

Review Article

Sekundarni metaboliti v navadni konoplji (*Cannabis sativa* L.) in njihova vloga pri obrambi rastline pred škodljivci in patogeni

Luka Bitežnik ^{1*}, Marina Dermastia ², Stanislav Trdan ¹

Izveček

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) je razširjena rastlina z zapleteno fitokemijo in bogatim sekundarnim metabolizmom. Sekundarni metaboliti so snovi, katerih vloga je interakcija rastline z okoljem. Njihova sinteza je pogojena s prisotnostjo stresa in je energetsko zelo potratna. Rastline varujejo pred škodljivci in patogeni ter abiotičnimi dejavniki. V konoplji so v največji meri prisotni kanabinoidi, terpenoidi in flavonoidi, skoncentrirani v socvetjih ženskih rastlin. Njihova ekološka vloga in delovanje ni povsem raziskano. Kanabinoidi Δ -9-*trans*-tetrahidrokanabinol (Δ ⁹-THC), kanabidiolna kislina (CBDA) in drugi naj bi bili vpleteni v antioksidativne procese in obrambni sistem rastline, zaradi prostorsko izolirane sinteze in citotoksičnih stranskih produktov. Ob prisotnosti stresa pride do povečanja njihove vsebnosti in spremembe kemijskega profila. Stres aktivira stresne signalne molekule – jasmonsko kislino in njene derivate, ki vplivajo na sproščanje terpenoidov, ter poveča izražanje genov v fenilpropanoidni poti, ki je ključna za sintezo flavonoidov. Sekundarni metaboliti delujejo sinergično in v povezavi z mikrobiomom – endofitnimi bakterijami in glivami – negativno vplivajo na škodljive organizme ter varujejo rastlino.

Ključne besede

Cannabis sativa L., flavonoidi, kanabinoidi, navadna konoplja, terpenoidi, patogeni, škodljivci

1 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

2 Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

* Corresponding author:

E-mail address: luka.biteznik@bf.uni-lj.si

Citation: Bitežnik, L., Dermastia, M., Trdan, S. (2023). Secondary metabolites of hemp (*Cannabis sativa* L.) and their role in defence against pests and pathogens. *Acta Biologica Slovenica* 66 (1)

<https://doi.org/10.14720/abs.66.1.12521>

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY SA) license

Secondary metabolites of hemp (*Cannabis sativa* L.) and their role in defence against pests and pathogens

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a globally distributed plant with a complex phytochemistry. Secondary metabolism is extremely rich. Secondary metabolites are substances whose role is the interaction of the plant with the environment. Their synthesis depends on the presence of stress and is very energy-consuming. They protect plants from pests and pathogens, as well as from abiotic factors. Cannabinoids, terpenoids and flavonoids are the predominant substances concentrated in the inflorescences of female plants. Their ecological role and function are not yet fully understood. The cannabinoids Δ -9-*trans*-tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC), cannabidiolic acid (CBDA), and others probably act as antioxidants, and based on their spatially isolated synthesis and cytotoxic by-products, they are thought to be involved in the plant's defense system. Under stress, their content increases and the chemical profile changes. Stress activates stress signalling molecules - jasmonic acid and its derivatives, which affect the release of terpenoids, and increases the expression of genes in the phenylpropanoid pathway, which is crucial for the synthesis of flavonoids. Secondary metabolites act synergistically and in conjunction with the microbiome - endophytic bacteria and fungi - have a negative effect on harmful organisms and protect the plant.

Keywords

cannabinoids, *Cannabis sativa* L, hemp, flavonoids, pests, pathogens, terpenoids

Uvod

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) je zelo razširjena rastlina na naravnih rastiščih, ki ji ustrezajo. Izvirala naj bi iz območij centralne in jugovzhodne Azije, od koder se je razširila po vsem svetu (Schultes in sod. 1974). Konoplja je vsestransko uporabna v tekstilni industriji in gradbeništvu zaradi hitre rasti in visoke vsebnosti celuloze ter lesnih vlaken. Ker pa vsebuje veliko bioaktivnih snovi – rastlinskih sekundarnih metabolitov z biološkim učinkom v človeškem telesu, je že tisočletja del vzhodnjaških kultur in je vse bolj cenjena tudi v farmacevtski industriji in medicini (Andre in sod. 2016). Pripravke iz konoplje danes uporabljamo za lajšanje kroničnih in nevropatskih bolečin ter bolezenskih znakov, ki se pojavljajo pri obolelosti z rakom, multiplo sklerozo, Parkinsonovo, Crohnovo boleznijo, številnimi psihičnimi motnjami in drugimi boleznimi (Hill 2015). Pripravki so se izkazali za učinkovite tudi pri zmanjševanju slabosti in stimulaciji apetita v primeru obolelosti s HIV-om (Woolridge in sod. 2005).

Sekundarni metaboliti rastlinam omogočajo interakcije z okoljem in s tem pomagajo pri njihovem preživetju (Yazaki 2004). Vključeni so v obrambne mehanizme pred biotičnimi in abiotičnimi dejavniki, kot je UV-B sevanje,

ter tudi v komuniciranje med samimi rastlinami (Schafer in Wink 2009). V splošnem velja, da so rastline z višjo vsebnostjo sekundarnih metabolitov odpornejše, vendar je proizvodnja teh snovi energetsko zelo potratna. To vpliva na rast in razvoj rastline, zato je povečana sinteza pogojena s prisotnostjo stresa. Rastline so razvile kompleksne obrambne sisteme, v katerih biotični ali abiotični stresni dejavniki sočasno vplivajo na številne signalne in odzivne poti. Obrambni sistemi omogočajo rastlini odkrivanje patogena in tudi sprožitev tarčne obrambe (Zaynab in sod. 2018).

Kljub številnim raziskavam sekundarnih metabolitov konoplje in njihovih učinkov na ljudi, je podatkov o vlogi teh snovi v biotičnem stresu in dejanskem ekološkem pomenu dokazanega protimikrobnega delovanju sekundarnih metabolitov iz konoplje zelo malo. V tem pregledu smo te skope informacije zbrali.

Obrambni sistem konoplje

Obrambni sistem konoplje vključuje fizično in kemijsko obrambo. Fizično rastlinske dele ščitijo trihomi; med njimi je največ žleznih. Žlezne votline žleznih trihomov (slika 1)

so občutljive na dotik in se zlahka poškodujejo ter na listno površino izločijo sekundarne metabolite – kanabinoide in terpenoide. Te spojine oksidirajo in polimerizirajo v smolo, ki mehansko in kemijsko prepreči napad škodljivca (Potter 2009). Bogat terpenški profil in intenzivne arome delujejo repelentno na številne škodljivce (Pate 1994).

V kombinaciji s sekundarnimi metaboliti, kot dodatna mehanska prepreka škodljivcem delujejo na listni površini prisotni posebni trihomi – cistolitni laski (slika 1 B) (Glattstein in Gorski 2001). Cistolitni laski so mikroskopsko majhni, močno silificirani kristali kalcijevega karbonata, ki ovirajo mobilnost manjšim herbivorom, večjim pa poškodujejo ustni aparat (Levin 1973).

