

VPLIV STRESA NA TVORBO TERPENOFENOLNIH SPOJIN - KANABINOIDOV V NAVADNI KONOPLJI (*Cannabis sativa* L.)

Jan Jurij ERŽEN¹ in Darja KOCJAN AČKO²

Pregledni članek / review article
Prispelo / received: 22. oktober 2018
Sprejeto / accepted: 17. december 2018

Izvleček

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) od preloma tisočletja ponovno pridobiva na pomenu kot vsestranska industrijska in prehranska rastlina, v zadnjih letih pa je tudi raziskovana kot zdravilna rastlina, in sicer zaradi smole, ki vsebuje kanabinoidno zmes tetrahidrokanabinola (THC) in kanabidiola (CBD). Njun pomen za človeka in sodobno fitoterapijo je neizpodbiten. Kemijska analitika smole omogoča jasno poznavanje razmerij farmacevtsko pomembnih spojin. Omejujoči dejavniki okolja določajo uspešnost rasti in tvorjenje sekundarnih metabolitov - kanabinoidov, ki so sestavni del žlezni trihomov ženskega socvetja. Poznavanje dejavnikov, ki vplivajo na fiziologijo in biokemične odzive rastline, so sestavni del ekonomsko upravičljive pridelave socvetij konoplje za farmacevtske in kozmetične namene.

Ključne besede: konoplja, *Cannabis sativa*, smola, žlezni trihomi, THC, CBD, fitoterapija, okoljski dejavniki, sekundarni metabolizem, kemotip

EFFECTS OF STRESS ON THE FORMATION OF TERPENOPHENOLIC COMPOUNDS – CANNABINOIDS IN HEMP (*Cannabis sativa* L.)

Abstract

From the start of the new millennia, hemp (*Cannabis sativa* L.) gains importance as a versatile industrial and food crop. In the last few year's research has moved forward on the medicinal properties of cannabinoid rich resin containing the most important two cannabinoids tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). Evidence for their importance for human phytotherapy is accumulating. Chemical analysis of resin content allows us precise quantification of the constituents and their respected ratios enabling identification of chemically important compounds. The environmental limiting factors dictate plant growth success and the final chemical composition of glandular trichomes of female inflorescences. Understanding the parameters, that affect physiology and biochemical responses of

¹ Študent, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Slovenija, e-naslov: jan.jurij.erzen@gmail.com

² Doc. dr., isti naslov, e-naslov: darja.kocjan@bf.uni-lj.si

the plant are necessary for the economically viable production of cannabis flowers intended for various pharmaceutical and cosmetic applications.

Key words: hemp, *Cannabis sativa*, resin, glandular trichomes, THC, CBD, phytotherapy, environmental factors, secondary metabolism, chemotype

1 UVOD

Na aktivnost sekundarnega metabolizma pri rastlinah vplivajo različni zunanji stresni signali, ki povzročijo odziv različnih prilagoditvenih mehanizmov (Taiz, 2010). Abiotski oziroma okoljski dejavniki odločilno vplivajo na fiziološke in biokemične procese. Medsebojna povezanost obeh vrst procesov v rastlini povzroči razporejanje energije za tvorbo primarnih in sekundarnih spojin. V stresnih okoliščinah rastline nehalo vlagati energijo v tvorbo primarnih gradnikov rastlinskih tkiv, celičnih sten, maščobnih kislin in proteinov ter jo preusmerijo v tvorbo bolj zahtevnih obrambnih komponent. Med stresne dejavnike prištevamo temperaturni stres, fotosintetski stres in tvorbo repelentnih aromatičnih snovi ob napadu herbivorov (Herms and Mattson, 1992).

Rastline imajo mehanizme in načine odzivanja na stresne dejavnike, mesto tvorbe sekundarnih spojin pa je odvisno od rastlinske vrste. Količina in stopnja izraženosti posameznih sekundarnih spojin sta genetsko in okoljsko pogojeni, pri čemer večji stresni signali povečajo njihovo akumulacijo (Siegler, 2012). Rastline se z žleznimi trihomi branijo in reagirajo v skladu s stresnimi signali, ki jih prejemajo iz okolja.

