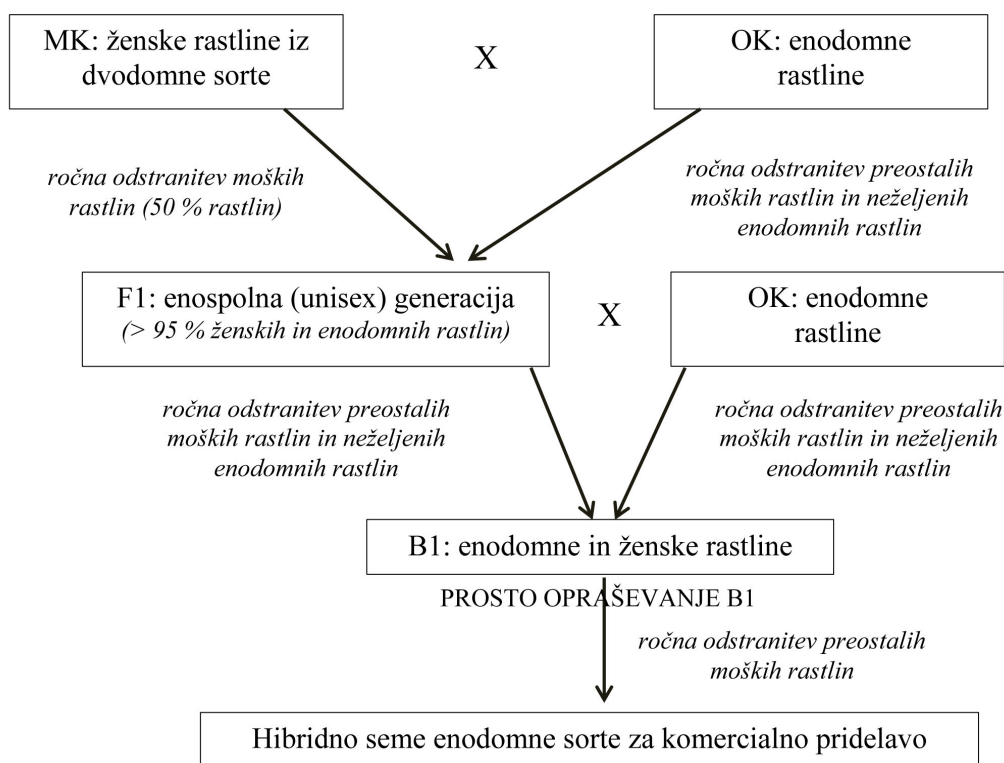
Pri tej metodi so žlahtnitelji za starša izbrali dve čim bolj izenačeni (vse rastline znotraj linije so morale biti morfološko čim bolj enake), a med sabo genetski različni liniji (pozneje so uporabili tudi sorte) in ju križali med sabo na prostem ter potomce odbirali glede na vsebnost vlaken, pridelok stebel in semen, glede na spol, fenološki razvoj, kakovost stebel, nizko vsebnost Δ^9 -THC, odpornost na bolezni, škodljivce in peganje. Do izboljšanih linij potomcev so prišli preko selekcije potomcev iz ene same matrne rastline, ki pa je bila oprašena z več različnimi očeti (angl. half-sib family). Selekcija je temeljila na splošni kombinacijski sposobnosti različnih kombinacij križanj (Salentijn in sod., 2015).

3.3 Žlahtnjenje s ciljem pridobivanja hibridov (hybrid breeding)

Žlahtnitelji konoplje so opazili, da načrtna križanja genotipov, ki so si med sabo močno različni, pripomorejo k večjemu vigorju potomcev, kar so pripisovali efektu heteroze oz. hibridnemu vigorju. Navadna konoplja je vrsta, kjer čistih homozigotnih linij (t.j. homozigotnih genotipov) ni, zato tudi pravih hibridov, ki nastanejo s križanjem čistih linij, še ni bilo pridobljenih (Berenji in sod., 2013). Zato pri konoplji hibridno žlahtnjenje poimenujemo križanja: a) med genetsko različnimi sortami, ki pa so čim bolj homogene; tako je bilo požlahtnjenih več sort, prve pridobljene na ta način so Uniko-B, Kompolti hibrid TC in YunMa 3 (Salentijn in sod., 2015); b) med različnimi homogenimi linijami, ki so večkrat samooprašene. 'Sintetik' je umetna populacija rastlin, ki je bila odbrana skozi masovno selekcijo in nato dalj časa vzdrževana v izolaciji (enodomne rastline so bile samooprašene skozi več generacij) z namenom čim večje genetske izenačitve. Najboljše linije (običajno med 4 in 10) se nato med sabo križa in pridobi t.i. sintetik. Opisan pristop so razvili v Franciji in ga uporabljajo za izboljševanje stržena stebela in pridelka semena (Berenji in sod., 2013).

