



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ
ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αξιολόγηση παραγόντων φυτοπροστασίας έναντι του παθογόνου
εδάφους *Rhizoctonia solani* AG1-IC σε καλλιέργεια βιομηχανικής
κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) με εφαρμογή μεταβολομικής

Σπυρίδων Φ. Δαούσης

Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Αξιολόγηση των παραγόντων φυτοπροστασίας έναντι του παθογόνου εδάφους *Rhizoctonia solani* AG1-IC σε καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) με εφαρμογή μεταβολομικής

“Evaluation of plant protection factors against soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1-IC in hemp cultivation (*Cannabis sativa* L.) with the application of metabolomics”

Σπυρίδων Φ. Δαούσης

Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Δημήτριος Μπιλάλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Σωτήριος Τζάμος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αξιολόγηση των παραγόντων φυτοπροστασίας έναντι του παθογόνου εδάφους *Rhizoctonia solani* AG-1-IC σε καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) με την χρήση μεταβολομικής

ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας

Περίληψη

Η βιομηχανική κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) αποτελεί μια αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στην Ελλάδα με υποσχόμενες οικονομικές προοπτικές στη βιομηχανία και τη φαρμακευτική. Ωστόσο οι ασθένειες που προκαλούνται στα νεαρά φυτάρια κάνναβης από εδαφογενή παθογόνα όπως ο *Rhizoctonia solani* υποβαθμίζουν σημαντικά την απόδοση και παραγωγή της καλλιέργειας από μείωση έως τη πλήρη καταστροφή της. Πέραν του γεγονότος ότι η χημική καταπολέμηση απαγορεύεται στη κάνναβη από τις ελληνικές αρμόδιες αρχές, είναι και αναποτελεσματική έναντι του *Rhizoctonia solani*. Ως εκ τούτου είναι επιτακτική η ανάγκη να βρεθούν εναλλακτικοί βιοδραστικοί παράγοντες για την καλλιέργεια κάνναβης που να πληρούν τις προϋποθέσεις για χαμηλά έως μηδενικά υπολείμματα, με προϊόντα απαλλαγμένα από πιθανές μυκοτοξίνες που θα μπορούσαν να βλάψουν την υγεία των καταναλωτών, διατηρώντας παράλληλα και την αειφορία του περιβάλλοντος δίχως ρύπανση, όπως επιβάλλουν οι νέες τάσεις στη σύγχρονη φυτοπροστασία, εξασφαλίζοντας εν τέλει και την βέλτιστη ποιότητα του τελικού προϊόντος ιδίως όταν προορίζεται για φαρμακευτική χρήση, αλλά και την ασφάλεια των καταναλωτών.

Σε αυτά τα πλαίσια στη παρούσα μελέτη αξιολογούνται τα σκευάσματα βιοδιεγερτών **Acadian** που περιέχει εκχύλισμα καφέ φυκών *Ascophyllum nodosum* όντας πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, φυτορμόνες και αμινοξέα, **Ekoprop 4G** που περιέχει σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών για τα φυτά, καθώς και το οργανικό προσθετικό εδάφους **biochar** από σφένδαμο για την

ικανότητά τους στην ανάπτυξη και φυτοπροστασία της κάνναβη έναντι του μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC. Η αξιολόγηση έγινε με την εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης με GC/EI/MS εξετάζοντας τα μεταβολικά προφίλ των φυτών από τις επεμβάσεις. Η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε διαφορές στα μεταβολικά προφίλ των φυτών αναλόγως των επεμβάσεων, ενώ ανακαλύφθηκαν οι αντίστοιχοι μεταβολίτες-βιοσημαντές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία και άμυνα του φυτού (π.χ λινολενικό οξύ) ή στη βιοδραστικότητά τους (πχ. κανναβινοειδή). Αναλόγως της εφαρμογής των επεμβάσεων που διενήργησα στα φυτά, φάνηκε να επηρεάστηκε σημαντικά η συγκέντρωση αμινοξέων όπως L-Proline, L-Serine, L-Aspartic acid, L-Isoleucine, L-Valine, L-Glutamine, Pyroglutamic acid, L-Asparagine, L-Threonine, Glycine, λιπαρών οξέων όπως α-λινολενικό οξύ και Monopalmitin, (ενώ δεν επηρεάστηκαν η L-Alanine και L-Leucine), καθώς και καρβοξυλικών οξέων όπως Ηλεκτρικό οξύ (*Succinic acid*) και Μηλικό οξύ (*Malic acid*) που συμμετέχουν στο κύκλο του Krebs, αλλά και άλλων οξέων όπως Cinnamic acid, Maleic acid, Glyceric acid και Oxalic acid. Ωστόσο τα κανναβινοειδή δεν επηρεάστηκαν. Άλλοι μεταβολίτες που επηρεάστηκαν ήταν οι υδατάνθρακες α-α-Trehalose που αποτελεί είτε πηγή ενέργειας, σηματοδοτικό μόριο και εμπλέκεται στις ανταποκρίσεις του φυτού σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες και η Myo-inositol με πολλαπλές δομικές και φυσιολογικές λειτουργίες για τα φυτά.

Παρά τη μη σημαντική μεταβολή των κανναβινοειδών τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά για την περαιτέρω χρήση των παραγόντων στη φυτοπροστασία ή για βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών και προϊόντων της βιομηχανικής κάνναβης. Τα φυτά που μεταχειρίστηκαν με τους βιοδραστικούς παράγοντες παρουσίασαν και φαινοτυπικά μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με του μάρτυρα, ενώ αυτά που εμβολιάστηκαν και με τον *Rhizoctonia solani* AG1-IC παρέμειναν φαινοτυπικά κατά μεγάλο βαθμό πιο υγιή σε σχέση με τα αμεταχειρίστη (από βιοδραστικούς παράγοντες) που εμβολιάστηκαν με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC.

Τέλος η *in vitro* αξιολόγηση των στελεχών ριζοσφαιρικών βακτηρίων *Bacillus humi* 3Ba30, *B. licheniformis* 1Ba18, *B. subtilis* 1Ba19, *B. subtilis* 2Ba19S και των ενδοφυτικών βακτηρίων

κάνναβης *Bacillus S₂* (PLS 176) και *B. L₅* (PLS 182) έδειξε παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* AG1-IC, γεγονός που τα καθιστά υποψήφιους μικροβιακούς παράγοντες για προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και για σχεδιασμένα πειράματα βιολογικού ελέγχου όπως του *Rhizoctonia solani* σε καλλιέργειες αγρού.

Εν κατακλείδι είναι εξίσου σημαντικό να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα σε πειράματα μεγάλης κλίμακας και σε συνθήκες αγρού, ώστε να αποσαφηνιστεί καλύτερα η δράση των βιοδραστικών παραγόντων, η οποία αποτελεί συνάρτηση διαφορετικών «μεταβλητών» όπως ηλικία και στάδιο ανάπτυξης του φυτού, χρονική διάρκεια εφαρμογών κατά την καλλιέργεια, κλιματολογικές συνθήκες και συνθήκες βιοτικών ή/και αβιοτικών καταπονήσεων.

Επιστημονική περιοχή: Φυτοπροστασία

Λέξεις κλειδιά: Φυτοπροστασία βιομηχανικής κάνναβης, βιοδιεγέρτες, biochar, *Rhizoctonia solani*, GC/EI/MS Μεταβολομική ανάλυση, παρεμπόδιση *in vitro*.

Evaluation of plant protection factors against soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1-IC in hemp cultivation (*Cannabis sativa* L.) with the application of metabolomics

MSc Integrated Plant Protection Systems and Environmental Management
Department of Crop Science
Laboratory of Agricultural Pharmacology

Abstract

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is considered a growing cultivation crop in Greece with promising financial prospects in the industry and medicine. However diseases caused in hemp seedlings by soil borne pathogens like *Rhizoctonia solani* greatly downgrade the crop's production and yield from diminution to total destruction. Beside the fact that chemical plant protection with pesticides in hemp is currently prohibited by the local authorities, it also stands as ineffective against *Rhizoctonia solani*. Therefore, it is imperative for a solution with alternative and bioactive factors of plant protection addressing hemp cultivation that meet the requirements for low or zero residues free of any potential mycotoxins that could put consumer's health and safety into great jeopardy, and at the same time maintaining the environmental sustainability avoiding the pollution hazards, as the recent trends in modern plant protection demand, thus mutually ensuring consumer's safety and also the product's maximum quality especially when intended for pharmaceutical use.

In this context at the present study the commercial biostimulant products **Acadian** consisted of brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* rich in nutrients, phytohormones and amino acids and **Ekoprop 4G** consisted of spores from beneficial microorganisms and the carbon soil amendment **biohar** from maple are all assessed for their ability to promote plant growth and protection against *Rhizoctonia solani* AG-1-IC fungus. The assessment was performed by applying GC/EI/MS metabolomic analysis, examining

the metabolic profiles from plant treated with the bioactive factors. Bioinformatic analysis showed differences in the metabolic profiles of the plants according to their treatment, while the corresponding biomarkers-metabolites that play an important part in plant's physiology and defence (e.g *α -Linolenic acid*) or its bioactivity (e.g *Cannabinoids*) were discovered. My treatments applied for the plants, seemed to have significantly affected their concentration in amino acids like L-Proline, L-Serine, L-Aspartic acid, L-Isoleucine, L-Valine, L-Glutamine, Pyroglutamic acid, L-Asparagine, L-Threonine, Glycine, (while *L-Alanine* and *L-Leucine* were unaffected), fatty acids like α -Linolenic acid and Monopalmitin, as well as carboxylic acids like Succinic acid and Malic acid that participate in Krebs cycle and other acids like Cinnamic acid, Maleic acid, Glyceric acid and Oxalic acid. However, Cannabinoids were not significantly affected. Some other metabolites affected were carbohydrates like α - α -Trehalose that its part is acting as energy sources, signaling molecule and involvement in plants' responses in abiotic and/or biotic factors, and also Myo-inositol which is involved in multiple structural and physiological functions. Additionally, the metabolites phosphate and α -Glyceryl stearate were significantly affected as well. Despite the fact that cannabinoids were unaffected the results are encouraging for a further use of the bioactive factors in plant protection or in their quality traits and products' improvement. The plants treated with bioactive factors presented a greater development compared to those of control, while those inoculated with *Rhizoctonia solani* AG1-IC remained phenotypically rather healthy compared to the untreated and simultaneously un-inoculated plants.

Finally, the *in vitro* assessment of the rhizospheric bacteria strains *Bacillus humi* 3Ba30, *B. licheniformis* 1Ba18, *B. subtilis* 1Ba19, *B. subtilis* 2Ba19S and hemp's endophytic bacteria *Bacillus* *S*₂ (PLS 176) και *B. L*₅ (PLS 182) showed inhibition to *Rhizoctonia solani* AG1-IC, a fact that grants them potential candidacy for plant promoting factors and planned biocontrol experiments in field conditions like *Rhizoctonia solani*'s.

In conclusion, it is also important further research to be conducted at large-scale experiments in order to clarify the

complete action of the bioactive factors that are a function of different "variables" like the plant's age and development stage, duration of treatments during the cultivation, climatic conditions and conditions of abiotic or/and biotic stresses.

Scientific area: Plant Protection

Keywords: Hemp plant protection, biostimulants, biochar, *Rhizoctonia solani*, GC/EI/MS Metabolomics, *In vitro inhibition*.

Contents

Ευχαριστίες	13
Συντομογραφίες.....	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
1.1 Γενική εισαγωγή του φυτού κάνναβης (διαφορετικές μορφές, βοτανική περιγραφή, ιστορική αναδρομή, κατανομή, χημικά συστατικά γενικές χρήσεις)	20
1.1.1 Η κάνναβη στην ιατρική και φαρμακολογία.....	28
1.1.2 Κάνναβη και Φυτοπροστασία	30
1.1.3. Κυριότερα κανναβινοειδή.....	55
1.1.4 Βιοσύνθεση των κανναβινοειδών.....	65
1.1.5 Βιοδραστικότητα κανναβινοειδών	70
1.1.6 Τερπενοειδή της κάνναβης, η βιοσύνθεσή τους, το γονιδίωμα της ποικιλομορφίας και παραλλαγής τους στο φυτό.....	73
1.1.7 Δραστικότητες των κυριότερων τερπενίων κάνναβης	76
1.2 Το παθογόνο εδάφους <i>Rhizoctonia solani</i>	81
1.2.1 Περιγραφή του γένους <i>Rhizoctonia</i> και ταξινομική ομαδοποίηση του <i>Rhizoctonia solani</i>	83
1.2.2 Αναπαραγωγή στο <i>Rhizoctonia solani</i> και μηχανισμός της παραλλαγής ..	87
1.2.3 Ομάδες Αναστόμωσης (AGs) και σχηματισμός ετεροκαρύων	88
1.2.4 Συστήματα ασυμβατότητας και δομή πληθυσμού στο <i>Rhizoctonia solani</i> .	91
1.2.5 Μηχανισμός παθογένειας στο <i>Rhizoctonia solani</i>	94
1.2.6 Βιολογικός κύκλος του <i>Rhizoctonia solani</i>	98
1.2.7 Φυτοπροστασία έναντι του <i>Rhizoctonia solani</i>	99
1.3 Βιοδιεγέρτες φυτών	106
1.3.1 Το χρονικό καθορισμού της έννοιας των βιοδιεγερτών	110
1.3.2 Κύριες κατηγορίες των φυτικών βιοδιεγερτών	112
1.3.3 Κοινά χαρακτηριστικά των βιοδιεγερτών	131
1.3.4 Η έννοια του τρόπου/μηχανισμού δράσης των βιοδιεγερτών	135
1.3.5 Κανονισμός των φυτικών βιοδιεγερτών.....	142
1.3.6 Τοξικολογικές και οικολογικές πτυχές των βιοδιεγερτών	144
1.3.7 Προβλήματα και προοπτικές των βιοδιεγερτών	145
1.3.8 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της επιστήμης και πρακτικής των βιοδιεγερτών.....	147
1.4 Το οργανικό προσθετικό εδάφους Biochar	149
1.5 Κατασταλτικά εδάφη.....	153
1.5.1. Μηχανισμοί καταστολής	154
1.5.2. Καταστολή του <i>Rhizoctonia solani</i> στο έδαφος.....	155
1.6 Η έννοια της Μεταβολομικής ανάλυσης.....	158
1.6.1 Αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού των δειγμάτων	161

1.6.2	Επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής.....	170
1.6.3	Μεταβολομική στο <i>Cannabis sativa</i> L.....	173
2.	Σκοπός της μελέτης	178
3.	Υλικά και μέθοδοι.....	181
3.1.	Βιολογικό υλικό.....	183
3.1.1	Φυτικό υλικό	183
3.1.2	Σκευάσματα βιοδιεγερτών για πειράματα in planta και τρόπος εφαρμογής τους.....	184
3.1.3	Στέλεχος <i>Rhizoctonia solani</i>	187
3.1.4	Στελέχη βακτηρίων και ενδοφύτων κάνναβης.....	188
3.2	Εκτίμηση βιοδραστικότητας του biochar σε πειράματα in planta.....	191
3.3	Καλλιέργεια του στελέχους <i>Rhizoctonia solani</i> για μακροχρόνια διατήρηση και παραγωγή μολυσματικών υφών	191
3.4	Μόλυνση φυτών κάνναβης στο εδαφικό υπόστρωμα τύρφη:περλίτη	193
3.5	Βιοδοκιμές για την αξιολόγηση βιοδραστικότητας ωφέλιμων βακτηρίων έναντι του <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-22.....	194
3.6	Τεχνητή μόλυνση φυτών κάνναβης με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC.....	195
3.7	Μεταβολομική ανάλυση μέσω GC/EI/MS και εφαρμογής πρωτοκόλλων.....	198
3.7.1	Ανάλυση των παραμέτρων.....	200
3.7.2	Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών από την επίδραση των παραγόντων φυτοπροστασίας στην <i>Cannabis sativa</i> L.....	201
3.8	Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών του <i>Cannabis sativa</i> L.....	202
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	203
4.1	Η ποικιλία κάνναβης «FUTURA 75» απέδωσε φυτάρια με καλύτερη και πιο παραγωγική ανάπτυξη	205
4.2	Οι επεμβάσεις με βιοδιεγέρτες και οργανικό προσθετικό εδάφους οδήγησαν σε φυτάρια αισθητά καλύτερης ανάπτυξης σε σχέση με του μάρτυρα.....	207
4.2.1	Η Επέμβαση με <i>Ascophyllum nodosum</i> του βιοδιεγέρτη «Acadian» ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα.....	212
4.2.2	Η Επέμβαση με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών του βιοδιεγέρτη «Ekorpor 4G» ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα..	221
4.2.3	Η επέμβαση με biochar σφενδάμου ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα	230
4.2.4	Οι επεμβάσεις με εκχυλίσμα <i>Ascophyllum nodosum</i> και σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών δίνουν παρόμοιους φαινότυπους.....	233
4.2.5	Οι επεμβάσεις με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών και biochar δίνουν παρεμφερείς φαινότυπους τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας.....	234
4.2.6	Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα <i>Ascophyllum nodosum</i> και biochar δίνουν παρεμφερείς φαινότυπους τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας.....	235
4.2.7	Επισκόπηση όλων των επεμβάσεων στα φυτά κάνναβης.....	236

4.3 Ο εδαφογενής μύκητας <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IC μόλυνε τα φυτάρια κάνναβης υπό εργαστηριακές συνθήκες.....	237
4.4 Ο εδαφογενής μύκητας <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC μόλυνε τα φυτάρια κάνναβης με φυσικό τρόπο <i>in planta</i>	238
4.4.1 Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα <i>Ascophyllum nodosum</i> σε φυτά εμβολιασμένα με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν παρεμφερείς φαινοτύπους με μικρές διαφορές σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά χωρίς επέμβαση.....	240
4.4.2 Οι επεμβάσεις με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών σε φυτά εμβολιασμένα με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν παρεμφερείς φαινοτύπους με μικρές διαφορές σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά χωρίς επέμβαση.....	245
4.4.3 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε εμβολιασμένα φυτά με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά της ίδιας επέμβασης.....	253
4.4.4 Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα <i>Ascophyllum nodosum</i> σε φυτά εμβολιασμένα με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν παρόμοιους φαινοτύπους σε σχέση με της αντίστοιχης επέμβασης σπορίων ωφέλιμων μικροοργανισμών.....	257
4.4.5 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε φυτά εμβολιασμένα με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα εμβολιασμένα φυτά της επέμβασης εκχύλισματος <i>Ascophyllum nodosum</i>	258
4.4.6 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε φυτά εμβολιασμένα με <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα εμβολιασμένα φυτά της επέμβασης σπορίων ωφέλιμων μικροοργανισμών.....	260
4.4.7 Επισκόπηση όλων των επεμβάσεων στα εμβολιασμένα με <i>R. solani</i> φυτά κάνναβης.....	262
4.5 Τα στελέχη ριζοσφαιρικών βακτηρίων <i>Bacillus subtilis</i> 1Ba19, 2B19S, <i>B.</i> <i>licheniformis</i> 1Ba18 και των ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης <i>Bacillus</i> S ₂ (PLS 176), <i>B.</i> L ₅ (PLS 182) εμφάνισαν <i>in vitro</i> παρεμπόδιση έναντι του <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> AG1-IC.....	264
4.6 Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης συνέβαλε στην καταγραφή και εκτίμηση σημαντικού μέρους του μεταβολώματος των φύλλων κάνναβης.....	270
4.6.1 Οι επεμβάσεις με τα σκευάσματα βιοδιεγερτών Acadian, Ekorpor 4G και με το οργανικό προσθετικό εδάφους biochar είχαν σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα των φυταρίων κάνναβης (<i>Cannabis sativa</i> L.) σε μεγάλο αριθμό μεταβολιτών.....	273
4.7.1 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στην περιεκτικότητα των φύλλων φυταρίων κάνναβης σε επιλεγμένους μεταβολίτες.....	277
4.8 Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάση δεδομένων μεταβολιτών κάνναβης..	328
5. Συμπεράσματα.....	331
5.1 Μελλοντικές προοπτικές.....	335
6. Βιβλιογραφία.....	337
Ξενόγλωσση.....	339

Ελληνική.....	436
Διαδικτυακή.....	437
Παραρτήματα	443

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος» και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη που μου εμπιστεύτηκε την παρούσα μελέτη.

Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην τριμελή Επιτροπή κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, κ. Δημήτριο Μπιλάλη και κ. Σωτήριο Τζάμο που βαθμολόγησαν την παρούσα εργασία.

Έπειτα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιάκωβο Παντελίδη του τμήματος Γεωργικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Λεμεσού στη Κύπρο για την εμπιστοσύνη και αποστολή βιολογικού υλικού και για όλες τις συμβουλές στο πλαίσιο της συνεργασίας μας. Επιπλέον εκφράζω ένα υπέρτατο ευχαριστώ τόσο στον επιβλέποντά μου κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, όσο και στην υποψήφια διδάκτορα κ. Εβίνα Παπαδοπούλου για την υπερπολύτιμη βοήθειά τους μέσω της επιστημονικής τους εμπειρίας και καλής διάθεσης που συνετέλεσαν καθοριστικό ρόλο στην ολοκλήρωση των εργαστηριακών αναλύσεων. Θέλω επίσης να τους ευχαριστήσω για την συνεχή παροχή επιστημονικών γνώσεων και συμβουλών, όσο και για την βοήθεια στις διορθώσεις πάνω στην διατύπωση και μορφοποίηση του κειμένου.

Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον διδάκτορα Γεωργικής Φαρμακολογίας κ. Ιωάννη Καλαμπόκη για την εκπαίδευση και εξοικείωσή μου με τον εξοπλισμό και πρωτοκόλλων του εργαστηρίου. Επιπλέον οφείλω πολλές ευχαριστίες στους συνεργάτες μου από την ομάδα PMG, Ιωάννη Παπαδημητρίου για την άμεση βοήθειά του, Εύη Παυλάκου για την αμέριμνη εκπαίδευση και ενεργή υποστήριξή της, Ναυσικά Ροσοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια στην προετοιμασία των φυτικών δειγμάτων προς ανάλυση, Χρήστο Κερεζούδη για την επίβλεψη του στην έναρξη του πειράματος και για τις συμβουλές του πάνω στη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, Δήμητρα Χριστοπούλου για την συνεργασία στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών για τα πειράματα βιοδοκιμών, Ειρήνη Ξαζίρη για την καλή διάθεση και συνεργασία στη χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού και τέλος τους Αλέξανδρο Μπάστα, Αικατερίνη Μεταξά και Νικόλαο Μπαρκολιά για την παροχή συμβουλών ως παλαιότερα και έμπειρα μέλη της ομάδας.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στον θείο μου Νικόλαο Πολέμη, Καθηγητή της Σιβιτανιδείου Σχολής Τεχνών και Επαγγελματιών για την βοήθειά του και στην μητέρα μου για την υπομονή και εγκάρδια υποστήριξή της.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Σπυρίδων Δαούσης

Στην μητέρα μου για όλη την φροντίδα και στήριξή της

Συνομογραφίες

CBC: Cannabichromene-Κανναβιχρωμίνη

CBCA: Cannabichromenic acid- Κανναβοχρωμινικό οξύ

CBCAS: Cannabichromenic acid synthase-Συνθετάση του κανναβιχρωμινικού οξέος

CBCVA: Cannabichrovarinic acid-Κανναβιχρωβαρινικό οξύ

CBD: Cannabidiol-Κανναβιδιόλη

CBDA: Cannabidiolic acid-Κανναβιδιολικό οξύ

CBDAS: Cannabidiolic acid synthase- Συνθετάση του κανναβιδιολικού οξέος

CBDV: Cannabidivarin-Κανναβιδιβαρίνη

CBDVA: Cannabidivarinic acid-Κανναβιδιβαρινικό οξύ

CBE: Cannabielsoin-Κανναβιελσοΐνη

CBG: Cannabigerol-Κανναβιγερόλη

CBGA: Cannabigerolic acid (3-geranyl olivetolate)

CBGAS: Cannabigerolic acid synthase-Συνθάση του κανναβιγερολικού οξέος

CBGVA: Cannabigerovarinic acid-Κανναβιγεροβαρινικό οξύ

CBN: Cannabinol-Κανναβινόλη

CBNRA: Cannabinerolic acid (*cis*-CBGA)-*cis* Κανναβιγερολικό οξύ

Cs(TPS): Cannabis Terpenes Synthases-Συνθετάσες των τερπενίων κάνναβης

FPP: Farnesyl diphosphate-διφωσφορικό φαρνεσύλιο

GC: Gas Chromatography-Αέρια χρωματογραφία

GOT: Geranylpyrophosphate:olivetolate geranyltransferase

GPP: Geranyl diphosphate

HPLC: High Performance Liquid Chromatography-Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

- LC:** Liquid Chromatography-Υγρή Χρωματογραφία
- MEP:** Methylerythritol phosphate-Φωσφορική μεθυλερυθριτόλη
- MEV:** Mevalonic acid-Μεβαλονικό οξύ
- Mono-TPs:** Mono Terpene Synthases-Συνθετάσες μονοτερπενίων
- MS:** Mass Spectrometry-Φασματομετρία μάζας
- NPP:** Neryl diphosphate
- NMR:** Nuclear Magnetic Resonance-Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού
- OA:** Olivetolic acid-Ολιβετολικό οξύ
- OAC:** Olivetolic acid cyclase-Κυκλάση του Ολιβετολικού οξέος
- OPLS-DA:** Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
- PGPA:** Plant Growth Promoting Agents-Παράγοντες προώθησης ανάπτυξης φυτών
- PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria-Ριζοβακτήρια προώθησης ανάπτυξης φυτών
- R. solani:*** *Rhizoctonia solani*
- Sesqui-TPs:** Sesqui Terpene Synthases-Συνθετάσες σεσκι-τερπενίων
- THC:** Tetrahydrocannabinol-Τετραϋδροκανναβινόλη
- THCA:** Tetrahydrocannabinolic acid: Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ
- THCAS:** Tetrahydrocannabinolic acid synthase-Συνθετάση του τετραϋδροκανναβινολικού οξέος
- THCV:** Tetrahydrocannabivarin-Τετραϋδροκανναβιβαρινικό οξύ
- THCVA:** Tetrahydrocannabivarinic acid-Τετραϋδροκανναβιβαρινικό οξύ
- TPS:** Terpenes Synthase-Συνθετάση τερπενίων
- Φ.Π.:** Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα
- δ.ο:** δραστική ουσία
-

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

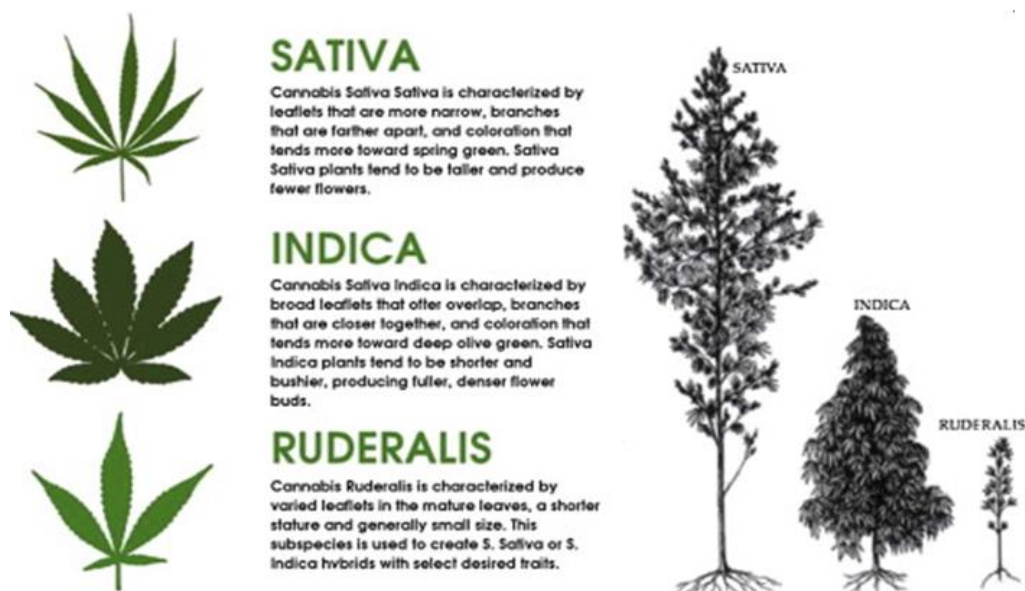
1.1 Γενική εισαγωγή του φυτού κάνναβης (διαφορετικές μορφές, βοτανική περιγραφή, ιστορική αναδρομή, κατανομή, χημικά συστατικά γενικές χρήσεις)

Η κάνναβη (**Εικόνα 1**) είναι γένος φυτών στο οποίο ταξινομούνται συνήθως τρία διακριτά είδη φυτών: Η *Cannabis sativa* L., (GRIN Taxonomy for Plants, 2018), η Ινδική κάνναβη (*Cannabis indica*) και η *Cannabis ruderalis* (Guy *et al.*, 2014). Αυτά τα είδη είναι ενδογενή στην κεντρική Ασία αλλά και την Ινδική υποήπειρο (Mahmoud, 2007).



Εικόνα 1: *Cannabis sativa* L. (A) Σπορόφυτο ηλικίας μίας εβδομάδας της δίοικης ποικιλίας βιομηχανικής κάνναβης, «*Finola*», (B) φυτό 4 εβδομάδων της ποικιλίας «*BIK*», και (C) φυτά στο στάδιο της ανθοφορίας. (D) Κοντινή λήψη φωτογραφίας άνθους της ποικιλίας «*Skunk*» και (E) μεγάλα αδενικά-άμισχα τριχωμάτα που φαίνονται στο στερεομικροσκόπιο. Πηγή: Aliferis & Bernard-Perro, (2020).

Σύμφωνα με κάποιους βοτανολόγους τα τρία αυτά είδη του γένους *Cannabis* μπορούν εναλλακτικά να θεωρηθούν και ως υποείδη του μοναδικού είδους (*C. sativa*), τα οποία συναντώνται στην φύση σε πολλές παραλλαγές και πέραν κάποιων μορφολογικών διαφορών (**Εικόνα 2**) διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την περιεκτικότητα σε ορισμένες δραστικές ουσίες (δ.ο.) (*κανναβινοειδή*). Συγκεκριμένα η *C. sativa var. sativa* έχει μεγαλύτερο ύψος, είναι πολυδιακλαδισμένη και αντιπροσωπεύει ποικιλίες βιομηχανικής χρήσης, η *C. sativa var. indica* έχει μικρό ύψος αλλά πλατύτερα φύλλα και περιλαμβάνει στελέχη για φαρμακευτικούς ή «ψυχαγωγικούς» σκοπούς, ενώ η *C. sativa var. ruderalis* έχει θαμνώδη εμφάνιση και περιέχει χαμηλά επίπεδα κανναβιδοειδών (Pollio, 2016).



Εικόνα 2: Τα τρία είδη του γένους *Cannabis* στα οποία περιγράφονται και διακρίνονται εμφανώς οι μορφολογικές διαφορές τους. Πηγή: Messina *et al.*, (2015).

Η *Cannabis sativa* ανήκει στην οικογένεια των κανναβιδών (*Cannabaceae*) και είναι πώδεις μονοετές, ύψους 1-2 m, με όρθιους ισχυρούς βλαστούς, λίγο ή πολύ διακλαδισμένους. Τα φύλλα είναι συνήθως εναλλασσόμενα, εκτός από τα κατώτερα που είναι αντίθετα, παλαμοειδή και αποτελούνται από 3-9 φυλλάρια λογχοειδή ή επιμήκη και οδοντωτά (Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Φυτολογίας, 1983).

Τα άνθη είναι δίοικα, περιέχουν το υψηλότερο ποσοστό των βιολογικά ενεργών συστατικών και ανθίζουν από τα μέσα του Καλοκαιριού έως τα τέλη Φθινοπώρου (Van der Weff, 1994). Τα θηλυκά άνθη είναι εξαιρετικά φυλλώδη, μη διακλαδισμένα και ζουν 3-5 εβδομάδες μετά την άνθηση, ενώ τα αρσενικά άνθη είναι διακλαδισμένα, έχουν λιγότερα φύλλα και πεθαίνουν αμέσως μετά την άνθηση (Van der Weff, 1994) (Εικόνα 3). Οι σπόροι της κάνναβης (κανναβούρι), είναι μικροί με ελλειπτικό σχήμα και είναι βοτανικά γνωστοί ως αχαίνια (Hazekamp *et al.*, 2010) (Εικόνα 3).