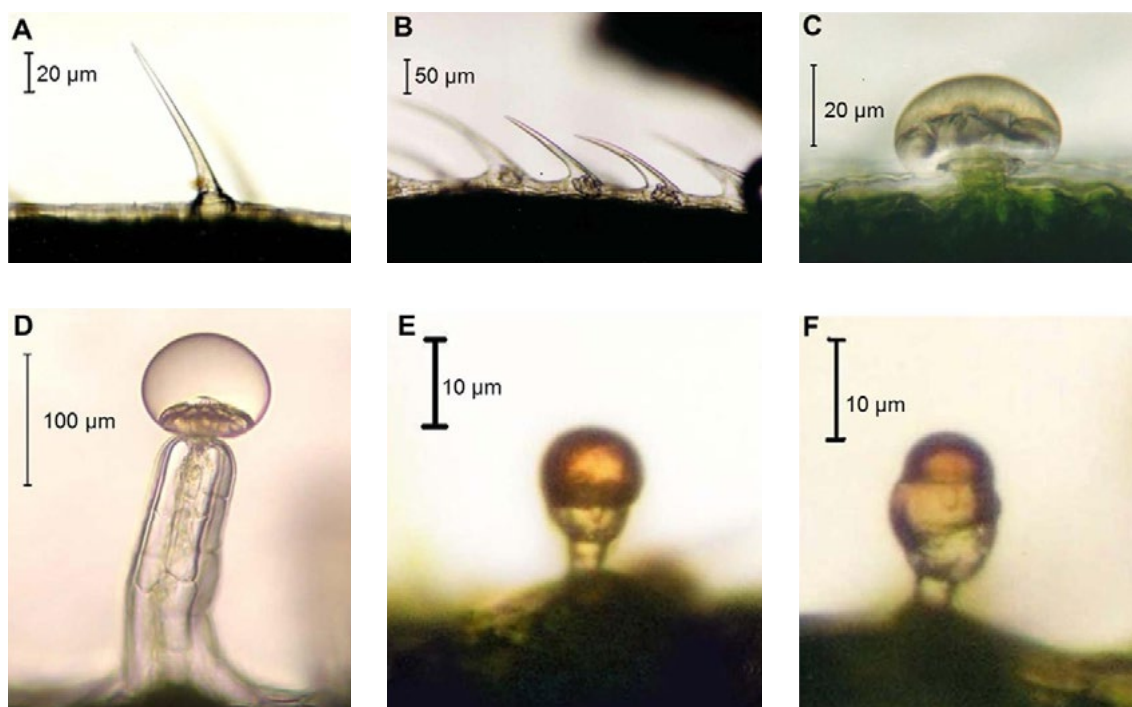
Fitokemija konoplje je zelo zapletena in zajema več kot 480 spojin (EISOhly in Slade 2005) iz različnih kemičnih skupin. Nekatere spojine so primarni metaboliti, vendar je večina sekundarnih. Med slednjimi so najpogostejši kanabinoidi, terpenoidi, flavonoidi, stilbenoidi, lignani in alkaloidi.

Njihova koncentracija v rastlinskem tkivu je pogojena z delom rastline, starostjo rastline, sorto, okoljskimi dejavniki in agrotehničnimi ukrepi (Keller in sod. 2001).

Prevladujoči sekundarni metaboliti v navadni konoplji in njihova interakcija z okoljem

Kanabioidi

Kanabinoidi so skupina terpenofenolnih spojin, sestavljeni iz 21 ogljikovih atomov in so v rastlini prisotni v obliki karboksilne kisline. V rodu *Cannabis* so najpogosteje zastopana skupina sekundarnih metabolitov (Głodowska 2016), saj jih več kot 100 različnih. Med njimi je najbolj raziskan Δ -9-*trans*-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC). Pri sesalcih



Slika 1. Vrste žleznih in nežleznih trihomov na rastlinah konoplje. (A) Enocelični nežlezni trihom; (B) cistolitni laski; (C) »glavasti sedeči« (angl. capitate-sessile) trihom (D) »pecljati glavasti« (angl. capitate-stalked) trihom; (E) »preprost čebulni« (angl. simple bulbous) trihom; (F) »kompleksen čebulasti« (angl. complex bulbous) trihom (Andre in sod. 2016).

Figure 1. Types of glandular and non-glandular trichomes on cannabis plants. (A) Unicellular non-glandular trichome; (B) cystolithic hairs; (C) "capitate-sessile" trichome (D) "capitate-stalked" trichome; (E) "simple bulbous" trichome; (F) "complex bulbous" trichome (Andre et al. 2016).

Δ^9 -THC ob zaužitju povzroča psihoaktivne učinke, zato je v večini držav po svetu prepovedan (Whiting in sod. 2015). Najpogosteje prisotni kanabinoidi oziroma fitokanabinoidi v rastlini so tetrahidrokanabinolna kislina (THCA), kanabidiolna kislina (CBDA), kanabigerolna kislina (CBGA), kanabinolna kislina (CBNA), kanabikromeska kislina (CBCA) in kanabikiklolna kislina (CBLA) (Jin in sod. 2020). Vsi kanabinoidi imajo pomembno vlogo pri obrambi rastline pred škodljivci, patogeni in abiotičnimi dejavniki (McPartland in sod. 2000; Pate 1994).

V rastlini so kanabinoidi nakopičeni predvsem v žlezni votlinah trihomov (slika 1. C-F) na ženskih socvetjih (Whiting in sod. 2015; Tanney in sod. 2021). Vsebnost kanabinoidov v socvetjih konoplje je odvisna od genetske osnove rastline, mineralne prehrane, osvetlitve, relativne zračne vlage in časa vzorčenja (Keller 2001). Njihova vsebnost in razmerja se močno spreminjajo glede na rastlinsko tkivo in se razlikujejo tudi na podlagi geografskega porekla rastline (Hemphill in sod. 1980). V neoprašenih ženskih socvetjih dosegajo vsebnosti do 21 % suhe mase socvetja, medtem ko je vsebnost v listih lahko le 0,3 % (Richins in sod. 2018). Rastline iz severnih območji imajo višje vsebnosti Δ^9 -THC in CBD, kar lahko pojasnimo z ostrejšimi podnebnimi razmerami (Leizer in sod. 2000). Poleg tega je vsebnost Δ^9 -THC v primerjavi s CBD višja pri rastlinah, ki rastejo bližje ekvatorju, zato naj bi Δ^9 -THC med drugim rastlino ščitil pred UV žarki. Δ^9 -THC je viskozna hidrofobna in nizko hlapna snov, ki v povezavi z drugimi kanabinoidi in terpeni tvori voskom podobne snovi. Te imajo številne funkcije, med katerimi je tudi omejitev transpiracije in izgube vode v suhih rastnih razmerah (Pate 1994).

Okoljski dejavniki povzročajo v rastlini oksidativen stres, ki ga uravnavajo antioksidanti in njihovi encimi. Pri varovanju celic pred reaktivnimi kisikovimi spojinami so najpomembnejši tokoferoli, fenoli, superoksid dismutaza, askorbat peroksidaza in katalaza. Reaktivne kisikove spojine vplivajo na biokemijo kanabinoidov, zato predvidevamo, da so kanabinoidi vpleteni v antioksidativne procese. Prosti radikali in hidroksilirani intermedijati sodelujejo pri oksidaciji nevtralne in kislinske oblike Δ^9 -THC v nevtralno in kislinsko obliko CBN ali Δ^8 -THC (Flores-Sanchez in Verpoorte 2008).