Pridobivanje hibridnega konopljinega semena poteka podobno kot pri pravih hibridih, kjer potrebujemo materno komponento, ki nima moških cvetov in ne proizvaja peloda, in očetno komponento, ki služi kot oprasivalec. Pri dvodomnih sortah sicer poznamo ženske rastline, ki lahko služijo kot materna komponenta, vendar je problem v tem, da se med posejanim semenom dvodomne sorte pojavi okoli 50 % moških, ki jih je treba odstraniti pred cvetenjem, kar je praktično nemogoče izvesti v večjem obsegu, torej v namene pridobivanja večjih količin semena, kjer morajo biti posejane večje površine. Opisan problem je rešil Bócsa (1967) z odkritjem, da so F1 potomci križanja dvodomnih ženskih rastlin in enodomnih rastlin, ki so oprasivna linija, v 70 do 85 % ženske rastline, 10 do 15 % enodomne rastline in samo 1 do 2 % moške rastline. F1 generacijo so imenovali enospolne rastline (angl. unisexual). Ti F1 potomci so v procesu pridobitve hibridnega semena služili kot materna linija, iz katere je bilo še vedno potrebno odstranjevati moške rastline, toda v znatno manjšem obsegu. Finta-Korpelova in Berenji (2007) sta natančneje opisala pridobivanje tri-linijskega hibridnega semena na Madžarskem; križanje dvodomnih ženskih rastlin in enodomnih rastlin poteka na površini 1 ha, kjer mora biti razmerje med materno in očetno komponento 3:1 ali manj. Na ta način je mogoče v prvem letu pridobiti 400 do 500 kg F1 semena (50 do 100 g na žensko rastlino), kar služi kot materna komponenta za setev v vrste na 200 do 250 hektarih, kjer se nato v drugem letu pridobi končno tri linijsko hibridno seme na način, da se zraven poseje tudi očetno komponento. To je dvodomna linija, kjer moške rastline služijo kot oprasivalci. Tak tri-linijski hibrid je glede na spol sestavljen iz 50 % ženskih in 50 % moških rastlin. Iz ženskih rastlin matrne komponente je tako v drugem letu mogoče pridobiti 0,5 do 1 t/ha tri-linijskega hibridnega semena, ki je namenjeno komercialni pridelavi in zadostuje za setev 3000 ha, če je setvena količina 80 kg/ha (namen pridelave tovrstnih hibridov konoplje je bil za vlakna). Z izbiro genotipa očetne komponente (enodomna linija) v prvem letu žlahtnjenja kot tudi z izbiro očetne komponente v zadnjem letu križanja (dvodomna linija) so žlahtnitelji vplivali na lastnosti tri-linijskega hibridnega semena. Začetnik tovrstnega pridobivanja hibridnega semena je bil dr. Ivan Bócsa iz Kmetijskega raziskovalnega inštituta »Fleischmann Rudolf« v mestu Kompolt na Madžarskem (Finta-Korpelova in Berenji, 2007).

Francoske sodobne sorte konoplje so enodomne sorte. Vendar to ne pomeni, da so vse rastline enodomne, saj je sorta sestavljena iz 50 % ženskih in 50 % enodomnih rastlin, moških rastlin pa ni (Berenji in sod., 2013). Postopek pridobitve se nekoliko razlikuje od madžarskega, saj so francoske sorte dvo-linijski odprto opraseni hibridi (slika 1).