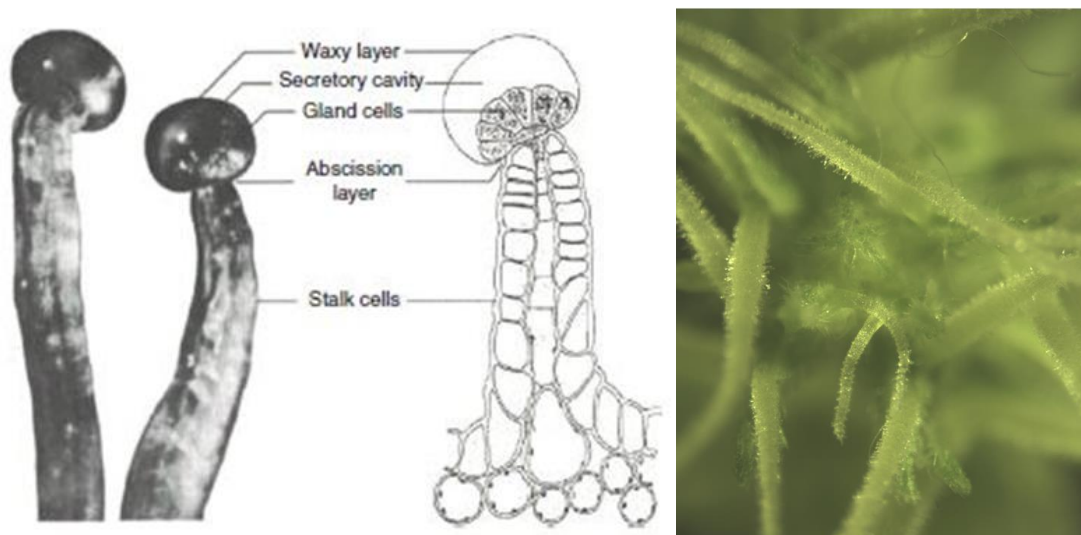


Εικόνα 3: Αριστερά: *Cannabis sativa*, θηλυκό άνθος σε πλήρη άνθηση, δεξιά: σπόροι του φυτού. Πηγή: Hazekamp *et al.*, (2010) και <https://www.dummies.com/health/how-to-grow-marijuana-from-seed>.

Η κατανομή των φυτικών ειδών της κάνναβης γίνεται και με βάση την χημική τους σύσταση σε σχέση με την αναλογία περιεκτικότητας των δύο αφθονότερων κανναβιδοειδών, της Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (*THC*) και Cannabidiol (*CBD*). Έχουμε τρεις πρωτεύοντες φαινότυπους και χημειότυπους, τον τύπο 1 με $THC > 20\%$ ως κυρίαρχη ουσία και $CBD < 10\%$ που χρησιμοποιείται κυρίως για «ψυχαγωγική - ναρκωτική» χρήση, είτε για φαρμακευτική χρήση μετά από χορήγηση ιατρικής συνταγής, τον τύπο 2 στον οποίο υπάρχει ισορροπία στην αναλογία *THC* και *CBD* που προορίζεται για μέση χρήση και μπορεί να επιτραπεί η χρήση του φαρμακευτικά μέσω ιατρικής συνταγογράφησης και ο τύπος 3 με $CBD > 30\%$ ως κυρίαρχη ουσία και $THC < 0,3\%$ που επιτρέπεται για βιομηχανική χρήση. Επομένως η κάνναβη διαχωρίζεται πρακτικά και ευρέως σε δύο ομάδες φυτών αναλόγως της χρήσης τους: την βιομηχανική (ή κλωστική) κάνναβη και την φαρμακευτική. (Schlutenhofer & Yuan, 2017).

Στην Ελλάδα υπάρχει ως αυτοφυές και καλλιεργούμενο φυτό και είναι γνωστή από την αρχαιότητα. Ο Ηρόδοτος αναφέρει την κάνναβη ως «αυτοφυόμενην και καλλιεργουμένην εις την Σκυθίαν, ένθα εκ των ινών του στελέχους της κατασκευάζοντο σχοινία και υφάσματα». Ο Διοσκουρίδης αναφέρει την «ήμερον» κάνναβη (*C. sativa*) ως «φαρμακευτικόν και εύχρηστον εκ τω βίω προς τας των ευτονωτάτων σχοινίων πλοκάς» (Λεξικόν Φυτολογικόν Γενναδίου). Επίσης τα σπέρματα κάνναβης αποτελούν παλιό λαϊκό φάρμακο και αναφέρονται ως συνταγολόγια του 7^{ου} και 1^{ου} αιώνα (Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Παύλος Δρανδάκης).

Τα ενεργά μέρη του φυτού που περιέχουν τα δραστικά συστατικά που το καθιστούν εύχρηστο παγκοσμίως είναι τα κύτταρα κεφαλής των τριχών των αδένων (*τριχώματα*) που κατανέμονται κατά μήκος της επιφάνειας του φυτού (Hazekamp *et al.*, 2010). Παρόλο που τα τριχώματα εντοπίζονται πάνω σε όλα τα αρσενικά και θηλυκά άνθη, συγκεντρώνονται κυρίως στα βράκκια που στηρίζουν τη θηλυκή ταξιανθία (Hazekamp *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα υφίστανται μονήρεις αδένες ρητίνης που αποτελούνται από μία ή δύο δωδεκάδες κύτταρα, οι οποίες σχηματίζονται συχνότερα στις άκρες των λεπτών στελεχών του τριχώματος που σχηματίζονται ως προεκτάσεις της επιφάνειας του φυτού (**Εικόνες 1Ε και 4**) (Hazekamp *et al.*, 2010). Η ρητίνη συλλέγεται κάτω από μια λεπτή κηρώδη μεμβράνη που περιβάλλει τα εκκριτικά κύτταρα της κεφαλής. Σε αυτούς τους θύλακες εξωκυτταρικής ρητίνης, οι εκκρινόμενες ενώσεις διαχωρίζονται από τα εκκριτικά κύτταρα προστατεύοντάς τη τόσο από την οξειδωτική αποδόμηση, όσο και από την ενζυματική αλλαγή. Ένα στρώμα κυτάρων αποκοπής στη βάση κάθε εκκριτικής κεφαλής επιτρέπει στον αδένα να αφαιρεθεί με ευκολία (Kim & Mahlberg 2003). Μέχρι προσφάτως έχουν ταυτοποιηθεί 554 πλήρως αναγνωρισμένα χημικά συστατικά στη κάνναβη καθιστώντας τη ένα από τα περισσότερο μελετημένα φυτά εκ χημικής απόψεως (Rock & Parker, 2021). Οι κύριες κατηγορίες των συστατικών του φυτού καταγράφονται στον **Πίνακα 1** εκ των οποίων συμπεριλαμβάνονται 113 φυτοκανναβινοειδή (Ahmet *et al.*, 2015), (ElSohly & Gul 2014) και 120 τερπένια (Elsohly & Slade 2005) ως κύριες κατηγορίες, αλλά και φλαβονοειδή, σάκχαρα, λιπαρά οξέα και άλλες ενώσεις (Hazekamp *et al.*, 2010).



Εικόνα 4: Αριστερά: Μικροσκοπική φωτογραφία και σχεδιασμός του αδένα ρητίνης με τα εκκριτικά κύτταρα κεφαλής, ορατά κάτω από τη διαφανή ρητίνη πλούσια σε κανναβινοειδή, τερπενοειδή και φλαβονοειδή, δεξιά: Στερεοσκοπική φωτογραφία όπου διακρίνονται τα τριχώματα από το άνθος. Πηγή: Hazekamp *et al.*, (2010) με άδεια των Hashish και R. Clarke, Los Angeles, Red Eye Press, 1998 και φωτογραφία από τη παρούσα μελέτη.

Πίνακας 1: Μια σφαιρική εικόνα των συστατικών που έχουν ταυτοποιηθεί στη κάνναβη βάσει των Elsohly & Slade (2005), Hazekamp *et al.*, (2010), ElSohl & Gul (2014), Ahmet *et al.*, (2015), Murillo-Rodriguez *et al.*, (2021).

Ομάδα συστατικών	Ταυτοποιημένα συστατικά
Τερπενοειδή	>120
Καναβινοειδή	113
Υδατάνθρακες	50
Σάκχαρα και συγγενικά συστατικά	34
Αζωτούχα συστατικά	27
Μη καναβινοειδείς φαινόλες	25
Φλαβονοειδή	23
Λιπαρά οξέα	22
Απλά οξέα	21
Αμινοξέα	18
Απλές κετόνες	13
Απλοί εστέρες και λακτόνες	13
Απλές αλδεΐδες	12
Πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και ένζυμα	11
Στεροειδή	11
Ιχνοστοιχεία	9
Απλές αλκοόλες	7
Χρωστικές	2
Βιταμίνες	1 (βιταμίνη Κ)

Η βιομηχανική κάνναβη έχει πολλαπλές χρήσεις (**Εικόνα 5**). Οι Τσαλίκη & Καλύβας (2017) αναφέρουν ότι οι παραγόμενες ίνες (28%) χρησιμοποιούνται για την κατασκευή σπάγκων, σχοινιών, δικτύων, υφασμάτων για σάκους, για πανιά ιστιοφόρων και για το κανναβάτσο. Οι ίνες ανώτερης ποιότητας προωθούνται στην υφαντουργία, ενώ μεγάλο μέρος των υπόλοιπων ινών χρησιμοποιούνται από τη χαρτοβιομηχανία για παραγωγή χαρτιού ειδικής ποιότητας. Από κοντές και σπασμένες, κατώτερης ποιότητας ίνες αποτελείται το «καννάβι» των υδραυλικών, που χρησιμοποιείται για τη σύνδεση των σωλήνων ύδρευσης. Οι ίνες της κάνναβης χρησιμοποιούνται ακόμα για την κατασκευή υλικών μόνωσης και υλικών οικοδομών. Κατασκευές από ίνες κάνναβης χρησιμοποιούνται στην αυτοκινητοβιομηχανία, ως μονωτικό και στεγανωτικό επίστρωμα των αυτοκινήτων.

Η εντεριώνη των στελεχών της κάνναβης χρησιμοποιείται ως υλικό στρωμνής ζώων και ιδιαίτερα των αλόγων ιππασίας, γιατί είναι 12 φορές περισσότερο απορροφητική από το άχυρο του σιταριού, απαλή, καθόλου ερεθιστική, έχει μεγάλη διάρκεια χρήσης, δεσμεύει την υγρασία και τις οσμές, και δεν ελκύει έντομα και τρωκτικά. Το υλικό αυτό, μετά τη χρησιμοποίησή

του, αποτελεί ένα άριστο χουμικό-βελτιωτικό του εδάφους για ανθοκομικά φυτά και κηπευτικές καλλιέργειες. (Τσαλίκη & Καλύβας 2017)

Η μέση περιεκτικότητα των σπόρων σε λάδι είναι 20-35%, χρησιμοποιούνταν αρχικά μόνο για τη διατροφή των ωδικών πτηνών και το λάδι των σπόρων κυρίως στη σαπωνοποιία και στη βιομηχανία βερνικιών. Σήμερα υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον και μελέτες σχετικά με την χρησιμοποίηση των σπόρων κάνναβης και των προϊόντων που παράγονται π.χ. αλεύρι, πρωτεΐνη, λάδι για ανθρώπινη χρήση λόγω της υψηλής θρεπτικής τους αξίας (Τσαλίκη & Καλύβας 2017). Στο εμπόριο διατίθενται εδώδιμα και πόσιμα προϊόντα βιομηχανικής κάνναβης αλλά και συμπληρώματα διατροφής, ενώ λόγω ευρείας εφαρμογής στην αρωματοποιία και βιομηχανία καλλυντικών το αιθέριο έλαιό της παραλαμβάνεται με τεχνικές απόσταξης και διατίθεται στην αγορά τυγχάνοντας μεγάλη ζήτηση. Αξιοσημείωτη είναι και η χρήση της στην ιατρική και φαρμακευτική (*πλήρης περιγραφή στην ενότητα 1.1.1*) λόγω βιοδραστικότητας των δραστικών συστατικών της, κυρίως της CBD.

Σήμερα η βιομηχανική κάνναβη θεωρείται κλωστικό φυτό. Μέχρι πριν και λίγα χρόνια η καλλιέργεια και διάθεση προϊόντων κάνναβης ήταν απαγορευμένη σύμφωνα με τον (*Νόμο υπ' αριθ. 4139 περί εξαρτησιογόνων ουσιών και άλλες διατάξεις*), αλλά πλέον με την τροποποίηση του άρθρου 2Α μέσω του άρθρου 58 του ν. 4554/2018 (Α130) και του άρθρου 155 του ν. 4601/2019 στην Ελλάδα είναι νόμιμα τα ακατέργαστα συγκομιζόμενα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια ποικιλιών κάνναβης του είδους *Cannabis sativa* L. χαμηλής περιεκτικότητας σε (THC) και συγκεκριμένα μέχρι 0,2%, σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες διατάξεις της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης.



Εικόνα 5: Διάφορες χρήσεις της βιομηχανικής κάνναβης. Πηγή: <https://www.slideshare.net/AdvancingEcoAgricult/using-cover-crops-to-develop-disease-suppressive-soil>.

Η φαρμακευτική κάνναβη καλλιεργείται κυρίως για το ψυχο-ενεργό συστατικό THC που προκαλεί την ψυχοτρόπο κατάσταση για την οποία φημίζεται η συγκεκριμένη ομάδα κάνναβης και λαμβάνεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού δια του καπνίσματος (Εικόνα 6). Επιστημονικές αναλύσεις έχουν εντοπίσει τουλάχιστον 6.000 ίδιες χημικές ουσίες στον καπνό φαρμακευτικής κάνναβης, όπως υπάρχουν στον καπνό (Wu *et al.*, 1988), (Tashkin, 2015). Τα κυριότερα προϊόντα της είναι: 1) η φαρμακευτική κάνναβη δηλαδή το πρασινωπό μείγμα αποξηραμένων θρυμμάτων από όλα τα μέρη του φυτού, που περιέχει 0,2-5% THC και χρησιμοποιείται ευρέως για ευφορικούς και θεραπευτικούς λόγους (πιο αναλυτικά στις ενότητες 1.1.1 και 1.1.5), 2) Το εκχύλισμα κάνναβης, σκουρόχρωμο αποξηραμένο ρετσίνι που βγαίνει από τις αδενικές τρίχες του φυτού, που περιέχει 5-12% THC και 3) το έλαιο, παχύρρευστο υλικό που παράγεται από παράνθια φύλλα της κάνναβης, περιέχει 20-60% THC και δεν έχει ευρεία χρήση.



Εικόνα 6: Αριστερά: αποξηραμένο βότανο φαρμακευτικής κάνναβης για ιατρική χρήση, δεξιά: συσκευή καπνίσματος καπνού υπό χρήση φαρμακευτικής κάνναβης για ψυχαγωγικούς σκοπούς. Πηγή: <https://edition.cnn.com/2014/03/07/health/gallery/uses-for-medical-marijuana/index.html> και <https://www.dummies.com/health/how-to-grow-marijuana-from-seed>.

Σχετικά με την χρήση της φαρμακευτικής κάνναβης μέσω καπνίσματος, από τις 6000 χημικές ουσίες που υπάρχουν και στον καπνό η κύρια διαφορά είναι η THC στην φαρμακευτική κάνναβη και η νικοτίνη στον καπνό. Σε διαφορετική περίπτωση η καπνίζουσα φαρμακευτική κάνναβη και ο καπνός είναι χημικά παρόμοιες. Το χρόνιο κάπνισμα κάνναβης συνδέεται με το βήχα, παραγωγή πτύελων, δύσπνοια και άλλα συμπτώματα της χρόνιας βρογχίτιδας (Tashkin, 2013), ενώ οι τακτικοί καπνιστές κάνναβης παρουσιάζουν παθολογικές αλλαγές στα κύτταρα των πνευμόνων παρόμοια με εκείνα που προηγούνται της ανάπτυξης του καρκίνου του πνεύμονα στους καπνιστές καπνού (Hall & Degenhart, 2009). Επιπλέον από μια ανασκόπηση σύγκρισης μελετών του 2013, διαφορετικές και λειτουργικές απεικονίσεις έδειξαν μορφολογικές αλλοιώσεις του εγκεφάλου σε χρήστες κάνναβης που ενδεχομένως να σχετίζονται με την συγκεκριμένη χρήση (Batalla *et al.*, 2013).

Έπειτα στοιχεία δείχνουν ότι η χρήση κάνναβης μπορεί να επιδεινώσει τα οξεία ψυχωπικά συμπτώματα και να αυξήσει τον κίνδυνο υποτροπής (Barceloux, 2012), (Vadhan *et al.*, 2017). Τέλος σε μια πρόσφατη γενική ανασκόπηση μελετών (Memedovich *et al.*, 2018) αναφέρθηκαν συγκεντρωτικά οι δυσμενείς επιπτώσεις και βλάβες στην υγεία που σχετίζονταν με την χρήση φαρμακευτικής κάνναβης, οι οποίες περιελάμβαναν αλλαγές και αλλοιώσεις στον εγκέφαλο (δομικές στην αμυγδαλή, ιππόκαμπο, όγκο της λευκής και γκρίζας ύλης εγκεφάλου, ροής αίματος), (λειτουργικές στην εκμάθηση, προσοχή, μνήμη και συνολική δραστηριότητα) (και χημικές όπως στη ντοπαμίνη του γλουταμικού οξέος, N-ακετυλοασπαρτικού οξέος, myo-inositol, χολίνη του γ-αμινοβουτυρικού οξέος), καρκίνου των όρχεων, πνευματικής υγείας (όπως ψύχωσης και πρώιμης έναρξης ψύχωσης μεθ' υποτροπής και επανεισαγωγής σε νοσοκομείο, αυτοκτονίας, αυτοκτονικές ιδέες και απόπειρα, κατάθλιψη, έντονης μανίας, άγχους), νευροδιαγνωστικών επιδράσεων (λειτουργικής και δομικής ακεραιότητας, μνήμης και εκμάθησης, ανεδονίας), διαταραχών εγκυμοσύνης (αυξημένος κίνδυνος αναιμίας στη μητέρα, μειωμένο βάρος νεογέννητου, αυξημένη ανάγκη για χρήση

θερμοκοιτίδας, επιπτώσεις στη μετέπειτα ζωή) και γενικότερες επιπτώσεις υγείας και βλάβες όπως εγκεφαλικό επεισόδιο, κολπική μαρμαρυγή, βρογχοδιαστολή, αναπνευστικά ζητήματα, φουσκάλες των πνευμόνων, εμφύσημα, υπερπληθωρισμός πνευμόνων, μετάδοση μολυσματικών ασθενειών, αλληλεπιδράσεις με φάρμακα και υπολειπόμενη επίδραση στην όραση.

1.1.1 Η κάνναβη στην ιατρική και φαρμακολογία

Μια ανασκόπηση των Grotenhermen & Russo (2002) πάνω σε ιατρική βιβλιογραφία αναφέρει ότι η ιατρική χρήση της κάνναβης έχει δείξει θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία κατά της ναυτίας, της έμμεσης, του προεμμηνορυσιακού συνδρόμου, της μη-σκόπιμης απώλειας βάρους, της αϋπνίας και της απώλειας της όρεξης από χημειοθεραπείες. Άλλα πρόσφατα και σχετικά καλώς επιβεβαιωμένα στοιχεία στην ανασκόπηση των Pratt *et al.*, (2019) έστω και από μικρό αριθμό μελετών κάνουν λόγο για επιπλέον χρήσεις των φαρμακευτικών σκευασμάτων κάνναβης σε διαχείριση της σπαστικότητας και άλλων συγκεκριμένων συμπτωμάτων σε άτομα με σκλήρυνση κατά πλάκας (San Diego Health System, 2012), του πόνου και ειδικότερα του νευρογενούς πόνου σε περιπτώσεις τραυματισμού και καρκίνου, των κινητικών δυσκολιών, του άσθματος, του γλαυκώματος, αλλά και για συμπτώματα ψυχικής υγείας.

Προκαταρκτικές ενδείξεις δείχνουν ότι φάρμακα με βάση την κάνναβη μπορεί να είναι χρήσιμα στη θεραπεία δυσλειτουργίας των επινεφριδίων, του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου, των ημικρανιών, της ινομυαλγίας και σχετικών παθήσεων (Russo, 2013). Η ιατρική χρήση της κάνναβης επίσης φαίνεται ότι μειώνει και τραυματισμούς του νωπιαίου μυελού (Malec *et al.*, 1982; Maurer *et al.*, 1990; Kogel *et al.*, 1995; Hagenbach, 2007) παρουσιάζοντας αντισπασμωδική και μυοχαλαρωτική δράση, αλλά και αυξάνοντας την όρεξη σε αυτούς τους ασθενείς.

Άλλες ιατρικές έρευνες αναφέρουν ότι η κάνναβη ή συγκεκριμένα κανναβινοειδή πιθανόν να χρησιμεύσουν στη θεραπεία της κατάχρησης του αλκοόλ (Dimitrakakis *et al.*, 2005), αρθρίτιδας που προκαλείται από περίσσια κολλαγόνου (Carter & Rosen, 2001; Weydt, 2005), άσθματος (Tashkin, 1975), αθηροσκλήρωσης, διπολικής διαταραχής (Grinspoon & Bakalar, 1998), μετατραυματικού συνδρόμου (Ganon-Elazar & Akirav, 2009), καρκίνου του παχέος εντέρου (Patsos *et al.*, 2005), αισθητηριακής νευροπάθειας σχετιζόμενης με τον HIV, δυστονίας (Fox *et al.*, 2002), επιληψίας (Gray, 2011), συγκεκριμένων παθήσεων του πεπτικού συστήματος (Di Carlo & Izzo, 2003), γλοιωμάτων (τύπος όγκου στον εγκέφαλο) (Lorente *et al.*, 2009), ηπατίτιδας C (Sylvestre & Clements, 2006), νόσου του Huntington, λευχαιμίας (Powles, 2015), όγκων του δέρματος (Casanova *et al.*, 2013), στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* που είναι ανθεκτικά στη methicillin (Ganon-Elazar & Akirav, 2009), νόσου του Parkinson (Kreitzer & Malenka, 2005), κνησμού, φωρίωσης (Wilkinson & Williamson, 2007), δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (Howard, 2007), καθώς και της νευρικής ανορεξίας (Grotenhermen & Russo, 2002).

Μια ελεγχόμενη έρευνα στη θεραπεία του συνδρόμου Tourette με ένα φάρμακο (*Dronabinol*) που περιέχει δραστική ουσία η οποία είναι συνθετικά ομόλογη με την THC, την κύρια ψυχοδραστική ουσία της κάνναβης, έδειξε ότι οι ασθενείς είχαν

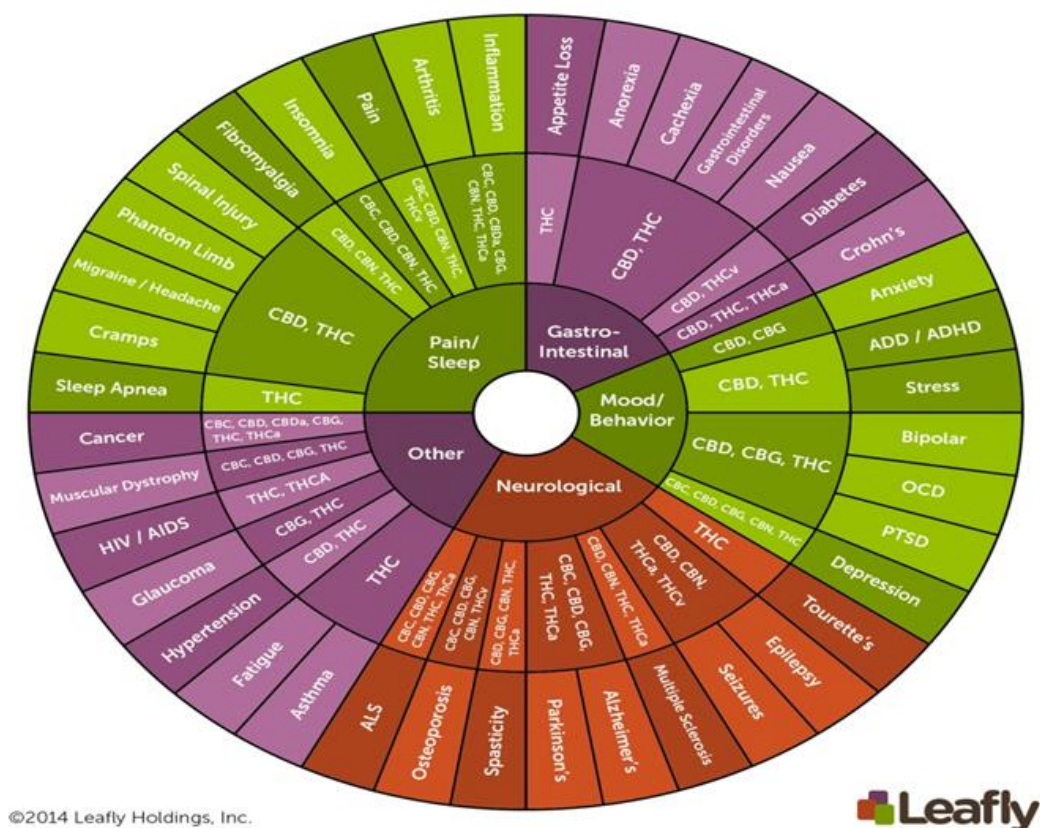
μείωση των συμπτωμάτων τους χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες (Singer, 2005). Άλλες έρευνες όμως ισχυρίζονται ότι δεν είχε αποτελέσματα στην μείωση των τικ (Robertson, 2000). Οι αναφορές των ίδιων των ασθενών δείχνουν μείωση των τικ με την ιατρική χρήση της κάνναβης (Sandyk, 1988; Müller-Vahl, *et al.*, 1997), όμως χρειάζονται μακροπρόθεσμες, ελεγχόμενες έρευνες για να το αποδείξουν σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Στον αντίποδα πρέπει να τονιστεί ότι λόγω μικρού αριθμού μελετών και πολλών άλλων με ασυνεπή ευρήματα και έλλειψης αυστηρά αξιόπιστων δεδομένων, είναι πιθανό τα επιβλαβή αποτελέσματα φαρμακευτικών σκευασμάτων βάσει της φαρμακευτικής κάνναβης (Mohiuddin *et al.*, 2020) να αντισταθμίζουν τα θετικά οφέλη (Pratt *et al.*, 2019).

Σε πολλά εργαστήρια σε όλον τον κόσμο γίνονται εντατικές έρευνες για να παραχθούν φάρμακα με βάση τα συστατικά της κάνναβης, τα οποία όμως δεν θα έχουν ψυχοτρόπες επιδράσεις, αλλά να παρουσιάζουν υψηλή αντιφλεγμονώδη δράση. Το πρώτο τέτοιο παρασκεύασμα ενάντια στον πόνο και στο στρες ανακοινώθηκε το 2005 στο περιοδικό «Nature» από ερευνητές του Πανεπιστημίου της Τζόρτζια, ενώ άλλα για την επιληψία και την σκλήρυνση κατά πλάκας αναμένεται να ακολουθήσουν.

Τον Μάρτιο του 2014 η Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας των ΗΠΑ εγκρίνει τη μελέτη για την ιατρική φαρμακευτική κάνναβη, σημαίνοντας έτσι μια ιστορική αλλαγή στην Ομοσπονδιακή πολιτική των ΗΠΑ (Preludance, 2014). Συγκεκριμένα, η Διεπιστημονική Ένωση Μελετών στα Ψυχοδηλωτικά (MAPS) έχει προσπαθήσει τα τελευταία 22 χρόνια να ξεκινήσει μια έρευνα ανάπτυξης φαρμάκων που θα βασίζονται στην ιατρική κάνναβη, και αυτή είναι η πρώτη φορά έκτοτε που έχει χορηγηθεί άδεια για αγορά φαρμακευτικής κάνναβης προς ιατρική χρήση από το Εθνικό Ινστιτούτο για την Κατάχρηση Ναρκωτικών (NIDA), τον μοναδικό πάροχο προς έρευνα, ρυθμιζόμενη σε ομοσπονδιακό επίπεδο στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Στην **Εικόνα 7** παρατίθενται συγκεντρωτικά οι ιατρο-φαρμακευτικές χρήσεις των κανναβινοειδών



Εικόνα 7: Ιατροφαρμακευτικές χρήσεις των κανναβινοειδών. Πηγή: Weissinger, S. (2012)

1.1.2 Κάνναβη και Φυτοπροστασία

Στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Επιτροπής συνεπώς και στην Ελλάδα ο κανονισμός που διέπει την χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) όπως καθορίζεται από τις αρμόδιες αρχές, δεν έχει εγκρίνει μέχρι σήμερα την διάθεση και εφαρμογή κάποιου Φ.Π. για την καλλιέργεια κάνναβης στην αγορά. Η συγκεκριμένη στάση ως προς αυτή την άποψη οφείλεται στην μειωμένη ευαισθησία της κάνναβης σε εχθρούς και ασθένειες όπως αναφέρουν οι McPartland *et al.*, (2000) και ως εκ τούτου τα προϊόντα της κάνναβης θεωρούνται περιβαλλοντικώς φιλικά.

Αντίθετα στις Η.Π.Α. γενικά η χρήση Φ.Π. διέπεται από νομοθεσία που δίνει την δυνατότητα σε κάθε πολιτεία να αποφασίσει την έγκριση τους με συγκεκριμένες προδιαγραφές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η πολιτεία της Καλιφόρνιας όπου τόσο το Τμήμα Νομοθεσίας Φυτοφαρμάκων της Καλιφόρνιας (DPR), όσο και η Κομητεία των Γεωργικών Επιτρόπων (CAC) επιβάλλουν την χρήση και πώληση των Φ.Π. υπό τις διατάξεις 6 και 7 του Κώδικα Τροφίμων και Γεωργίας της Καλιφόρνιας (FAC) και του Τίτλου 3

του Κώδικα Κανονισμών της Καλιφόρνιας (CCR). Συνεπώς η εφαρμογή τους στην κάνναβη δεν αποτελεί εξαίρεση. Επιπλέον η προστασία των εργατών, των καταναλωτών και του περιβάλλοντος από τις δυσμενείς επιπτώσεις της χρήσης Φ.Π. στην καλλιέργεια κάνναβης αποτελεί σημαντική προτεραιότητα του DPR της Καλιφόρνιας για την έγκριση συγκεκριμένων Φ.Π. στην προστασία της κάνναβης. Όλες οι επικέτες των Φ.Π. όπως και της κάνναβης περιλαμβάνουν προειδοποιητική σήμανση, προληπτικές σημάνσεις για την προστασία του ανθρώπου και την υγεία του περιβάλλοντος, σημάνσεις την αποθήκευση και απόρριψη καθώς και οδηγίες χρήσεις τους, που υποχρεούνται να ακολουθούν οι καλλιεργητές. Έπειτα όταν γίνεται η χρήση Φ.Π. σε κάνναβη οι εφαρμοστές δεν πρέπει να χρησιμοποιούν μια αναλογία που να είναι υψηλότερη από τις αναλογίες που αναφέρονται στην ετικέτα και να ακολουθούν τις απαιτήσεις γεωργικής χρήσης συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων εφαρμογής, περιορισμένου διαστήματος εισροής, εξοπλισμού ατομικής προστασίας και διαστήματος πριν τη συγκομιδή.