Specifično mesto skladiščenja kanabinoidov v žlezni trihomih na površini rastline kaže še na drugo vlogo v rastlini, kar so potrdili Sirikantaramas in sodelavci leta 2005. Stranski produkt THCA-sintaze in oksidacije CBGA je vodikov peroksid, ki nastaja v velikih količinah. THCA in

vodikov peroksid sta za rastlinske celice toksična, zato se THCA-sintaza izloča iz sekretornih celic v žlezne votline. Prostorsko izolirana biosinteza prepreči poškodbo celic. V žlezni trihomih poteka sinteza tudi drugih kanabinoidov, kot na primer izomer CBDA in CBCA, kar bi lahko pomenilo vključenost kanabinoidov v obrambnem mehanizmu rastline (Taura in sod. 1996).

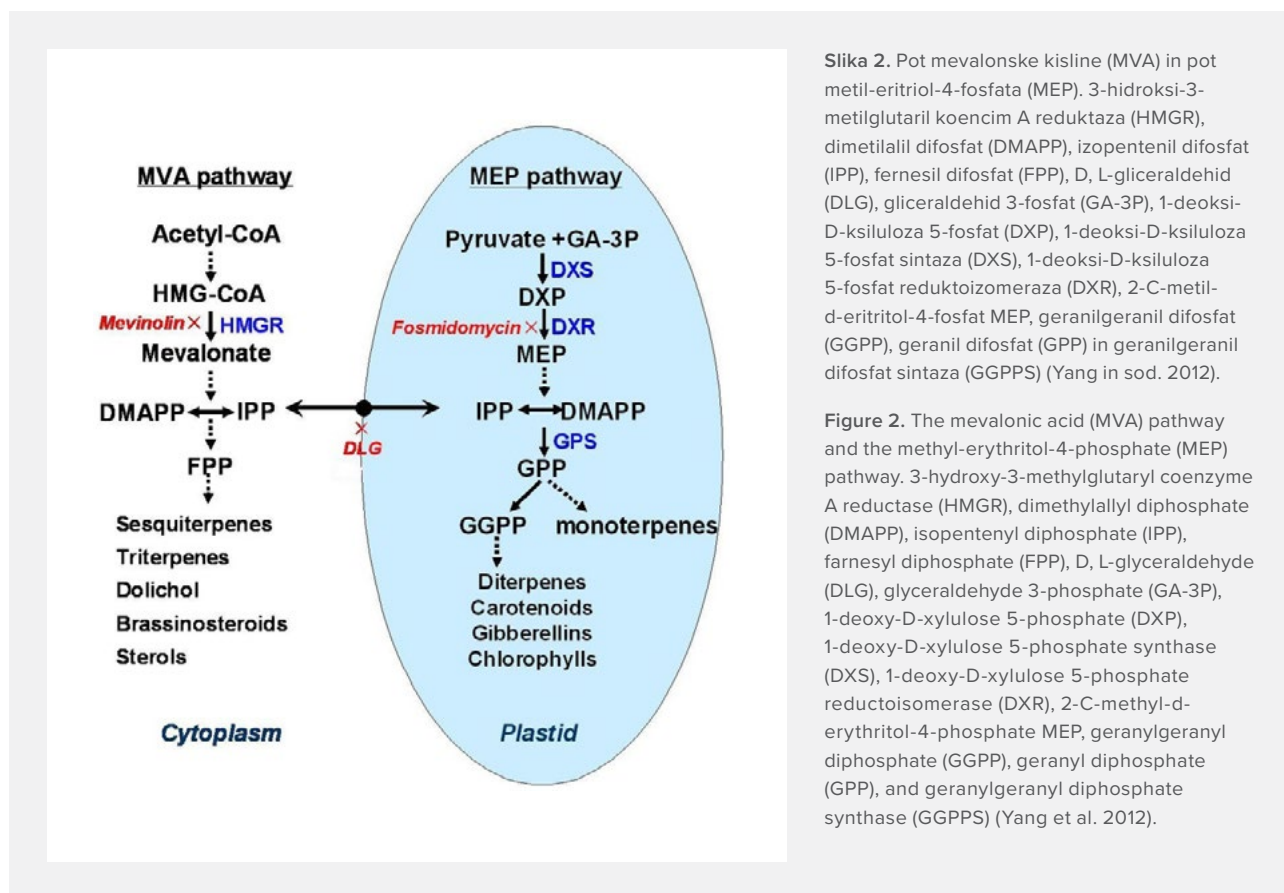
Terpenoidi

Terpenoidi so spojine, ki vključujejo terpene in njihove oksigenirane derivate. Terpeni imajo skupaj z drugimi sekundarnimi metaboliti pomembno vlogo v obrambnem sistemu rastline pred škodljivci in patogeni (Gershenzon in Dudareva 2007). Terpenoide nekaterih rastlinskih vrst danes uporabljamo kot insekticide, med najbolj poznanimi so azadirahthin in piretrini. Konoplja sintetizira več kot 140 terpenoidov, med katerimi so v največji meri zastopani terpeni (McPartland in Sheikh 2018). Od prisotnosti terpenov je odvisna aroma in intenzivnost vonja rastline. Vsebnost terpenov v rastlinskem tkivu je odvisna od genetske osnove, okoljskih dejavnikov in razvojne stopnje rastline (Brenneisen 2007).

Ob poškodbi rastlinskega tkiva in sprožitvi sinteze rastlinske signalne molekule v primeru prisotnosti stresnih dejavnikov – jasmonske kisline in njenih derivatov (Ruan in sod. 2019), se iz rastline začno sproščati hlapne spojine. To so večinoma terpenoidi in nekatere snovi nastale po šikimski sintezni poti. Za povečano tvorbo terpenoidov sta odgovorni dve sintezni poti – pot mevalonske kisline in pot metil-eritriol-4-fosfata (slika 2) (Bartram in sod. 2006).

Izražanje genov za pot mevalonske kisline in pot metil-eritriol-4-fosfata je zelo nadzorovano, saj obe poti predstavljata pomemben člen v biosintezi izoprenoidov, osnovnih gradbenih enot terpenoidov (Vranová in sod. 2013). Izoprenoidi geranil difosfat (GPP), fernesil difosfat (FPP) in geranilgeranil difosfat (GGPP) so začetne molekule tudi za številne sekundarne metabolite, vključno s kanabinoidi (Bergman in sod. 2019).

Terpene klasificiramo na podlagi števila ponavljajočih se izoprenskih enot, sestavljenih iz petih ogljikovih atomov. V socvetjih, koreninah in listih rastlin konoplje je največ monoterpenev in seskviterpenov. Prevladujoči hlapni terpeni v ženskih socvetjih so monoterpenev, med katerimi so najpogostejši D-limonen, β -mircen, α - in β -pinen, terpinolen ter linalol (Fischedick in sod. 2010). Hlapne terpene lahko z uporabo parne destilacije skoncentriramo



Slika 2. Pot mevalonske kisline (MVA) in pot metil-eritriol-4-fosfata (MEP). 3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A reduktaza (HMGR), dimetilalil difosfat (DMAPP), izopentenil difosfat (IPP), farnesil difosfat (FPP), D, L-gliceraldehid (DLG), gliceraldehid 3-fosfat (GA-3P), 1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat (DXP), 1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat sintaza (DXS), 1-deoksi-D-ksiluloza 5-fosfat reduktioizomeraza (DXR), 2-C-metil-d-eritriol-4-fosfat MEP, geranilgeranil difosfat (GGPP), geranil difosfat (GPP) in geranilgeranil difosfat sintaza (GGPPS) (Yang in sod. 2012).