Slika 1: Shema pridobitve hibridnega semena in novih sort s križanjem enodomnih in dvodomnih rastlin. MK: materna komponenta; OK: očetna komponenta (prirejeno po Berenji in sod., 2013)

Pridobitev F1 enospolne generacije (angl. unisex) v prvem letu poteka na enak način kot na Madžarskem, in sicer s križanjem dvodomnih ženskih rastlin (moške rastline je treba pred cvetenjem odstraniti) in enodomnih rastlin, ki so opraševalna linija. V drugem letu se F1 rastline povratno križa z enodomno očetno komponento iste linije, kar vodi v pridobitev F2 semena. V obeh letih je treba v populaciji rastlin enodomne očetne komponente in tudi F1 potomcev odstranjevati preostale moške rastline in neželjene fenotipe ter atipične rastline (slika 2). V tretjem letu se F2 rastline med sabo prosto oprašijo, njihov pridelek pa je dvo-linijsko hibridno seme (50 % ženskih in 50 % enodomnih rastlin), namenjeno komercialni pridelavi (Finta-Korpelova in Berenji, 2007; Berenji in sod., 2013). To je način, kako je mogoče enostavneje pridobiti velike količine semena enodomne sorte z manj vloženega dela v primerjavi s klasičnim razmnoževanjem in ohranjanjem enodomnih sort (Berenji in sod., 2013). Tudi več enodomnih novejših sort iz Poljske je bilo pridobljenih na opisan način (Poniatowska in sod., 2019).



Slika 2: Primer dveh atipičnih rastlin; levo – rastlina z zavitim stebлом in dvema vrhovoma; desno – rastlina s prevelikim številom preozkih lističev v listih

3.4 Mutacijsko žlahtnjenje

Mutacijsko žlahtnjenje, kjer na različne načine (fizikalni in kemijski načini) induciramo mutacije v dednem zapisu rastline, posnema naravni proces spontanih mutacij (Liang, 2012). Enodomne rastline konoplje naj bi bile posledica spontane mutacije v dvodomnih rastlinah. Tudi rumena stebła konoplje, ki so jo v preteklosti uporabljali pri žlahtnjenju in se je po barvi stebła jasno ločevala od ostalih sort, so bila posledica naravne spontane mutacije (Berenji in sod., 2013). Sort konoplje, ki bi bile pridobljene na ta način, uradno ni registriranih. Grassi in McPartland (2017) omenjata, da so Di Candilo in sod. (2000) uporabili s ^{60}Co gama žarki obsevan pelod sort Carmagnola in Fibranova ter pridobili sorti Red petiole (rastline so imele rdeče obarvane petiole-listne peclje) in Yellow apex (rastline so imele rumeno obarvane lističe na vrhu rastline). Ker sta bili opisani lastnosti nepopolno dominantni, se po nekaj generacijah razmnoževanja nista ohranili in zelena barva se je povrnila. Tudi sorta Ermo je nastala tako, da so rastline sorte Ermes oprašili s pelodom moške rastline z nizko vsebnostjo kanabinoidov, ki so jo obsevali s ^{60}Co gama žarki (Grassi in McPartland, 2017). Nobene od opisanih sort danes ni na evropski sortni listi. Flajšman in sod. (2017) so obsevali semena treh sort

industrijske konoplje in določili odmerke obsevanja, ki bi bil primeren za uporabo v žlahtniteljske namene konoplje. Dela z mutacijskim žlahtnjenjem konoplje niso nadaljevali.

3.5 Genomske raziskave navadne konoplje in žlahtnjenje z uporabo molekulskih markerjev

Molekulski markerji za gene, ki so vpleteni v biosintezne poti posameznih metabolitov ali odgovorni za izražanje pomembnih agronomskih lastnosti, bi omogočili odbiro rastlin že v njihovi juvenilni fazi, torej precej pred cvetenjem, in bi bili v veliko pomoč žlahtniteljem (de Meijer, 2004). Za uporabo molekulskih markerjev pri žlahtnjenju rastlin mora biti vsaj delno znan genom preučevane rastline.