Αναλυτικά σύμφωνα πάντα με το DPR της Καλιφόρνιας (CDPR.ca.gov) ένα Φ.Π. μπορεί νόμιμα να εφαρμοστεί στην κάνναβη υπό την νομοθεσία της πολιτείας εφόσον τα δραστικά συστατικά που υπάρχουν στο προϊόν, εξαιρούνται από τις απαιτήσεις υπολειμμάτων, είτε το προϊόν εξαιρείται από τις απαιτήσεις έγκρισης ή εγκρίνεται για χρήση που είναι αρκετά ευρεία να συμπεριληφθεί στην κάνναβη. Για κάθε Φ.Π. σε κάθε τρόφιμο οι απαιτήσεις υπολειμμάτων καθορίζονται από το Υπουργείο Περιβαλλοντικής Προστασίας (EPA) των Η.Π.Α. και είναι η ποσότητα του υπολείμματος Φ.Π. που επιτρέπεται να παραμείνει εντός ή πάνω στη εφαρμοζόμενη καλλιέργεια με «εύλογη βεβαιότητα για καθόλου ζημιά». Ωστόσο κάποια Φ.Π. όπως ακριβώς συμβαίνει με της κάνναβης εξαιρούνται από τις απαιτήσεις ανεκτικότητας, καθώς αποτελούν ουσίες χαμηλού κινδύνου. Πολλές εξ αυτών είναι αιθέρια έλαια βαθμίδας τροφίμων. Στον Πίνακα 2 αναγράφονται οι δ.ο.οι οποίες είτε εξαιρούνται από απαιτήσεις ανεκτικότητας, είτε εξαιρούνται από απαιτήσεις έγκρισης ή έχουν σημάνσεις αρκετά ευρείες για συμπεριληφθούν στη χρήση της κάνναβης.

Πίνακας 2: Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για την καλλιέργεια κάνναβης στην Πολιτεία της Καλιφόρνιας των Η.Π.Α.

Εντομοκτόνα και Ακαρεοκτόνα

Azadirachtin	Φωσφορικός σίδηρος
<i>Bacillus thuringiensis</i> sub. <i>kurstaki</i>	<i>Isaria fumosorosea</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i> sub. <i>israelensis</i>	Έλαιο Νημ
<i>Beauveria bassiana</i>	Διπτανθρακικό Κάλιο
<i>Burkholderia</i> spp. strain A396	Σορβικό Κάλιο
Καψαϊκίνη	Έλαιο Δεντρολίβανου
Κανέλλα και έλαιο Κανέλλας	Σουσάμι και έλαιο σουσαμιού
Κιτρικό οξύ	Διπτανθρακικό Νάτριο
Σκόρδο και έλαιο Σκόρδου	Έλαιο Σόγιας
Geraniol	Θειάφι
Κηπευτικά έλαια (έλαιο πετρελαίου)	Έλαιο Θυμαριού
Εντομοκτόνα σαπούνια (Καλιούχα άλατα λιπαρών οξέων)	

Μυκητοκτόνα και Αντιμικροβιακά

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain D747	Έλαιο νημ
Γαρίφαλλο και έλαιο Γαριφάλλου	Διπτανθρακικό Νάτριο
Έλαιο Καλαμποκιού	<i>Gliocladium virens</i>
Έλαιο Βαμβακόσπορου	<i>Trichoderma harzianum</i>
Εκχύλισμα <i>Reynoutria sachalinensis</i>	Δυόσμος και έλαιο Δυόσμου
Δεντρολίβανο και έλαιο Δεντρολίβανου	Διπτανθρακικό Κάλιο
Πυριτικό Κάλιο	

Απωθητικά Σπονδυλωτών

Καστορέλαιο	Geraniol
-------------	----------

Πέρα από τα εγκεκριμένα υπό τον Πολιτειακό νόμο Φ.Π. για την εφαρμογή τους σε κάνναβη, υπάρχουν και προϊόντα που δεν επιτρέπεται ποτέ η χρήση τους σε κάνναβη. Τα επακόλουθα κριτήρια ταυτοποιούν τα Φ.Π. που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καλλιέργεια κάνναβης υπό καμία προϋπόθεση και η χρήση οποιουδήποτε εξ αυτών που συναντούν αυτά τα κριτήρια στην κάνναβη, επιβάλλεται αυστηρά ως παράβαση του FAC και μπορεί να καταλήξει σε αστικές ή ποινικές κυρώσεις. Συγκεκριμένα οι διατάξεις 12996 και 12999.5 του FAC περιλαμβάνουν: α) μη εγκεκριμένα Φ.Π. για χρήση τους σε τρόφιμα στην Καλιφόρνια, β) περιορισμένα υλικά στην Καλιφόρνια συμπεριλαμβανομένων των Ομοσπονδιακών Φ.Π. περιορισμένης χρήσης (3 CCR ενότητα 6400) και καταλόγου προστασίας υπογείων υδάτων (3 CCR ενότητα 6800). Με πηγή το DPR της Καλιφόρνιας (CDPR.ca.gov) στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται τα Φ.Π. που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κάνναβη, καθώς πληρούν τα παραπάνω κριτήρια. Στο συγκεκριμένο κατάλογο αναφέρονται κάποιες ενδεικτικές δραστικές ουσίες, ωστόσο

το γεγονός ότι κάποιες δεν αναγράφονται στον κατάλογο, δεν τους δίνει έγκριση να χρησιμοποιηθούν σε κάνναβη στην πολιτεία της Καλιφόρνιας.

Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα χωρίς έγκριση για χρήση σε τρόφιμα

Εάν ένα Φ.Π. δεν έχει οδηγίες για χρήση σε μια καλλιέργεια τροφίμων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καλλιέργεια κάνναβης. Παραδείγματα δ.ο που δεν έχουν χρήσεις σε καλλιέργεια τροφίμων περιλαμβάνουν:

Πίνακας 3: Φυτοπροστατευτικά προϊόντα που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια κάνναβης καθώς δεν έχουν άδεια χρήσεις για καλλιέργεια τροφίμων

Φυτοπροστατευτικά προϊόντα		
Aldicarb	DDVP (Dichlorvos)	Paclobutrazol
Carbofuran	Etofenprox	Propoxur
Chlordane	Fenoxycarb	Spiroxamine
Chlorfenapyr	Imazalil	Thiacloprid
Coumaphos	Methyl parathion	Mevinphos
Daminozide		

Υλικά Περιορισμένης Χρήσης στην Καλιφόρνια

Το DPR καθορίζει ορισμένα Φ.Π. ως υλικά περιορισμένης χρήσης στην Καλιφόρνια (3 CCR, ενότητα 6400). Ένα Φ.Π. μπορεί να θεωρηθεί περιορισμένο υλικό για πολλούς λόγους συμπεριλαμβανομένου του χαρακτηρισμού ως Ομοσπονδιακό φυτοφάρμακο περιορισμένης χρήσης. Πολλά από αυτά τα προϊόντα φέρουν ετικέτες σήμανσης που σαφέστατα αναφέρουν «Φυτοφάρμακα Περιορισμένης Χρήσης» αλλά για σαφέστερη ενημέρωση συνίσταται η συμβουλή από την τοπική CAC για το αν εμπίπτουν σε αυτή την κατηγορία. Παραδείγματα Υλικών Περιορισμένης Χρήσης στην Καλιφόρνια περιλαμβάνουν:

Πίνακας 4: Φυτοπροστατευτικά προϊόντα περιορισμένης χρήσης τα οποία δεν επιτρέπονται για εφαρμογή στην καλλιέργεια κάνναβης

Φυτοπροστατευτικά προϊόντα		
Abamectin	Bromodiolone	Difethialone
Bifenthrin	Cyfluthrin	Fipronil
Brodifacoum	Difenacoum	Naled

Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα στον κατάλογο Προστασίας των Υπογείων Υδάτων

Τα δραστικά συστατικά που περιλαμβάνονται στον κατάλογο προστασίας των υπογείων υδάτων (3 CCR, ενότητα 6800), έχουν χημικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πιθανά να μετακινηθούν προς τα υπόγεια ύδατα. Τέτοια παραδείγματα περιλαμβάνουν:

Πίνακας 5: Φυτοπροστατευτικά προϊόντα που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κάνναβη, λόγω υπαγωγής τους σε κατηγορίες ειδικής διάταξης για προστασία των υπογείων υδάτων

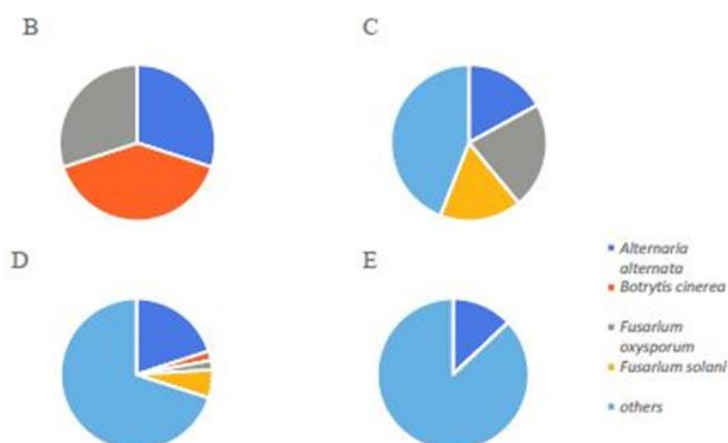
Φυτοπροστατευτικά προϊόντα		
Acephate	Dimethomorph	Methomyl
Azoxystrobin	Ethoprophos	Myclobutanil
Boscalid	Fludioxonil	Propiconazole
Carbaryl	Imidacloprid	Tebuconazole
Chlorantraniliprole	Malathion	Thiamethoxam
Diazinon	Metalaxyl	Methiocarb
Dimethoate		

1.1.2.1 Ασθένειες προσβολής της κάνναβης

Τα φυτοπαθογόνα που προσβάλλουν τη κάνναβη υποβαθμίζουν και μειώνουν την ανάπτυξη της καλλιέργειας μολύνοντας τις ρίζες, στέμα και φύλλωμα (Punja *et al.*, 2019), (Jerushalmi *et al.*, 2020). Οι μυκητολογικές μολύνσεις των ριζών μπορούν να υφίστανται σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή του κύκλου παραγωγής, ενώ η αποίκιση στους οφθαλμούς του άνθους τυγχάνει γενικά κατά τα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης του άνθους και μπορεί να εκδηλωθεί ως σήψη ανθέων προ ή μετά συγκομιδής (Punja *et al.*, 2019). Όσον αφορά τα παθογόνα φυλλώματος μπορούν να προσβάλλουν τα φυτά σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής τους (Punja *et al.*, 2019). Η εναέρια κατανομή του παθογόνου φορτίου, τα σπόριά τους και η διάδοση μέσω πολλαπλασιασμού της φυτείας αποτελούν σημαντικές μεθόδους εξάπλωσης και η είσοδος μέσω ανοιχτών πληγών στις ιστούς ριζών, στελεχών και ανθέων διευκολύνει την εγκατάσταση των παθογόνων στα φυτά κάνναβης (Punja *et al.*, 2019).

Τα παθογόνα κάνναβης έχουν περιγραφεί στο παρελθόν και περιλαμβάνουν είδη μυκήτων, βακτηρίων, ιών και νηματωδών (McPartland, 1991, 1992). Επί του παρόντος έχουν καταγραφεί πάνω από 88 γνωστά είδη μυκήτων που μολύνουν τη κλωστική και φαρμακευτική κάνναβη σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των φυτών, χωρίς να περιλαμβάνονται τα παθογόνα κατά το στάδιο της αποθήκευσης των φυτικών προϊόντων (McPartland *et al.*, 2017). Τα σημαντικότερα παθογόνα που χρήζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον από άποψη μηχανισμών αποίκησης, μόλυνσης και επέκτασης προσβολής, εστιάζονται στους μύκητες και ιδίως στους μυκηλιακούς μύκητες (*molds*), με απότερο σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων διαχείρισης αναδυόμενων ασθενειών από αυτές. Συγκεκριμένα οι μυκηλιακοί μύκητες που αποικίζουν είτε την ταξιανθία κατά την ανάπτυξη ή μετά τη συγκομιδή του φυτού, είτε τους εσωτερικούς ιστούς ως ενδόφυτα, μπορούν να μειώσουν σημαντικά την απόδοση της παραγωγής όχι μόνο σε εξωτερική καλλιέργεια (Jerushalmi *et al.*, 2020) αλλά και σε ελεγχόμενο περιβάλλον εσωτερικής υδροπονικής καλλιέργειας με ειδικά δωμάτια ανάπτυξης και θερμοκήπια (Punja *et al.*, 2019).

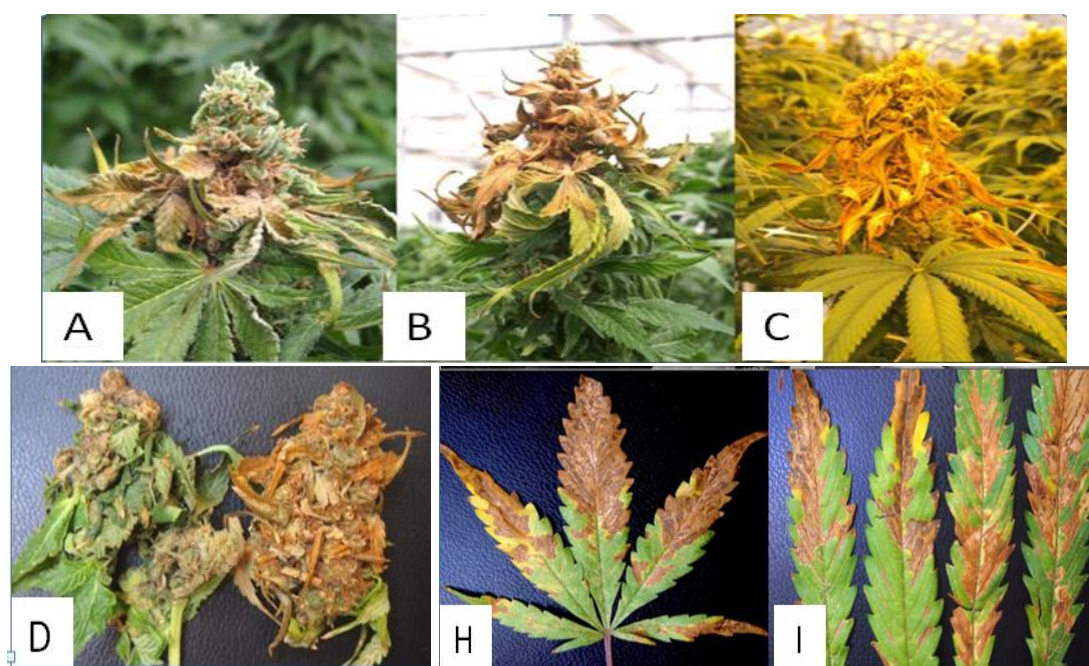
Επιπλέον πέραν της φυσιολογικής απόψεως ζημιάς στα φυτά και απώλειας της παραγωγής κάποια φυτοπαθογόνα της κάνναβης επιφέρουν άμεσο κίνδυνο υγείας σε ασθενείς που κατανάλωσαν προσβεβλημένες ταξιανθίες με όργανα καρποφορίας (Jurgensen & Madsen, 2009; Gargani *et al.*, 2011; Lemons *et al.*, 2018) ή παραπροϊόντα μεταβολισμού τους όπως μυκοτοξίνες (Dryburgh *et al.*, 2018). Παρακάτω αναφέρονται και περιγράφονται τα συμπτώματα και οι ζημιές που προκαλούν οι μυκηλιακοί μύκητες με την συχνότερη εμφάνιση και μεγαλύτερη υποβάθμιση στις σοδιές. Το διάγραμμα πίτας στην **Εικόνα 8** απεικονίζει τα πιο συχνά εμφανιζόμενα παθογόνα κάνναβης που απομονώνονται από γεωργικά εδάφη εμπορικής καλλιέργειας του Ισραήλ ως χώρα με ευρεία διάδοση στη καλλιέργεια κάνναβης.



Εικόνα 8: (B-E) Διαγράμματα πίτας με είδη μυκήτων που απομονώθηκαν από προσβεβλημένο φυτικό υλικό από εμπορικά αγροκτήματα σε όλο το Ισραήλ. Οι τέσσερις πιο συχνόι μύκητες που απομονώθηκαν περιελάμβαναν *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* κατά τη διάρκεια διαφορετικών εποχών (B) Άνοιξη (Μάρτιος-Μάιος), (C) Καλοκαίρι (Ιούνιος-Αύγουστος), (D) Φθινόπωρο (Σεπτέμβριος-Νοέμβριος), και (E) Χειμώνας (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος). Άλλοι μύκητες μικρότερης εμφάνισης περιελάμβαναν είδη από τα γένη *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Petriella*, *Lasioidiplodia*, *Sordaria*, κ.α.. Πηγή: Jerushalmi *et al.*, (2020).

Η πιο κοινή ασθένεια που προσβάλλει τις ταξιανθίες κάνναβης είναι ο βοτρυτής (ή *τεφρά σήψη*) του *Botrytis cinerea*, ο οποίος ευδοκιμεί υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας με δροσερές έως μέτριες θερμοκρασίες και κορυφώνεται σε θαλάσσιες συνθήκες (McPartland *et al.*, 2017). Οι McPartland & McKernan (2017) αναφέρουν τον βοτρυτή ως μία από τις τρεις πιο απειλητικές ασθένειες των ανθισμένων κορυφών κάνναβης. Στη μελέτη των Punja *et al.*, (2019) εκ Καναδά σε συνθήκες υδροπονικής καλλιέργειας με διαδεδομένο εδαφικό υπόστρωμα για καλλιέργεια κάνναβης (*κοκοφοίνικα*) ο βοτρυτής προκάλεσε σήψη στους οφθαλμούς της ταξιανθίας. Συγκεκριμένα στην αναπτυσσόμενη ταξιανθία παρατηρήθηκε πρώιμη μόλυνση επιδεικνύοντας συμπτώματα καφέ αποχρωματισμού και αποσύνθεσης φύλλων και βρακτίων, ενώ σε εξελιγμένα επίπεδα σήψης του άνθους η ταξιανθία καταστράφηκε τελείως. Επιπλέον σε σοβαρή έκταση μόλυνσης (*προσβολής του 50% των φυτών*) παρατηρήθηκε σε συγκομισμένες νεκρές ταξιανθίες ανάπτυξη του μυκηλίου εντός του οφθαλμού και γενικότερα αποσύνθεση, ενώ στα φύλλα παρατηρήθηκαν βλάβες και αλλοιώσεις λόγω της εναπόθεσης σπορίων του βοτρυτή

στη προσβεβλημένη ταξιανθία που προκάλεσαν μεμονωμένες μικρές κυκλικές κηλίδες, οι οποίες διευρύνθηκαν σε νεκρωτικές περιοχές που περιστασιακά περικλείονταν από κίτρινα περιθώρια και πολύ πιο συχνά οριοθετούνταν από τις φλέβες των φύλλων. Όλα τα συμπτώματα διακρίνονται ευκρινώς στην **Εικόνα 9**. Από άποψη επιβλαβών επιδράσεων στην υγεία ο *B. cinerea* είναι γνωστό αλλεργιογόνο και μπορεί να οδηγήσει σε δριμύτατες αντιδράσεις στον άνθρωπο (Jurgensen & Madsen 2009). Επιπλέον εναέρια δείγματα από τους πνεύμονες των εργατών από αγροκτήματα κάνναβης περιείχαν σημαντικά υψηλότερη από τη κανονική συγκέντρωση μικροοργανισμών, ιδίως διαφορετικών ειδών μυκητών εκ των οποίων ο *B. cinerea* ήταν ο πιο συχνός (Lemons et al., 2018), ενώ σε πρόσφατη μελέτη αναφέρθηκε πρόκληση πλαστικής βρογχίτιδας σε παιδί (Liu & Ai 2020). Δεδομένα που συνιστούν ότι η έκθεση σε σπόρια μυκήτων δια κατανάλωση κάνναβης μπορεί να οδηγήσει σε ενδεχόμενες επιπλοκές ασθένειας (Lemons et al., 2018).



Εικόνα 9: Ανάπτυξη της σήψης από *Botrytis cinerea* σε εγκαταστάσεις θερμοκηπίου. (A) Πρώιμη μόλυνση σε αναπτυσσόμενη ταξιανθία δείχνοντας καφέτιασμα και αποσύνθεση φύλλων και βρακτίων φύλλων. (B,C) Προηγμένα στάδια σήψης μπουμπουκιών όπου ολόκληρη η ταξιανθία έχει καταστραφεί. (D) Κονινή λήψη από συγκομισμένες νεκρές ταξιανθίες δείχνοντας ανάπτυξη μυκηλίου μέσα στον οφθαλμό και αποσύνθεση. (H,I) βλάβες στα φύλλα κάνναβης λόγω εναπόθεσης σπορίων του βοτρύτη στις προσβεβλημένες ταξιανθίες προκαλώντας μεμονωμένες κηλίδες που διευρύνθηκαν σε νεκρωτικές βλάβες. Πηγή: Punja et al., (2019).

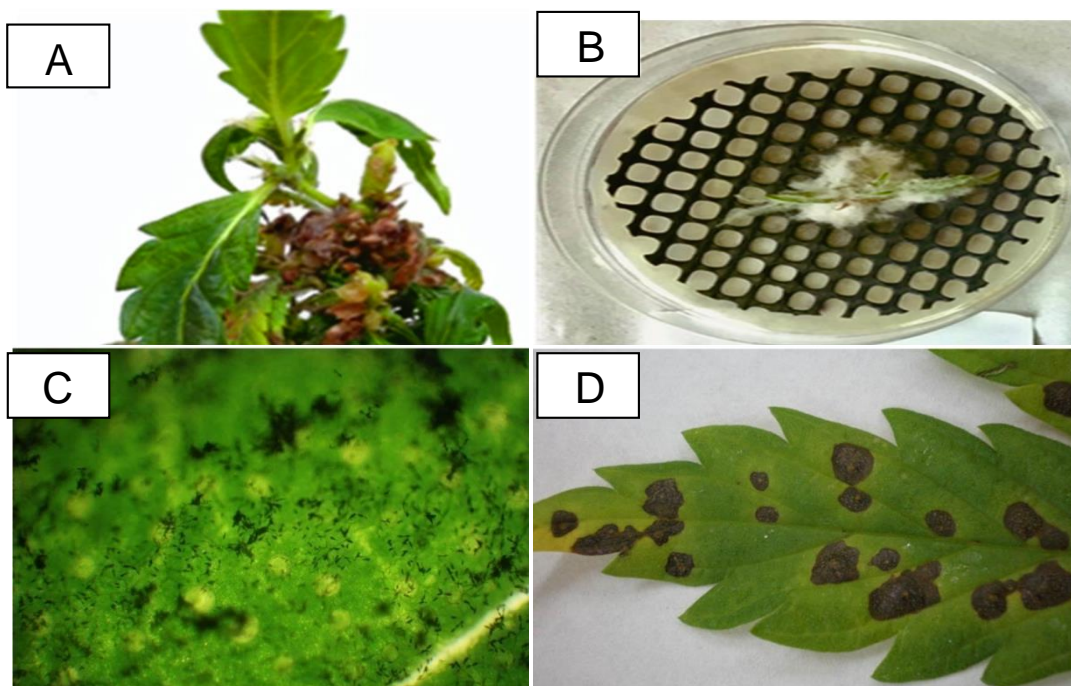
Η καφέ σήψη προκαλείται από τον απανταχού παρόντα μύκητα *Alternaria alternata*. Ο συγκεκριμένος μύκητας σε γενικές γραμμές προσβάλλει ήδη περίπου 100 φυτικά είδη και ως εκ τούτου είναι ένας οικονομικά σημαντικός επιμολυντής μύκητας τροφίμων και ζωοτροφών (Lee et al., 2015). Από άποψη μόλυνσης ο *A. alternata* προσβάλλει τα φυτά σαν ευκαιριακό σαπρόφυτο σε νεκρωτικό ιστό και αποτελεί το κύριο παθογόνο σε θηλυκά άνθη κάνναβης (McPartland 1983a; Thompson et al., 2017; McPartland et al., 2017). Η απώλεια που προκαλείται στη γεωργική παραγωγή κάνναβης είναι σημαντική και σύμφωνα πρόσφατη έρευνα το

80% των φυτών βιομηχανικής κάνναβης σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια καταγράφηκε με κηλίδες στα φύλλα, καταλήγοντας σε απώλεια απόδοσης της τάξης του 20% (Tang et al., 2021), δεδομένα που αναδεικνύουν το σοβαρό ζήτημα του προβλήματος για αγρότες και καλλιεργητές. Τα σπόρια μπορούν να επιβιώσουν σε αδράνεια κατά τη διαχείμαση για χρονική περίοδο και ως εκ τούτου είναι παρόντα σε ατμοσφαιρικό επίπεδο σχεδόν όλο τον χρόνο (Kumari et al., 2020). Το βέλτιστο της ανάπτυξης του μυκηλίου *A. alternata* τυγχάνει συνήθως σε θερμοκρασία γύρω στους 27°C. Ο μύκητας αρχίζει να παράγει σπόρια σε θερμοκρασίες από 19-23°C από δέκα ημέρες μετά την μόλυνση και μετά διασκορπίζονται από τον άνεμο και τη βροχή (Kumari et al., 2020). Τα σπόρια συνήθως εγκαθίστανται στα κατώτερα μέρη του φυτού και μετά από 12 ώρες βλαστάνουν και διαπερνούν την επιδερμίδα του φύλλου (Kumari et al., 2020) Ο μύκητας επιβιώνει στο έδαφος σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη και στα υπολείμματα των προσβεβλημένων φύλλων (McPartland et al., 2000).

Σύμφωνα με διάφορες μελέτες τα συμπτώματα που προκαλεί ο *A. alternata* στα φυτά της κάνναβης είναι νέκρωση φύλλων χαρακτηρισμένων από ξηρές κηλίδες καφέ, γκριζου ή μαύρου χρώματος (Tang et al., 2020), λευκού χρωματισμού στα προστατευτικά φύλλα της ταξιανθίας (Jerushalmi et al., 2020), ενώ οι Jerushalmi et al., (2020) και Punja et al., (2019) ανέφεραν και λευκές κηλίδες στους οφθαλμούς και στις ταξιανθίες αντίστοιχα. Γενικά οι κηλίδες των φύλλων μετρούνται έως 2 cm διαμέτρου και παρουσιάζουν στρογγυλά ομόκεντρα σημάδια που εναλλάσσονται μεταξύ ανοιχτής και σκοτεινής απόχρωσης, σχηματίζοντας δακτυλίου στα φύλλα με κιτρινωπό περιθώριο χλώρωσης τύπου φωτοστέφανο (χλωρωπικά φωτοστέφανα) (Εικόνα 10D) (McPartland et al., 2017). Οι κηλίδες μπορεί να επεκταθούν και στους μίσχους των φύλλων αλλά και τα στελέχη του φυτού (McPartland et al., 2000). Επιπλέον περιστασιακά οι κηλίδες μπορεί να θρυμματιστούν και να αποσυντεθούν, αφήνοντας μια οπή στα φύλλα (McPartland et al., 2017). Κανονικά η ανάπτυξη αυτών των κηλίδων περιορίζεται από τα παχύτερα νεύρα των φύλων, ωστόσο μπορούν να συγκεντρωθούν μαζί και να σχηματίσουν ευρείες προσβεβλημένες περιοχές (Cannabis magazine.com). Σε αυτή την περίπτωση η αποφύλλωση θα είναι μεγαλύτερη και σε σοβαρές περιπτώσεις ενδέχεται να είναι αρκετή για να οδηγήσει στη πλήρη νέκρωση του φυτού. Τέλος σε μια πολύ παλιά εργασία αναφέρθηκε και προσβολή των θηλυκών ανθέων (και σπόρων) κάνναβης από τον *A. alternata*, μετατρέποντάς τα σε γκριζο-καφέ (Ferri 1961). Τα περισσότερα από τα αναφερθέντα συμπτώματα διακρίνονται στην Εικόνα 10.

Πέραν των προσβολών στα φυτά πρέπει να τονιστεί ότι ο *A. alternata* επιφέρει μόλυνση των τροφίμων και ζωοτροφών μέσω παραγωγής μυκοτοξινών (Garganese et al., 2016). Τα δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού του *A. alternata*, alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), altertoxin I και II (Jarolim et al., 2017) έχουν ταξινομηθεί ως μυκοτοξίνες και έχουν αξιολογηθεί από τις Ευρωπαϊκές αρχές ασφάλειας τροφίμων (EFSA) ως δυνητικά επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία (EFSA, 2011). Τα προβλήματα της ανθρώπινης υγείας συνήθως δεν περιορίζονται σε οξεία αλλά σε μακροπρόθεσμες επιπτώσεις από την πρόκληση μυκοτοξικώσεων (Wenderoth et al., 2019) και στη χειρίστη περίπτωση καταλήγουν σε καρκίνο λόγω των μεταλλαξιογόνων ιδιοτήτων των παραπάνω μυκοτοξινών (Zhen et al., 1991; Liu et al., 1991). Επιπλέον ο *A. alternata* ως δυνητικός παραγωγός δευτερογενών μεταβολιτών έχει καταγραφεί ως ένα από τα κύρια μυκητιακά αλλεργιογόνα σε ανθρώπους και ζώα (Babicaneanu et al., 2013; Hayes et al., 2018) με σημαντικά

ζητήματα όπως συσχέτιση με άσθμα, αλλεργική ρινοκολπίτιδα και λοιμώξεις του δέρματος σε ασθενείς (Pulimood *et al.*, 2007; Gabriel *et al.*, 2016).



Εικόνα 10: Ανάπτυξη του μύκητα *Alternaria alternata* σε φύλλα κάνναβης. (A) Αναπτυσσόμενες μούχλες καφε-γκρίζης απόχρωσης στις ταξιανθίες σε δοκιμή μόλυνσης ατόφιων φυτών σύμφωνα με τις αρχές του Koch. (B) Αλλοιώσεις-βλάβες λευκού χρώματος στη ταξιανθία και σακχαρόφυλλα σε βιοδοκιμές αποκολλημένων φυτικών ιστών σύμφωνα με τις αρχές του Koch. (C) Εξάπλωση του *A. alternata* με όργανα καρποφορίας πάνω στο φύλλο του φυτού. (D) Ξηρές νεκρωτικές κηλίδες γκρίζου και καφέ χρώματος στο φύλλωμα του φυτού με εμφανείς περιοχές χλώρωσης προς σχηματισμό φωτοστεφάνου. Πηγή: Jerushalmi *et al.*, (2020) και <https://www.alchimiaweb.com/blog/alternaria-cannabis-crop/>.

Οι σηψηρριζίες και αδρομυκώσεις από τον μύκητα *Fusarium oxysporum* αποτελούν διαδεδομένες ασθένειες που προκαλούν σημαντικές απώλειες στα φυτά κάνναβης (McPartland *et al.*, 2000), (Punja & Rodriguez 2018), (Punja, 2021) και με δεδομένα που έδειξαν καταστροφή ακόμα και 80% των φυτών (Jerushalmi *et al.*, 2020). Ως εδαφογενές παθογόνο ο *F. oxysporum* μπορεί να επιβιώσει για μεγάλες περιόδους εν απουσία ξενιστή, κυρίως σε μορφή χλαμυδοσπορίων (Παντελίδης, 2009). Όταν οι ρίζες προσεγγίσουν τα χλαμυδοσπόρια, αυτά βλαστάνουν και οι αναπτυσσόμενες υφές προσκολούνται στις ρίζες των φυτών και εν συνεχεία το μυκήλιο προχωρά από τους μεσοκυττάριους χώρους μέχρι να φτάσει στα αγγεία του ξύλου μέσω των οποίων αποικίζει τον ξενιστή (Παντελίδης, 2009).