Figure 2. The mevalonic acid (MVA) pathway and the methyl-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR), dimethylallyl diphosphate (DMAPP), isopentenyl diphosphate (IPP), farnesyl diphosphate (FPP), D, L-glyceraldehyde (DLG), glyceraldehyde 3-phosphate (GA-3P), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR), 2-C-methyl-d-erythritol-4-phosphate MEP, geranylgeranyl diphosphate (GGPP), geranyl diphosphate (GPP), and geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) (Yang et al. 2012).

v eterično olje (Beek in Joulain 2017). Izmed vseh monoterpenov, pinen, mircen in limonen predstavljajo približno 85 % vseh hlapnih terpenov, ki jih zaznamo v bližini rastline, vendar skupno prispevajo manj kot 10 % k celokupni vsebnosti eteričnega olja v rastlinskem tkivu konoplje (Hood in sod. 1973). Konoplja z visoko vsebnostjo Δ^9 -THC ima tri do šest krat višjo vsebnost limonena in pinena v primerjavi z industrijsko konopljo (Mediavilla in Steinemann 1997).

Flavonoidi

V konoplji so določili že več kot 20 flavonoidov, od katerih večina pripada flavon- (apigenin in luteolin) in flavonol- (kaempferol in kvartecin) aglikonom in glikozidom (Flores-Sanchez in Verpoorte 2008). Biološka funkcija flavonoidov je povezana z njihovo potencialno citotoksičnostjo in sposobnostjo interakcije z encimi. Nekateri delujejo kot stabilizatorji prostih radikalov, na primer reaktivnih kisikovih spojin, lahko pa tudi kot kelatorji kovin, pri čemer v Fentonovi reakciji nastajajo reaktivne kisikove spojine (Williams in sod. 2004). Sposobnost keliranja kovin daje OH skupina na tretji

poziciji flavonoidnega skeleta (Verdan in sod. 2011).

Posledica abiotičnega stresa je velikokrat povečana sinteza flavonoidov. Flavon luteolin ima na primer varovalno vlogo pred UV-B sevanjem (Ferreira in sod. 2012). Posebni flavonoidi, ki jih najdemo v rastlinah konoplje so kanaflavini A, B in C. Kanaflavin A so določili tudi v *Mimulus bigelovii*, rastlini iz družine *Phrymaceae*, medtem ko sta preostala dva znana izključno v navadni konoplji (Bautista in sod. 2021).

Sinteza kanaflavinov je tako kot pri večini sekundarnih metabolitov pogojena s stresnimi razmerami, kar so potrdili v raziskavi leta 2020. Z večanjem nadmorske višine se povečuje vsebnost kanaflavina A, B in C (Giupponi in sod. 2020). Sinteza flavonoidov se poveča tudi pri biotskem stresu, saj sprožena obramba pred patogenom poveča izražanje genov v fenilpropanoidni poti. Ob napadu patogena se zmanjša sinteza antocianov in poveča izražanje genov, odgovornih za sintezo flavonov in izoflavonov. Predvidevajo, da zaradi nasprotno delujočega uravnavanja sinteze, izoflavoni prevzamejo vlogo antocianov in delujejo kot antioksidativne in protimikrobne spojine (Samac in Graham 2007).

Pomembni škodljivci in patogeni navadne konoplje

Leta 1976 sta Small in Cronquist izoblikovala uradno nomenklaturu za konopljo in jo uvrstila v družino konopljevcev (Cannabaceae). Razvrstitev v podvrste temelji na vsebnosti sekundarnega metabolita Δ^9 -THC, vendar so med podvrstami tudi znatne razlike v prisotnosti drugih sekundarnih metabolitov. Poznavanje lastnosti gostiteljske rastline in njene kemijske sestave je ključnega pomena za uspešno prepoznavanje patogenov in škodljivcev. Kanabinoid Δ^9 -THC in terpenoida humulen ter kariofilen imajo insekticidno delovanje, medtem ko imajo metil-ketoni repelentno delovanje na listne herbivore (Mediavilla in Steinemann 1997).

Variabilnost vsebnosti sekundarnih metabolitov je zelo velika, zato je zaradi sočasne evolucije patogenov in škodljivcev ter gostiteljske rastline prišlo do speciacije. Škodljivci organizmi napadajo le izbrane rastline (McPartland in sod. 2000). Speciacija škodljivih organizmov je prisotna med podvrstami konoplje, vendar ni dokazov, s katerimi mehanizmi se ti organizmi izogibajo rastlinski obrambi.

McPartland (1992) je identificiral številne patogene, ki okužujejo konopljo. Skupno naj bi bila konoplja gostiteljska rastlina okrog 100 različnim patogenom in številnim škodljivcem, kot so insekti in pajkovci. Novejše raziskave se osredotočajo na patogene na posušeni ženskih socvetjih (Thompson in sod. 2017).

Škodljivci konoplje

Navadna pršica (*Tetranychus urticae*) in karminasta pršica (*Tetranychus cinnabarinus*), iz skupine pršic prelka sta izraziti termofilni vrsti ter zato pogosta škodljivca pri gojenju konoplje v zavarovanih prostorih (McPartland in sod. 2000). Optimalne razmere za razvoj škodljivcev so v času cvetenja rastlin konoplje, zato takrat povzročajo največ škode. Prehranjujejo se na spodnji strani listov, prebadajo posamezne celice in povzročajo izgubljanje klorofila ter zmanjšanje neto fotosinteze rastline. Poškodbe opazimo kot bele ali rumene pike na zgornji strani listov (Park in Lee 2002). Problematična je tudi pršica *Aculops cannabicola*. Je monofag, ki napada liste, listne peclje, meristeme in socvetja ženskih in moških rastlin. Povzroča zvijanje in nekroze listov, ter zmanjšuje produkcijo smolnih snovi pri konoplji (Petanović in sod. 2007). Konoplja je priljubljena

gostiteljska rastlina tudi ušem. Večinoma jo napadajo siva breskova uš (*Myzlis persicae*), konopljina uš (*Phorodon cannabis*) in črna fižolova uš (*Aphid fabae*). Prehranjujejo se s floemskim sokom, le redke sesajo ksilem. Zadržujejo se na spodnji strani listov in povzročajo venenje in rumenjenje ter so prenašalci številnih gliv, bakterij in virusov (Kennedy in sod. 1959; Prado in Tjallingii 1994). Izločajo eksudat, medeno roso, s katero se prehranjujejo mravlje in glive sajavosti, ki povzročajo sekundarne poškodbe na rastlinah (McPartland in sod. 2000). Uši na konoplji so toplo in vlago ljube, previsoke temperature povzročajo pritlikavost osebkov, zmanjšujejo plodnost in skrajšujejo njihovo življenje. So pogostejši škodljivci pri pridelavi na prostem (Chi in Su 2006). V nadzorovanih prostorih in rastlinjakih je zelo pogost škodljivec rastlinjakov ščitkar (*Trialeurodes vaporariorum*). Bolezenska znamenja napada in poškodbe so podobne ušem, rastline izgubljajo vigor, listi venijo in rumenijo. Ob močnejšem napadu rastline propadejo (McPartland in sod. 2000). Rastlinjakov ščitkar ravno tako izloča medeno roso, s katero privabi glive sajavosti, ki posledično zmanjšujejo neto fotosintezo rastline (Hall 1982; Byrne in Miller 1990). Optimalne razmere za razmnoževanje so pri 24 °C in visoki relativni zračni vlagi, ko samice ležejo sto in več jajčec na spodnjo stran listov (Gamarra in sod. 2020). Poleg rastlinjakovega ščitkarja sta zelo problematična še tobakov resar (*Thrips tabaci*) in cvetlični resar (*Frankliniella occidentalis*). Cvetlični resar je škodljivec zunaj rastočih rastlin, medtem ko se tobakov resar pojavlja pri pridelavi rastlin konoplje v zavarovanih prostorih (McCune in sod. 2021). Resarji sesajo celični sok na spodnji strani listov, zato so prve poškodbe težko vidne. Ob močnejšem napadu na listih najdemo njihove izločke, vidne kot majhne črne pike. Izleže se do osem generacij letno, vendar je število močno odvisno od temperature (Van Rijn in sod. 1995, McPartland in sod. 2000).