Velik napredek na področju genomske raziskave navadne konoplje je pomenila objava osnutkov genoma in transkriptoma leta 2011. Van Bakel in sod. (2011) so z Illumina sekvenciranjem določili genomsko zaporedje ženskih rastlin medicinske konoplje (sorta Purple Kush) in industrijske konoplje (sorta Finola). Ugotovili so, da se med sortama pojavljajo številne razlike, npr. v medicinski konoplji je prisoten gen *THCAS* (angl. Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase) in odsoten gen *CBDAS* (angl. cannabidiolic acid synthase), ki sta odgovorna za sintezo THCA in CBDA. V industrijski konoplji je stanje obratno. Na ta način so delno (odkrili so tudi nekaj psevdogenov za oba encima) potrdili teorijo, da je kemotip konoplje kodiran z dvema tesno povezanima lokusoma. Ugotovili so tudi, da ima medicinska konoplja prisotnih mnogo kopij gena *AAE3*, ki bi lahko bil vključen v biosintezo kanabinoidov. V nadaljnjo genomsko analizo, kjer so želeli ugotoviti dodatne razlike med medicinsko in industrijsko konopljo, so vključili še USO-31 (sorta industrijske konoplje) in Chemdawg (sorta medicinske konoplje). Ugotovili so, da sta se medicinska in industrijska konoplja iz njihove raziskave značilno genetsko razlikovali. Transkriptom konoplje (določen iz korenin, stebela, poganjkov in cvetov sorte Purple Kush) obsega več kot 30 000 genov. Pri primerjavi izražanja genov biosintezne encimatske poti kanabinoidov med konopljama Purple Kush in Finola so ugotovili, da so geni omenjene poti 15 × višje izraženi pri medicinski konoplji. Med višje izraženimi geni pri sorti Purple Kush so bili tudi številni transkripcijski faktorji, ki vplivajo na številne razvojne procese v žleznih trihomih (van Bakel in sod., 2011). Objavljen genom navadne konoplje je bil podlaga za identifikacijo 55 genov za encime sintaze v biosintezni poti terpenov, ki so bili tudi tkivno specifično izraženi (Allen in sod., 2019).

Weiblen in sod. (2015) so odkrili kvantitativni lokus (angl. quantitative trait locus – QTL), ki je povezan s skupno količino kanabinoidov in njihovim razmerjem (predvsem razmerjem med THCA in CBDA) v rastlini.

Sawler in sod. (2015) so s pomočjo 14 031 markerjev za polimorfizem posameznih nukleotidov (SNP - angl. singel nucleotide polymorphism) uspešno ločili industrijsko (43 vzorcev) od medicinske konoplje (81 vzorcev), kjer samo 2 vzorca glede na izvor in ime nista ustrezala ugotovljenemu genetskemu profilu.

Laverty in sod. (2018) so na podlagi križanja medicinske (sorta Purple Kush) in industrijske konoplje (sorta Finola) izdelali fizično in genetsko karto. Iz sekvenčnih podatkov so sestavili 10 kromosomov. Ugotovili so, da sta gena za sintezo glavnih dveh kanabinoidov (*THCAS* in *CBDAS*) nepovezana oz. se nahajata na dveh različnih lokusih, toda zelo blizu na kromosomu 6. Kromosomi 5, 9 in 10 so telocentrični in eden izmed njih bi lahko bil spolni kromosom. Mapa še ni končana, saj na njo ni mogoče mapirati vseh poznanih transkriptov konoplje, med njimi so tudi markerji za določanje moškega spola.

Tudi Grassa in sod. (2018) so iz pridobljenih podatkov o nukleotidnem zaporedju konoplje sestavili 10 kromosomov. Objavili so natančno genetsko karto, pridobljeno s sekvenciranjem 100 različnih genomov konoplje staršev in potomcev ene družine križanja, s pomočjo katere so razkrili genetski mehanizem, ki je odgovoren za razmerje med CBDA in THCA v rastlinah konoplje. Ugotovili so, da se v genomu konoplje nahaja večje število kopij genov za encime sintaze, ki sintetizirajo kanabinoide. Predpostavili so, da je verjetno od števila kopij genov posamezne sintaze odvisno, kakšno je na koncu razmerje med kanabinoide. Poleg tega so sintazni geni pod nadzorom regulatornih elementov iz drugih regij genoma in imajo večji vpliv na količino proizvedenih kanabinoidov kot sintaze same. Lokusi s *CBDAS* geni (ne lokusi s *THCAS* geni) imajo verjetno glavni vpliv na CBDA/THCA razmerje.

Salentijn in sod. (2019) so naredili pregled možnih genov, ki v konoplji nadzirajo čas cvetenja, določajo spol in kakovost vlaken. S poznavanjem genetskih mehanizmov, ki nadzirajo opisane lastnosti, je mogoče izboljšati metode žlahtnjenja (uporaba molekularskih markerjev) in skrajšati čas za pridobitev novih izboljšanih sort.