Pri konoplji, sorodnici hmelja iz družine konopljevok (Cannabaceae) in rodu koprivovk (Urticales), ni bilo opravljenih veliko raziskav glede vpliva abiotskih dejavnikov na sestavo in produkcijo kanabinoidov (Hazekamp, 2016). Redke študije se posvečajo vplivu posameznega stresnega dejavnika, kar zakriva možnost podrobnega razumevanja pri tvorbi trihomov, smolnatih žleznih izcedkov, v katerih se akumulirajo kanabinoidi. Ker v naravi na procese v rastlini pogosto vpliva sočasno več stresnih dejavnikov, kot so intenziteta svetlobe, višja temperatura, nizka zračna vlaga in sušni stres, to otežuje jasno kvantifikacijo vpliva posamičnega dejavnika na sestavo obrambnih spojin.

V znanstveni literaturi so glede abiotskih dejavnikov v povezavi s tvorbo kanabinoidne smole mnenja deljena, posamezne raziskave so mestoma pripeljale do nasprotujočih dognanj. V študiji kanadskih raziskovalcev so ugotavljali, da povečevanje dušika negativno vpliva na končno vsebnost kanabidov ob žetvi (Small, 2015), obratno pa je ugotovila ob žetvi madžarskih sort madžarska raziskovalna skupina (Bosca 1998).

V prispevku bomo predstavili nekaj glavnih vplivov okolja in njihove znane učinke.

2 OBRAMBNE FUNKCIJE TRIHOMOV KONOPLJE

Konopljini trihomi predstavljajo širok spekter obrambnih mehanizmov rastline, ki jih lahko razdelimo glede na osnovno funkcijo:

- filtriranje škodljivih valovnih dolžin sončnega sevanja,
- preprečevanje izsuševanja ali hlajenja listne površine,
- preprečevanje premikanja insektov po nadzemnih delih rastline,
- privabljanje ali odvrčanje insektov in preprečevanje prehranjevanja herbivorov,
- preprečevanje vzpostavljanja glivičnih in bakterijskih kolonij z inhibiranjem njihove rasti.

2.1 Sestava trihomov

Znano je, da trihomi pri večini višjih rastlin prevzemajo več obrambnih funkcij hkrati. Enako velja za žlezne trihome konoplje. Trihomi konoplje so kemično zelo raznovrstni smolnati izcedki epidermalnih žlez konoplje, ki tvorijo kompleksno zmes terpenofenolnih spojin, izhajajočih iz dveh biosinteznih poti - malonilne in malonske (Fellermeier, 2001). Vsaka od njih tvori enega od prekurzorjev geranil pirofosfat in olivetol, ki skupaj tvorita CBG - kanabigerol, prekurzor vsem kanabinoidom, z izjemo kanabinola CBN, ki je znan kot razpadni produkt THC, CBD in drugih (El Sohly, 2005; Florez-Sanchez, 2008). Različne molekule kanabinoidov absorbirajo specifične valovne dolžine svetlobe, oddajajo različne aromatične spojine ter sestavljajo bolj in manj trpežne strukture trihomov (Clarke, 1981).

3 OKOLJSKI DEJAVNIKI TVORBE KANABINOIDOV

3.1 Vpliv dolžine cvetenja na vsebnost kanabinoidov

Rastlina konoplje je zaradi svoje izjemne fenotipske plastičnosti najdena v vseh geografskih širinah našega planeta. Od ekvatorja do 60. poldnevnikaja najdemo različne podvrste konoplje, prilagojene na različne klimate (Hillig, 2005; Chandra, 2009). Kljub temu da je v večini primerov rastlina enoletnica, lahko v ekvatorialnih temperaturnih in svetlobnih razmerah postane trajnica (Clarke in Merlin, 2013). Tako je v ekvatorialnih območjih najdena *Cannabis sativa* L. spp. *sativa*, znana po daljšem obdobju cvetenja in slabšem fotoperiodičnemu odzivu ter višjem odstotku THC v nadzemnih delih in socvetjih (Bazzaz, 1975). V subekvatorialnih pasovih, kjer so razlike med dnevom in nočjo jasno poudarjene, bolje uspeva *Cannabis sativa* L. spp. *indica*, kjer je čas cvetenja krajši zaradi prilagajanja na krajšo rastno

sezono. Temu primerno je odstotek vsebnosti kanabinoidov na socvetjih manjši vendar bolj raznolik. V severnih območjih Finske in Rusije pa poznamo podvrsto *Cannabis sativa* L. spp. *ruderalis*, katere posebnost je neodzivnost na fotoperiodo. Prehod iz vegetativnega razvoja v generativnega je pri tej podvrsti vnaprej določen s starostjo rastline in ne s krajšanjem dneva (Hillig, 2005).