Patogeni konoplje

Najpogostejši patogen, ki napada rastline konoplje je siva plesen, ki jo povzroča gliva *Botrytis cinerea*. Njen razvoj pospešuje visoka relativna zračna vlaga, zato na obdelovalnih površinah v deževnih mesecih povzroča velike izpade pridelka (Van der Werf in sod. 1995). Do okužbe koreninskega sistema pride v vseh razvojnih stopnjah rastline, socvetja pa gliva kolonizira ob poznem cvetenju ali po spravilu pridelka socvetij. Okužba lahko izbruhne v sušilnicah ali med skladiščenjem in s tem zmanjšuje

kakovost in uporabnost socvetij (Punja in sod. 2019). Pogosti patogen rastočih rastlin je pepelovka, ki jo povzročata glivi *Podospheera macularis* (prej *Sphaerotheca macularis*) in *Leveillula taurica*. Napadata mlade rastline na katerih se bolezenska znamenja pokažejo nekaj tednov po okužbi. Okužba je omejena na liste in se širi v suhih rastnih razmerah, ob nizki stopnji osvetlitve in slabem kroženju zraka. Konidiji uspešno kalijo pri relativni zračni vlagi 0 – 100 %. Ob močnem napadu je okužba za rastlino usodna (Nour 1958; McPartland in sod. 2000).

Vpliv sekundarnih metabolitov konoplje na škodljivce in patogene

Prevladujoči terpeni v eteričnem olju konoplje – α -pinen, β -mircen, ocimen, terpinolen in *trans*-kariofilen delujejo insekticidno na navadno pršico (*T. urticae*) in uš *Aulacorthum solani* (Górski in sod. 2016). Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene napadu navadne pršice se je povišala vsebnost vseh analiziranih terpenov, razen α -pinena. Vsebnost terpenov se je povišala tudi v socvetjih rastlin, ki so bile pred cvetenjem obdelane z akaricidom, kar naj bi nakazovalo pomembnost interakcije s škodljivcem (Kostanda in Khatib 2021). Čeprav je v konoplji veliko terpena β -kariofilena, njegovega insekticidnega delovanja na konopljo še niso proučili. Kljub temu sklepajo, da naj bi deloval podobno (Kostanda in Khatib 2021) kot proti komarju ščitarju (*Aedes aegypti*), žitnemu kutarju (*Rhyzopertha dominica*), riževemu žužku (*Sitophilus oryzae*) in riževemu mokaerju (*Tribolium castaneum*) (Satyal in Setzer 2014). Za enkrat tudi ni znano, če na konopljo deluje kot atraktant moških osebkov navadne pršice in posledično večjo dovzetnosti konoplje na napad pršice, prisoten seskviterpen alkohol farnesol (Nuutinen 2018), kot je to pri rastlini iz iste družine – hmelju (Regev in Cone 1975).

Po izpostavitvi konoplje navadni pršici se je v listih in socvetjih povečala vsebnost kanabinoidov CBG za 29 %, CBC za 41 % in Δ^9 -THC za 52 %, medtem ko je bila vsebnost CBCA višja pri kontrolnih rastlinah, ki niso bile izpostavljene škodljivcu.

Zaradi sinteze hlapnih snovi z insekticidnim delovanjem, ima konoplja dobre sosedске odnose z drugimi rastlinskimi vrstami. Rastline konoplje v bližini bombažnih polj naj bi zmanjševale pojavnost škodljivca listov bombaža

Alabama argillacea, kot vmesni posevek v pridelavi zelenjadnic zmanjšuje prisotnost kapusovega belina (*Pieris brassicae*), rastline krompirja štiti pred koloradskim hroščem (*Leptinotarsa decemlineata*) in zmanjšuje pojavnost poškodb *Delia coarctata* na posevkih pšenice (McPartland 2000).

Že leta 1952 so se začele raziskave o potencialnem protimikrobnem delovanju bioaktivnih snovi konoplje. Danes vemo, da na kanabinoidno biosintezo pot v konoplji dokazano vpliva prisotnost bakterijskih in glivnih patogenov. Številni kanabinoidi delujejo celo na odporne seve bakterij (Gorelick in Bernstein 2017).

Eterično olje konoplje deluje močno protimikrobno proti Gram-pozitivnim bakterijama *Bacillus cereus* in *Staphylococcus aureus*; Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* ter glivam *Candida albicans* in *Aspergillus niger* (Satyal in sod. 2012). Nissen in sodelavci so leta 2010 izvedli raziskavo protimikrobnega delovanja konopljinega ekstrakta v razmerah *in vitro*. Izmed treh izbranih sort konoplje se je za najučinkovitejšega proti Gram-pozitivnim bakterijama *Clostridium* spp. in *Enterococcus* spp. ter Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas* spp. in *Pectobacterium* spp., ter kvasovkam pokazal ekstrakt sorte Futura. Razlog za širok spekter delovanja ekstrakta te sorte je najverjetneje višja vsebnost terpena terpinolena.

Nekateri terpeni imajo v povezavi s kanabinoidi sinergistični učinek, zato poleg lastnega repelentnega delovanja na škodljivce, povečajo tudi insekticidno delovanje kanabinoidov (Russo 2011).

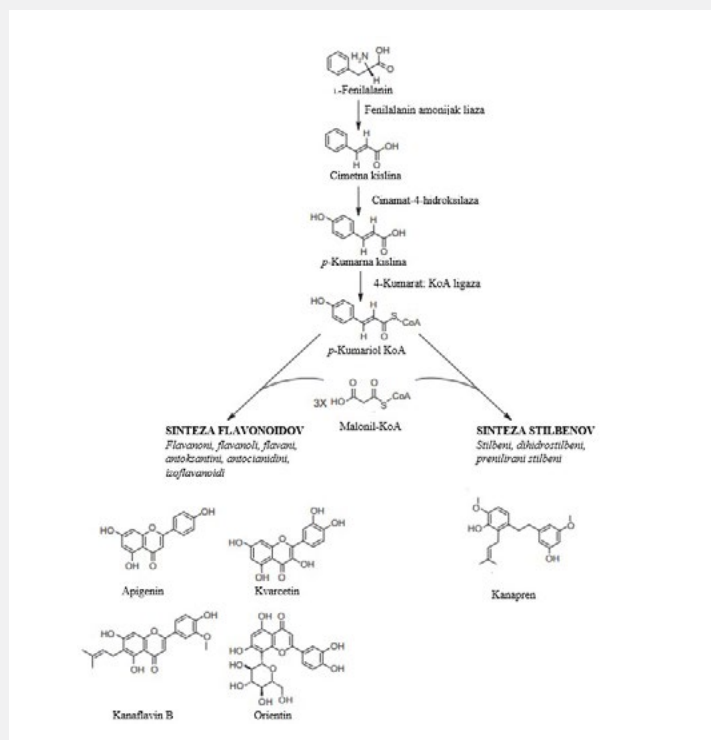
Konopljini sekundarni metaboliti, tako terpenoidi kot kanabinoidi, imajo tudi protiglivne lastnosti. Izolata THC in CBD preprečita kalitev glive *Phomopsis ganjae* (McPartland 1984). Kanabinoida CBC (Turner in Elsohly 1981) in CBG (Elsohly in sod. 1982) ter terpenoidi in fenoli linalol, citronelol, geraniol, eugenol (Kurita in sod. 1981) limonen, evkaliptol, β -myrcene, α - in β -pinen delujejo tako proti bakterijam kot proti glivam (De Groot 1972). Ekstrakt listov konoplje inhibira rast in razvoj glive *Aspergillus niger* in s tem prepreči nastanek črne plesni, ki je pogosto prisotna bolezen na sadju in zelenjavi (Wasim in sod. 1995). V celičnih kulturah konoplje, suspenzija micelija dveh najpogostejših patogenih gliv, *Pythium aphanidermantum* in *B. cinerea*, pospeši biosintezne poti in poviša vsebnosti triptofana, fumarata, aspartata in glutamina (Flores-Sanchez in sod. 2009).