Kljub številnim raziskovalnim naporom pri odkrivanju genetskega ozadja navadne konoplje pa je malo uporabnih rezultatov raziskav prešlo mejo bazičnega raziskovanja in se uveljavilo kot pomoč pri žlahtnjenju. Uporabnost molekularskih markerjev za žlahtnjenje se je zaenkrat pokazala pri določanju spola (Mandolino in sod., 1999; Törjék in sod., 2002; Kolenc in Čerenak, 2017) in pri določanju kemotipa. Pacifico in sod. (2006) so razvili PCR marker B1080/B1192, s katerim je bilo mogoče zanesljivo določiti kemotip rastline. Vendar pa se je pokazalo, da lahko pride pri genetskem določevanju kemotipa tudi do odstopanj (Weiblen in sod., 2015), kar kaže na kompleksnost sistema dedovanja in izražanja genov za sintezno pot kanabinoidov. Welling in sod. (2016) so z dvema SCAR markerjema z 98 % uspešnostjo predvideli kanabinoidne profile 22 različnih akcesij konoplje.

Še vedno ne obstaja markerski sistem, ki bi bil povezan z enodomnostjo rastlin (enodomne rastline imajo enak kariotip kot dvodomne ženske rastline), kljub temu da enodomne sorte pridobivajo na veljavi v smislu obsežnega žlahtnjena in razširjene pridelave. Prav tako npr. še niso razviti markerji, ki bi bili povezani z rastno dobo in odzivom na fotoperiodo, z zastopanostjo trihomov na cvetovih in s kakovostjo vlaken (Onofri in Mandolino, 2017). Taki markerji bi bili še posebej uporabni pri dvodomnih sortah za odbiro moških rastlin, ki niso nosilci pomembnih ekonomskih lastnosti (pridelek semena, kanabinoidi) in je njihov doprinos viden šele na izraženih lastnostih ženskih rastlin naslednje generacije (Clarke in Merlin, 2017). Razlog za počasen napredek pri razvoju markerskih sistemov za uporabo v žlahtnjenju je predvsem v tem, da je genetska variabilnost v navadni konoplji zelo velika in stopnja heterozigotnosti visoka, kar je posledica tujeprašnosti in medsebojnega opraševanja rastlin konoplje v preteklosti (Salentijn in sod., 2015).

4 TEŽAVE PRI ŽLAHTNJENJU NAVADNE KONOPLJE

Težave pri žlahtnjenju navadne konoplje izvirajo iz njenih lastnosti, kot so dvodomnost, tujeprašnost in medsebojno opraševanje. Konoplja ni rastlina, ki bi jo bilo enostavno žlahtniti, čeprav proizvede veliko peloda kot tudi semen. Uspešno žlahtnjenje tujeprašnic, ki se oprašujejo z vetrom, zahteva najprej odbiro rastlin z željenimi lastnostmi, potem pridobitev homozigotnih linij s ponavljajočo se odbiro in samooplodnjo, nato pa križanje različnih homozigotnih linij in testiranje njihovega potomstva na polju (Posselt, 2010). Pri dvodomni konoplji so ženske rastline tiste, ki so najbolj uporabne (vlakna, seme, socvetja), medtem ko se moške rastline, ki so pri križanjih nujno potrebne zaradi peloda, uporabljajo samo za vlakna. Zato je odbira moških rastlin pri konoplji težavna, saj jih ne moremo odbirati glede na fenotip in uporabno vrednost moških rastlin (izjema je odbira glede na vlakna, kar je znano kot Bredemannova metoda), ampak se šele na ženski populaciji potomcev vidijo dobre oz. slabe lastnosti moške starševske linije. Dvodomne rastline tudi ni mogoče po naravni poti samoopraševati (Clarke in Merlin, 2017). Na drugi strani pa so enodomne sorte težavne predvsem za vzdrževanje in razmnoževanje semena, saj so naravno nagnjene k povrnitvi v dvodomnost, kar zahteva velike napore pri odstranjevanju neželenih moških rastlin pri razmnoževanju semenskega materiala (Berenji in sod., 2013). Pelod konoplje se lahko z vetrom prenaša na velike razdalje (Small in Antle, 2003), zato je potrebno posamezne linije gojiti v izolaciji, da ne pride do neželenega opraševanja, saj se rastline konoplje ne glede na izvor prosto oprašujejo med sabo in je potomstvo v celoti fertilno (Small, 1972). Small in Antle (2003) sta preučevala širjenje peloda z vetrom in ugotovila, da je zakonsko določena meja 5 km več kot dovolj, saj je v njihovem poskusu število pelodnih zrn močno upadlo že v oddaljenosti 400 m od rastlin. Je pa res, da so imeli enodomno konopljo (moški cvetijo manj bujno), odvisno je bilo tudi od vetra.