Rastline z antociani, fenoli, tanini, karotenoidi, stilbeni, kumarini in navsezadnje tudi kanabinoidi branijo svoje rastne in reproduktivne organe (Florez-Sanchez, 2009). Spodbujanje proizvodnje sekundarnih metabolitov je pri prehranskih in zdravilnih rastlinah pomemben vidik, ki lahko močno vpliva na produktivnost posamezne rastlinske vrste. Znano je, da so rastline, ki doživljajo stresne dejavnike v okolju, bogatejše v hranilih in učinkovitejše za prehranske potrebe posameznika (Brandt, 2001).

3.2 Vpliv dolžine osvetljenosti

Genotipi podvrst konoplje *sativa*, *indica* in *ruderalis* reagirajo na krajše ali daljše dobe osvetljenosti z različno tvorbo kanabinoidov (Potter, 2009). Večja gostota osvetljenosti vpliva na tvorbo krajših internodijev in na gostejši cvetni nastavek, kar poveča količino biomase, na kateri se nahajajo kanabinoidi (Russo, 2011). Ker so fotosintetski produkti prekurzorji v sintezni poti kanabinoidov, se z daljšim osvetljevanjem v času cvetenja tvori več tistih, ki so nujni za sintezo sekundarnih spojin terpenov in fenolov. Tako *ruderalis*, ki ni fotoperiodično občutljiva podvrsta, cveti pod daljšim svetlobnim režimom (18 ur svetlobe in 6 ur teme) in tvori več primarnih in sekundarnih metabolitov, kar pomeni več smole v povezavi s povečano maso socvetij (Potter, 2014). Podobno so ugotovili za šentjanževko, pri kateri večja fotosintetska aktivnost vpliva na večjo sintezo hipericina ob povečanju biomase (Mosaleeyanon, 2005). Povezave med omenjenimi interakcijami so kompleksne in zahtevajo nadaljnja znanstvena preučevanja, ki bi teze potrdila ali zavrgla.

3.3 Vpliv UV žarkov na kanabinoidni profil trihomov

Pomen sestave valovnih dolžin svetlobe je bil ugotovljen s preučevanjem škodljivih UV žarkov, ki so pokazali znaten vpliv na sintezo THC. To se ujema s spoznanji o večji vsebnosti bioaktivnih snovi v rastlinah, ki se nahajajo v višjih gorskih območjih (Zhang, 2008; Jansen, 1998). V raziskavi pa UV sevanje ni imelo vpliva na količino trihomov na splošno, ampak predvsem na sestavo, ki je bila nagnjena k večji sintezi THC (Lydon, 1987).

3.4 Vpliv sušnega stresa

Znana funkcija žlezatega trihoma pri rastlinah je prekrivanje nadzemnih delov z namenom preprečevanja izsuševanja površine rastlinskih tkiv (Lusa, 2015). Konopljni trihomi služijo podobnemu evolucijskemu prilagoditvenemu namenu. Konoplja, ki raste v sušnem podnebnju, je v primerjavi z deževnimi območji proizvajala manjše količine kanabinoidov, predvsem THC, saj ima v deževnih sezonah na voljo več vode za rast in ne potrebuje zaščite pred izsušitvijo. Zadostna preskrbljenost z vodo pomeni tudi, da bo rastlina manj vlagala v sekundarne metabolne procese (Pate, 1983). Nasprotno pa je primerjava osojnega in prisojnega hriba v maroškem hribovju je pokazala manjše količine smole tam, kjer je bil vdor vlažnega zraka iz morja večji (Bouquet, 1950).