Οι Punja *et al.*, (2019) κατέγραψαν προσβολές στις ρίζες και στον λαιμό των φυτών φαρμακευτικής κάνναβης και συγκεκριμένα βυθισμένες αλλοιώσεις στον λαιμό των προσβεβλημένων φυτών, που μολύνθηκαν με φυσικό τρόπο σε καλλιέργεια αγρού (Εικόνα 11C). Επιπλέον στην υπάρχουσα δημοσίευση αλλά και σε επόμενη (Punza, 2021) αναφέρθηκε καφέπιασμα της ρίζας (Εικόνα 11A) λόγω παρουσίας του παθογόνου σε δείγματα νεκρών στεμάτων, στελεχών, ιστών εντεριώνης και ριζών που είχαν ουσιαστικά σαν συνέπεια την αδρομύκωση των προσβεβλημένων φυτών λόγω *F. oxysporum*, δηλαδή καθυστέρηση ανάπτυξης και γενικά μια καχεκτικότητα,

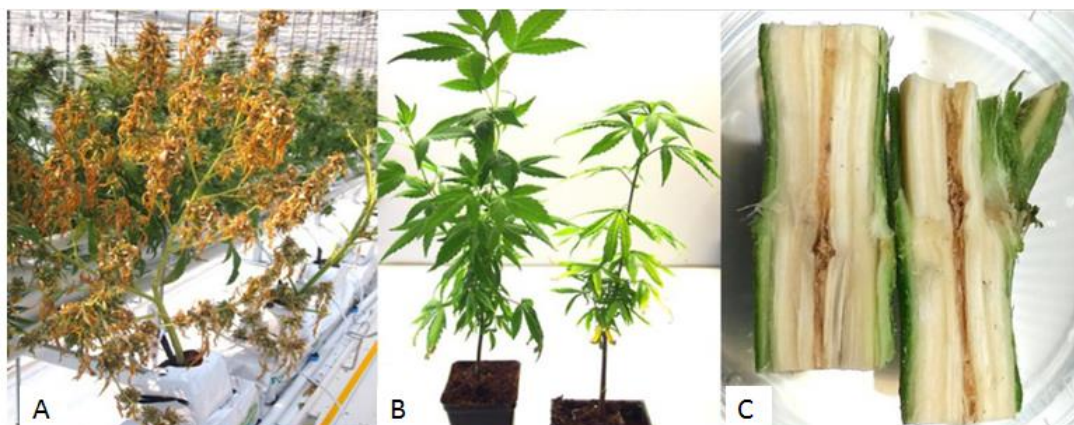
μετατροπή φύλλων αρχικώς σε ανοιχτό πράσινο προς χρυσοκίτρινο και μετέπειτα μάρανση, θάνατο και σταδιακή πτώση πάνω από τη βάση του στελέχους (Παντελίδης, 2009). Τα χαρακτηριστικά αυτά συμπτώματα της μάρανσης εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της σημαντικής υδατικής καταπόνησης, κυρίως λόγω της απόφραξης των αγγείων και συνεπώς η μάρανση προκαλείται από ένα συνδυασμό δραστηριοτήτων του μύκητα όπως η συσσώρευση μυκηλίου ή/και η παραγωγή τοξινών, αλλά και από τις αντιδράσεις άμυνας του φυτού ξενιστή όπως σχηματισμού πηγμάτων, τυλώσεων και κατάρρευσης των αγγείων από τον πολλαπλασιασμό των γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (Παντελίδης, 2009). Για του λόγου το αληθές, οι (Punja *et al.*, 2019) κατέγραψαν σκούρες ραβδώσεις στον αγγειακό ιστό του ξυλώματος των ριζών, του κάτω στελέχους και γενικότερα καφέπασμα των ιστών της εντεριώνης (Εικόνα 12C), αλλά και περιπτώσεις αποσύνθεσης των ριζών. Τα μολυσμένα φυτά παρουσίασαν και πλάγιασμα (Εικόνα 13D).

Επιπλέον οι Jerushalmi *et al.*, (2020) παρατήρησαν σε σπορόφυτα κάνναβης αρχικώς μια απώλεια σπαργής και κασάρωμα των φύλλων χωρίς απώλεια χρώματος και εν συνεχεία ακολούθησε ξήρανση, μάρανση και θάνατος των σποροφύτων σε υψηλό ποσοστό (80%) (Εικόνα 15 A,B), ενώ τα υπόλοιπα φυτά παρέμειναν με μειωμένη και καχεκτική ανάπτυξη σε σχέση με τα υγιή (Εικόνα 15 C,D). Η ιδιαίτερα εύκαρπη και ευέλικτη παραγωγή σπορίων η οποία δύναται να επιφέρει διασπορά του μολύσματος στον αέρα, μπορεί δυνητικά να καταλήξει σε μόλυνση φυλλώματος (Punja *et al.*, 2019) στο ίδιο ή παρακείμενα φυτά (Εικόνα 13A) ή σήψη και θανάτωση ταξιανθιών (Εικόνα 14 B,C) (Punja, 2021). Επιπροσθέτως τα σπόρια του *F. oxysporum* μπορεί να διασπαρθούν μέσω ύδατος ή υδροπονικού διαλύματος θρεπτικών συστατικών (Εικόνα 13B) και αν επαναληφθεί ο κύκλος χωρίς κάποια διαχείριση καταστροφής των σπόρων του παθογόνου, μπορεί να εισάγει μολυσματικό φορτίο εντός δωματίων πολλαπλασιασμού όπου ριζώνονται τα μοσχεύματα προκαλώντας θνησιμότητα (Εικόνα 14D) και μόλυνση λαιμού και ρίζας. Εν κατακλείδι, το *F. oxysporum* μπορεί να μολύνει σε πολλαπλά σημεία εντός μιας εγκατάστασης παραγωγής.

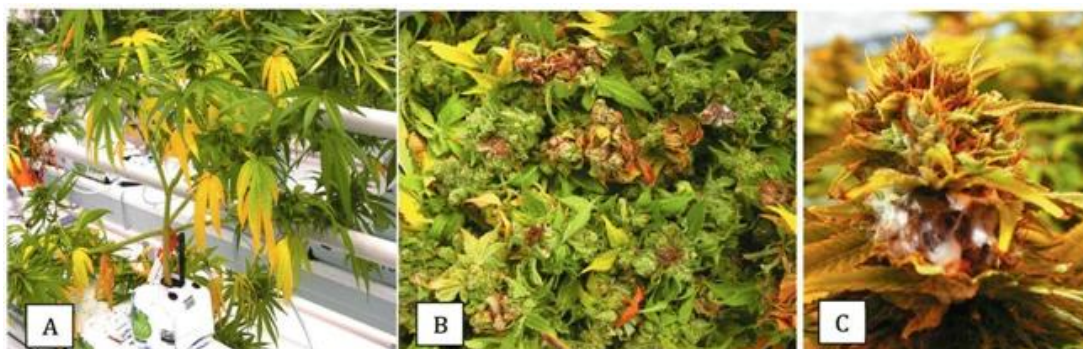
Από άποψη υγείας είναι γνωστό ότι γένη του *Fusarium* παράγουν τις μυκοτοξίνες fumosins, οι οποίες μπορούν να βλάψουν τα θηλαστικά που καταναλώνουν προσβεβλημένα δημητριακά (D'Mello *et al.*, 1999; Placinta *et al.*, 1999; Edwards, 2004). Η κατανάλωση των μολυσμένων δημητριακών συνδέθηκε με καρκίνο του ισοφάγου (D'Mello *et al.*, 1999), λευκοεγκεφαλομαλακία σε θηλαστικά και ηπατοτοξικές, καρκινογόνες και αποπτωτικές επιπτώσεις στο ήπαρ ποντικών (Placinta *et al.*, 1999; da Rossa *et al.*, 2014). Τέλος η χημική ομάδα των μυκοτοξινών trichothecenes που παράγονται και από τον *F. oxysporum*, βρέθηκε να είναι παθογενετική και στη φαρμακευτική κάνναβη (Jerushalmi *et al.*, 2020). Οι μυκοτοξίνες deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV) και η τοξίνη T₂ είναι γνωστές για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με την DON να σχετίζεται με τη διατροφική τοξική νόσο της αλευκίας και να είναι συμπτωματική με φλεγμονή του δέρματος, εμετού και βλάβης ηπατικού ιστού (da Rossa *et al.*, 2014).



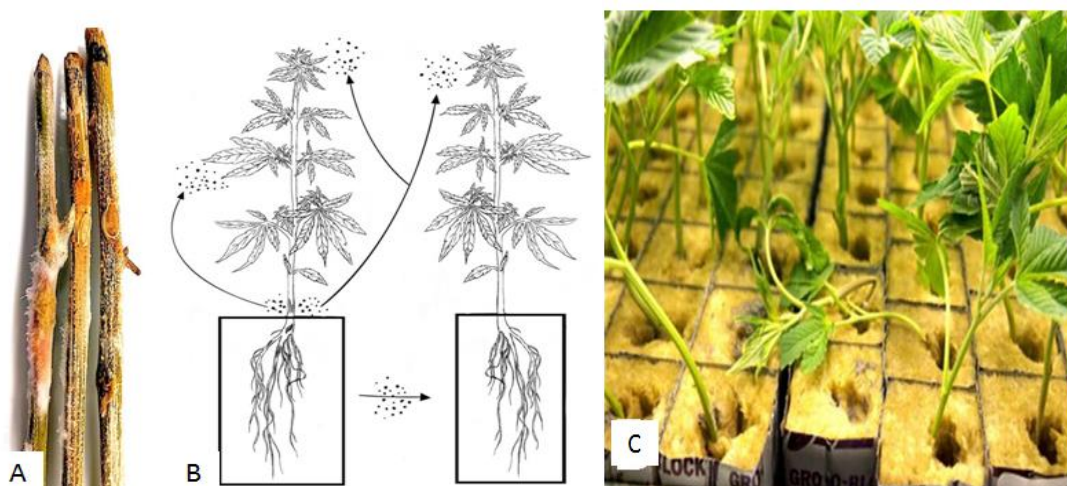
Εικόνα 11: Επιπτώσεις από το παθογόνο προσβολής ριζών *Fusarium oxysporum* στη κάνναβη. (A) Συμπτώματα καφέ αποχρωματισμού στο ριζικό σύστημα φυτών εσωτερικής υδροπονικής καλλιέργειας. (B) Συμπτώματα φυσικής μόλυνσης λαιμού σε καλλιεργήσιμο φυτό αγρού. (C) Η περιοχή του λαιμού από το προσβεβλημένο φυτό που φαίνεται στην (C) είναι κούφια και υπάρχει ορατή ανάπτυξη μυκηλίου στην επιφάνεια. Πηγή: Punja *et al.*, (2019).



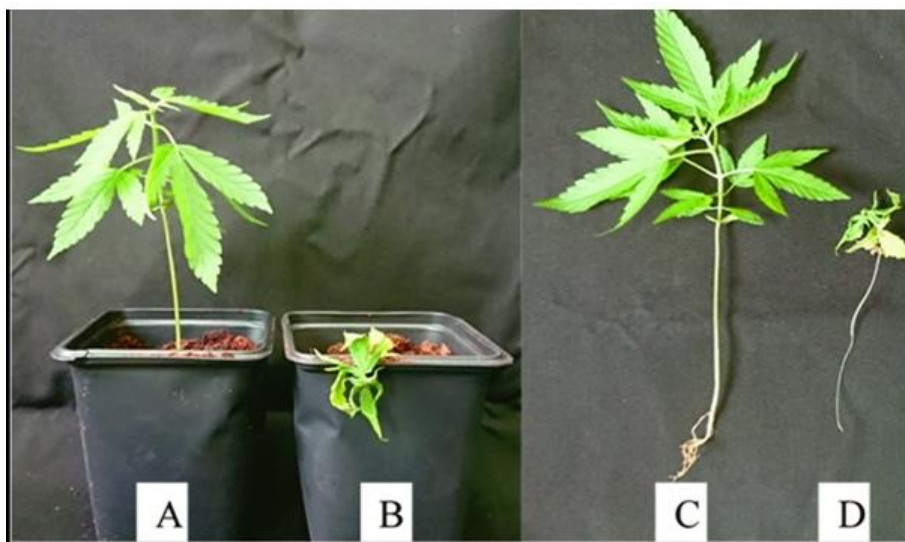
Εικόνα 12: Υπέργειες επιπτώσεις από το παθογόνο *Fusarium oxysporum* στη κάνναβη. (A) Συμπτώματα μάρανσης και κατάρρευσης του φυτού εσωτερικής καλλιέργειας. (B) Συμπτώματα κιτρινίσματος και καθυστερημένης ανάπτυξης φύλλων μη εμβολιασμένου φυτού (αριστερά) σε σχέση με εμβολιασμένου (δεξιά) με σπόρια *F. oxysporum* σε υπόστρωμα κοκοφοίνικα και ηλικίας 4 εβδομάδων. (C) Συμπτώματα εσωτερικού αποχρωματισμού του ιστού εντεριώνης στα ανώτερα 10 cm της περιοχής του λαιμού σε μολυσμένο φυτό. Πηγή: Punja *et al.*, (2019).



Εικόνα 13: Συμπτώματα ασθένειας από *Fusarium oxysporum* σε καλλιεργούμενη εντός θερμοκηπίου κάνναβη. (Α) Κιτρίνισμα των κατώτερων φύλλων ως συνέπεια προσβολής του λαιμού από τον *F. oxysporum*. (Β) Προσβεβλημένη ταξιανθία εκ της οποίας απομονώθηκε ο *F. oxysporum*. (C) Κονινή λήψη νεκρής ταξιανθίας που επιδεικνύει μυκηλιακή ανάπτυξη του *F. oxysporum* υπό συνθήκες θερμοκηπίου. Πηγή: Punja (2021).

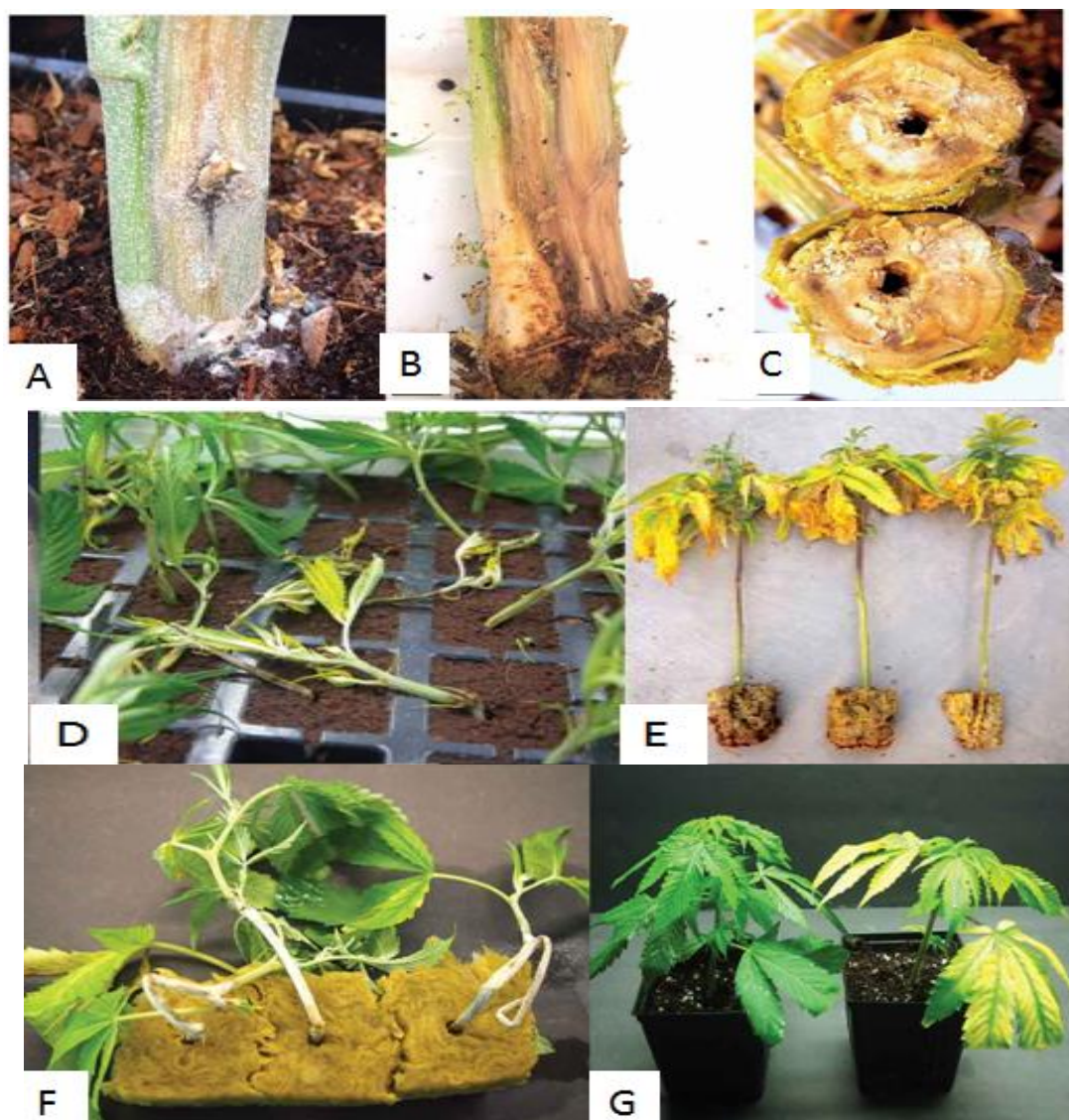


Εικόνα 14: (Α) Μυκηλιακή ανάπτυξη και σποροποίηση από είδη του *Fusarium* πάνω σε στελέχη κάνναβης. (Β) Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την ενδεχόμενη διασπορά των σπορίων του *Fusarium* από ιστούς στελεχών έως τα φύλλα και οφθαλμούς ανθέων του ίδιου και παρακείμενων φυτών. (C) Πλάγιασμα σποροφύτων κάνναβης σε blocks πετροβάμβακα ως αποτέλεσμα της διασποράς του *F. oxysporum* και μόλυνση στα κομμένα άκρα του στελέχους. Πηγή: Punja *et al.*, (2019) με άδεια του Can. J. Plant Pathol. 40(4)

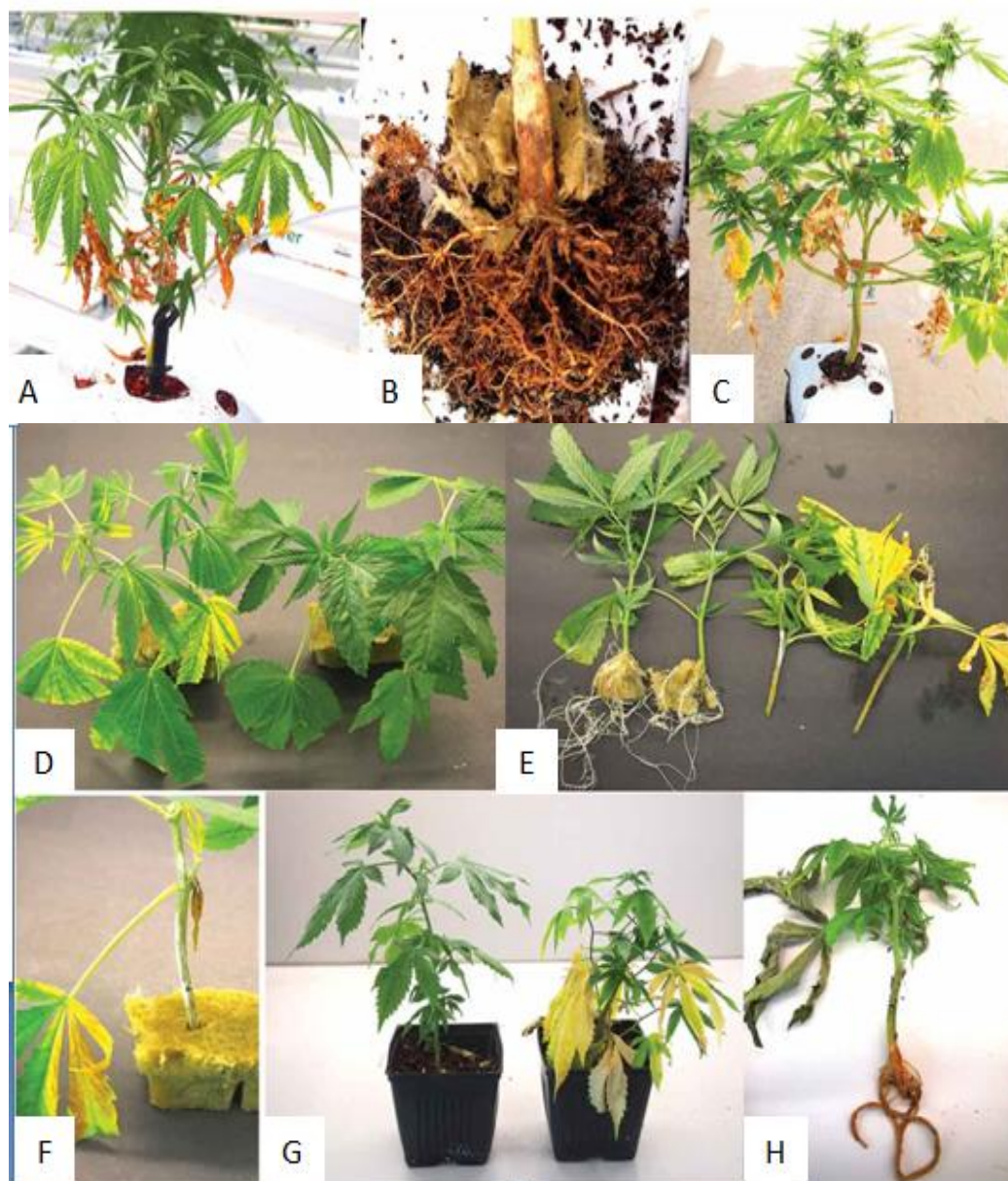


Εικόνα 15: Εμβολιασμός σποροφύτων φαρμακευτικής κάνναβης με (A) αλατούχο διάλυμα (μάρτυρας) σε σχέση με το εμβολιασμένο με (B) *Fusarium oxysporum* το οποίο καταλήγει σε θάνατο. Φωτογραφίες από ατόφια φυτά συμπεριλαμβανομένων και των ριζών τους που εμβολιάστηκαν με (C) αλατούχο διάλυμα (μάρτυρας) σε σύγκριση με τα εμβολιασμένα (D) με *Fusarium oxysporum* στα οποία παρατηρείται καθυστερημένη ανάπτυξη, καχεκτικότητα, κιτρίνισμα και μάρανση φύλλων. Πηγή: Jerushalmi *et al.*, (2020).

Πέραν του *F. oxysporum* έχουν αναφερθεί και διάφορα άλλα φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Fusarium* που προκαλούν σήψη ρίζας και λαιμού στη κάνναβη υπό συνθήκες θερμοκηπίου όπως ο *Fusarium solani* (Punja & Rodriguez, 2018) αλλά και ο *Fusarium lichenicola* (συν. *Cylindrosporion linechicola* και *Neocosmopora linechicola*) ο οποίος αποτέλεσε το πρώτο καταγεγραμμένο περιστατικό μόλυνσης της κάνναβης παγκοσμίως ως νέο παθογόνο του συγκεκριμένου φυτού (Punja *et al.*, 2021). Στη συγκεκριμένη έρευνα ανακτήθηκαν από εδαφικά δείγματα έξι αδειοδοτημένων εγκαταστάσεων παραγωγής φαρμακευτικής κάνναβης το χρονικό διάστημα 2019-2020 34 απομονώσεις (*isolates*) *F. solani* και 6 *F. lichenicola* οι οποίες ταυτοποιήθηκαν με τεχνικές μοριακών αναλύσεων και φυλογενετικές μελέτες. Τα συμπτώματα που καταγράφηκαν για τον *F. solani* περιελάμβαναν αλλοιώσεις και βλάβες στον λαιμό μητρικών φυτών με εσωτερικό καφέ τιασμα και αποσύνθεση των στελεχών (Εικόνα 16 A-C), ενώ παρατηρήθηκαν και συμπτώματα ανάπτυξης «υγρής σήψης» στους ιστούς των στελεχών (Εικόνα 16C). Επιπλέον κάποια φυτά παρουσίασαν συμπτώματα πλαγιάσματος στα μοσχεύματα εντός δίσκων πολλαπλασιασμού (Εικόνα 16D), ενώ σαν αποτέλεσμα της προσβολής του λαιμού και της ρίζας από τον μύκητα, τα βλαστικά φυτά εμφάνισαν κιτρίνισμα (Εικόνα 16F). Αντιστοίχως τα συμπτώματα που καταγράφηκαν σε βλαστικά και νεαρά ανθισμένα φυτά από την προσβολή του *F. lichenicola*, περιελάμβαναν κιτρίνισμα φύλλων και βλάβες σκούρου καφέ χρώματος στο λαιμό και καφέ ρίζες (Εικόνα 17 A-C), κιτρίνισμα και νέκρωση των κατώτερων φύλλων ανθισμένων φυτών (Εικόνα 17G) και αναστολή ανάπτυξης της ρίζας σε εμβολιασμένα με μύκητα μοσχεύματα σε σύγκριση με τα ανεμβολίαστα (Εικόνα 17H). Τέλος παρουσιάστηκαν αντίστοιχα συμπτώματα στα φύλλα και ρίζες των βλαστικών φυτών (Εικόνα 17K).



Εικόνα 16: Συμπτώματα ασθένειας από φυσική και τεχνητή μόλυνση από το *Fusarium solani* σε φυτά κάνναβης. (Α) Μόλυνση βάσης του λαιμού σε μητρικό φυτό. (Β) Βαθύτερος αποχρωματισμός των ιστών του λαιμού. (C) Συμπτώματα εσωτερικής υγρής σήψης σε στελέχη μητρικών φυτών εξαιτίας *F. solani*. (D) Συμπτώματα πλαγιάσματος σε μοσχεύματα εντός δίσκων πολλαπλασιασμού. (E) Κιτρίνισμα των βλαστικών φυτών ως αποτέλεσμα μόλυνσης της ρίζας και του λαιμού από το *F. solani*. (F) Συμπτώματα πλαγιάσματος ακολουθούμενα από τεχνητή μόλυνση με *F. solani*. (G) Συμπτώματα κιτρινίσματος ως αποτέλεσμα του εμβολιασμού ρίζας με *F. solani* (δεξιά) εν συγκρίσει με μη εμβολιασμένο φυτό (αριστερά). Πηγή: Punja *et al.*, (2021).



Εικόνα 17: Συμπτώματα ασθένειας από φυσική και τεχνητή μόλυνση από το *Fusarium lichenicola* σε φυτά κάνναβης. (Α) Βλαστικό φυτό με την μετατροπή των κατωτέρων φύλλων του σε νεκρωτικά. (Β) Μόλυνση λαιμού και ρίζας στο φυτό της εικόνας Α εκ του οποίου απομονώθηκε ο *F. lichenicola*. (C) Ανθισμένο φυτό με την μετατροπή των κατωτέρων φύλλων του σε κίτρινα και νεκρωτικά. (D) Συμπτώματα κιτρινίσματος των εμβολιασμένων με *F. lichenicola* (αριστερά) μοσχευμάτων εν συγκρίσει με τους ανεμβολίαστους μάρτυρες (δεξιά). (E) Αναστολή της ανάπτυξης της ρίζας στα εμβολιασμένα με *F. lichenicola* (δεξιά) μοσχεύματα εν συγκρίσει με τη παρατεταμένη ριζοποίηση που φαίνεται στους μάρτυρες (αριστερά). (F) Μυκηλιακή ανάπτυξη πάνω σε εμβολιασμένα μοσχεύματα με *F. lichenicola*. (G) Συμπτώματα κιτρινίσματος σε ριζωμένο φυτό που εμβολιάστηκε με *F. lichenicola* (δεξιά) εν συγκρίσει με το μη εμβολιασμένο μάρτυρα (αριστερά). (H) Βλαστικό φυτό με συμπτώματα καφετιάσματος ρίζας και νέκρωσης φύλλου ως αποτέλεσμα εμβολιασμού με *F. lichenicola*. Πηγή: Punja *et al.*, (2021).

Το ωίδιο (*powdery mildew*) που οφείλεται σε προσβολή από τον μύκητα *Golovinomyces cichacearum* είναι μια ασθένεια με τακτική συχνότητα εμφάνισης σε χώρες με υψηλή ενασχόληση στην θερμοκηπιακή καλλιέργεια φαρμακευτικής κάνναβης, όπως Καναδά (Perin *et al.*, 2018; Punja *et al.*, 2019) και Ισραήλ (Mayman *et al.*, 2020). Τα σημαντικά προβλήματα που προκαλούνται, καθιστούν το ζήτημα υψίστης σημασίας καθώς το προσβεβλημένο φυτικό υλικό αναγκαστικά απορρίπτεται, κρινόμενο ως ακατάλληλο για κατανάλωση. Αρχικά οι Perin *et al.*, (2018) σε εσωτερική καλλιέργεια εγκαταστάσεων στον ατλαντικό Καναδά και Βρετανική Columbia κατέγραψαν αναλυτικά τα συμπτώματα του ωιδίου, το οποίο ήταν παρόν σε όλες τις τοποθεσίες παραγωγής από τα ληφθέντα δείγματα μεταξύ 2013 και 2017 με ποσοστά επίπτωσης 20 έως 35%.

Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν ως λευκές κυκλικές κηλίδες αποτελούμενες από επιφυτικά μυκήλια και κονίδια στην κάτω επιφάνεια του φύλλου (Εικόνα 18C) με εμφανείς διαφορές από τα προσωρινώς υγιή φύλλα (Εικόνα 18A). Καθώς προχωρούσε η ασθένεια τα μυκήλια και οι κονιδιοφόροι επικάλυψαν ολόκληρη την επιφάνεια των φύλλων και εξαπλώθηκαν στα βράκτια του άνθους και στους οφθαλμούς (Εικόνα 18B). Αργότερα οι Punja *et al.*, (2019) κατέταξαν τον *G. cichacearum* ως το κυριότερο παθογόνο του φυλλώματος στην μελέτη τους, καταγράφοντας μόλυνση φύλλων με φυσικό τρόπο από το ωίδιο του μύκητα με παρόμοια αποτελέσματα, εμφανίζοντας αρχικά ανάπτυξη λευκού μυκηλίου εν συνεχεία ακολουθούμενη από άφθονη σποροποίηση του παθογόνου, η οποία προκάλεσε στα φύλλα την ανάπτυξη μιας λευκής πουδραρισμένης εμφάνισης (Εικόνα 19 A,B), ενώ παρατηρήθηκε επιπλέον και μόλυνση στα στελέχη (Εικόνα 19C) και στις ταξιανθίες (Εικόνα 19D). Τα ίδια συμπτώματα ουσιαστικά επιβεβαιώθηκαν και σε εμπορικές θερμοκηπιακές καλλιέργειες φαρμακευτικής κάνναβης στο Ισραήλ (Mayman *et al.*, 2020), όπου με την πρόοδο της ασθένειας οι αποικίες του μύκητα εξαπλώνονταν σε μέγεθος, συνάυξηση και κάλυψη ολόκληρων των φυτικών επιφανειών όλων των οργάνων.



Εικόνα 18: Ωίδιο του *Cannabis sativa* που προκαλείται από τον *Golovinomyces cichoracearum*. (A) Υγιές φύλλο (αριστερά) και βαρέως προσβεβλημένο φύλλο (δεξιά). (B) Λευκές κυκλικές κηλίδες πάνω στα φύλλα και μυκητιακές μάζες στα βράκτια φύλλα και οφθαλμούς. (C) Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης δείχνοντας επιφυτικές υφές, κονδιοφόρους στεγάζοντας 1-2 κονίδια σε αλυσίδες και μεμονωμένα κονίδια. Στο κατώτερο τμήμα της φωτογραφίας διακρίνεται ένα αδενικό τρίχωμα με πολλαπλά κονίδια προσκολλημένα σε αυτό. (D) Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης δείχνοντας κονίδια του ωιδίου. Πηγή: Perin *et al.*, (2018).



Εικόνα 19: Στάδια ανάπτυξης του ωιδίου στα φύλλα, στελέχη και οφθαλμούς ανθέων, που προκαλείται από τον *Golovinomyces cichoracearum*. (A) Πρώιμη μόλυνση του νεαρού φύλλου επιδεικνύοντας αραιό λευκό μυκήλιο στην φυλλική επιφάνεια. (B) Προηγμένα στάδια μόλυνσης με άφθονη σποροποίηση, καταλήγοντας σε πουδραρισμένη εμφάνιση στην φυλλική επιφάνεια. (C) Ανάπτυξη του ωιδίου στα φύλλα και στέλεχος των βλαστικών μοσχευμάτων του στελέχους κάναβης «*Pink Kush*». (D) Μόλυνση των ταξιανθιών κάναβης «*Pink Kush*» επιδεικνύοντας παρατεταμένη ανάπτυξη μυκηλίου. Πηγή: Punja *et al.*, (2019).