Razvoj nove sorte je dolgotrajen proces, traja lahko tudi več kot 20 let (Poniatowska in sod., 2019). Kvantitativne lastnosti (pridelek, količina kanabinoidov, idr.) so običajno dedovane z velikim številom genov na različnih lokusih v genomu, kjer ima posamezen gen majhen učinek. Zato je dednost takih lastnosti nizka in napredek pri žlahtnjenju počasen, kar otežuje tudi genetski napredek pri žlahtnjenju konoplje (Clarke in Merlin, 2017). Za začetek žlahtnjenja nove sorte, kjer uporabimo ciljna križanja, je potrebno imeti veliko populacijo rastlin, iz katere lahko odberemo rastline z željenimi lastnostmi in jih potem uporabimo za nadaljnja križanja. Velika populacija rastlin je potrebna zato, da se lahko večina pomembnih alelnih oblik prenese na potomce; pri enodomnih sortah je potrebnih za eno starševsko komponento uporabiti vsaj 1000 odbranih rastlin, pri dvodomnih pa vsaj 2000 odbranih rastlin (Crossa in sod., 1993).

5 ZAKLJUČKI

Industrijska konoplja je rastlina s številnimi nameni uporabe, čemur je prilagojeno tudi žlahtnjenje. Številne sorte iz preteklosti se ne uporabljajo več, zamenjale so jih novejša sorte, ki imajo predvsem nizko vsebnost Δ^9 -THC in jih odlikujejo druge uporabne lastnosti. Vedno večje število sort na evropski sortni listi dokazuje, da poteka v Evropi intenzivno žlahtnjenje industrijske konoplje.

Industrijska konoplja se načrtno žlahtni zadnjih 100 let. Kljub številnim raziskavam v zadnjem času na področju genetike navadne konoplje, npr. objava osnutkov genoma in transkriptoma (van Bakel in sod., 2011), konstrukcija genetskih map (Grassa in sod., 2018; Lavery in sod., 2019), uporaba številnih markerjev za preučevanje genetske variabilnosti različnih skupin rastlin konoplje ter določanja spola in kemotipa (Onofri in Mandolino, 2017), učinkovitih molekularnih metod, ki bi omogočale žlahtnjenje s pomočjo markerjev, ni na voljo, z izjemo markerjev za spol in kemotip. Še vedno so največ v uporabi klasični pristopi, ki se uporabljajo pri žlahtnjenju tujeprašnic, kot so masovna selekcija, medsebojno oprasovanje ter vzgoja hibridnih sort. Zato je napredek pri pomembnih ekonomskih lastnostih navadne konoplje, kot so pridelek vlaken, semena in kanabinoidov, počasen.

Kljub temu so žlahtnitelji industrijske konoplje uspeli doseči nekaj pomembnih prebojev pri žlahtnjenju, kot je odbira moških rastlin pred cvetenjem za namene povečevanja deleža vlaken v steblih, pridobitev enodomnih sort, hibridno križanje dvodomnih in enodomnih sort ter pridobitev zgodnje sorte Finole, ki cveti neodvisno od fotoperiode, ima velik potencial za pridelek visoko kakovostnega semena in je primerna za strojno žetev.

Industrijska konoplja se zaradi pomembnosti kanabinoidov pri uporabi v medicini (Janatova in sod., 2018) že prideluje za uporabo v medicinske namene, v prihodnosti pa se bo verjetno še v večjem obsegu. Zato čaka žlahtnitelje pomemben izziv, kako pridobiti sorte, ki bi vsebovale čim več željenega kanabinoida (npr. CBD, CBG, THCV, CBC, idr.), a hkrati zakonsko dovoljeno vsebnost Δ^9 -THC-a. Drug vidik pridobivanja sort za uporabo v medicini je tudi pridobiti rastline z ustreznim razmerjem med določenimi kanabinoidi.

Uporabi industrijske konoplje v medicinske namene bo morala slediti tudi njena pridelava. Oprašene ženske rastline sintetizirajo nižje količine kanabinoidov, ker po cvetenju primarne metabolite preusmerijo v zorenje semen (Chandra in sod., 2017). Zato pri pridelavi za namene pridobivanja kanabinoidov moške in enodomne rastline niso zaželjene, saj s svojim pelodom oprašujejo ženske rastline in tako znižujejo pridelek kanabinoidov. V ta namen bi bilo potrebno pridobiti feminizirano seme industrijske konoplje, ki bi omogočalo pridelavo samo ženskih rastlin brez dolgotrajnega in naporenega odstranjevanja moških ali enodomnih rastlin.