Ob okužbi z glivo *B. cinerea* se poveča izražanje

genov vpletenih v signalno pot salicilne kisline, jasmonske kisline in etilena (Balthazar in sod. 2020). V večini primerov rastlinski obrambni mehanizem proti nekrotrofnim organizmom deluje po signalni poti jasmonska kislina/etilen (Thomma in sod. 2001). Ob okužbi mladih listov konoplje z glivo *B. cinerea*, se poveča izražanje encima fenilalanin amonijak liaze (slika 3.), označevalca v signalni poti jasmonska kislina/etilen, ki katalizira začetno reakcijo biosinteze fenilpropanoidov. Fenilpropanoidi so začetniki za kompleksne sekundarne metabolite, kot so na primer pigmenti ali protimikrobni fitoaleksini (Balthazar in sod. 2020). Jasmonska kislina je pomembna za sintezo flavonoidov in alkaloidov (Hayat in sod. 2010) ter vpliva na vsebnost terpenoidov in kanabinoidov v rastlinah konoplje (Salari in Mansori in sod. 2013). Salicilna kislina je povezana s sistemsko pridobljeno odpornostjo, v kateri se povečuje tudi sinteza sekundarnih metabolitov (Hayat in sod. 2010), vendar njena vloga v obrambi konoplje pred *B. cinerea* ni povsem jasna (AbuQamar in sod. 2006). Eksogena salicilna kislina povečuje ekspresijo gena za THC-sintazo, kar potrjuje njeno vlogo v stimulaciji biosinteznih poti sekundarnih metabolitov (Jalali in sod. 2019). Predvidevajo, da določene sorte konoplje, okužene s *B. cinerea* lahko pridobijo sistemsko odpornost (Balthazar in sod. 2020).

Vse bolj je jasen pomen mikrobioma in z njim tudi endofitnih bakterij in endofitnih gliv pri rastlinah, vključno s konopljo (Kusari in sod. 2013; Kusari in sod. 2014; Taghinasab in Jabaji 2020). Predvidevajo, da so endofiti antagonisti številnih patogenov, med njimi konopljni endofiti tudi antagonisti glivnih rodov *Trichothecium* in *Botrytis* (Kusari in sod. 2013; Kusari in sod. 2014). Ob prisotnosti endofitov se poveča izražanje genov vpletenih v biosintezni poti mevalonske kisline in metil-eritriol-4-fosfata (slika 2), kar naj bi bilo ključno pri zvišanju odpornosti rastline proti stresu (Mishra in sod. 2018). Endofitne bakterije pogosto izločajo sekundarne metabolite, ki so podobni gostiteljski rastlini, kar še dodatno poveča tolerantnost konoplje proti stresnim dejavnikom (Kusari in sod. 2013). *Bacillus megaterium* B4, *Brevibacillus borstelensis* B8, *Bacillus* sp. B11, in *Bacillus* sp. B3 povzročajo motnje komunikacijskih signalov (angl. 'quorum quenching') med celicami bakterij, kar prepreči razvoj odpornosti proti gostiteljskim in/ali endofitnim sekundarnim metabolitom (Taghinasab in Jabaji 2020).

V celičnih kulturah navadne konoplje, tobaka BY-2 in ameriške koruzne sovke (*Spodoptera frugiperda*) delujejo kanabinoidi citotoksično in inducirajo celično apoptozo (Sirikantaramas in sod. 2005).



Slika 3. Biosintezna pot fenilpropanoidov (Thomas in ElSohly, 2016).

Figure 3. Biosynthetic pathway of phenylpropanoids (Thomas and ElSohly, 2016).

Sklepi

Sekundarni metabolizem konoplje je kompleksen sistem, v katerem je še veliko neznank. Številne snovi med seboj sodelujejo in imajo sinergičen učinek pri obrambi rastline pred škodljivci in patogeni. Čeprav ekološka vloga konopljinih kanabinoidov, terpenoidov in flavonoidov še ni povsem razkrita, je jasno, da kanabinoidi in flavonoidi varujejo rastline pred abiotičnim stresom v največji meri pred UV sevanjem, medtem ko kanabinoidi in terpenoidi delujejo repelentno, insekticidno in protimikrobno.

Več študij potrjuje insekticidno in antimikrobno delovanje kanabinoidov THC in CBD. Povečana sinteza THC in CBD se v rastlinah konoplje pojavlja ob napadu in po napadu škodljivca. THC in CBD s številnimi terpeni učinkujeta sinergično.

Ko rastlino napade škodljivec ali jo okuži patogen, se aktivirajo signalne poti, ki delujejo na encim fenilalanin amonijak liaza ali na poti mevalonske kisline in metil-eritriol-4-fosfata. Fenilalanin amonijak liaza katalizira začetno reakcijo fenilpropanoidov, ki so ključni za sintezo fenolnih snovi, medtem ko sta sintezni poti mevalonske kisline in metil-eritriol-4-fosfata odgovorni za sintezno

kanabinoidov in terpenoidov. Glive in bakterije dokazano sprožijo kanabinoidne in terpenske biosintezne poti. To potrjuje vlogo kanabinoidov in terpenov v interakciji rastline z biotskimi dejavniki.

Na rastlinski površini in v rastlini so prisotni številni glivni in bakterijski endofiti, ki sodelujejo pri rastlinski obrambi. V največji meri so prisotni *Chaetomium globosum*, *Eupenicillium rubidurum* in *Penicillium sumatrense* (Kusari in sod. 2014). Delujejo neposredno antagonistično s patogenovimi sekundarnimi metaboliti ali posredno z izločanjem sekundarnih metabolitov, toksičnih za patogena. Endofiti lahko spodbujajo rastlinski sekundarni metabolizem ali celo omejujejo razvoj škodljivega organizma v prid rastlini.

Zaradi pomanjkanja raziskav ekološkega pomena sekundarnih metabolitov pri navadni konoplji, ta pomen ni povsem jasen. Kljub temu vemo, da imajo številne snovi v konoplji varovalno vlogo pred škodljivimi organizmi in da je stres osnova za povečano sintezo sekundarnih metabolitov. Z načrtovanim in pravilnim izvajanjem stresa in ohranjanjem zdravega rastlinskega mikrobioma lahko s tehnologijo pridelave povečamo tvorbo obrambnih snovi in s tem izboljšamo odpornost konoplje proti patogenom in škodljivcem.