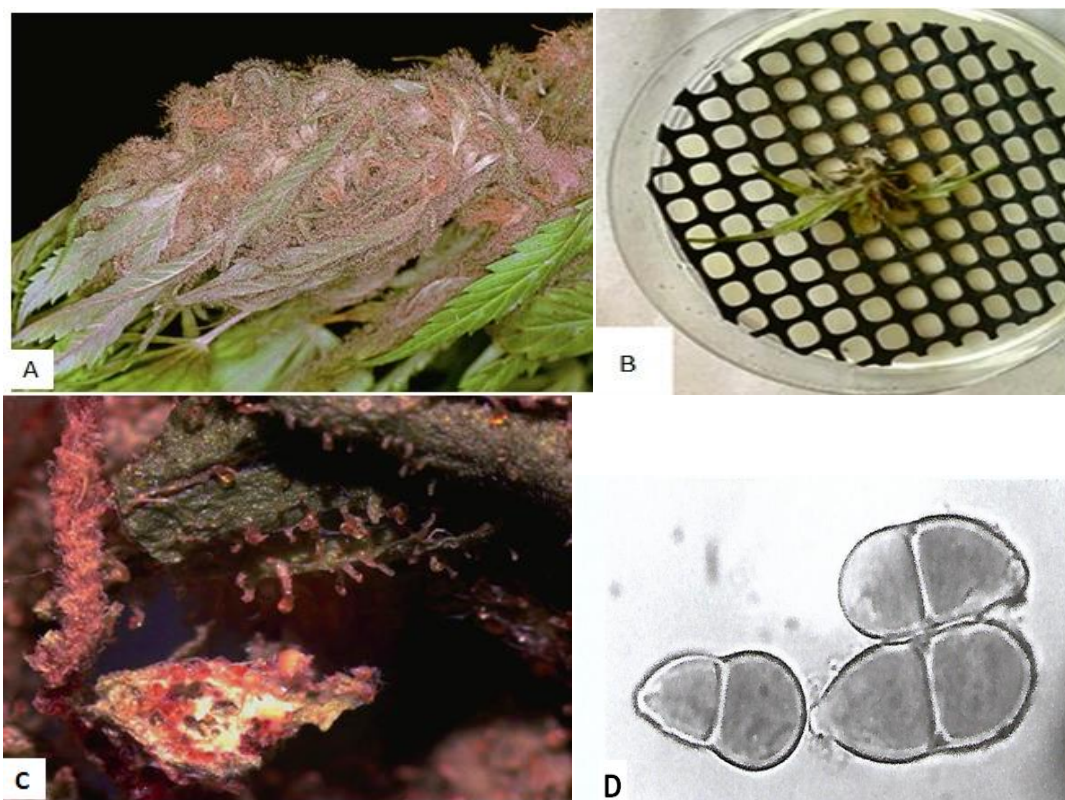
Το «ψευδο»-ωίδιο (*false powdery mildew*) που προκαλείται από τον επιμολυντή κάνναβης *Trichothecium roseum* έχει αναφερθεί στο παρελθόν (McPartland, 1995) αλλά και προσφάτως (Jerushalmi *et al.*, 2020) σε προσβολή βιομηχανικής και φαρμακευτικής κάνναβης αντίστοιχα και θεωρείται πλέον μία από τις τρεις πιο απειλητικές ασθένειες των ανθισμένων κορυφών κάνναβης (McPartland & McKernan, 2017). Στη διάγνωση της ασθένειας το «ψευδο»-ωίδιο δεν πρέπει να συγχέεται με το πραγματικό ωίδιο που οφείλεται και στον έταιρο παθογόνο μύκητα προσβολής κάνναβης *Sphaerotheca macularis* (McPartland & Hillig, 2008). Τα συμπτώματα που περιέγραψαν οι συγκεκριμένοι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι επιφανειακές υφές του *T. roseum* μπορεί να σχηματίζουν μια πυκνή στρώση χνουδωτής αποικίας (mat) στην επιφάνεια του φύλλου ή να επεκταθούν σε ιστό ο οποίος περικλείει εξ ολοκλήρου τα μικρά άνθη.

Παλαιότερα αυτή η ασθένεια εξαιτίας του *T. roseum*, αποκαλούνταν «ροζ σήψη» (McPartland *et al.*, 2000) ωστόσο ο συγκεκριμένος όρος καθίσταται παραπλανητικός. Ο λόγος είναι ότι ο μύκητας αρχικά παρουσιάζεται ως ένα λευκό χνούδι καλύπτοντας τα φύλλα ή τις ανθισμένες κορυφές και μόνο μετά την παραγωγή κονιδίων προκύπτει μια αραιή ροζ απόχρωση (Εικόνα 20A). Τα συμπτώματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με την ίδια πορεία εξέλιξης και από τους Jerushalmi *et al.*, 2020 (Εικόνα 20I). Υπήρξαν και παλαιές αναφορές από τους McPartland *et al.*, (2000) στην Ολλανδία για ανάπτυξη του *T. roseum* πάνω στα στελέχη των κλάδων και να «περιζώνει» τα φυτά, τα οποία εν συνεχεία μαράθηκαν και ανατράπηκαν. Σε ακόμα παλαιότερες αναφορές οι (Ghillini, 1951) και (Fuller & Norman, 1945) σημείωσαν ότι ο μύκητας καταστρέφει τις ίνες κλωστικής κάνναβης. Σε κάθε περίπτωση οι αποξηραμένες μυκηλιακές mats του *T. roseum* μπορεί να εμφανίζονται κιτρινωπές σε χρώμα, όταν παρατηρούνται μέσω μικροσκοπίου (Εικόνα 20C).

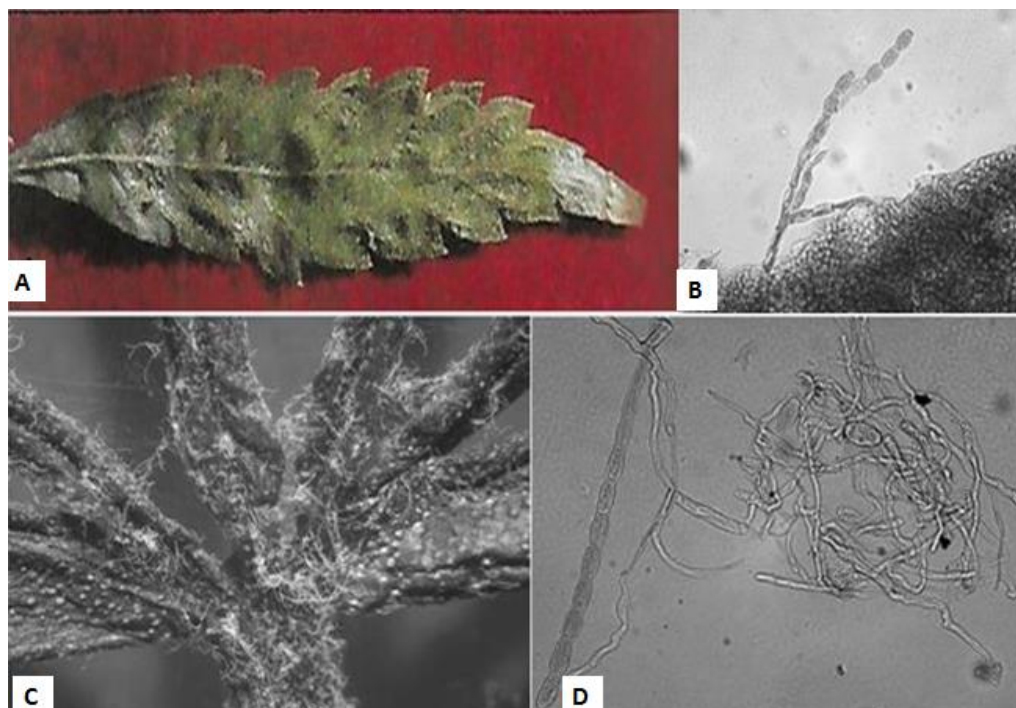
Όσον αφορά τα συμπτώματα του *S. macularis* τα πρώιμα προειδοποιητικά σημάδια μόλυνσης περιλαμβάνουν κυρτωμένα ανασηκωμένα εξογκώματα ή εξανθήματα στις άνω επιφάνειες του φύλλου. Από αυτές τις περιοχές οι σχεδόν αόρατες επιφανειακές υφές σχηματίζουν μια χνουδωτή αποικία πάνω στην επιφάνεια του φύλλου, με εμφανείς λευκούς κονιδιοφόρους να προκύπτουν από την επιφάνεια (Εικόνα 21C). Το ωίδιο μπορεί να παραμείνει απομονωμένο σε ακανόνιστες φλύκταινες ή να συναυξάνεται σε ολόκληρο το φύλλο. Οι μίσχοι και οι μικροί κλάδοι μπορούν επίσης να μολυνθούν υπό επιδημιολογικές συνθήκες. Σύντομα τα φύλλα αρχίζουν και μοιάζουν σαν να πασπαλίστηκαν με αλεύρι (Εικόνα 21A). Ο μύκητας παράγει άφθονες ποσότητες κονιδίων τα οποία διασκορπίζονται μέσω της πιο ήπιας αύρας ανέμου σε τοποθεσίες δευτερογενούς μόλυνσης. Τα προσβεβλημένα φυτά παραμένουν ζωντανά για απροσδιόριστους περιόδους ή μαραίνονται πρόωρα, έπειτα γίνονται κίτρινα, καφέ και πεθαίνουν. Αν δε, η ασθένεια αφεθεί να ολοκληρώσει τον κύκλο της τότε προκύπτουν και μαύρα κλειστοθήκια μέσα στις χνουδωτές αποικίες των επιφανειακών υφών.

Από άποψη διαφοροποίησης τα κονίδια των δύο μυκήτων ξεχωρίζουν εύκολα μεταξύ τους καθώς του *S. macularis* είναι μονοπύρηννα και σχήματος βαρελιού (Εικόνα 21 B, D), ενώ του *T. roseum* είναι διπύρηννα σχήματος δακρύου (Εικόνα 20D). Επιπλέον με την πάροδο της ηλικίας τα κονίδια του *S. macularis* μετατρέπονται σε ήπιο καφέ, ενώ του *T. roseum* σε ήπιο ροζ. Τέλος από άποψη υγείας το *T. roseum* είναι ανέκαθεν επιβλαβές στον άνθρωπο λόγω της παραγωγής των τοξικών σεσκι-τερπενοειδών μεταβολιτών trichothecenes (Mcdougal & Schmuff, 1985). Οι τοξικές εκδηλώσεις που προκαλούνται από αυτές τις μυκοτοξίνες

περιλαμβάνουν παλαιές αναφορές για καρδιαγγειακές βλάβες, γαστρεντερικές διαταραχές, υπόταση, αναιμία και λεμφοειδή νέκρωση (Ueno, 1977; Schoetal *et al.*, 1979; Buening *et al.*, 1982).



Εικόνα 20: Ασθένεια του «ψευδο»-ωιδίου από τον μύκητα *Trichothecium roseum* πάνω σε φυτικούς ιστούς κάνναβης. (A) μια «πολυτελής» ανάπτυξη υφών και κονιδίων του μύκητα *T. roseum* τυλίγοντας μια ανθισμένη κορυφή. (B) Ανάπτυξη του *T. roseum* πάνω σε ταξιανθίες φαρμακευτικής κάνναβης σε βιοδοκιμές αποκολλημένων φυτικών ιστών σύμφωνα με τις αρχές του Koch, όπου αρχικά αναπτύχθηκε μούχλα λευκού χρώματος ακολουθούμενη από εμφάνιση ροζ κονιδίων. (C) Αποξηραμένο δείγμα του *T. roseum* ανάμεικτο με μαραμένα και αποχρωματισμένα αδενώδη τριχώματα σε ανθισμένες κορυφές. Μεγέθυνση μικροσκοπίου LM x 100, μεταδιδόμενου φωτός. (D) μικροσκοπική εικόνα των κονιδίων του *T. roseum*. Μεγέθυνση μικροσκοπίου LM x 1000, χορηγείας του Bud Uecker. Πηγή: McPartland & Hillig (2018), McPartland *et al.*, (2000).



Εικόνα 21: Ασθένεια πραγματικού ωιδίου από τον μύκητα *Sphaerotheca macularis* και μικροσκοπική παρακολούθησή του πάνω σε φυτικούς ιστούς κάνναβης. (A) Δείγμα προσβεβλημένου φύλλου από τον μύκητα ωιδίου *S. macularis* με κλασική «πουδραρισμένη» εμφάνιση. (B) Αλυσίδα κονιδίων του *S. macularis* που υψώνονται από την επιφάνεια ενός φυλλαρίου κλωστικής κάνναβης. Μεγένθυση μικροσκοπίου LM x 400, μεταδιδόμενου φωτός ψευδούς χρώματος. (C) Οι σχεδόν άορατες υπερκείμενες υφές του *S. macularis* σχηματίζουν μια χνουδωτή αποικία στην επιφάνεια του φύλλου με εμφανείς κονδιοφόρους να προκύπτουν από την επιφάνεια. Μεγένθυση μικροσκοπίου LM x 100, ανακλώμενου φωτός. (D) Ο μύκητας του ωιδίου *S. macularis* που απομονώθηκε από ένα φυλλάριο κλωστικής κάνναβης. Αριστερα, μια αλυσίδα από κονίδια. Δεξιά, ένα κουβάρι από επιφανειακές υφές. Μεγένθυση μικροσκοπίου LM x 400 σε lactophenol και βαμβακερή μπλε βαφή. Πηγή: McPartland *et al.*, (2000), McPartland & Hillig, (2008).

Πέραν των πιο διαδεδομένων παθογόνων μυκήτων που επιφέρουν ασθένειες στην κάνναβη, θα αναφερθούν συνοπτικά και κάποια άλλα λιγότερο εμφανιζόμενα μεν αλλά καταγεγραμμένα σε παλαιότερες ή σύγχρονες μελέτες δε. Επιπροσθέτως, ασθένειες στη κάνναβη εντοπίζονται και από παθογόνα που ανήκουν στο βασίλειο των *Chromista* κυρίως ωομύκητες. Στον **Πίνακα 6** συνοψίζονται οι ασθένειες και τα παθογόνα που έχουν καταγραφεί για την κάνναβη με την πρώτη βιβλιογραφική τους αναφορά στο φυτό, ενώ στην **Εικόνα 22** διακρίνονται και συμπτώματα προσβολής από κάποια παθογόνα του σχετικού πίνακα.

Πίνακας 6: Ασθένειες της κάνναβης που προκαλούνται από μύκητες και ωομύκητες σε παγκόσμια εξάπλωση, καταγεγραμμένα από την επιστημονική βιβλιογραφία πρώτης εμφάνισης (ή πρόσφατης) στη κάνναβη

Όνομα ασθενειών	Υπαίτιος Οργανισμός
Βασίλειο: Μύκητες	
Βοτρύτης ή («τεφρά σήψη»)	<i>Botrytis cinerea</i> (Barloy & Pelhate 1962), <i>B. infestans</i> (Trutus & Naie 2008)
Κίτρινη κηλίδωση φύλλων	<i>Septoria cannabis</i> , <i>S. neocannabina</i> (Szembel 1927)
Sore shin και σήψη ρίζας από Rhizoctonia	<i>Rhizoctonia solani</i> (McPartland & Cubeta 1997)
Έλκος στελέχους από Φουζάριο	<i>Fusarium salphureum</i> , <i>F. sambucinum</i> (Oudemans 1920), <i>F. graminearum</i> (Ceapoiu 1958), <i>F. laterittium</i> (Pietkiewicz 1958), <i>F. avenaceum</i> (Zelenay 1960), <i>F. calmorum</i> (Abiusso 1954)
Σήψη ποδός και ρίζας από Φουζάριο	<i>Fusarium solani</i> (Zelenay 1960)
Μάρανση από Φουζάριο	<i>F. oxysporum f sp vasinfectum</i> (Armstrong & Armstrong 1975), <i>F. oxysporum f sp cannabis</i> (Noviello 1962), <i>F. lichenicola</i> (Punja et al., 2021)
Ωίδιο	<i>Sphaerotheca macularis</i> (McPartland & Cubeta 1997), <i>Leveillula taurica f sp. cannabis</i> (Jaczewski 1933), <i>Golovinomyces cichacearum</i> (Pepin et al., 2018), <i>G. spaticeus</i> (Szarka et al., 2019)
Σήψη άνθρακα	<i>Macrophomica phaseolina</i> (De corato 1961)
Κηλίδωση φύλλου τύπου ελιάς	<i>Pseudocercospora cannabina</i> (Viegas 1961)
Καφέ σήψη	<i>Alternaria alternata</i> (Agostini 1927), <i>A. cheiranthi</i> (Gzebenyuk 1984), <i>A. longipes</i> (Lentz 1977)
Κηλίδωση φύλλου και στελέχους από Stemphylium	<i>Stemphylium botryosum</i> , <i>S. herbarum</i> (Gzebenyuk 1984)
Σκληρωτίνια ή νότια σήψη	<i>Sclerotium rolfsii</i> (Hector 1931)
Μαύρος περονόσπορος	<i>Shciffnerula cannabis</i> (McPartland & Hughes 1994)
"Ψευδο"-ωίδιο	<i>Trichothecium roseum</i> (Ghillini 1951)
Έλκος στελέχους από Cladosporium	<i>Cladosporium herbarum</i> (Curzi & Barabaini 1927), <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. resiane</i> (Gzebenyuk 1984), <i>C. enuissimum</i> (Nair & Ponnappa 1974)
Ανθράκωση	<i>Colletotrichum coccodes</i> (Hoffman 1958)

Πίνακας 6 (συνέχεια): Ασθένειες της κάνναβης που προκαλούνται από μύκητες και ωομύκητες σε παγκόσμια εξάπλωση, καταγεγραμμένα από την επιστημονική βιβλιογραφία πρώτης εμφάνισης (ή πρόσφατης) στη κάνναβη

Όνομα ασθενειών	Υπαίτιος Οργανισμός
Βασίλειο Μύκητες	
Σηψηρρηζίδες	<i>Fusarium brachygibbosum</i> , <i>Pythium dissotocum</i> , <i>P. myriotylum</i> , <i>P. aphanidermatum</i> (Punja et al., 2019)
Καφέ στίγμα φύλλων	<i>Phoma glomerata</i> (McPartland, 1995c), <i>Phoma nebulosa</i> (Gruyter et al., 1993), <i>Ascochyta prasaddi</i> (Shukla & Pathak 1967), <i>A. cannabina</i> (Reichardt 1925)
Μάρανση βερτσιλίου	<i>Verticillium dahliae</i> (Vassilieff 1933), <i>V. albo-atrum</i> (Tai 1979)
Μαύρο στίγμα ή μαύρη κηλίδα φύλλων και στελεχών	<i>Epicoccum nigrum</i> (Nair & Ponnappa 1974; Ondrej 1991)
Βασιδιοσήψη	<i>Athelia arachnoidea</i> (Lentz 1977), <i>A. epiphylla</i> (Endo 1931)
Σηψηρρηζία του Τέξας	<i>Phymatrichopsis omnivore</i> (Chwster 1941)
Έλκος στελέχους από <i>Ophibolus</i>	<i>Ophibolus anguillidus</i> (Preston & Dosedall 1955)
Έλκος στελέχους από <i>Phomopsis</i>	<i>Phomopsis arctii</i> (Curzi 1927)
Ασπρη κηλίδωση φύλλου	<i>Phomopsis ganjae</i> (Sohi & Nayar 1971)
Κηλίδα τύπου πιπεριού	<i>Leptosphaerulica trifolli</i> (Gutner 1933)
Σήψη ταξιανθίας	<i>Penicillium olsoni</i> , <i>P. copticola</i> (Punja et al., 2019), <i>P. citrinum</i> , <i>P. steckii</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>Cladosporium tenuissimum</i> , <i>C. spp.</i> , <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Trichothecium rosae</i> (Jerushalmi et al., 2020), <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. ochraceus</i> (McPartland et al., 1994)
Βασίλειο Chromista	
Πλάγιασμα	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>P. dissotocum</i> (Punja et al., 2019), <i>P. chrysogenum</i> (Babu et al., 1977), <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. sulphureum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. graminearum</i> (Patschk et al., 1997)
Περονόσπορος	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Smarods 1936)



Εικόνα 22: Πειράματα εμβολιασμού σύμφωνα με τις αρχές του Koch που διεξήχθησαν σε αναπτυσσόμενους οφθαλμούς της κάναβης για τον προσδιορισμό της έκτασης της ανάπτυξης της ασθένειας που προκαλείται από 8 μύκητες. (A) *Aspergillus flavus*. (B) *Aspergillus westerdijikiae*. (C) *Cladosporium tenuissimum*. (D) *Cladosporium* spp. (E) *Penicillium citrinum*. (F) *Penicillium steckii*. (G) *Fusarium equiseti*. (H) *Penicillium olsoni*. Πηγή: Jerushalmi *et al.*, 2020 και Punja *et al.*, (2019).

Επομένως για ασθένειες φυλλώματος που αναφέρονται κυρίως σε ποικιλίες παραγωγής κλωστής έχουμε αρχικά τα είδη *Septoria cannabis* και *S. neocannabina* τα οποία καταγράφηκαν ως οι αιτιατοί παράγοντες της ασθένειας της κίτρινης κηλίδωσης φύλλου (Szembel, 1927). Η διαχειμάσουσα μορφή τους είναι τα πυκνίδια όντας παρόντα σε υπολείμματα καλλιέργειας δίπλα στην επιφάνεια του εδάφους, ενώ η μόλυνση εμφανίζεται σαν μικρές λευκο-κίτρινες αλλοιώσεις στο κατώτερο τμήμα του φύλλου, οι οποίες αποξηραίνονται και πέφτουν αφήνοντας οπές στα φύλλα (Nykter, 2006). Άλλες σοβαρές ασθένειες σύμφωνα με τον McPartland (1995) είναι το καφέ στίγμα φύλλων από τα είδη του γένους *Phoma* και *Ascophyta*. Επιπλέον η καφέ σήψη που προκαλείται από τα είδη του *Stemphylium*, η ανθράκωση από τα είδη του *Colletotrichum* και το λευκό στίγμα φύλλων από τον *Phomopsis ganjae* καταγράφονται ως σημαντικές αιτίες ζημιάς στα φύλλα (McPartland 1983). Έπειτα κάποια είδη μυκήτων μπορούν να μολύνουν και τα στελέχη ιδίως του *Phoma*, *Stemphylium*, *Colletotrichum* και *Phomopsis*.

Ασθένειες ωδίου προκαλούνται από το *Leveillula taurica* f. sp. *cannabis* το οποίο αναφέρθηκε σαν υπαίτιος οργανισμός μόλυνσης κάνναβης στην Ανατολική Ευρώπη (Jaczewski, 1927) και ευδοκίμει σε εύκρατες και υποτροπικές περιοχές μολύνοντας εξωτερική καλλιέργεια κάνναβης (Transhel *et al.*, 1933) με τα συμπτώματα να είναι πανομοιότυπα του *Sphaerotheca macularis* σε πρώιμα και όψιμα στάδια προσβολής.

Ασθένειες σηψηρρηζίας προκαλούν είδη μυκήτων του *Fusarium* αλλά και ωμομύκητες (*Chromista*) του γένους *Pythium* (Punja *et al.*, 2019) με τα συμπτώματα να κάνουν για καφέπιασμα της ρίζας, αποχρωματισμό του λαιμού και ιστών εντεριώνης, αλλά και τα επιμέρους συμπτώματα από την προσβολή όπως καθυστέρηση ανάπτυξης, κιτρίνισμα φύλλων και ενίοτε θάνατο.

Στις ασθένειες σήψης ταξιανθίας περιλαμβάνονται οι *Penicillium olsoni* (Εικόνα 22H) και *P. copticola* οι οποίοι καταγράφονται από τους Punja *et al.*, (2019) για σήψη οφθαλμών, με τον δεύτερο να αναφέρεται και ως ενδόφυτο σε κλαδιά, φύλλα, κορυφαίους και πλευρικούς οφθαλμούς φυτών κάνναβης (Gautam *et al.*, 2013; Kusari *et al.*, 2013) και γενικά να θεωρείται πιο αδύναμο παθογόνο σε σχέση με το πρώτο (Punja, 2018). Ο Punja (2020) κατέγραψε μολύνσεις στις ταξιανθίες από είδη του γένους *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*). Επιπλέον οι Jerushalmi *et al.*, (2020) επισήμαναν στις σήψεις ταξιανθίας υπαίτια είδη και από διάφορα γένη. Συγκεκριμένα από το *Aspergillus* (*A. flavus* και *A. Westerdijkiae*) με συμπτώματα εμφάνισης του πρώτου ως ήπια γκριζα μούχλα με ορατά κίτρινα πυκνίδια (Εικόνα 22A) και με παρόμοια συμπτώματα του δεύτερου αλλά με πιο εμφανή μούχλα που επικάλυψε και τα σακχαρόφυλλα, ενώ τα κονίδια είχαν μια κιτρινο-ροζ επίχρωση (Εικόνα 22B). Από το *Cladosporium* τα *C. tenuissimum* και *C. spp.* προκάλεσαν μια μούχλα ήπιου λευκο-γκρίζου χρώματος που αναπτύχθηκε στην ταξιανθία (Εικόνα 22C,D). Επίσης από το γένος *Penicillium* το *P. citrinum* προκάλεσε μια ήπια λευκή μούχλα που επικάλυψε όλη τη ταξιανθία και τα σακχαρόφυλλα (Εικόνα 22E), ενώ τα συμπτώματα από τον *P. steckii* ήταν ορατά κυρίως ως ανάπτυξη μαύρων κονιδίων καθόλη τη ταξιανθία (Εικόνα 22F). Τέλος τα συμπτώματα από το είδος *Fusarium equiseti* χαρακτηρίζονται από τη μαζική ανάπτυξη λευκού χρώματος μούχλας καλύπτοντας τελείως την ταξιανθία και τα σακχαρόφυλλα (Εικόνα 22G).

Η ασθένεια του πλαγιάσματος στην κάνναβη μπορεί να προκληθεί από τα είδη ωμομυκήτων *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum* και *P. debaryanum* μαζί με τα είδη μυκήτων *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, είδη του γένους *Fusarium* όπως *F. sulphureum*, *F. avenaceum* και *F. graminearum* (Bakro *et al.*, 2018). Τα

παθογόνα του *Pythium* επιτίθενται στο φυτό είτε προφυτρωτικά είτε μεταφυτρωτικά. Στη πρώτη περίπτωση τα σπόρια αποικίζουν το σπόρο, διαχειμάζουν και περιορίζουν τον ρυθμό βλάστησης. Στη δεύτερη περίπτωση τα σπορόφυτα και τα στελέχη μολύνονται, γίνονται καφέ στη γραμμή εδάφους και μαραίνονται (Kirchner, 1966).

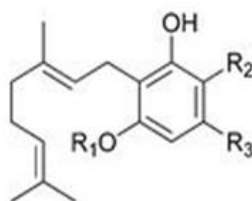
Από τα υπόλοιπα παθογόνα κάνναβης το μεγαλύτερο ιατρικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γένη *Aspergillus* και *Penicillium* ως σημαντικοί επιμολυντές γεωργικών προϊόντων (Beteriya *et al.*, 2009) όπως και αποξηραμένων βιομηχανικής και φαρμακευτικής κάνναβης (McPartland *et al.*, 2017) απ' όπου και έχουν απομονωθεί σε διάφορες μελέτες (Gautam *et al.*, 2012; Kusari *et al.*, 2013). Η αξιοσημείωτη σημασία τους οφείλεται αφενώς σε περιπτώσεις αλλεργικών αντιδράσεων κυρίως από την αναπνευστική οδό μέσω καπνίσματος φαρμακευτικής κάνναβης (και ενδεχομένως από κατανάλωση βιομηχανικής ως τρόφιμο ή ποτό) όπως βρογχοπνευμονικής ασπεργίλλωσης (Shankar *et al.*, 2004), αλλεργικών διαταραχών σε ανοσοεπαρκείς ξενιστές (Chaudhary & Marr, 2011) αλλά και αντιδράσεων υπερευαισθησίας σε διεισδυτικές λοιμώξεις ασπεργίλλωσης (Morgan *et al.*, 2005) και πνευμονίτιδας (Lal *et al.*, 2018) και αφετέρου στην παραγωγή ύποπτων καρκινογόνων και τοξικών μυκοτοξινών, (Louis, 2018) με τις σημαντικότερες να θεωρούνται οι αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, G₂, η ωχρατοξίνη A και σε λιγότερο εύρος οι fumonisins. Τα υπαίτια είδη είναι τα *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* (Perrone & Gallo, 2017) και διάφορα είδη του *Penicillium* όπως το *P. raxilli* (McPartland *et al.*, 2017). Οι προαναφερθείσες αφλατοξίνες είναι οι πιο τοξικές και καρκινογόνες μυκοτοξίνες λόγω της ακραίας ηπατοκαρκινογένεσής τους (Verma, 2004). Η ωχρατοξίνη A που παράγεται και από τον *Penicillium verucossum*, θεωρείται μια ενδεχόμενη νεφροτοξίνη και είναι επίσης καρκινογόνος, τερατογόνος και ανοσοτοξική σε αρουραίους και πιθανόν σε ανθρώπους (Walker & Larsen, 2005). Τέλος οι fumonisins είναι ηπατοτοξικές και νεφροτοξικές με ενδεχόμενες καρκινογόνες επιδράσεις σε ποντίκια, αρουραίους (Voss *et al.*, 1995) και διάφορα αγροτικά ζώα (Edrington *et al.*, 1995; Orsi *et al.*, 2009), ενώ αυξάνουν τον κίνδυνο για νευρικές διαταραχές του νωτιαίου σωλήνα και καρκίνο του ισοφάγου στον άνθρωπο (Missmer *et al.*, 2006; Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008).

1.1.3. Κυριότερα κανναβινοειδή

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί 113 φυτοκανναβινοειδή συστατικά στην κάνναβη (EISOHL & Gul 2014), (Ahmet *et al.*, 2015) τα οποία αποτελούν τα βιοδραστικά στοιχεία του φυτού (Leghissa *et al.*, 2017). Οι Gaoni & Mechoulam, 1967 ήταν οι πρώτοι που όρισαν αυτά τα τερπενοφαινολικά συστατικά ως «συστατικά της ομάδας των C₂₁ που είναι τυπικά και παρόντα στην *Cannabis sativa* L., τα καρβοξυλικά οξέα τους, τα ανάλογά τους και τα προϊόντα μετασχηματισμού τους». Επί του παρόντος έχουν ομαδοποιηθεί πολλοί και διαφορετικοί τύποι κανναβινοειδών σύμφωνα με γενικές δομικές παραλλαγές και παρακάτω αναφέρονται οι 9 βασικότεροι (Hanus *et al.*, 2016).

Η δομή στα κανναβινοειδή τύπου **cannabigerol** οφείλεται στην παρουσία ενός γραμμικού υπολείμματος ισοπρενυλίου και δομικά διασαφηνίστηκε το 1964 από τους Gaoni και Mechoulam. Επί του παρόντος έχουν ταυτοποιηθεί έξι τύποι CBG που ποικίλουν με βάση το μήκος της ανθρακικής πλευράς της αλυσίδας (EISOHL & Slade, 2005) και διακρίνονται στον Πίνακα 7. Είναι τα Cannabigerolic acid (CBGA) (Mechoulam & Gaoni., 1965), Cannabigerolic acid methylether (Soyama *et al.*, 1970), Cannabigerol (CBG), O-Methylcannabigerol (Yamauchi *et al.*, 1968), Cannabigerovarinic acid (CBGVA) (Shoyama *et al.*, 1977) και Cannabigerovarin (CBGV) (Shoyama *et al.*, 1975). Συγκεκριμένα το 1964 οι Gaoni and Mechoulam απομόνωσαν την CBG όταν χρωματογράφησαν ένα εκχύλισμα εξανίου σε florasil. Οι συγγραφείς επιβεβαίωσαν τη δομή και τη στερεοχημεία της CBG με φυσικά δεδομένα και με σύνθεση. Στην φύση παρατηρήθηκε να σχηματίζεται από συμπύκνωση της geranyl pyrophosphate με olivetol.