Gotovo je eden izmed večjih izzivov tudi vzgoja homozigotnih linij konoplje in iz njih vzgojenih križancev.

Zahvala. Delo je nastalo v okviru raziskovalnega programa P4-0077 Kmetijske rastline - genetika in sodobne tehnologije, ki ga financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Bohancu (Biotehniška fakulteta) za nasvete.

6 VIRI

- Allen KD, McKernan K, Pauli C, Roe J, Torres A, Gaudino R (2019) Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. PLoS ONE. 2019; 14(9): e0222363.
- Berenji J., Sikora V., Fournier G., Beherec O. Genetics and selection of hemp V: Hemp: Industrial Production and Uses. Bouloc P. (ur.). London, CABI. 2013: 48-72.
- Bielecka M., Kaminski F., Adams I., Poulson H., Sloan R., Li Y., ..., Graham I.A. Targeted mutation of $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturase genes in hemp produce major alterations in seed fatty acid composition including a high oleic hemp oil. Plant biotechnology journal. 2014; 12(5): 613-623.
- Bócsa I. Kender fajtahibrid előállításához szükséges unisexuális (hímmentes) anyafajta nemesítése. Rostnövények. 1967: 3-7.
- Bócsa I., Karus M. The cultivation of hemp. Botany, varieties, cultivation and harvesting. HempTech, Sebastopol (ZDA.). 1998: 172 str.
- Brown J., Caligari P., Campos H. Plant Breeding, 2nd Edition. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, Združeno kraljestvo. 2014: 278 str. |

- Chandra S., Lata H., Khan I. A., ElSohly M.A. *Cannabis sativa* L.: Botany and Horticulture. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 76-100.
- Clarke R.C., Merlin M.D. Cannabis domestication, breeding history, present-day genetic diversity, and future prospects. *Critical reviews in plant sciences*. 2016; 35(5-6): 293-327.
- Crossa J., Hernandez C.M., Bretting P., Eberhart S.A., Taba S. Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 1993; 86: 673-678.
- de Meijer E.P.M. 2004. The breeding of Cannabis cultivars for pharmaceutical end uses. V: The medicinal uses of cannabis and cannabinoids. G. W, Whittle B. A., Robson P. J. (ur). Pharmaceutical Press, London. 2004: 55-69.
- de Meijer E.P.M. The chemical phenotypes (chemotypes) of Cannabis. V: Handbook of Cannabis. Handbooks in Psychopharmacology. Pertwee R.G. (ur). Oxford University Press, London. 2014: 89-110.
- de Meijer E.P.M., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V.C., Ranalli P., Mandolino G. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 2003; 163(1): 335-346.
- Di Candilo M., Di Bari V., Giordano I., Grassi G., Pentagelo A., Ranalli P. Due nuovi genotipi di canapa da fibra: descrizione morfo-produttiva. *Sementi Elette*. 2000; 46: 25-31.
- Fike J. Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2016; 35(5-6): 406-424.
- Finta-Korpelova Z., Berenji J. Trends and achievements in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Bilten za hmelj, sirak i lekovito bilje*. 2007; 39(80): 63-75.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D., Bohanec B. Določanje odmerka obsevanja z X-žarki RD30 iz površine listov pri treh sortah navadne konoplje. V: ČEH, Barbara (ur.) in sod. *Novi izzivi v agronomiji 2017 : zbornik simpozija, Laško, 2017*. Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo. 2017; 140-146.
- Flajšman M., Kocjan Ačko D., Čeh B. Karakteristike sort navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) v pridelavi v Sloveniji. *Hmeljarski bilten*. 2018; 25: 44-58.
- Gamelas J.A.F. The surface properties of cellulose and lignocellulosic materials assessed by inverse gas chromatography: a review. *Cellulose*. 2013; 20: 2675-2693.
- Grassa C.J., Wenger J.P., Dabney C., Poplawski S.G., Motley S.T., Michael T.P., Weiblen G.D. A complete Cannabis chromosome assembly and adaptive admixture for elevated cannabidiol (CBD) content. *BioRxiv*. 2018. doi: 10.1101/458083
- Grassi G., McPartland J.M. Chemical and morphological phenotypes in breeding of *Cannabis sativa* L. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 137-160.
- Hennink S. Optimization of breeding for agronomic traits in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) by study of parentoffspring relationships. *Euphytica*. 1994; 78: 69-76.
- Janatova A., Frankova A., Tlustoš P., Hamouz K., Božik M., Klouček P. Yield and cannabinoid contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Industrial Crops and Production*. 2018; 112: 363-367.
- Kolenc Z., Čerenak A. Application of sex molecular markers in hemp plant (*Cannabis sativa* sp.). *Hmeljarski bilten*. 2017; 24: 121-128.