Viri

- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S. (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 48, 28–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02849.x>
- Andre, C.M., Hausman, J.F., Guerriero, G. (2016). *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7(19), 17 str. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>
- Balthazar, C., Novinscak, A., Joly, D.L., Filion, M. (2020). Expression of putative defense responses in cannabis primed by *Pseudomonas* and/or *Bacillus* strains and infected by *botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.572112>
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., Boland, W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, 67(15), 1661-1672. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.004>
- Bautista, J.L., Yu, S., Tian, L. (2021). Flavonoids in *Cannabis sativa*: Biosynthesis, Bioactivities, and Biotechnology. *ACS Omega* 6(8), 5119-5123. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00318>
- Beek, T.A. in Joulain, D. (2017). The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. *Flavour and Fragrance Journal* 33(1), 6-51. <https://doi.org/10.1002/ffj.3418>
- Bergman, M.E., Davis, B., Phillips, M.A. (2019). Medically useful plant terpenoids: Biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. *Molecules* 24, 3961. <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>
- Brenneisen, R. (2007). "Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents," in *Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine*, ed. M. ElSohly (New York, NY: Humana Press), 17–49 https://doi.org/10.1007/978-1-59259-947-9_2
- Byrne, D.N., Miller, W.B. (1990). Carbohydrate and amino acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. *Journal of Insect Physiology* 36, 433–439. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(90\)90061-J](https://doi.org/10.1016/0022-1910(90)90061-J)
- Chi, H., Su, H.Y. (2006). Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. *Environmental Entomology* 35, 10–21. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.1.10>

- De Groot, R.C. (1972). Growth of wood-inhabiting fungi in saturated atmospheres of monoterpenoids. *Mycologia*, 64(4), 863–870. <https://doi.org/10.1080/0027514.1972.12019336>
- Elsohly, H.N., Turner, C.E., Clark, A.M., Elsohly, M.A. (1982). Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(12), 1319-1323. <https://doi.org/10.1002/jps.2600711204>.
- ElSohly, M.A., Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences* 78(5), 539-48. <https://doi.org/78:539-54810.1016/j.lfs.2005.09.011>
- Ferreira, M.L.F., Rius, S.P., Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science* 3, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- Fischedick, J.T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y.H., Verpoorte, R. (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 71, 2058–2073. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>
- Flores-Sanchez, I.J., Pec, J., Fei, J., Choi, Y.H., Dusek, J., Verpoorte, R. (2009). Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *Biotechnology* 143(2), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.05.006>
- Flores-Sanchez, I.J., Verpoorte, R. (2008). Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry Review* 7, 615–639. <https://doi.org/10.1007/s1101-008-9094-4>
- Gamarra, H., Sporleder, M., Carhuapoma, P., Kroschel, J., Kreuze, J. (2020). A temperature-dependent phenology model for the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Virus Research* 289, 198107. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198107>
- Gershenzon, J., Dudareva, N., (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3, 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Giupponi, L., Leoni, V., Pavlovic, R. Giorgi, A. (2020). Influence of Altitude on Phytochemical Composition of Hemp Inflorescence: A Metabolomic Approach. *Molecules*, 25(6), 1381. <https://doi.org/10.3390/molecules25061381>
- Glattstein, B., Gorski, A. (2001). Marijuana identification: A test for calcium in cystolithytic hairs. *Microscopy Today*, 9(4), 16. <https://doi.org/10.1017/S155192950005728X>
- Głodowska, M. (2016). *Cannabis sativa* L. and its antimicrobial properties – A review. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Agronomia i ochrona roślin*
- Gorelick, J., Bernstein, N. (2017). *Cannabis sativa* L. Springer International Publishing. Chandra S. et al. (eds.), - Botany and Biotechnology, 439-456. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_21
- Górski, R., Sobieralski, K., Siwulski, M. (2016). The effect of hemp essential oil on mortality *Aulacorthum solani* Kalt. and *Tetranychus urticae* Koch.. *Ecological Chemistry and Engineering*, 23(3), 505-511. <https://doi.org/10.1515/eces-2016-0037>
- Hall, R.A. (1982). Control of whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and cotton aphid, *Aphis gossypii* in glasshouses by two isolates of the fungus, *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology* 101(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1982.tb00794.x>
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- Hemphill, J.T., Paul, J.M. (2004). Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of *Cannabis sativa* L. *Journal of Natural Products* 43. <https://doi.org/10.1021/np50007a009>
- Hill, K.P. (2015). Medical marijuana for treatment of chronic pain and other medical and psychiatric problems: A clinical review. *The Journal of the American Medical Association* 313, 2474–2483. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6199>
- Hood, L.V.S., Dames M.E., Barry, G.T., (1973). Headspace volatiles of marijuana. *Nature* 24, 402-403.
- Jalali, S., Salami, S.A., Sharifi, M., Sohrabi, S. (2019). Signaling compounds elicit expression of key genes in cannabinoid pathway and related metabolites in cannabis. *Industrial Crops and Products* 133, 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.004>
- Jin, D., Dai, K, Xie, Z., Chen J. 2020. Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes. *Scientific Reports* 10, 3309 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6>
- Keller, A., Leupin, M., Mediavilla, V., Wintermantel, E. (2001). Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres. *Industrial Crops and Products* 13, 35–48. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00051-0](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00051-0)
- Kennedy, J. S., Booth, C. O., Kershaw, W. J. S. (1959). Host finding by aphids in the field: *Aphis fabae* scop. (Gynoparae) and *Brevicoryne brassicae* L.; with a re-appraisal of the role of host-finding behaviour in virus spread. *Annals of Applied Biology*, 47(3), 424–444. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1959.tb07277.x>
- Kostanda, E., Khatib, S. (2022). Biotic stress caused by *Tetranychus urticae* mites elevates the quantity of secondary metabolites, cannabinoids and terpenes, in *Cannabis sativa* L.. *Industrial Crops and Products* 176, 114331. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114331>
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945-952. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864635>
- Kusari, P., Kusari, S., Lamshöft, M., Sezgin, S., Spitteller, M., Kayser, O. (2014). Quorum quenching is an antivirulence strategy employed by endophytic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(16), 7173–7183. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5807-3>
- Kusari, P., Kusari, S., Spitteller, M., Kayser, O. (2013) Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity* 60, 137. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0216-3>

- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, functional & medical foods*, 2(4), 35–53. https://doi.org/10.1300/J133v02n04_04
- Levin, D. A. (1973). The role of trichomes in plant defense. *Quarterly Review Biology* 48, 3-15.
- McCune, F., Morphy, C., Eaves, J., Fournier, V. (2021). Onion thrips, *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae), reduces yields in indoor-grown cannabis. *Phytoprotection*, 101(1), 14–20 <https://doi.org/10.7202/1076365ar>
- McPartland, J. (1984). Pathogenicity of *Phomopsis ganjae* on *Cannabis sativa* and the fungistatic effect of cannabinoids produced by the host. *Mycopathologia* 87(3), 149–153. <https://doi.org/10.1007/BF00436900>
- McPartland, J. M. 1992. A review of *Cannabis* diseases. *Journal of the International Hemp Association* 3, 19–23.
- McPartland, J. M., Clarke, R. C., Watson, D. P. (2000). *Hemp Diseases and Pests Management and Biological Control*. University of Vermont, Vermont, USA. Chapter: 4 25-93 <https://doi.org/10.1079/9780851994543.0000>
- McPartland, J., Sheikh, Z. (2018). A review of *Cannabis sativa*-based insecticides, miticides, and repellents. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(6), 1288-1299. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.10.001>
- Mediavilla, V. Steinemann, S. (1997). Essential oil of *Cannabis sativa* strains. *Journal of the International Hemp Association* 4(2), 82-84.
- Mishra, A., Singh, S.P., Mahfooz, S., Bhattacharya, A., Mishra, N., Shirke, P.A.,
- Nissen L., Zatta A., Stefanini I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B., Monti A., (2010). Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*. 31;81(5):413-9. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.11.010>
- Nour, M.A. (1958). Studies on *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. and other powdery mildews. *Transactions of the British Mycological Society*, 41 (1), 17-38. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(58\)80003-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(58)80003-0)
- Nuutinen, T. (2018). Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 198-228. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076>
- Park, Y.L., Lee, J.H. (2002). Leaf cell and tissue damage of cucumber caused by twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(5), 952-7. <https://doi.org/10.1093/jee/95.5.952>
- Pate, D. (1994). Chemical ecology of Cannabis. *Journal of the International Hemp Association* 2, 32-37.
- Petanović, R. Magud, B., Smiljanić, D., (2007). The Hemp Russet Mite *Aculops cannabicola* (Farkas, 1960) (Acari: eriophyoidea) Found on *Cannabis sativa* L. in Serbia. *Supplement to the Description Archives of Biological Sciences*, 59(1), 81-85. <https://doi.org/10.2298/ABS0701081P>
- Potter, D. The propagation, characterisation and optimisation of *Cannabis sativa* L. as a phytopharmaceutical. Doctoral thesis, King's College, London, 2009.
- Prado, E., Tjallingii, W.F. (1994). Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72, 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01813.x>
- Punja, Z.K., Collyer, D., Scott, C., Lung, S., Holmes, J., Sutton, D. (2019). Pathogens and molds affecting production and quality of *Cannabis sativa* L. *Frontiers in Plant Science* 10: 1120. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01120>
- Regev, S., Cone, W.W. (1975). Evidence of Farnesol as a Male Sex Attractant of the Twospotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae). *Environmental Entomology*, 4(2), 307–311. <https://doi.org/10.1093/ee/4.2.307>
- Richins, R.D., Rodriguez-Urbe, L., Lowe, K., Ferral, R., O'Connell, M.A. (2018). Accumulation of bioactive metabolites in cultivated medical *Cannabis*. *PLOS ONE* 13, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201119>
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J., Zhang, K. (2019). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2479. <https://doi.org/10.3390/ijms20102479>
- Russo, E.B. (2011). Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* 163, 1344–1364. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>
- Salari, F., Mansori, H. (2013). The effect of jasmonic acid on the terpenoid compounds in *Cannabis sativa*. *Journal of Plant Process and Function* 1(2), 51-60. <https://doi.org/20.1001.1.23222727.1391.1.2.5.4>
- Samac, D.A., Graham, M.A. (2007). Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. *Plant Physiol.* 144, 582–587. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096503>
- Satyal, P., Woods, K.E., Dosoky, N.S., Neupane, S., Setzer, W.N. (2012). Biological activities and volatile constituents of *Aegle marmelos* (L.) Corrèa from Nepal. *Journal of Medicinally Active Plants* 1(3), 114-122. <https://doi.org/10.7275/R5Q23X59>
- Schafer, H., Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal* 4, 1684–1703. <https://doi.org/10.1002/biot.200900229>
- Schultes, R.E., Klein W.M., Plowman T., Lockwood T.E. 1974. Cannabis: An example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets*, 23(9), 337-367.
- Setzer, N., Satyal, P., (2014). Chemotyping and Determination of Antimicrobial, Insecticidal, and Cytotoxic Properties of Wild-Grown Cannabis sativa from Nepal. *Journal of Medicinally Active Plants* 3(1), 9-16. <https://doi.org/10.7275/R58W3B8V>
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa Y., Morimoto, S., Shoyama, Y. (2005). Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant and Cell Physiology* 46, 1578–1582. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci166>

- Small, E., Cronquist, A. (1976). A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon* 25, 405-435. <https://doi.org/10.2307/1220524>
- Taghinasab, M., Jabaji, S. (2020). Cannabis microbiome and the role of endophytes in modulating the production of secondary metabolites: An Overview. *Microorganisms*, 8, 355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030355>
- Tanney, C.A.S., Backer, R., Geitmann, A., Smith D.L. (2021). Cannabis glandular trichomes: A cellular metabolite factory. *Frontiers in Plant Science* 12, 721986. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721986>
- Taura, F., Morimoto, S. Shoyama, Y. (1996). Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. *Journal of Biological Chemistry* 271, 17411–17416. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17411>
- Thomas, B.F., ElSohly, M.A., 2016. Chapter 2 - Biosynthesis and Pharmacology of Phytocannabinoids and Related Chemical Constituents. In: Thomas, B.F., ElSohly M.A. (eds.): *The Analytical Chemistry of Cannabis*, Elsevier, pp. 27-41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804646-3.00002-3>
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Cammue, B.P., Broekaert, W.F. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* 13, 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00183-7)
- Thompson, G.R., Tuscano, J.M., Dennis, M., Singapuri, A., Libertini, S., Gaudino, R. (2017). A microbiome assessment of medical marijuana. *Clinical Microbiology and Infection* 23(4), 269–270. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.001>
- Turner, C.E., Elsohly, M.A. (1981). Biological activity of cannabichromene, its homologs and isomers. *The Journal of Clinical Pharmacology* 21(S1), 283-291. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1981.tb02606.x>
- Van der Werf, H.M., Van Geel, W., Wijnhuizen, M. (1995). Agronomic research on hemp (*Cannabis sativa* L.) in the Netherlands, 1987-1993. *Journal of the International Hemp Association* 2, 14–17
- Van Rijn, P.C.J., Mollema, C., Steenhuis-Broers, G.M. (1995). Comparative life history studies of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) on cucumber. *Bulletin of Entomological Research* 85(2), 285 – 297, <https://doi.org/10.1017/S0007485300034386>
- Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P., Brumaghim, J.L. (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105, 1314–1322. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.006>
- Vranová, E., Coman, D., Wilhelm, G. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 665–700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>
- Wasim, K., Haq, I.U., Ashraf, M. (1995). Antimicrobial studies of the leaf of *Cannabis sativa* L., *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 8, 22- 38.
- Whiting, P.F., Wolff, R.F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A.V., Keurentjes, J.C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidkofer, S., Westwood, M., Kleijnen, J. (2015). Cannabinoids for medical use: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association* 313(24), 2456–2473. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.6358>
- Williams, R J, Spencer, J. P.E, Rice-Evans C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* 36 (7), 838-849. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>.
- Woolridge, E., Barton, S., Samuel, J., Osorio, J., Dougherty, A., Holdcroft, A. (2005). Cannabis use in HIV for pain and other medical symptoms. *Journal of Pain and Symptom Management*, 29(4), 358-67. <https://doi.org/10.1016/j.jpainsymman.2004.07.011>
- Yang, D. Du, X., Liang, X., Han, R., Liang Z., Liu, Y., Liu, F., Zhao, J. (2012). Different roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in cell growth and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots, *Plos One* 7 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046797>
- Yazaki, K. 2004. Natural products and metabolites. V: Handbook of plant biotechnology. 1st ed. Christou P, Klee H. (ur.). Chichester, Wiley: 811–857
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens, *Microbial Pathogenesis* 124, 198-202 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>