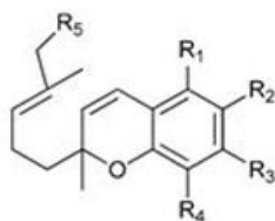
Πίνακας 7: Κανναβινοειδή τύπου CBG και η χημική δομή τους



	R ₁	R ₂	R ₃
Cannabigerovarin (CBGV)	H	H	C ₃ H ₇
Cannabigerovarinic acid (CBGVA)	H	COOH	C ₃ H ₇
Cannabigerol (CBG)	H	H	C ₅ H ₁₁
Cannabigerolic acid (CBGA)	H	COOH	C ₅ H ₁₁
O-Methylcannabigerol	Me	H	C ₅ H ₁₁
Cannabigerolic acid methylether	Me	COOH	C ₅ H ₁₁

Στα κανναβινοειδή τύπου **Cannabinochromene** το υπόλειμμα πρενυλίου ενώνεται οξειδωτικά στον δακτύλιο του resorcinyl (Hanus *et al.*, 2016). Τα κυριότερα κανναβινοειδή αυτού του τύπου (Πίνακας 8) είναι τα Cannabiorcichromene (Iwata & Kitanaka, 2012), Cannabiorcichromenic acid (Iwata & Kitanaka, 2012), cannabiorcichromenic acid (CBCA) (Shoymaetal, 1968), Chlorcannabiorcichromenic acid (Quaghebeur *et al.*, 1994), (Gaoni & Mechoulam, 1966), cannabiorchomevarinic acid (Shoyama *et al.*, 1977), 4-Acetoxycannabiorchome (Radwan *et al.*, 2009), Anthopogochromenic acid (Iwata & Kitanaka, 2012), Confluetin (Iwata & Kitanaka, 2012), Daurichromenic acid (Iwata & Kitanaka, 2012) και cannabiorvarinchromene (CBCV) (Shoyama *et al.*, 1975). Το CBC αποκτήθηκε από τους Claussen *et al.*, 1966 ως σύμπλοκο με dimethylformamide, ενώ από τους Gaoni & Mechoulam 1966 ως εκχύλισμα εξανίου του χασισιού μέσω χρωματογραφίας στήλης Florisil και οι συγκρίσεις των φυσικών δεδομένων έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ωστόσο παρόλο που υπήρξε διαφωνία των δύο ομάδων στα δεδομένα των θραυσμάτων μάζας που παρέλαβαν, συμφώνησαν στο όνομα του νέου κανναβινοειδούς.

Πίνακας 8: Κανναβινοειδή τύπου CBC και η χημική δομή τους



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Cannabiorcichromene	OH	H	CH ₃	H	H
Cannabiorcichromenic acid	OH	COOH	CH ₃	H	H
Chlorcannabiorcichromenic acid	OH	COOH	CH ₃	Cl	H
Cannabiorvarinchromene (CBCV)	OH	H	C ₃ H ₇	H	H
Cannabiorchomevarinic acid	OH	COOH	C ₃ H ₇	H	H
Cannabiorchome (CBC)	OH	H	C ₅ H ₁₁	H	H
Cannabiorchomeenic acid	OH	COOH	C ₅ H ₁₁	H	H
4-Acetoxycannabiorchome	OH	H	C ₅ H ₁₁	OAc	H
Anthopogochromenic acid	H	OH	COOH	Me	H
Confluetin	OH	H	CH ₃	H	Prenyl
Daurichromenic acid	OH	COOH	CH ₃	H	Prenyl

Τα κυριότερα κανναβινοειδή τύπου **Cannabidiol** (Πίνακας 9) είναι τα Cannabidiolic acid (CBDA), (Krejci & Santavy, 1955), (Krejci *et al.*, 1958), cannabidiol (CBD) (Adams *et al.*, 1940), (Jacob & Todd., 1940), (Mechoulam & Shvo, 1963), (Santavy, 1964), Cannabidiocol (Vree *et al.*, 1972), cannabidivarinic acid, (CBDVA) (Shoyama *et al.*, 1977), cannabidivarin (CBDV) (Vollner *et al.*, 1969), (Fetterman *et al.*, 1972), nor-Cannabidiol (Harvey, 1976), O-Methylcannabidiol (Shoyama *et al.*, 1972), O-propylcannabidiol (Hendricks *et al.*, 1978), O-pentylcannabidiol (Hendricks *et al.*, 1978) και CBDA-THC ester (Von Spulak *et al.*, 1968). Η CBD ήταν το πρώτο γνήσιο κανναβινοειδές που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Adams *et al.*, (1940) όπου άγρια κάνναβη από την Μινεσότα εκχυλίστηκε με αιθανόλη και το κόκκινο έλαιο που αποκτήθηκε, μελετήθηκε λεπτομερώς. Το καθαρό συστατικό που βρέθηκε είχε τον χημικό τύπο $C_{21}H_{32}O_2$ και του δόθηκε το συγκεκριμένο όνομα. Αργότερα το ίδιο έτος Jacob και Todd απομόνωσαν την CBD από χασίσι Αιγυπτιακής προέλευσης εκχυλίζοντας τις «σκληρές επίπεδες πλάκες χακί χρώματος» με ελαφρύ πετρέλαιο. Το εκχύλισμα αποστάχτηκε και η ρητίνη μέσω p-nitrobenzoylate διαχωρίστηκε σε δύο κλάσματα σύμφωνα με την διαλυτότητα του πετρελαϊκού αιθέρα. Η υδρόλυση ενός ακάθαρτου εστέρα χαμηλής τήξης και μια διαδοχική ακυλίωση με 3,5-dinitrobenzoyl chloride παρείχε ένα προϊόν παρόμοιο με αυτό των Adams *et al.* (1940). Οι τελευταίοι κρυσταλλοποίησαν την CBD επιτρέποντας στην ελαιώδη CBD να σταθεί για μερικές βδομάδες. Το 1963 οι Mechoulam και Shvo, καθόρισαν την χημική δομή της CBD όπως είναι γνωστή σήμερα και οι στερεοχημικές αναθέσεις έγιναν με βάση τα δεδομένα NMR.

Πίνακας 9: Κανναβινοειδή τύπου CBD και η χημική δομή τους



	R ₁	R ₂	R ₃
Cannabidiocol	H	H	CH ₃
Cannabidivarin	H	H	C ₃ H ₇
Cannabidivarinic acid	H	COOH	C ₃ H ₇
nor-Cannabidiol	H	H	C ₄ H ₉
Cannabidiol (CBD)	H	H	C ₅ H ₁₁
O-Methylcannabidiol	CH ₃	H	C ₅ H ₁₁
O-Propylcannabidiol	C ₃ H ₇	H	C ₅ H ₁₁
O-Pentylcannabidiol	C ₅ H ₁₁	H	C ₅ H ₁₁
Cannabidiolic acid	H	COOH	C ₅ H ₁₁
CBDA-THC ester	H	COOA	C ₅ H ₁₁

Τα κυριότερα κανναβιδοειδή τύπου **(-)- Δ^9 -Trans-Tetrahydrocannabinol** (Πίνακας 10) είναι τα Δ^9 -Trans-tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THC acid A) (Korte *et al.*, 1965), (Yamauchi *et al.*, 1967), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinolic acid B (Δ^9 -THC acid B) (Mechoulam *et al.*, 1969), (Mole *et al.*, 1974), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964), Δ^9 -trans-nor-tetrahydrocannabinolic acid (Harvey, 1976), Δ^9 -trans-nor-tetrahydrocannabinol (Smith, 1976), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabivarinic acid (Δ^9 -THCVA) (Turner *et al.*, 1973), (Shoyama *et al.*, 1973), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) (Gill, 1971), (Mole & Turner, 1974), 8 α -Hydroxy- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2010), 8 β -Hydroxy- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2010), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabiorcol (Vree *et al.*, 1972), Δ^9 -trans-tetrahydrocannabiorcolic acid (Harvey, 1976), 8-Oxo- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2008), 2-Formyl- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2008), O-propyl- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Hendrics *et al.*, 1978) και O-pentyl- Δ^9 -trans-tetrahydrocannabinol (Hendrics *et al.*, 1978). Το Δ^9 -THC acid A εκχυλίστηκε πρώτη φορά από τους Korte *et al.*, 1965 σε πετρελαϊκό αιθέρα από κονιοποιημένο και ομογενοποιημένο φυτικό έλαιο και απομονώθηκε ως σύμπλοκο με dimethylformamide. Η ομάδα του Nishioka, (1967) απομόνωσε επίσης το ίδιο καθαρό οξύ από Μεξικάνικη βιομηχανική κάνναβη που καλλιεργήθηκε στην Ιαπωνία. Το οξύ αποκτήθηκε ως το κυριότερο συστατικό με την βοήθεια χρωματογραφίας σε σκόνη κυπαρίνης εμποτισμένη με dimethylformamide και με εξάνιο ως διαλύτη έκλουσης, ακολουθούμενη από προπαρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής σήλης με n-hexane-ethylacetate.

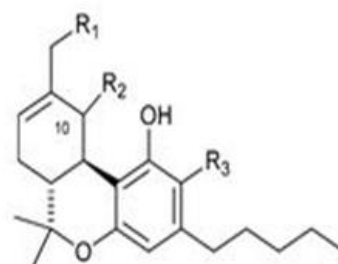
Πίνακας 10: Κανναβιδοειδή τύπου Δ⁹-THC και η χημική δομή τους

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabiorcol	H,H	H	H	CH ₃	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabiorcolic acid	H,H	H	COOH	CH ₃	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabivarin (THCV)	H,H	H	H	C ₃ H ₇	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabivarinic acid	H,H	H	COOH	C ₃ H ₇	H
Δ ⁹ - <i>trans-nor</i> -Tetrahydrocannabinol	H,H	H	H	C ₄ H ₉	H
Δ ⁹ - <i>trans-nor</i> -Tetrahydrocannabinolic acid	H,H	H	COOH	C ₄ H ₉	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabinol (Δ ⁹ -THC)	H,H	H	H	C ₅ H ₁₁	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabinolic acid A	H,H	H	COOH	C ₅ H ₁₁	H
Δ ⁹ - <i>trans</i> -Tetrahydrocannabinolic acid B	H,H	H	H	C ₅ H ₁₁	CO
8α-Hydroxy-Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	α-OH,H	H	H	C ₅ H ₁₁	H
8β-Hydroxy-Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	β-OH,H	H	H	C ₅ H ₁₁	H
8-Oxo- Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	=O	H	H	C ₅ H ₁₁	H
<i>O</i> -Propyl- Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	H,H	C ₃ H ₇	H	C ₅ H ₁₁	H
<i>O</i> -Pentyl- Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	H,H	C ₅ H ₁₁	H	C ₅ H ₁₁	H
2-Formyl- Δ ⁹ - <i>trans</i> -tetrahydrocannabinol	H,H	H	CHO	C ₅ H ₁₁	H

Τα κανναβιδοειδή τύπου τύπου (-)-Δ⁸-**Trans-Tetrahydrocannabinol** μπορεί να είναι παραπροϊόντα απομόνωσης που προέκυψαν από Δ⁹-THC acid ή από οξειδωτικά προωθημένη μετατόπιση του ενδοκυκλικού διπλού δεσμού ή από την CBD με ηλεκρόφιλη κυκλοποίηση (Hanus *et al.*, 2016). Τα κυριότερα κανναβιδοειδή αυτού του τύπου (Πίνακας 11) είναι τα *trans*-Δ⁸-Tetrahydrocannabinolic acid (Δ⁸-THCA) (Hanus & Krejci, 1975), *trans*-Δ⁸-Tetrahydrocannabinol (Δ⁸-THC) (Hively *et al.*, 1966), 10α-Hydroxy *trans*-Δ⁸-Tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2010), 10β-Hydroxy *trans*-Δ⁸-Tetrahydrocannabinol (Ross *et al.*, 2010) και 11-Acetoxy-Δ⁸-tetrahydrocannabinolic acid (Ross *et al.*, 2010). Οι Hively *et al.* (1966) ανακοίνωσαν την απομόνωση της Δ⁸-THC από ένα εκχύλισμα πετρελαϊκού αιθέρα των ανθισμένων κορυφών και φύλλων φαρμακευτικής κάνναβης που καλλιεργήθηκε στο Maryland. Η χρωματογραφία σε πυριτικό οξύ με βενζένιο, ακολουθούμενη από χρωματογραφία σε πυριτικό gel νιτρικού αργύρου με βενζένιο, παρήγαγε το συγκεκριμένο κανναβιδοειδές. Η υγρή και αέρια χρωματογραφία σχεδόν πάντα έδειχναν το Δ⁸-THC, ωστόσο η κορυφή που κανονικά αναφέρονταν ως ελεύθερη ή πυριτωμένη Δ⁸-THC έχει ταυτοποιηθεί ως Cannabispiran (Ottersen *et al.*, 1976). Γενικά η Δ⁸-THC θεωρείται ένα παραπροϊόν (Turner *et al.*, 1973). Η χημεία στην οποία η Δ⁹-THC ισομερίζεται

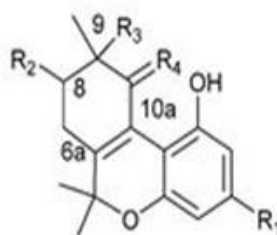
στην Δ^8 -THC έχει καταγραφεί από τους (Mechoulam, 1970; Razdan, 1973). Οι Archer *et al.*, (1970) δημοσίευσαν λεπτομερή δεδομένα από ακτινογραφία και πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό σε Δ^8 -THC.

Πίνακας 11: Καναβινοειδή τύπου Δ^8 -THC και η χημική δομή τους



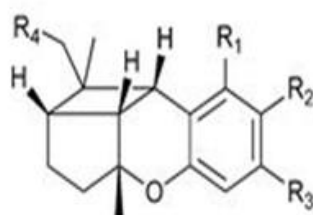
	R ₁	R ₂	R ₃
<i>trans</i> - Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)	H	H	H
<i>trans</i> - Δ^8 -Tetrahydrocannabinolic acid	H	H	COOH
10 α -Hydroxy <i>trans</i> - Δ^8 -tetrahydrocannabinol	H	α -OH	H
10 β -Hydroxy <i>trans</i> - Δ^8 -tetrahydrocannabinol	H	β -OH	H
11-Acetoxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinolic acid	OAc	H	COOH

Τα κανναβινοειδή τύπου **Cannabitriol** χαρακτηρίζονται από την σύζευξη του διπλού δεσμού στο μισό τμήμα του terpenyl και του υπολείμματος resorcinyl και υποθετικά είναι ενδιάμεσα προϊόντα στην οξειδωτική αρωματοποίηση της Δ^9 -THC, μιας διαδικασίας που ενεργοποιείται από την δημιουργία ρίζας C-10a (Hanus *et al.*, 2016). Τα κυριότερα κανναβιδοειδή αυτού του τύπου (Πίνακας 12) είναι τα Cannabitriol (CBT) (Obata & Ishikawa, 1966; Chan *et al.*, 1976), Isocannabitriol (Elsohly *et al.*, 1978), Ισομερές της CBT (Elsohly *et al.*, 1977), (Elsohly *et al.*, 1978), Bis-nor-cannabitriol (Harvey, 1996), Ισομερές της Bis-nor-cannabitriol (Harvey, 1996), 10-O-ethyl bis-nor cannabitriol (Harvey, 1996) και το Ισομερές της 10-O-ethyl cannabitriol (Elsohly *et al.*, 1977).

Πίνακας 12: κανναβινοειδή τύπου CBT και η χημική δομή τους

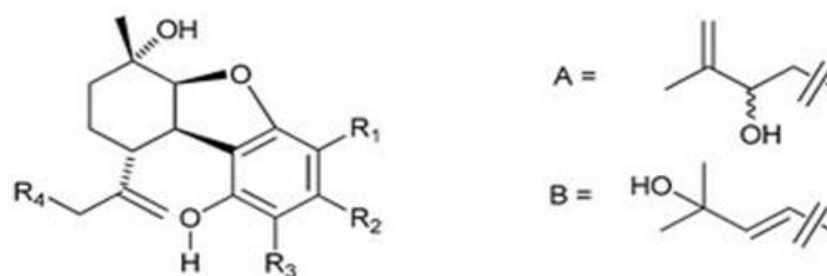
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Bis- <i>nor</i> cannabitrinol	C ₃ H ₇	H	α-OH	β-OH,α-H
Bis- <i>nor</i> -Cannabitrinol isomer	C ₃ H ₇	H	OH	OH, H
10- <i>O</i> -Ethyl bis- <i>nor</i> cannabitrinol	C ₃ H ₇	H	α-OH	β-OH,α-H
Isocannabitrinol	C ₅ H ₁₁	OH	OH	H,H
Cannabitrinol	C ₅ H ₁₁	H	α-OH	β-OH,α-H
Cannabitrinol isomer	C ₅ H ₁₁	H	OH	OH
10- <i>O</i> -Ethyl cannabitrinol isomer	C ₅ H ₁₁	H	OH	OEt

Τα κανναβινοειδή τύπου **Cannabicyclol** (Πίνακας 13) είναι τα Cannabicyclic acid (CBLA) (Sohyama *et al.*, 1972), Cannabicyclol (CBL) (Korte & Sieper, 1964), (Korte *et al.*, 1965), (Claussen *et al.*, 1968), (Crombie & Ponsford, 1968), Cannabicyclovarin (CBLV) (Vree *et al.*, 1972), Cannabiorcicyclol (Iwata & Kitanaka, 2011), Cannabiorcicyclic acid (Iwata & Kitanaka, 2011), Anthopogocyclic acid (Iwata & Kitanaka, 2011) και Rhododaurichromanolic acid A (Kashiwada *et al.*, 2011). Η CBL απομονώθηκε και ανιχνεύτηκε πρώτη φορά από τους Korte και Sieper το 1964, όπου η χρωματογραφία λεπτής στήλης σε διάφορα δείγματα χασισιού και κάνναβης έδειξε αρχικά το προϊόν «THC- III», ωστόσο οι Mechoulam και Gaoni (1967) ισχυρίστηκαν ότι η συγκεκριμένη δομή δεν έχει καθιερωθεί βασισμένη σε φασματικά δεδομένα και με την δική τους έρευνα σε ακτίνες-Χ επί του διβρωμοπαραγώγου απέκτησαν το μόριο από την ακτινοβόλησή του μέσω της ενδομοριακής στερεοεπιλεκτικής [2+2] κυκλοπροσθήκης. Ως εκ τούτου πρότειναν την ονομασία cannabicyclol. Αυτή η παρατήρηση για την ρακεμική φύση αυτών των κανναβινοειδών και η αυστηρή σχέση μεταξύ της συγκέντρωσής τους στο φυτικό υλικό κι εκείνης των αντίστοιχων cannabichromes υποδηλώνει έντονα ότι, είναι παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την αποθήκευση του φυτικού υλικού υπό την παρουσία του φωτός.

Πίνακας 13: Καναβινοειδή τύπου CBL και η χημική δομή τους

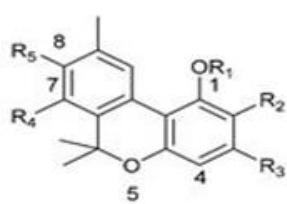
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cannabiorcicyclol	OH	H	CH ₃	H
Cannabiorcicyclolic acid	OH	COOH	CH ₃	H
Cannabicyclovarin	OH	H	C ₃ H ₇	H
Cannabicyclol (CBL)	OH	H	C ₅ H ₁₁	H
Cannabicyclolic acid	OH	COOH	C ₅ H ₁₁	H
Anthopogocyclolic acid	CH ₃	COOH	OH	H
Rhododaurichromanic acid A	OH	COOH	CH ₃	Prenyl

Τα κανναβινοειδή τύπου **Cannabielsoin** (Πίνακας 14) ονομάστηκαν από την Elsa Boyanova η οποία απομόνωσε τα πρώτα μέλη αυτής της ομάδας του Mechoulam αλλά απεβίωσε πρόωρα πριν την δημοσίευση (Shani & Mechoulam, 1970). Αυτά τα συστατικά ήταν το αποτέλεσμα του τυπικού ενδομοριακού ανοίγματος των εποξειδίων τύπου CBD, όπως είναι εμφανές από την *trans*-συσχέτιση των λειτουργιών του οξυγόνου στο μισό τμήμα της *menthyl*. Η διαδικασία έχει μιμηθεί με εποξείδωση του διοξειδίου της CBD. Επομένως η υδρόλυση του οξικού άλατος πυροδότησε το άνοιγμα του δακτυλίου του οξιρανίου με ένα από τα δύο φαινολικά ορθο-υδροξύλια, παρέχοντας μία ένωση πανομοιότυπη με αυτή που αποκτήθηκε με την αποκαρβοξυλίωση του *cannabielsoic acid*. Τα κανναβινοειδή αυτού του τύπου είναι τα *Cannabielsoin* (CBE) (Yamamoto *et al.*, 1992), *Cannabielsoic acid A*, (Shani & Mechoulam, 1970), (Shani & Mechoulam, 1974) *Cannabielsoic acid B* (Shani & Mechoulam, 1970), (Shani & Mechoulam, 1974), *Bis-nor-cannabielsoin* (Bercht *et al.*, 1973), *Bis-nor-Cannabielsoic acid B* (Bercht *et al.*, 1973), *Ferruginene A* (Seephonkai *et al.*, 2011) και *Ferruginene B* (Seephonkai *et al.*, 2011).

Πίνακας 14: Καναβινοειδή τύπου Cannabielsoin (CBE) και η χημική δομή τους

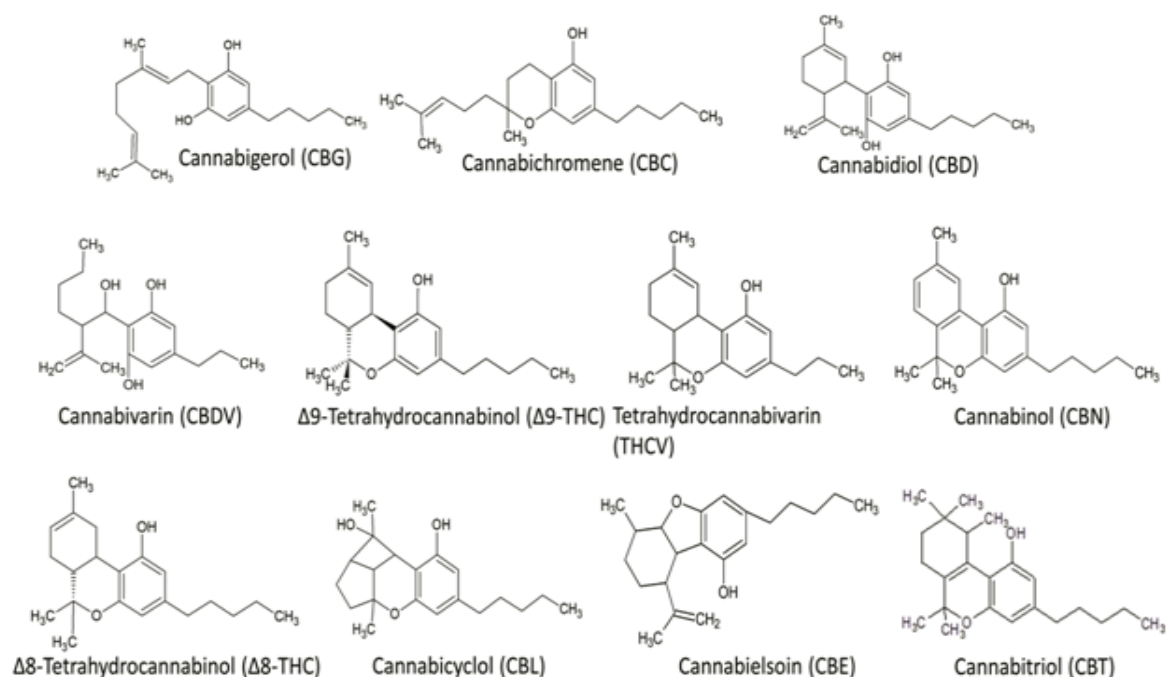
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Bisnor-cannabielsoin	H	C ₃ H ₇	H	H
Bis-nor-Cannabielsoic acid B	COOH	C ₃ H ₇	H	H
Cannabielsoin	H	C ₅ H ₁₁	H	H
Cannabielsoic acid A	H	C ₅ H ₁₁	COOH	H
Cannabielsoic acid B	COOH	C ₅ H ₁₁	H	H
Ferruginene A	H	CH ₃	H	A
Ferruginene B	H	CH ₃	H	B

Τα κανναβινοειδή τύπου **Cannabinol** (Πίνακας 15) θεωρούνται τα παραπροϊόντα απομόνωσης που προήλθαν από την οξειδωτική αρωματοποίηση των αντίστοιχων παραγώγων τύπου THC, και η απομόνωση των μερικώς αρωματισμένων παραγώγων του mentadienic όπως η (7,8-dihydrocannabinol) υποστηρίζει αυτή την άποψη (Adams *et al.*, 1940). Τα σημαντικότερα από τα συγκεκριμένα κανναβινοειδή είναι τα Cannabinol (CBN) (Adams *et al.*, 1940), (Wood *et al.*, 1896), Cannabinolic acid (CBNA) (Mechoulam & Gaoni, 1968), nor-Cannabinol (Harvey, 1976), (Smith, 1997), O-Methylcannabinol (Grote & Spiteler, 1978), O-Propylcannabinol (Hendriks *et al.*, 1978), 7-Hydroxycannabinol (Hendriks *et al.*, 1978), 8-Hydroxycannabinol (Radwan *et al.*, 2009), 8-Hydroxycannabinolic acid (Radwan *et al.*, 2009), ενώ τα Cannabiorcol, nor-Cannabivarin και Cannabivarin που αναφέρθηκαν ήδη, εντάσσονται επίσης και στα κανναβινοειδή τύπου Cannabidiol. Η CBN ήταν το πρώτο φυτοκανναβινοειδές που απομονώθηκε από την κάνναβη από ένα κλάσμα υψηλού σημείου ζέσεως ενός εκχυλίσματος αιθέριου ελαίου Ινδικού δείγματος κάνναβης (Wood *et al.*, 1896).

Πίνακας 15: Καναβινοειδή τύπου CBN και η χημική δομή τους


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Cannabiorcol	H	H	CH ₃	H	H
nor-Cannabivarin	H	H	C ₂ H ₅	H	H
Cannabivarin	H	H	C ₃ H ₇	H	H
nor-Cannabinol	H	H	C ₄ H ₉	H	H
Cannabinol	H	H	C ₅ H ₁₁	H	H
Cannabinolic acid	H	COOH	C ₅ H ₁₁	H	H
<i>O</i> -Methylcannabinol	CH ₃	H	C ₅ H ₁₁	H	H
<i>O</i> -Propylcannabinol	C ₃ H ₇	H	C ₅ H ₁₁	H	H
<i>O</i> -Pentylcannabinol	C ₅ H ₁₁	H	C ₅ H ₁₁	H	H
7-Hydroxycannabinol	H	H	C ₅ H ₁₁	OH	H
8-Hydroxycannabinol	H	H	C ₅ H ₁₁	H	OH
8-Hydroxycannabinolic acid	H	COOH	C ₅ H ₁₁	H	OH

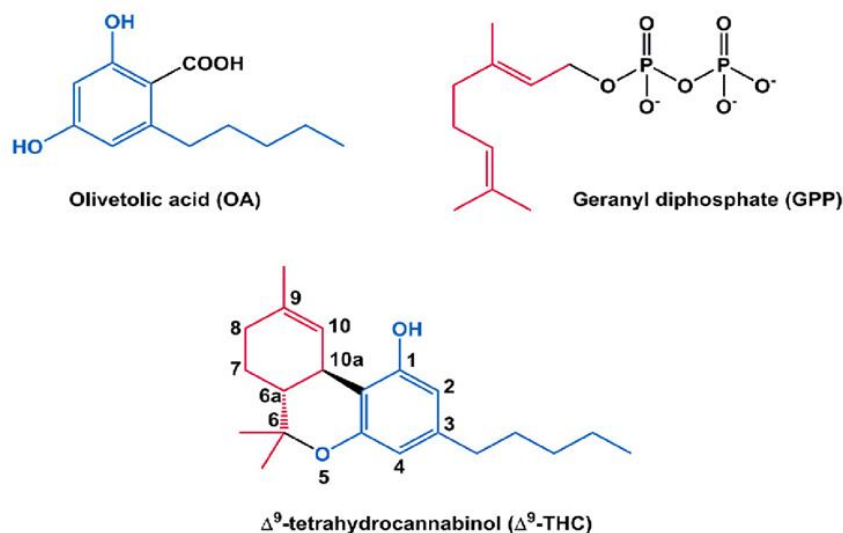
Συνοψίζοντας, στην **Εικόνα 23** απεικονίζονται οι στερεοχημικές δομές των αναφερθέντων βασικών τύπων κανναβινοειδών, μαζί με άλλα δύο που εμπεριέχονται πάντα σε ικανοποιητικό ποσοστό στην κάνναβη.

**Εικόνα 23:** Στερεοχημικές δομές των βασικών τύπων ομαδοποίησης κανναβινοειδών και των κανναβινοειδών Tetrahydrocannabivarin (THCV) και Cannabivarin (CBDV)

1.1.4 Βιοσύνθεση των κανναβινοειδών

Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των κανναβινοειδών έχουν μελετηθεί από διάφορες ομάδες. Για πολλά χρόνια υπέθεταν ότι το ενδιάμεσο κλειδί ήταν η CBD ή το CBDA τα οποία κατέληγαν από την συμπύκνωση ενός μονοτερπενίου και της ολιβετόλης ή ολιβετολικού οξέος (OA) αντίστοιχα. Το 1964 οι Gaoni & Mechoulam υπέθεσαν ότι η CBG ήταν το ενδιάμεσο κλειδί ως το προϊόν συμπύκνωσης από το geranyl diphosphate (GPP) και ολιβετόλης ή OA. Βασισμένοι σε αυτό κατέληξαν ότι τα κανναβινοειδή CBD, THC και CBN παράγονται όλα από την CBG και απλά διαφέρουν στον τρόπο της κυκλοποίησης. Εν τέλει η ενσωμάτωση μελετών με ¹³C-επισημασμένη γλυκόζη έδειξε ότι το GPP και OA είναι πράγματι οι πρόδρομοι για τον σχηματισμό του CBGA. Ως εκ τούτου η γενική δομή των κανναβινοειδών συναρμολογείται από δύο μέρη : 1) μια διφαινόλη (resorcin) κουβαλώντας μια αλκυλική αλυσίδα (από το OA) και 2) τη μονοτερπενιακή μονάδα (από το GPP) (Εικόνα 24). Συνεπώς οι Fellemeier *et al.*, (2001) θεώρησαν το CBGA ως το κεντρικό πρόδρομο κανναβιδοειδές, παρόλο που το ελεύθερο OA δεν ανιχνεύτηκε ποτέ σε φυτικό υλικό της κάνναβης μέχρι πρόσφατα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί πάρα πολλά κανναβινοειδή, μόνο τρία ένζυμα εκτός της συνθάσης του CBGA (CBGAS) εμπλέκονται στην βιοσύνθεση των κανναβιδοειδών και αυτά είναι η συνθάση του THCA (THCAS), η συνθάση του CBDA (CBDAS) και η συνθάση του CBCA (CBCAS) (Degenhardt *et al.*, 2017). Τα επακόλουθα όξινα κανναβινοειδή είναι τα πιο άφθονα που συσσωρεύονται στην κάνναβη. Οι ουδέτερες και οι ψυχοενεργές μορφές είναι τα αποτελέσματα της μη ενζυμικής αποκαρβοξυλοποίησης κατά την αποθήκευση, θέρμανση ή έκθεση σε ηλιακό φως εξηγώντας έτσι την θέρμανση του φυτικού υλικού (για κάπνισμα ή ψήσιμο) κατά την κατανάλωση της κάνναβης (Taura *et al.*, 2007a), (Fischedick *et al.*, 2010). Επομένως η ευρεία ποικιλομορφία των διαφορετικών κανναβινοειδών υφίσταται κυρίως στην μη ενζυμική μεταμόρφωση ή αποσύνθεση των όξινων και ουδέτερων κανναβινοειδών ταυτόχρονα από τις επιδράσεις του φωτός (ακτινοβολίας UV) και αυτο-οξειδωσης (Razdan *et al.*, 1972; Crombie *et al.*, 1978).



Εικόνα 24: Γενική δομή των καναβινοειδών και των πρόδρομών τους olivetolic acid και Geranyl diphosphate. Τα καναβινοειδή συντίθενται από δύο μέρη: από ένα κυκλικό μονοτερπενοειδές (κόκκινο χρώμα) και από μια διφαινόλη (*resorcin*) που κουβαλάει μια αλκυλική αλυσίδα (μπλε χρώμα). Χρησιμοποιείται το σύστημα αρίθμησης dibenzopyran. Πηγή: Degenhardt *et al.*, (2017).