3.5 Vpliv povečane koncentracije CO₂

Dodajanje CO₂ je pogost ukrep v cvetličarski in vrtnarski industriji za hitrejši in večji pridelek (Lavola, 1994). Ker so vplivi dodajanja CO₂ dokazani na različnih rastlinskih modelih in je komercialna uporaba tega inertnega plina čedalje pogostejša, je vredno omeniti vpliv, ki ga CO₂ nudi gradnikom sekundarnih metabolitov. Dodajanje CO₂ konoplji v rastnih komorah je znatno povečalo kapaciteto fotosinteznega aparata za fiksacijo ogljika in zvišalo saturacijske nivoje (Chandra, 2008). Povečanje fotosinteze pomeni povečanje kapacitete rastline za fiksacijo ogljikovih skeletov in tvorbo produktov sekundarnega metabolizma (Akula, 2011). Zaradi tega preide v sintezne korake sekundarnega metabolizma več prekursorskih molekul, ki vplivajo na večjo sintezo kanabinoidov. Ker so terpeni in fenoli organske molekule, sestavljene iz ogljikovih skeletov, ki prihajajo kot intermediarni produkti biosintezne poti, ki poteka v kloroplastu, je dodajanje večjih koncentracij CO₂ kot prekursorja za večjo aktivnost fotosinteze posledično omogočalo tudi več gradnikov za tvorbo smole.

3.6 Vpliv tal

Nasprotujoči izsledki študij na področju vplivov tal na tvorbo kanabinoidov nudijo različne interpretacije. Raziskan je predvsem vpliv dušika (Bosca, 1998), medtem ko so ostali elementi raziskani v manjšem obsegu. Različni izsledki dajejo nasprotujoče podatke o vplivu dušika, saj so študije glede na določene večje ali manjše odmerke dušika poročale tako o povečevanju kot zmanjševanju vsebnosti THC. Poročila o vplivu fosforja in kalija so maloštevilna, vendar je opažena pozitivna korelacija med povečevanjem gnojilnih odmerkov in povečevanjem sinteze kanabinoidov (Pate, 1999), prav tako so znani vplivi težkih kovin na povečanje THC (Linger, 2005). Vsekakor pa so vplivi tal slabo raziskani, poleg tega raziskave za zdaj niso dale jasnih in enoznačnih rezultatov.

3.7 Vpliv napada/privabljanja insektov

Napad škodljivcev in s tem povezan metabolični odziv rastlin je natančno raziskal Acamovic (2005). Rastline konoplje izločajo vrsto metabolitov kot obrambni odziv na signale vdora v organizem, ki se prenašajo preko mehanskih poškodb (McPartland, 2000). Različni genotipi konoplje tvorijo raznolike terpenške profile, ki imajo odvrtačni vpliv na obnašanje insektov (Regnault-Roger, 1997).

3.8 Vpliv prisotnosti patogenov

Patogeni delujejo kot elicitorji signalov za obrambno reakcijo rastline na molekularni ravni. Spregledan vidik pri raziskavah je vpliv endogeno naseljenih organizmov – endofitov, ki nudijo dodatni imunski odziv rastlinskemu gostitelju. Izolacija in identifikacija teh gliv bi pomenila nove možnosti uravnavanja imunskega odziva rastline. Rezultati raziskav *Phomopsis* na konoplji so pokazali razlike v sestavi kanabinoidov ob interakciji z glivnim patogenom (McPartland, 1984). To lahko povzroči večjo odpornost rastline na bolezni ali pa izzove njen sekundarni metabolizem in pripelje do večje proizvodnje kanabinoidov (Kusari in sod., 2013).

4 ZAKLJUČKI

Rastne razmere, ki zadostijo potrebam konoplje, so prisotne v večini zemeljskih ekosistemov. Glavni dejavniki, kot so temperatura, zračna vlaga, prehranjenost tal, količina padavin, vplivajo tako na primarne kot tudi sekundarne procese v rastlini in predstavljajo pomembno točko preučevanja v naslednjih desetletjih, saj je potrebno zapolniti vrzeli, ki so nastale v času stigmatizacije rastline kot škodljive prepovedane droge. Okoljski dejavniki in poznavanje okoliščin tvorbe smole je vidik, ki v zadnjih letih prihaja v ospredje zaradi potreb po izobraževanju javnosti in ločevanja med navadno in indijsko konopljo. Pridelovanje rastlin za pridobivanje kozmetičnih, prehranskih ali farmacevtskih substanc zahteva nadaljnja raziskovanja na nivoju laboratorijskih in poljskih poskusov. Raziskave, ki bi omogočile standardizacijo sort konoplje in procesov pridelave in predelave, bodo v prihodnosti pridobivale na pomenu skupaj drugimi vzpenjajočimi vejami industrije, kozmetike in farmacije.