- Kušar A., Flajšman M., Kocjan Ačko D., Pravst I., Čeh B. Prehranska sestava industrijske konoplje glede na sorto. *Hmeljarski bilten*. 2018; 25: 76-84.
- Laverty K.U., Stout J.M., Sullivan M.J., Shah H., Gill N., Holbrook, L., ..., Van Bakel H.A. A physical and genetic map of *Cannabis sativa* identifies extensive rearrangements at the THC/CBD acid synthase loci. *Genome research*. 2019; 29(1): 146-156.
- Liang Q. Foreword. V: Plant mutation breeding and biotechnology. Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H. (ur.). CABI, Oxfordshire. 2012: 608 str.
- Mandolino G., Carboni A. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*. 2004; 140: 107-120.
- Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Ranalli P. Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1999; 98: 86-92.
- Müssig J. Quality aspects in hemp fiber production influence of cultivation, harvesting and retting. *Journal of Industrial Hemp*. 2003; 8(1): 11-32.
- Onofri C., Mandolino F. Genomics and Molecular Markers in *Cannabis sativa* L.. V: S. Chandra in sod. (ur.). *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer International Publishing, Cham. 2017; 319-342.
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*. 2006; 17: 257-268.
- Placet V. Characterization of the thermo-mechanical behaviour of Hempfibers intended for the manufacturing of high performance composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2009; 40: 1111-1118.
- Plant variety database- European Commission. Dostopno na: http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=A&species_id=240&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted (oktober 2019)
- Poniatowska J., Wielgus K., Szalata M., Szalata M., Ożarowski M., Panasiewicz K. Contribution of Polish agrotechnical studies on *Cannabis sativa* L. to the global industrial hemp cultivation and processing economy. *Herba Polonica*. 2019; 65(2): 37-50.
- Posselt U.K. Breeding methods in cross-pollinated species. V: Fodder Crops and Amenity Grasses. *Handbook of Plant Breeding*. Vol. 5. Boller B. (ur.). Springer Science and Business Media, LLC, New York. 2010: 39-87.
- Ranalli P. Current status and future scenarios of hemp breeding. *Euphytica*. 2004; 140(1-2): 121-131.
- Salentijn E.M., Petit J., Trindade L.M. The Complex Interactions Between Flowering Behavior and Fiber Quality in Hemp. *Frontiers in plant science*. 2019: 10.
- Salentijn E.M., Zhang Q., Amaducci S., Yang M., Trindade L.M. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*. 2015; 68: 32-41.
- Sawler J., Stout J.M., Gardner K., Hudson D., Vidmar J., Butler L., ... , Myles S. The genetic structure of marijuana and hemp. *PloS one*. 2015; 10(8): e0133292.
- Small E. Interfertility and chromosomal uniformity in *Cannabis*. *Canadian Journal of Botany*. 1972; 50: 1947-1949.
- Small E., Antle T. A preliminary study of pollen dispersal in *Cannabis sativa* in relation to wind direction. *Journal of Industrial Hemp*. 2003; 8(2): 37-50.

-
- Small E., Cronquist A. Practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon. 1976; 25, 4: 405-435.
- Törjék O., Bucherna N., Kiss E., Homoki H., Finta-Korpelová Z., Bócsa I., Nagy I., Heszky L.E. Novel male-specific molecular markers (MADC5, MADC6) in hemp. Euphytica. 2002; 127(2): 209–218.
- Van Bakel H., Stout J.M., Cote A.G., Tallon C.M., Sharpe A.G., Hughes T.R., Page J.E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. Genome biology. 2011; 12(10): R102.
- Weiblen G.D., Wenger J.P., Craft K.J., ElSohly M.A., Mehmedic Z., Treiber E.L., Marks M.D. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. New Phytologist. 2015; 208: 1241–1250.
- Welling M.T., Liu L., Shapter T., Raymond C.A., King G.J. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. Euphytica. 2016; 208(3): 463-475.
- Zeven A.C., Zhukovsky P.M. Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity. Pudoc, Wageningen, Nizozemska. 1975: ISBN 9022005496.