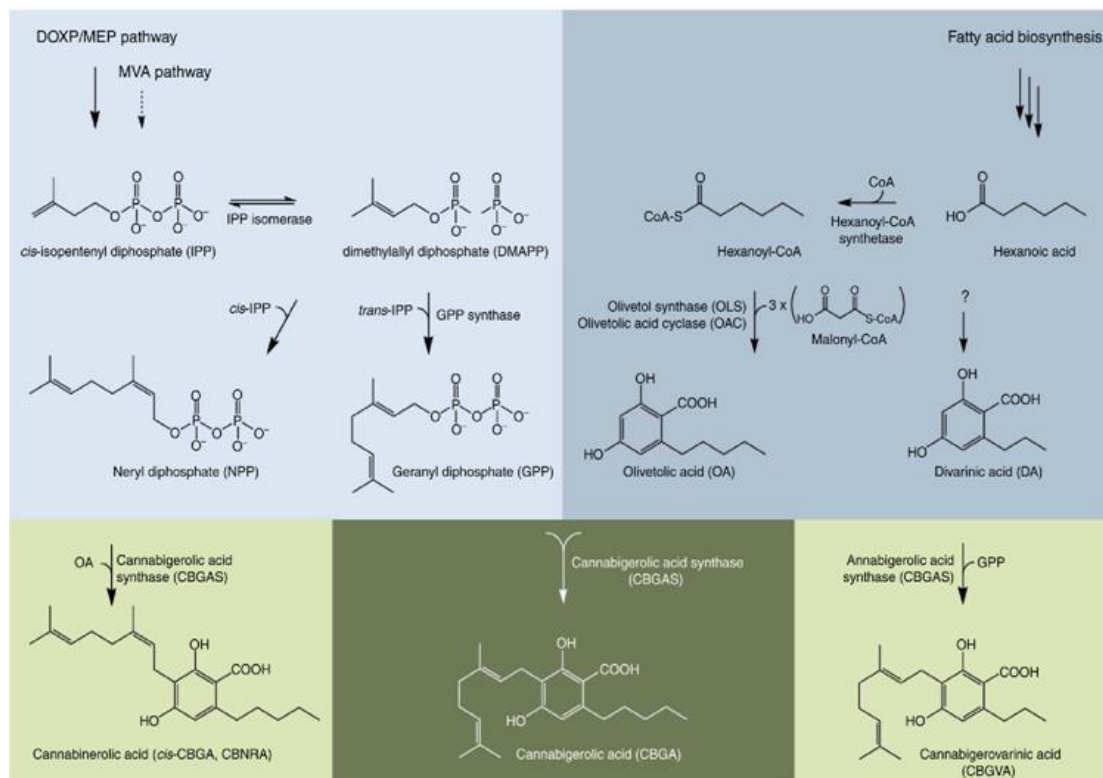
Σχετικά με την βιοσύνθεση του CBGA, η CBGAS ή η olivetolate geranyltransferase (*GOT*) καταλύουν κατά κύριο λόγο την C-πρενυλίωση του OA από το GPP για να σχηματίσει CBGA (**Εικόνα 25**). Το CBGA θεωρείται ο κεντρικός πρόδρομος για την βιοσύνθεση, μιας και η διαφορετική κυκλοποίηση του μισού μονοτερπενικού τμήματος οδηγεί στο THCA ή στα ισομερή CBCA και CBDA (Page & Boubakir, 2012), (Sirikantaramas *et al.*, 2007).

Οι Fellermeier & Zenk (1998) ανίχνευσαν το ένζυμο σε ακατέργαστα ομογενοποιημένα ταχέως αναπτυσσόμενα νεαρά φύλλα *C. sativa*. Αυτό το μέρος του φυτού περιέχει τα εκ των υστέρων ένζυμα του βιοσυνθετικού μονοπατιού του THCA (Morimoto *et al.*, 1997), (Taura *et al.*, 1995a). Αυτές οι ενδείξεις απέδειξαν ότι η CBGAS όπως και άλλες πρενυλο-τρανσφεράσες είναι μια μεμβρανο-δεσμευμένη πρενυλοτρανσφεράση (Yamamoto *et al.*, 1997). Ωστόσο παρόλο που οι Fellermeier & Zenk (1998) δεν ανίχνευσαν καμία ενζυμική δραστηριότητα στα συγκεκριμένα κλάσματα, αλλά στο διαλυτό κλάσμα του ακατέργαστου εκχυλίσματος, μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν δύο κύρια συστατικά μέσω μετρήσεων φασματομετρίας μάζας: το CBGA και το ισομερές του Cannabinolic acid (*CBNRA*). Η ενζυμική δραστηριότητα βρέθηκε να είναι Mg²⁺ εξαρτώμενη. Η CBGAS φαίνεται να είναι συγκεκριμένη για το OA ως δέκτης πρενυλίου, αλλά δέχεται επίσης και διαφορετικούς δότες πρενυλίου όπως το GPP, και σε μικρότερο βαθμό το neryl diphosphate (*NPP*) (**Εικόνα 25**) (Degenhardt *et al.*, 2017). Η αναλογία των αλλαγών CBGA/*CBNRA* αλλάζει από 2:1 σε 1:1 όταν το *NPP* χρησιμοποιείται σαν δότης πρενυλίου αντί του GPP.

Ωστόσο η αρωματική πρενυλοτρανσφεράση CBGAS φαίνεται να είναι ένα διαλυτό ένζυμο, αλλά οι Fellermeier & Zenk (1998) δεν μπόρεσαν να αποκλείσουν εξολοκλήρου μια μεμβρανο-δεσμευμένη δραστηριότητα. Παρόλα αυτά αυτές είναι οι μοναδικές δύο περιγραφές των διαλυτών φυτικών C-πρενυλοποιητικών ενζύμων, καθώς μέχρι σήμερα δεν ήταν δυνατό να αποκτηθεί η πληροφορία της αλληλουχίας ή

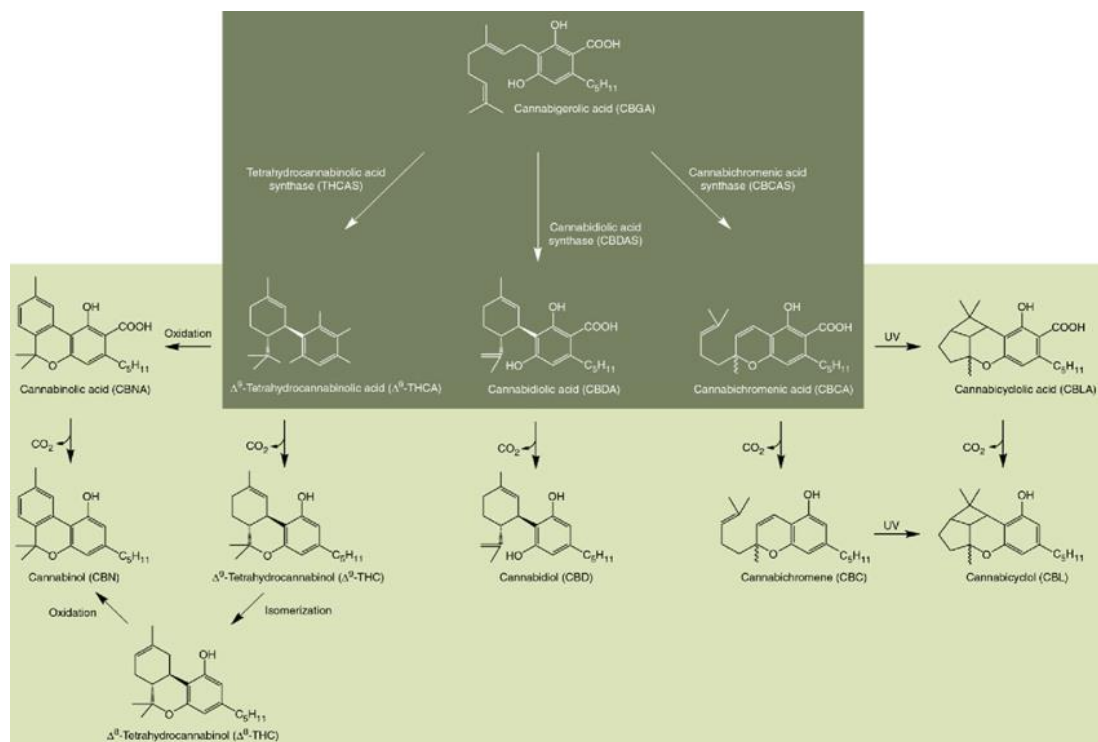
να απομονωθούν τα ανταποκρινόμενα γονίδια ή ένζυμα. Αντιφατικά όλες οι γνωστές αλληλουχίες των αρωματικών πρενυλοτρανσφερασών ανήκουν σε μεμβρανοδεσμευμένα ένζυμα (Yamamoto *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003). Οι συγκεκριμένες μελέτες συμφώνησαν με μια δεύτερη αναφορά που ασχολήθηκε με την CBGAS (Page & Boubakir, 2012) κατά την οποία οι συγγραφείς δημοσίευσαν μια αλληλουχία από CBGAS που εκφράστηκε κυρίως σε αδενικά τριχώματα των θηλυκών ανθέων και νεαρών φύλλων σε φυτά κάνναβης. Το γονίδιο κωδικοποιεί μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 395 αμινοξέων δείχνοντας μεμβρανοδεσμευμένο τύπο πρενυλοτρανσφερασών. Εν τέλει κατάφεραν να εκφράσουν τόσο την ανασυνδυασμένη CBGAS σε έντομο sf9, όσο και σε κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και επιβεβαίωσαν την δραστικότητα της CBGAS σε μικροσωματικά κλάσματα. Με την χρήση μετρήσεων MS το CBGA (το 3-geranyl olivetolate σε σύγκριση με το πρότυπο ανάλυσης CBGA) ταυτοποιήθηκε ως το κύριο προϊόν και το 5-geranyl olivetolate (μέσω LC-MS) ως το παραπροϊόν. Επιπλέον οι ίδιοι μελετητές έδειξαν ότι η CBGAS είναι εξειδικευμένη μόνο στο GPP ως δότης πρενυλίου και ότι εγκρίνει το OA, την olivetol, την phlorisovalerophenone, την naringenin και τη resveratol ως δέκτες πρενυλίου. Επιπροσθέτως η ενζυμική αντίδραση εξαρτάται από δισθενή καπνόντα, όπου η υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα αποκομίστηκε με την χρήση Mg^{2+} (Page & Boubakir, 2012).

Όπως περιγράφουν οι (Degenhardt *et al.*, 2017) το βιοσυνθετικό μονοπάτι των κανναβινοειδών σχετίζεται άμεσα με το CBGA που είναι το κεντρικό πρόδρομο μόριο για την βιοσύνθεσή τους (Εικόνα 26) και μετατρέπεται από τις CBDAS, CBCAS και THCAS. Τα συγκεκριμένα ένζυμα χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο το CBGA ως υπόστρωμα και καταλύουν τη στερεοεπιλεκτική, οξειδωτική κυκλοποίηση της μονοτερπενικής μονάδας του CBGA σε CBDA, CBCA ή THCA αντίστοιχα (Degenhardt *et al.*, 2017). Οι αντιδράσεις των THCAS και CBDAS είναι οξυγονο-εξαρτώμενες, παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου αναλογικά προς τα CBDA ή THCA (Sirikantaramas *et al.*, 2004), (Taura *et al.*, 2007b). Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντίδραση CBCAS είναι οξυγονο-εξαρτώμενη και μπορεί να ανασταλεί από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνεπώς το ένζυμο φαίνεται να μην είναι μια οξυγονάση ή υπεροξειδοϋδρογονάση (Morimoto *et al.*, 1998). Επιπλέον όλα τα τρία ένζυμα μετατρέπουν επίσης το CBNRA, το cis-ισομερές του CBGA, με μια χαμηλότερη εξειδίκευση (Taura *et al.*, 1995b; Taura *et al.*, 1996; Morimoto *et al.*, 1998; Shoyama *et al.*, 2012), (Sirikantaramas *et al.*, 2012). Εφόσον δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ενζυμική δραστηριότητα με την χρήση του ουδέτερου κανναβινοειδούς CBG, η καρβοξυλομάδα στο CGBA φαίνεται να είναι απαραίτητη για τις ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύονται από τις CBGAS, CBCAS και THCAS (Taura *et al.*, 1995; Taura *et al.*, 1996; Morimoto *et al.*, 1997). Εξάλλου υποτέθηκε ότι το THCA βιοσυντίθεται και αποθηκεύεται στην κοιλότητα αποθήκευσης των αδενικών τριχωμάτων των φυτών κάνναβης (Sirikantaramas *et al.*, 2007).



Εικόνα 25: Βιοσύνθεση του Cannabinerolic acid (CBGA). Η βιοσύνθεση του κεντρικού ενδιάμεσου CBGA χρωματίζεται με σκούρο πράσινο. Τα πρόδρομα μονοπάτια επισημαίνονται με ανοιχτό μπλε το Geranyl diphosphate (GPP), με μπλε το ολιβερολικό οξύ (OA). MEC το 2C-methyl-d-erythritol-4-phosphate; DOXP, το 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate; και MVA το mevalonate (Burke *et al.*, 1999, de Meijer *et al.*, 2009, Fellermeier & Zenk, 1998, Page & Gagne, 2013, Taura *et al.*, 2009). Πηγή: Degenhardt *et al.*, (2017).

Τέλος σε αντίθεση με τα κλασικά C5-φυτοκανναβινοειδή τα οποία περιέχουν μια n-πέντυλο πλευρική αλυσίδα, τα κανναβινοειδή με n-προπυλο πλευρική αλυσίδα λέγονται C3- φυτοκανναβινοειδή ή πρόπυλο κανναβινοειδή. Η C-πρενυλίωση του divarinic acid (DA) αντί του OA από το GPP αποδίδει σε CBGVA (Εικόνα 26) (de Meijer *et al.*, 2009). Ο σχηματισμός των πρόπυλο κανναβινοειδών δεν υφίσταται με σμίκρυνση της πλευρικής αλυσίδας των πεντυλο κανναβινοειδών (Kajima & Piraux, 1982). Το CGBVA είναι το κεντρικό σημείο διακλάδωσης της διαμεσολάβησης στην βιοσύνθεση των C3- κανναβινοειδών οξέων, όπως CBGA για πεντυλο κανναβινοειδών οξέων. Τα ένζυμα CBDAS, CBCAS και THCAS δεν είναι εκλεκτικά για το μήκος της αλκυλικής πλευράς της αλυσίδας και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα τρία σαν υπόστρωμα (Degenhardt *et al.*, 2017). Τα προκύπτοντα κανναβινοειδή είναι τα CBDVA, CBCVA και THCVA. Η ποικίλη ποσότητα των 2-καρβοξυλικών οξέων σε διαφορετικά στελέχη της κάνναβης προκαλείται από ανόμοια εξειδίκευση των ενζύμων στο επίπεδο του σχηματισμού του CBGA ή των αναλόγων του CBGA (Shoyama *et al.*, 1984), (de Meijer *et al.*, 2009). Τέλος οι σχετικά υψηλές ποσότητες της THCV και/ή CBDV είναι συνήθως ανιχνεύσιμες μόνο στην *Cannabis indica* (de Zeeuw, 1972).



Εικόνα 26 : Βιοσύνθεση των καναβινοειδών. Οι ενζυματικά καταλυόμενες αντιδράσεις τονίζονται σε σκούρο πράσινο. Όλες οι μη ενζυματικά-εξαρτώμενες αντιδράσεις τροποποιήσεων χρωματίζονται με ανοιχτό πράσινο. Η βιοσύνθεση των C3-καναβινοειδών ξεκινώντας από το Cannabigeronarinic acid (CBGVA) διεξάγεται από τα ίδια ένζυμα και για καλύτερη ευκρίνεια αυτά δεν δείχνονται. (Crombie *et al.*, 1968, de Meijer, 2011, Morimoto *et al.*, 1998, Shoyama, Fujita, Yamauchi, & Nishioka, 1968; Shoyama, ku, Yamauchi, & Nishioka, 1972; Taura *et al.*, 1995a). Πηγή: Degenhardt *et al.*, (2017).

1.1.5 Βιοδραστικότητα κανναβινοειδών

Η ανακάλυψη των υποδοχέων κάνναβης CB₁ και CB₂ στους οποίους δεσμεύονται τα κανναβινοειδή επιφέροντας διαφορετικές επιδράσεις, σχετίζεται άμεσα με την βιοδραστικότητα των κανναβινοειδών (Pertwee, 1988), (Howlett *et al.*, 2002). Οι υποδοχείς των κανναβινοειδών που εντοπίζονται σε όλο το σώμα, είναι μέρος του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, το οποίο σχετίζεται σε μια ποικιλία από φυσιολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων της όρεξης, αίσθησης πόνου, διάθεσης και μνήμης (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2017).

Οι υποδοχείς των κανναβινοειδών είναι μια κατηγορία υποδοχέων κυτταρικής μεμβράνης στην υπεροικογένεια υποδοχής της συζευγμένης πρωτεΐνης G (GPCRs) (Howlett, 2002; Mackie, 2008; Graham *et al.*, 2009). Όπως συμβαίνει τυπικά στους GPCRs, οι υποδοχείς των κανναβινοειδών περιέχουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές σύνδεσης και ενεργοποιούνται από τρεις κύριες ομάδες συμπλόκων: τα ενδοκανναβινοειδή, τα φυτικά κανναβινοειδή και τα συνθετικά κανναβινοειδή (Galiegue *et al.*, 1995). Προς επιβεβαίωση οι Ryberg *et al.*, (2007) περιέγραψαν την δέσμευση μερικών κανναβινοειδών σε συγκεκριμένο υποδοχέα συζευγμένης πρωτεΐνης G (GPR55) στον εγκέφαλο.

Επιπλέον η υψηλή λιποδιαλυτότητα των κανναβινοειδών έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή τους στο σώμα για μεγάλες χρονικές περιόδους (Hall, 2003). Για παράδειγμα ακόμη και μετά από μία μόνο χορήγηση THC, ανιχνεύσιμα επίπεδά της μπορούν να βρεθούν στο σώμα για εβδομάδες ή και περισσότερο (*ανάλογα με την ποσότητα που χορηγείται και την ευαισθησία της μεθόδου αξιολόγησης*) (Hall, 2003).

Προς το παρόν υπάρχουν δύο γνωστοί υποτύποι υποδοχέων κανναβινοειδών, οι CB₁ και CB₂ (Matsuda *et al.*, 1990; Gerard *et al.*, 1991). Ο CB₁ εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) του εγκεφάλου, αλλά και στους πνεύμονες, ήπαρ και νεφρά, ενώ ο CB₂ στο ανοσοποιητικό σύστημα και στα αιματοποιητικά κύτταρα (Pasher & Mechoulam, 2011), ωστόσο περαιτέρω έρευνα έδειξε εξίσου την ύπαρξη των τελευταίων σε μέρη του εγκεφάλου (Jordan & Xi, 2019). Υπάρχουν και αυξανόμενες ενδείξεις για νέους υποδοχείς κανναβινοειδών, οι μη-CB₁ και μη-CB₂ οι οποίοι εκφράζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και στο CNS (Begg *et al.*, 2005).

Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των υποδοχέων CB₁ και CB₂ είναι κατά 44% πανομοιότυπες (Latek *et al.*, 2011). Όταν λαμβάνονται υπόψη μόνο οι διαμεμβρανικές δομές των υποδοχέων, η πανομοιότητα των αμινοξέων μεταξύ των δύο υποτύπων υποδοχέων είναι περίπου 68% (Galiegue *et al.*, 1995). Επιπλέον έχουν ταυτοποιηθεί και κάποιες μικρές παραλλαγές σε κάθε υποδοχέα όπου τα κανναβινοειδή δεσμεύονται αντίστροφα και στερεο-επιλεκτικά στους υποδοχείς και γενικότερα έχουν αναπτυχθεί υποτύποι επιλεκτικών κανναβινοειδών οι οποίοι μπορεί θεωρητικά να πλεονεκτούν στην θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών όπως η παχυσαρκία (Kyrou *et al.*, 2006).

Αναλυτικά ως παράδειγμα δράσης κανναβινοειδούς που ασκεί τα σημαντικότερα αποτελέσματά του μέσω των υποδοχέων κανναβινοειδών, η THC μέσω του CB₁ επηρεάζει τη περιφερειακή και κεντρική κυκλοφορία από την ελάττωση της δράσης του συμπαθητικού συστήματος, τροποποιώντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μείωση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων, τη ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών όπως έμμεση αύξηση της ντοπαμίνης στην συναπτική σχισμή, ρυθμίζοντας έτσι την καρδιαγγειακή λειτουργία, την ογκογένεση, τις ανοσολογικές αποκρίσεις, τις συμπεριφορικές και κινητικές

δραστηριότητες (Bijou *et al.*, 2021) και εν τέλει ενεργοποιώντας το ντοπαμινεργικό μονοπάτι της ανταμοιβής, έτσι παράγει και τα ψυχοτρόπα αποτελέσματα (Oleson *et al.*, 2012). Στον αντίποδα η THC είναι υπεύθυνη για την ιδιότητα της κάνναβης να βοηθά στην αντιμετώπιση πόνων χρόνιας νευροπάθειας όπως νευροφλεγμονή (Bijou *et al.*, 2021), και να διεγείρει την όρεξη σε καρκινοπαθείς ή ασθενείς με AIDS και πολλαπλή σκλήρυνση (MS) (Fischedick *et al.*, 2009) και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό σκεύασμα στοματικής χρήσης κατά της ναυτίας και του εμετού λόγω χημειοθεραπείας (Wargent *et al.*, 2013), (dos Santos *et al.*, 2021), αλλά και ως διεγερτικό όρεξης σε χρόνιο πόνο (dos Santos *et al.*, 2021).

Στη πολύ πρόσφατη μελέτη των Bijou *et al.*, 2021 η THC έδειξε αποτελεσματικά καταστολή εμετών επαγόμενων στη χημειοθεραπεία, καθυστέρηση στον κακοήγη ανάπτυξη όγκου, αναστολή της μετάστασης αλλά και προώθηση της απόπτωσης με διάφορους μηχανισμούς που στοχεύουν στον κύκλο ζωής κυττάρων σε ανθρώπινο καρκίνο του μαστού, στην υποέκφραση παραγόντων μεταγραφής σε κακοήθες ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα και στη διέγερση αυτοφαγίας που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Έπειτα η THC παίζει ρόλο και στη βελτίωση διεγερτοτοξικότητας, νευροπλαστικότητας και εγκεφαλικών επεισοδίων και συνδέεται με την ανακούφιση παιδικής επιληψίας, εγκεφαλικού τραύματος και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Bijou *et al.*, 2021). Η THC μέσω των CB₁ επηρεάζει την νοημοσύνη, συναίσθημα, μνήμη και μειώνει τη νευρωνική διεγερσιμότητα και διεργοτοξικότητα στην επιληψία (Bijou *et al.*, 2021). Επιπλέον αυξάνει επίσης τη ροή του νεφρικού αίματος, μειώνει την ενδοφθάλμια πίεση μέσω του συμπαθητικού μονοπατιού και ρυθμίζει την ορμονική απελευθέρωση, μειώνοντας έτσι την αναπαραγωγική λειτουργία και αυξάνοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης (Bijou *et al.*, 2021).

Ωστόσο σαν παρενέργειες πέραν των βασικών ψυχοτικών συμπτωμάτων η THC μπορεί να προκαλέσει δυσφορία και άγχος (dos Santos *et al.*, 2021). Λιγότερο από 1% της THC εξαλείφεται από το ανθρώπινο σώμα στην αρχική του μορφή, διότι μόλις φτάσει το ήπαρ, τους πνεύμονες ή τα έντερα, μετασχηματίζεται κυρίως στον υδροξυλιωμένο μεταβολίτη (Δ^9 -THC-OH) από το κυτόχρωμα P450 (Iribarne *et al.*, 1966). Ο τελευταίος θεωρείται ο πιο ενεργός μεταβολίτης των THC και μετασχηματίζεται περαιτέρω στο σώμα στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (11 -nor- 9 -carboxy- Δ^9 -THC) το οποίο είναι βιολογικά ανενεργό και έχει ανιχνευτεί στο πλάσμα, ούρα και κόπρανα (Lemberger, 1972; Wall & Perez-Reyes, 1981).

Σχετικά με την βιοδραστικότητα άλλων βασικών κανναβινοειδών η CBD δεσμεύεται στους CB₂ υποδοχείς και έχει τον υψηλότερο αριθμό από ιατρικά οφέλη, τα οποία ποικίλουν μεταξύ αντι-επιληπτικών (Cunha *et al.*, 1980), (Grotenhermen & Muller-Vahl 2012; Weston-Green, 2019), αντιψυχωτικών (Rohleder *et al.*, 2016; Weston-Green, 2019), αντι-αγχολυτικών (Fogaca *et al.*, 2014), αντιοξειδωτικών (Russo, 2008; Weston-Green, 2019), νευροπροστατευτικών (Weston-Green, 2019) καθώς και άλλων βιολογικών δράσεων όπως αντιβακτηριακής, αναστολής ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, μείωσης σπασμών, επιπέδων σακχάρου αίματος, φλεγμονών, κινδύνου έμφραξης αρτηριών (Grotenhermen & Muller-Vahl, 2012) και ναυτίας (Weston-Green, 2019). Επιπλέον ανακουφίζει από τον πόνο, καταστέλλει τους μυϊκούς σπασμούς, είναι ηρεμιστικό, αγγειοχαλαρωτικό (Grotenhermen & Muller-Vahl, 2012) και τέλος μειώνει και την επαγόμενη ψυχοτροπική δράση της THC (Russo, 2008; Grotenhermen & Muller-Vahl, 2012).

Η CBN δρα σαν μερικός ανταγωνιστής στους CB₁ υποδοχείς αλλά έχει μεγαλύτερη συνάφεια δέσμευσης με τους CB₂, και σαφώς μικρότερη συνάφεια

δέσμευσης σε σχέση με την THC (Petitet, 1998; Mahadevan et al., 2000). Έχει ήπια ψυχοτρόπο δράση αλλά πολύ μικρότερη της THC (Karniol et al., 1975), ενώ πειράματα που έγιναν *in vivo* αναδεικνύουν ενδεχόμενη αντι-μικροβιακή δράση (Arendino et al., 2008), πιθανότητα για ισχυρή νευροπροστασία (Weydt et al., 2005) με τους Schubert et al., (2019) να επιβεβαιώνουν επίτευξη νευροπροστασίας μέσω της αναστολής της ωκυτοκίνης σε πειράματα με μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών (με EC_{50} των 700 nM) καθιστώντας την CBN υποσχόμενη ουσία στην ανάπτυξη θεραπείας τέτοιων ασθενειών χωρίς τον αρνητικό ψυχοτροπισμό της THC. Άλλες μελέτες έδειξαν δυνατότητα διέγερσης όρεξης (Farrimond et al., 2012), ενδεχόμενη βοήθεια σε πάσχοντες από γλαύκωμα (Kogan & Mechoulam 2007) και ενδεχόμενη αντιφλεγμονώδη δράση βοηθώντας σε πάσχοντες από ρευματοειδή αρθρίτιδα (Zurier & Burnstein, 2016). Επιπλέον βοηθά στον ύπνο, καταστέλλει τους μυϊκούς σπασμούς και ανακουφίζει τους πόνους (Benson et al., 1999).

Η CBG θεωρείται «ανενεργή» συγκριτικά με την THC, ωστόσο έχει μια ελαφριά τάση για πρόσδεση σε υποδοχείς CB_1 περίπου ίσης με αυτή της CBD (Devane et al., 1988). Σαν βιοδραστικές ιδιότητες ανακουφίζει την ενδοφθάλμια πίεση (Colasanti, 1990), βοηθά στον ύπνο, αναστέλλει ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και προάγει την ανάπτυξη των οστών (Benson et al., 1999). Σε σύγχρονη μελέτη έδειξε να έχει και αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικά κατά Gram βακτήρια όπως σε στέλεχος του *Staphylococcus aureus* ανθεκτικό στην methicillin (MRSA) (Farha et al., 2020).

Το CBC δεν είναι ενεργό στους υποδοχείς CB_1 ή CB_2 αλλά δεσμεύεται με άλλους υποδοχείς στο σώμα (*TRPV1*) που σχετίζονται με την αντίληψη του πόνου (Turner et al., 2017) και είναι δεύτερο μετά τη CBG σε καταστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων σε ποντίκια (Ligresti et al., 2006). Σε παλαιότερες μελέτες αναφέρονται αναστολή ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, προώθηση ανάπτυξης οστών, μείωσης φλεγμονών, ανακούφισης πόνου και αντιβακτηριακή ιδιότητα (Elsohly et al., 1982; Benson et al., 1999; El-Alfy et al., 2010). Σύγχρονες μελέτες *in vivo* σε ποντίκια κάνουν λόγο για δράση του CBC ως επιλεκτικό ανταγωνιστή στους CB_2 (Udoh et al., 2019) και για μείωση έκφρασης προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών (μακροφάγα, παράγοντας στρατολόγησης μαστοκυττάρων MCP-2) και κυτοκινών (Petrosino et al., 2018), καθιστώντας το με πιθανό ρόλο αντιφλεγμονώδους παράγοντα.

Η CBDV είναι αποτελεσματικό αντισπασμωδικό (Hill et al., 2013), και η THCV δρα ως ανταγωνιστής των υποδοχέων CB_1 και CB_2 (Pertwee, 2008). Οι Benson et al., (1999) αναφέρουν για μείωση υπερδιέγερσης, επιληψίας και ναυτίας.

Η Δ^8 -THC χαρακτηρίζεται κατά 20% λιγότερο δραστική από ότι η Δ^9 -THC (Elsohly & Slade, 2005) και ανακουφίζει τους πόνους (Benson et al., 1999). Σε μια μελέτη ποντικών βρέθηκε καταστολή συμπεριφοράς από την Δ^8 -THC με τη μεσολάβηση του καταρράκτη του αραχιδονικού οξέος μέσω του υποδοχέα CB_1 (Yamaguchi et al., 2004), κάτι που μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμο μοντέλο στη μελέτη του Συνδρόμου έλλειψης κίνητρων (*Amotivational syndrome*). Τα THCA και CBDA είναι δραστικώς ανενεργά και δεν παρουσιάζουν ψυχοτροπική δραστηριότητα (Moreno, 2017). Τέλος για τα CBT, CBE και CBL δεν έχουν αναφερθεί βιοδραστικότητες σε μελέτες.

Το κυριότερο μέρος των κανναβινοειδών (65%) απεκκρίνεται στα κόπραννα, ενώ μόνο το 13% απεκκρίνεται στα ούρα και επιπλέον το 80-90% των ολικών κανναβινοειδών που εισάγεται στο σώμα απεκκρίνεται τις πρώτες 5 ημέρες μετά την κατανάλωση (Wall & Perez-Reyes, 1981).

1.1.6 Τερπενοειδή της κάνναβης, η βιοσύνθεσή τους, το γονιδίωμα της ποικιλομορφίας και παραλλαγής τους στο φυτό

Η σύνθεση του τερπενίου είναι ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που δείχνει μεγάλη ποικιλία σε διάφορα «στελέχη» της κάνναβης. Η πλειοψηφία των τερπενίων που εντοπίζονται στην κάνναβη είναι υδρογονάνθρακες, οι οποίοι είναι τα άμεσα προϊόντα των ενζύμων συνθετάσης τερπενίων (TPS) (Chen *et al.*, 2011; Booth *et al.*, 2017), σε αντίθεση με περισσότερα σύνθετα τερπένια που απαιτούν τροποποίηση από άλλα ένζυμα όπως το κυτόχρωμα P450. Ως εκ τούτου η χημική ποικιλία των τερπενίων κάνναβης αντανάκλα την ποικιλία των ενζύμων TPS που κωδικοποιούνται στην οικογένεια γονιδίων (Cs)TPS κάνναβης.