5 VIRI IN LITERATURA

- Acamovic, T., & Brooker, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2005; 64(3), 403-412.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 2011; 6(11), 1720-1731.

- Brandt, K., & Mølgaard, J. P. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001; 81(9), 924-931.
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & Elsohly, M. A. Photosynthetic response of *Cannabis sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO₂ conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2008; 14(4), 299-306.
- Clarke, R. C., & Merlin, M. D. *Cannabis: evolution and ethnobotany*. Univ of California Press. 2013; 465p.
- Clarke, R. C. *Marijuana botany: An advanced study: The propagation and breeding of distinctive cannabis*. Ronin publishing, 1981; 197p.
- ElSohly, M. A., & Slade, D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*, 78(5), 2005; 539-548.
- Flores-Sanchez, I. J., & Verpoorte, R. Secondary metabolism in cannabis. *Phytochemistry reviews*, 7(3), 2008; 615-639.
- Gershenzon, J. *Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. Phytochemical adaptations to stress* Springer, Boston, MA, 1984; 273-320.
- Gorelick, J., & Bernstein, N. Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. In *Advances in agronomy*, 124, Academic Press, 2014; 201-230.
- Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. Cannabis: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to Cannabis classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 2016; 202-215.
- Herms, D. A., & Mattson, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology*, 67(3), 1992; 283-335.
- Hillig, K. W. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52(2), 2005; 161-180.
- Jansen, M. A., Gaba, V., & Greenberg, B. M. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in plant science*, 3(4), 1998; 131-135.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal diversity*, 60(1), 2013; 137-151.
- Latta, R. P., & Eaton, B. J. *Seasonal Fluctuations in Cannabinoid Content of Kansas Marijuana*. *Economic Botany*, 1975; 153-163.
- Lanyon, V. S., Turner, J. C., & Mahlberg, P. G. Quantitative analysis of cannabinoids in the secretory product from capitate-stalked glands of *Cannabis sativa* L.(Cannabaceae). *Botanical Gazette*, 142(3), 1981, 316-319.
- Lavola, A., & Julkunen-Tiitto, R. The effect of elevated carbon dioxide and fertilization on primary and secondary metabolites in birch, *Betula pendula* (Roth). *Oecologia*, 99(3-4), 1994; 315-321.
- Linger, P., Ostwald, A., & Haensler, J. *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia plantarum*, 49(4), 2005; 567-576.
- Lusa, M. G., Cardoso, E. C., Machado, S. R., & Appezzato-da-Glória, B. Trichomes related to an unusual method of water retention and protection of the stem apex in an arid zone perennial species. *AoB PLANTS*, 2015; 7.

- Lydon, J., Teramura, A. H., & Coffman, C. B. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes. *Photochemistry and Photobiology*, 46(2), 1987; 201-206.
- McPartland, J. Pathogenicity of *Phomopsis ganjae* on *Cannabis sativa* and the fungistatic effect of cannabinoids produced by the host. *Mycopathologia*, 87(3), 1984; 149-153.
- McPartland, J. M., Clarke, R. C., & Watson, D. P. Hemp diseases and pests: management and biological control: an advanced treatise. CABI, 2000; 272s.
- Mosaleeyanon, K., Zobayed, S. M. A., Afreen, F., & Kozai, T. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. *Plant Science*, 169(3), 2005; 523-531.
- Pate, D. W. Chemical ecology of *Cannabis*. *Journal of the International Hemp Association*, 2(29), 1994; 32-37.
- Pate, D. W. The phytochemistry of *Cannabis*: its ecological and evolutionary implications. *Advances in hemp research*. Food Product Press, New York, 1999; 21-42.
- Potter, D. J. *Cannabis horticulture*. Handbook of *Cannabis*; Pertwee, RG, Ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014; 65-88.
- Regnault-Roger, C. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2(1), 1997; 25-34.
- Russo E.B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163,2011; 1344-1364.
- Small, E. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *The Botanical Review*, 81(3), 2015; 189-294.
- Seigler, D. S. *Plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media, 2012; 759p.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* 5th Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010; 782p.
- Zhang, W. J., & Björn, L. O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80(4), 2009; 207-218.