Το μονοτερπένιο myrcene καθώς και τα σεσκιτερπένια β -caryophyllene και α -humulene φαίνονται να είναι παρόντα στα περισσότερα «στελέχη» κάνναβης. Άλλα κοινά τερπένια περιλαμβάνουν τα μονοτερπένια α -pinene, limonene και linalool καθώς και τα σεσκιτερπένια bisabolol και (E)- β -farnesene. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε κάποια τερπένια κυρίως από τα σεσκιτερπένια παραμένει δύσκολη η ταυτοποίησή τους λόγω της έλλειψης αυθεντικών προτύπων ανάλυσης πολλών εξ αυτών συστατικών. Σαν αποτέλεσμα αναφορές των προφίλ τερπενίων κάνναβης μπορεί να περιλαμβάνουν άγνωστα συστατικά, να βασίζονται σε δοκιμαστική ταυτοποίηση ή να περιουσιάζουν ανολοκλήρωτα προφίλ των επιλεγμένων συστατικών. Η στερεοχημεία τους δεν περιγράφεται με συνέπεια, ή συχνά αγνοείται σε αναφορές τερπενίων κάνναβης. Αυτά τα ζητήματα καθιστούν δύσκολη την πλήρη εκτίμηση της ποικιλίας των τερπενίων κάνναβης χρησιμοποιώντας τα διαθέσιμα δεδομένα και καθιστούν προβληματική τη σύγκριση των αποτελεσμάτων από διάφορες μελέτες.

Τα τερπένια που εντοπίζονται στην ρηίνη της κάνναβης, καθώς και η ισοπρενοειδής μονάδα της δομής των κανναβινοειδών παράγονται μέσω του ισοπρενοειδούς βιοσυνθετικού συστήματος, το οποίο προέρχεται στο μονοπάτι του mevalonic acid (MEV) στην cytosol και στο μονοπάτι του methylerythritol phosphate (MEP) στα πλαστίδια. Τα μονοτερπένια (όπως και τα κανναβιδοειδή) έχουν ένα κοινό 10-C ισοπρενοειδή προκάτοχο την geranyl diphosphate (GPP), ενώ τα σεσκιτερπένια παράγονται από το 15-C ισοπρενοειδές farnesyl diphosphate (FPP, C₁₅). Χρησιμοποιώντας τα GPP ή FPP ως υποστρώματα, οι συνθετάσες μονοτερπενίων (*mono-TPS*) και συνθετάσες σεσκιτερπενίων (*sesqui-TPS*) παράγουν τις διαφορετικές δομές των μονο και σεσκιτερπενίων που βρίσκονται στην ρηίνη της κάνναβης (Εικόνα 27).

Σε μια πρόσφατη ανάλυση του γονιδιώματος και των μεταγραφικών αλληλουχιών της ποικιλίας κάνναβης «Purple Kush» ταυτοποιήθηκαν περισσότερα από 30 διαφορετικά γονίδια (Cs)TPS (Booth *et al.*, 2017) και μόνο εννιά (Cs)TPS έχουν λειτουργικά χαρακτηριστεί και δημοσιευτεί μέχρι σήμερα (Gunnawich *et al.*, 2007) Όπως σε πολλά άλλα φυτικά TPS (Chen *et*

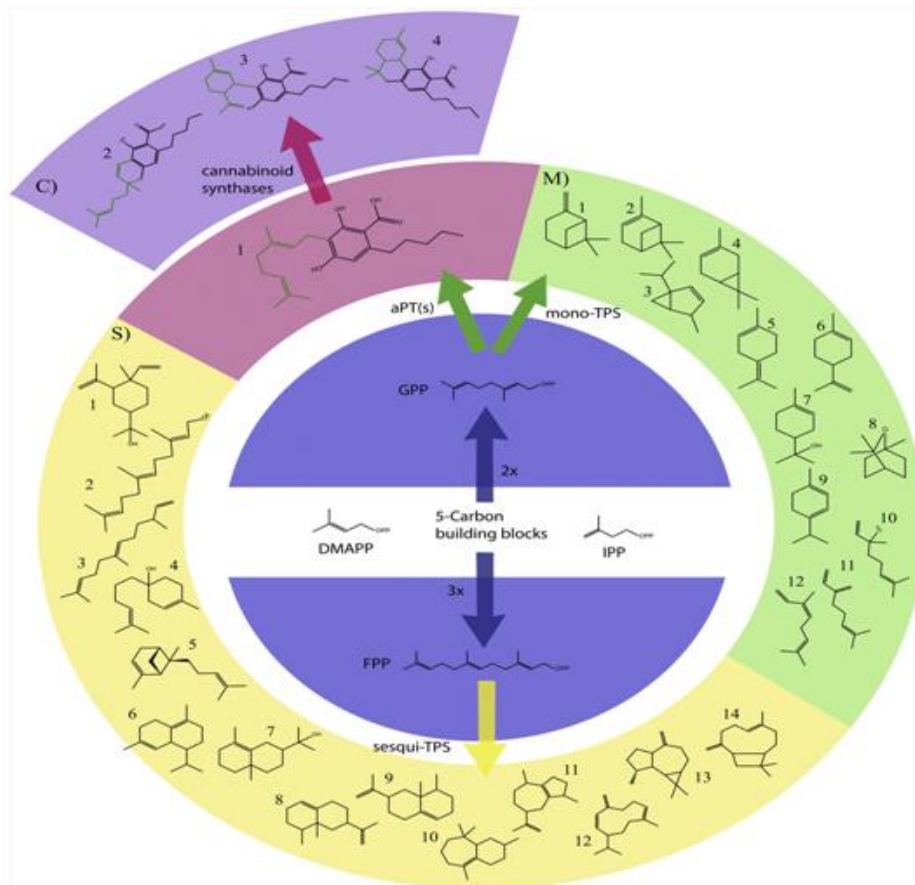
al., 2011), οκτώ από τα εννιά χαρακτηρισμένα CsTPS είναι ένζυμα πολλαπλής-παραγωγής που ενεργοποιούν αρκετές διαφορετικές δομές τερπενίων είτε από GPP ή FPP (Booth *et al.*, 2017). Η πολυ-παραγωγική φύση των CsTPS μπορεί να εξηγήσει γιατί κάποια τερπένια όπως το α-humulene και β-caryophyllene συνυπάρχουν τυπικά σε διαφορετικά δείγματα κάνναβης, ενώ τα υπεύθυνα CsTPS για άλλα διαφορετικά τερπένια που βρίσκονται στην κάνναβη είναι ακόμα άγνωστα.

Η παραλλαγή στην σύσταση της οικογένειας των γονιδίων CsTPS και η παραλλαγή στην έκφρασή τους είναι πιθανόν να εξηγήσει παρατηρούμενες παραλλαγές στα προφίλ των τερπενίων μεταξύ των ειδών. Ωστόσο το επίπεδο της παραλλαγής του μεγέθους, της σύστασης και της έκφρασης της οικογένειας γονιδίων CsTPS καθώς και παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση αυτών των γονιδίων, είναι ως επί το πλείστον άγνωστες. Για παράδειγμα η παραλλαγή της βιοσύνθεσης των τερπενίων στο γονιδίωμα, μεταγράψωμα, πρωτέωμα και στα βιοχημικά επίπεδα έχουν δείξει σε άλλα φυτά να λαμβάνουν υπόψη τη φαινοτυπική ενδο-ειδική παραλλαγή των προφίλ των τερπενίων (Hall *et al.*, 2011; Drew *et al.*, 2016). Τα προφίλ των τερπενίων μπορούν να αλλάξουν ουσιαστικά σαν αποτέλεσμα της διαφορετικής έκφρασης γονιδίων CsTPS κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών ή ως ανταπόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιπλέον αναπτυξιακή ή η ιστική εξειδίκευση των CsTPS μπορεί να επηρεάσει τη παραλλαγή των προφίλ των τερπενίων σε προϊόντα κάνναβης. Κανένας από αυτούς τους παράγοντες παραλλαγής των τερπενίων που μπορεί να συνεισφέρει στην χαμηλή αναπαραγωγικότητα της σύστασης των τερπενίων δεν έχει μελετηθεί συστηματικά στην κάνναβη.

Η λειτουργικότητα του οξυγόνου των απλών τερπενικών αλκοολών που υπάρχουν στην κάνναβη όπως η linalool ή bisabolol μπορεί να καταλήγει από ενζυματική δραστηριότητα των CsTPS όπως βρέθηκε επίσης για τα TPS σε άλλα φυτικά είδη (Booth *et al.*, 2017). Άλλα παράγωγα τερπενίων που ανιχνεύονται στην κάνναβη μπορεί να προκύπτουν μη ενζυματικά εξαιτίας της οξειδωσης ή λόγω των θερμικών ή επαγόμενης υπερϊώδης ακτινοβολίας ανακατατάξεων κατά τη διαδικασία της αποθήκευσης, όπως το caryophyllene oxide, β-elemene ή παράγωγα του myrcene (Booth *et al.*, 2011; Marchini *et al.*, 2014). Αυτές οι μη ενζυματικές τροποποιήσεις μπορεί να προσθέτουν ένα επίπεδο παραλλαγής που να είναι ανεξάρτητο από το γονιδίωμα του φυτού και την βιοχημεία. Όταν η ανάλυση του τερπενίου εκτελείται με αποξηραμένο φυτικό υλικό, οι μεταβλητές ποσοτικές απώλειες τερπενίων ιδίως των πιο πτητικών μονοτερπενίων (Ross *et al.*, 1996) μπορεί να είναι άλλη αιτία παραλλαγής των τερπενίων.

Για την επίλυση των ζητημάτων χαμηλής αναπαραγωγικότητας στα προφίλ των τερπενίων κάνναβης, θα είναι απαραίτητο να διεξαχθούν εξονυχιστικές μελέτες με ποικιλία γενοτύπων κάνναβης που αναπτύσσονται από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και να αναλύσουν ποσοτικά και ποιοτικά πέραν του πλαισίου ανάπτυξης των φυτών. Αυτό πρέπει να

περιλαμβάνει συγκεκριμένο τύπο ανάλυσης τερπενίων σε όργανα, ιστό και κύτταρα και να περιλαμβάνει ελεγχόμενα πειράματα για την εκτίμηση των επιδράσεων των περιβαλλοντικών συνθηκών όπως φως, άρδευση και θρεπτικά συστατικά. Τέτοια πειράματα δεν πρέπει να περιλαμβάνουν μόνο ανάλυση τερπενίων μεταβολιτών αλλά και ένα περιεκτικό προφίλ μεταγραφώματος της έκφρασης γονιδίων CsTPS. Τα αποτελέσματα μιας τέτοιας μελέτης θα επέτρεπε την πολύ αναγκαία κατάλληλη ανάθεση αναπαραγωγικότητας των προφίλ των τερπενίων σε διαφορετικά «στελέχη» και να υποστηρίζουν την προτυποποίηση των ποικιλιών κάνναβης και τα παράγωγα καταναλωτικά προϊόντα. (Booth & Bohlmann, 2019).



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση της βιοσύνθεσης των τερπενίων και εν συνεχεία κανναβινοειδών: 5-ανθράκων ισοπρενοειδείς δομικές μονάδες isopentenyl diphosphate (*IPP*) και dimethylallyl diphosphate (*DMAPP*) συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν geranyl diphosphate (*GPP*) (*C*10) ή farnesyl diphosphate (*FPP*) (*C*15). Συνθάσες τερπενίων (*TPS*) μετατρέπουν το *GPP* ή *FPP* σε τερπένα. Οι αρωματικές πρενυλοτρανσφεράσες (*aPTs*) συμπυκνώνουν το *GPP* με το olivetolic acid για να σχηματίσουν cannabinigerolic acid (*CBGA*), το οποίο κυκλοποιείται από τις συνθάσες των κανναβιδοειδών για να παραγάγουν κανναβιδοειδή: C1: cannabigerolic acid, C2: cannabichromenic acid, C3: cannabidiolic acid, C4: tetrahydrocannabinolic acid. Μονοτερπένα: M1: β-pinene, M2: α-pinene, M3: β-thujone, M4: 3-carene, M5: terpinolene, M6: limonene, M7: terpineol, M8: 1,8-cineole, M9: α-terpinene, M10: linalool, M11: myrcene, M12: (Z)-β-ocimene. Sesquiterpenes S1: α-elemol, S2: (E)-β-farnesol, S3: (E)-β-farnesene, S4: bisabolol, S5: (+)-α-bergamotene, S6: δ-cadinene, S7: γ-eudesmol, S8: valencene, S9: eremophilene, S10: β-himachalene, S11: α-guaiene, S12: germacrene D, S13: alloaromadendrene, S14: β-caryophyllene. Πηγή: Booth & Bohlmann, (2019).

1.1.7 Δραστικότητα των κυριότερων τερπενίων κάνναβης

Σχετικά με τις δραστικότητες των τερπενίων κάνναβης η κύρια χαρακτηριστική ιδιότητα που ανιλαμβάνονται οι άνθρωποι είναι το αποδιδόμενο άρωμα των διαφορετικών πτηκίων μόνο και σεσκι τερπενίων αλλά και των μιγμάτων τους. Το άρωμα αυτό έχει αξιολογηθεί από ομάδες δοκιμής που περιέγραψαν την οσμή αλλά και τις φυσικές επιδράσεις που ανιλήφθηκαν από την χρήση

αυτών των συστατικών τα οποία επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες. Επιπλέον διάφορες έρευνες έδειξαν ότι τα συστατικά αυτά εκδήλωσαν ιατρικές και φαρμακολογικές ιδιότητες (Clarke & Watson, 2007). Ο Πίνακας 16 παραθέτει συγκεντρωτικά όλες τις ιδιότητες των κυριότερων τερπενίων της κάνναβης.

Συγκεκριμένα από τα πιο κοινά τερπένια που συναντώνται στην κάνναβη η linalool επιδεικνύει ανθώδη οσμή (Raguso & Pichersky, 1999) και σαν φυσικό καταπραϋντικό χρησιμοποιείται εδώ και καιρό στην παραδοσιακή και εναλλακτική ιατρική, για να συμβάλλει στην αντιμετώπιση του ανησυχίας και κατάθλιψης όπως έχουν δείξει πολυάριθμες μελέτες με ποντίκια (Guzman-Gutierrez *et al.*, 2012). Επιπλέον εμποδίζει τους υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος μιας χημικής ουσίας του εγκεφάλου που προκαλεί επιληψία σε περίσσεια συγκέντρωσης (Elisabetsky *et al.*, 1995). Έπειτα μπορεί να μειώσει τον πόνο στοχεύοντας στην ακετυλοχολίνη (Re *et al.*, 2000), τη χημική ουσία του εγκεφάλου υπεύθυνη για μυϊκή κίνηση μειώνοντας την ευερεθιστότητα των κυττάρων της σπονδυλικής στήλης που μεταφέρουν σήματα πόνου στον εγκέφαλο (Leal-Cardoso *et al.*, 2010) και αυξάνοντας τα επίπεδα αδενosίνης στον εγκέφαλο που ελέγχει τον καρδιακό παλμό (Peana *et al.*, 2006). Επίσης σε πειράματα ποντικών (Nakamura *et al.*, 2009) η linalool μείωσε το στρες ενεργοποιώντας το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα το οποίο διατηρεί ενέργεια, επιβραδύνει τον καρδιακό παλμό και ρυθμίζει τα επίπεδα στρες στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπροσθέτως μπορεί να βοηθήσει και σε σπασμούς (Russo, 2011).

Το β-Caryophyllene επιδεικνύει οσμή πιπεριού και διαθέτει γαστροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Gertsch *et al.*, 2009) και βελτιώνει την απορρόφηση των υποδοχέων κανναβινοειδών CB₂ (Sharma *et al.*, 2016). Επιπλέον, ποντίκια σε πειράματα (Katsuyama *et al.*, 2013) που τους χορηγήθηκε β-caryophyllene με ένεση, βίωσαν λιγότερο πόνο από ότι με διάλυμα μάρτυρα. Επίσης διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Daham *et al.*, 2015) και αντισπασμωδικές επιδράσεις σε ποντίκια (Leonhardt *et al.*, 2010).

Το Limonene επιδεικνύει οσμή εσπεριδοειδών και έχει πολυάριθμα ιατρικά οφέλη. Είναι ένα ανιμικητικό συστατικό (Hartsel *et al.*, 2016) και έχει προταθεί σαν μια εξαιρετική διαιτητική πηγή για πρόληψη κατά του καρκίνου (Aggarwal & Shishodia, 2006), ενώ οι αγχολυτικές του επιδράσεις σε μοντέλο λαβυρίνθου ποντικών ήταν συγκρίσιμες με αυτές γνωστού φαρμάκου στην αγορά (Lima *et al.*, 2013). Επιπλέον η εισπνοή του σε μια μελέτη ομάδας ασθενών (Komori *et al.*, 1999) μείωσε την ανάγκη για αντικαταθλιπτική αγωγή. Επιπλέον ο Sun (2007) ανέφερε χρήση κατά της γαστρικής παλινδρόμησης.

Το β-Myrcene έχει έντονο άρωμα και μπορεί να επιδείξει αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Ciftsi *et al.*, 2011), αντιφλεγμονώδη δράση σε ποντίκια (Souza *et al.*, 2003), ενώ οι Sadraei *et al.*, (2016) υποστηρίζουν ότι μπορεί να καταστείλει τους μυϊκούς σπασμούς.

Πίνακας 16 :Τα κυριότερα τερπένα της κάνναβης και οι ιδιότητές τους

Τα 10 κυριότερα τερπενοειδή στην Κάνναβη				
Τερπενοειδή	Άρωμα	Ευρισκόμενα επίσης	Φυσικές Επιδράσεις	Ιατρικά οφέλη
Linalool	Ανθώδεις, Εσπεριδοειδών, Καρκευμάτων	Λεβάντες, Εσπεριδοειδή, Δάφνες, Σημύδες	Καταπραϋντικό, Ηρεμιστικό	Αϋπνία, Στρες, Κατάθλιψη, Ανησυχία, Σπασμοί, Πόνος, Επιληψία
Terpinolene	Πεύκο, Μούρο, Βάλσαμο	Ρίγανη, Κύμινο, Πασχαλιά	Καταπραϋντικό	Αντιμικροβιακό, Κατά των Όγκων, Αντιοξειδωτικό
Phytol	Ανθώδεις, Μούρο, Βάλσαμο	Πράσινο τσάι	Καμία	Αντιοξειδωτικό, Αντιφλεγμονώδες, Πόνοι
β-Myrcene	Γαρίφαλα, Γήινο, Φυτικό	Μάνγκο, Λυκίσκος, Φύλλα Δάφνης, Ευκάλυπτος	Καταπραϋντικό, Χαλαρωτικό	Αντιοξειδωτικό, Αντικαρκινικό, Αντιφλεγμονώδες, Σπασμοί
Citronellol	Ανθώδεις, Εσπεριδοειδών, Ρόδινο, Γλυκό	Γεράνια, Τριαντάφυλλο, Φλούδες Εσπεριδοειδών	Καμία	Αντιβακτηριακό, Αντιφλεγμονώδες, Κατά των Όγκων
Caryophyllene oxide	Ισχυρά Ξυλώδεις, Πιπερώδεις, Πικάντικο, Γαρίφαλα	Μαύρο Πιπέρι, Γαρίφαλα, Δεντρολίβανο	Καμία	Αντιοξειδωτικό, Βελτίωση απορρόφησης των CB ₂ Υποδοχέων κάνναβης
α-Pinene	Άκρως Γλυκό	Πευκοβελόνες, Φλούδα Πορτοκαλιού, Μαϊντανός	Εγρήγορηση Μνήμης	Αντιβακτηριακό, Αντιφλεγμονώδες, Άσθμα
Limonene	Εσπεριδοειδών, Πικρό	Εσπεριδοειδή, Δυόσμος, Άρκευθος	Ανεβασμένη Διάθεση, Στρες	Αντιμυκητιακό, Αντικαρκινικό, Ανησυχία, Κατάθλιψη, Γαστρική Παλινδρόμηση
β-Caryophyllene	Πικάντικο	Ταϊλανδέζος Βασιλικός, Γαρίφαλο, Μαύρο Πιπέρι	Καμία	Αντιφλεγμονώδες, Πόνοι, Αντιοξειδωτικό, Μυϊκοί Σπασμοί, Βελτίωση απορρόφησης των CB ₂ Υποδοχέων κάνναβης
Humulene	Ξυλώδεις, Γήινο	Λυκίσκος, Βιετναμέζικος Κόλιανδρος	Καταστέλει την όρεξη	Αντιφλεγμονώδες, Αντιβακτηριακό, Πόνοι

Τα α και β-Pinene που διαθέτουν οσμή πεύκου και χαρακτηρίζονται από αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση (Silva *et al.*, 2012), ενώ το πρώτο διαθέτει και αντιφλεγμονώδη δράση (Kim *et al.*, 2015) και σε συνεργία με την THC δρα ως βρογχοδιασταλτικό, ανοίγοντας τους αεραγωγούς σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης για να βοηθήσει καταστάσεις όπως το άσθμα (Russo, 2011).

Το Humulene διαθέτει γήινο άρωμα και στην μελέτη των Fidy *et al.*, (2016) φάνηκε να τερματίζει τα καρκινικά κύτταρα όταν συνδυάζεται με

φυτοκανναβιδοειδή και άλλα τερπένια. Επιπλέον επέδειξε και αντιφλεγμονώδη δράση σε ποντίκια (Fernandez *et al.*, 2009), ενώ λόγω της κατασταλτικής του ιδιότητας αποτελεί ισχυρό παυσίπονο (Guimaraez & Serafini, 2014). Επίσης λόγω της αντιβακτηριακής του δράσης οι εφαρμογές του στην παραδοσιακή ιατρική ήταν πολύ διαδεδομένες αλλά χρησιμοποιούνται και σήμερα κατά των μολύνσεων από *Staphylococcus* (Pichette *et al.*, 2006).

Η Phytol επιδεικνύει ανθώδη οσμή και μια δημοσιευμένη μελέτη (Costa *et al.*, 2016) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι θα μπορούσε να είναι μια καλή υποψήφια για τη θεραπεία ή την πρόληψη ασθενειών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες (μια ευρεία οικογένεια ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές μεταξύ άλλων). Επιπλέον μερικές μελέτες έδειξαν ότι η phytol διαθέτει τόσο αντιφλεγμονώδεις, όσο και αναλγητικές δράσεις (Silva *et al.*, 2014)

Το Terpinolene είναι πολυδιάστατο αρωματικά επιδεικνύοντας ανθώδη, πευκώδη, φυλλώδη οσμή και λίγο εσπεριδοειδών. Η αναδυόμενη έρευνα εξετάζει επίσης τη αντιοξειδωτική δυνατότητα της **terpinolene** να μειώσει τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων (Grassman *et al.*, 2005) όταν χρησιμοποιείται μαζί με άλλα θρεπτικά συστατικά και τον πιθανό ρόλο της στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (Okumura *et al.*, 2012). Ωστόσο οι ερευνητές εξακολουθούν να προσπαθούν να αποσαφηνίσουν τις πιθανές επιδράσεις της **terpinolene**. Επιπλέον, πολλοί επιστήμονες πιστεύουν ότι τα τερπένια και τα κανναβινοειδή δρουν παράλληλα για να δημιουργήσουν την συνολική επίδραση του στελέχους, επομένως δεν αναμένεται ότι ένα στέλεχος που περιέχει **terpinolene** θα έχει υποχρεωτικά χαλαρωτικές ή κατασταλτικές ιδιότητες. Επιπλέον ενδέχεται να έχει και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Shafaghat & Shafaghatlonbar, 2011).

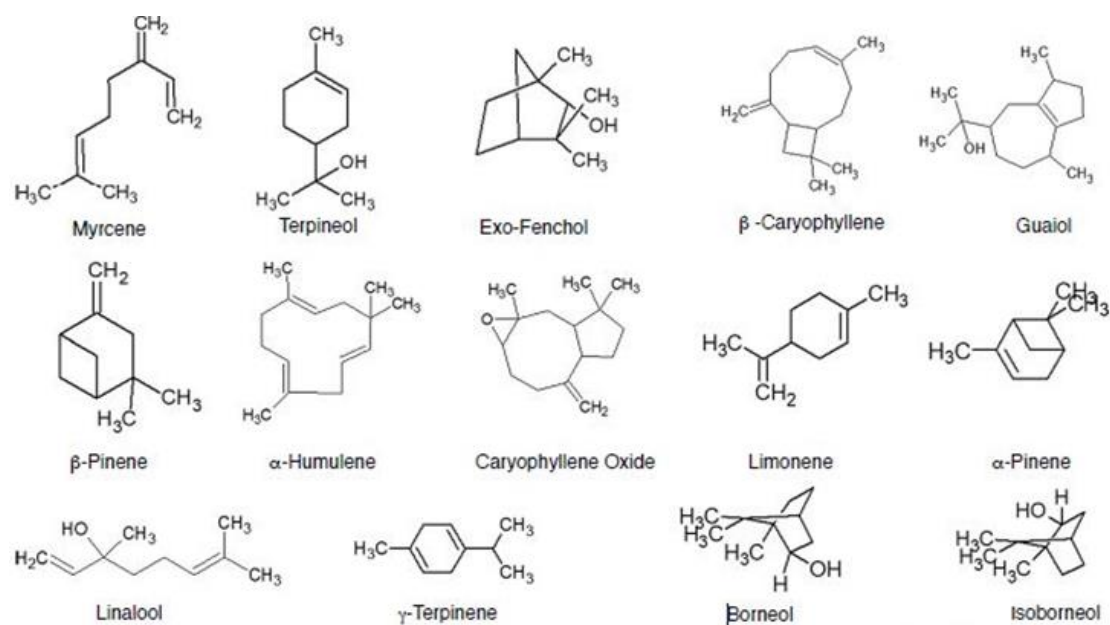
Η Citronellol διαθέτει εσπεριδοειδές και ανθώδες άρωμα και έδειξε αντιφλεγμονώδη δράση σε πειράματα ποντικών (Brito *et al.*, 2012), μικρή δράση ενάντια σε όγκους (Sobral *et al.*, 2014) και ταχέα βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στο *Escherichia Coli* (Guimaraez *et al.*, 2019).

Το Caryophyllene oxide διαθέτει έντονο ξυλώδες άρωμα, επιδεικνύει αντιοξειδωτική δράση (Singh, *et al.*, 2006) και βελτιώνει την απορρόφηση των υποδοχέων κανναβιδοειδών CB₂ (Fidyt *et al.*, 2016)

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά τις ιδιότητες κάποιων εξ αυτών και άλλων τερπενίων να εμποδίζουν τον σχηματισμό όγκων ή να αναστέλλουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε πειράματα *in vivo* και σε ποντίκια (Burle *et al.*, 1996; Gould, 1997; Karlson, 1997), οι ποσότητες των τερπενίων που απαιτούνται για αυτές τις αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις στα ποντίκια είναι αρκετά υψηλές με έως και 10% της διατροφής των ζώων (Gould, 1997). Ομοίως και τα κανναβιδοειδή μπορούν να αναστείλουν τον σχηματισμό όγκου σε περιπτώσεις ζώων μοντέλων με καρκίνο (Blazquez *et al.*, 2003). Τέτοιου τύπου εργαστηριακές μελέτες μπορεί να οδήγησαν στη πρόταση ότι τα κανναβινοειδή σε συνδυασμό με τα τερπένια, έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες (Russo *et al.*, 2011; Nuutinen, 2018), ωστόσο προς

γνώσιν δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία για να υποστηρίξουν ότι οι αντικαρκινική δράση των τερπενίων εκδηλώνεται με την κατανάλωσή τους από προϊόντα κάνναβης. Τέλος είναι σημαντική η υπενθύμιση ότι η κατανάλωση της κάνναβης γίνεται συχνά από νεαρούς ενήλικες με κάπνισμα ή ως ατμός, ωστόσο αυτή η συνήθεια εισπνοής αναφλεγμένων ή εξατμισμένων προϊόντων κάνναβης αποτελούν κίνδυνο για την υγεία συμπεριλαμβανομένου και του πιθανού κινδύνου πρόκλησης καρκίνου ή άλλων προβλημάτων υγείας (Aldington *et al.*, 2008; Meehan-Atrash *et al.*, 2017), συνεπώς δεν θα πρέπει να καταναλώνεται η κάνναβη ως προϊόν πρόληψης κατά του καρκίνου.

Στην **Εικόνα 28** διακρίνονται οι στερεοχημικές δομές μερικών τερπενίων που συναντώνται συχνά στη κάνναβη.



Εικόνα 28: Στερεοχημικές δομές 14 τερπενίων που συναντώνται συχνά στην *Cannabis sativa* L.

1.2 Το παθογόνο εδάφους *Rhizoctonia solani*

Ο *Rhizoctonia solani* Kuhn είναι ένας πανταχού παρόν εδαφογενής νεκροτροφικός μύκητας που προκαλεί ζημιά σε ένα ευρύ φάσμα καλλιεργειών μεγάλης οικονομικής σημασίας. Η σημαντική ποικιλομορφία στη μορφολογία αποικίας, σε βιοχημικούς και μοριακούς βιοσημαντές, στη παθογένεια και επιθετικότητα υφίσταται μεταξύ των μελών αυτών των ειδών και επέτρεψε την ομαδοποίησή τους σε δεκατέσσερις σωματικές ομάδες ή αλλιώς με την ορολογία ομάδες αναστόμωσης (AGs). Παρόλο που μια πληθώρα από βιοχημικές και μοριακές γενετικές μελέτες επιβεβαιώνουν την παραδοσιακή ταξινόμηση κατά AG και αναγνωρίζουν τις AG ως μη διασταυρωμένους πληθυσμούς (Anderson, 1984) με χαρακτηριστικές εξελικτικές προελεύσεις (Vilgalys & Cubeta, 1994), η γενετική βάση και ο έλεγχος της παρατηρούμενης ασυμβατότητας, καθώς και οι παράγοντες που διαμορφώνουν τη δομή του πληθυσμού ενώπιον κάθε AG παραμένουν ασαφείς.

Ταξινομικά ο *Rhizoctonia solani* ανήκει στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Πίνακας 14: Επιστημονική ταξινόμηση του *Rhizoctonia solani*

Βασίλειο	Μύκητες
Υποβασίλειο	<i>Dicarya</i>
Φύλλο	<i>Basidiomycota</i>
Υποφύλλο	<i>Agaricomycetes</i>
Τάξη	<i>Ceratobasidiaceae</i>
Οικογένεια	<i>Cantharellales</i>
Γένος	<i>Rhizoctonia</i>
Είδος	<i>Rhizoctonia solani</i>

Η παραδοσιακή ταυτοποίησή του βασίζεται κυρίως σε βλαστικούς χαρακτήρες (Parmeter & Whitney 1970; Ogoshi, 1987) ως εξής: οι πολυπυρηνικές διαφραγματικές υφές εμφανίζονται υαλώδεις όντας νεαρές, αλλά μετατρέπονται σε καφέ με την ηλικία. Η υφική διακλάδωση προέρχεται από απομακρυσμένο δολίπορο διάφραγμα με μια χαρακτηριστική στένωση στο σημείο διακλάδωσης. Επιπλέον από τα περισσότερα αλλά όχι όλα τα μέλη παράγονται μονιλοειδή κύτταρα και σκληρώπια ομοιόμορφης υφής. Ενώ δεν παρατηρούνται κονίδια, κρίκους (*club connections*), ριζόμορφα και χρωστικές καλλιέργειας πέραν των καφετί. Η βασιδιοματική δομή της σεξουαλικής κατάστασης χαρακτηρίζεται από καθέτως διακλαδιζόμενο υμένιο διαδεχόμενο από επιμήκη βασίδια ελαφρώς ευρύτερα από υφές στη βάση.

Ο *R. solani* περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος ξενιστών. Επιτίθεται σε μέλη των οικογενειών *Poaceae* πχ. αραβόσιπος (Garg *et al.*, 2011), σιτάρι (Smiley & Uddin, 1993), βρώμη (Simay, 1989), κριθάρι (Ogoshi *et al.*, 1990), ρύζι (Savary & Mew, 1996), *Fabaceae* πχ. σόγια (Dorrance *et al.*, 2003), αράπικο φιστίκι (Brenneman, 1996), ξηρό φασόλι (Pena *et al.*, 2013), αλφαλφα (Jones & Samac 1996), ρεβύθι (Hwang *et al.*, 2003), φακή (Van emden *et al.*, 1988), μπιζέλι (Hwang *et al.*, 2007), *Solanaceae* πχ. καπνός, πατάτα (Johnk *et al.*, 1993), *Amaranthaceae* πχ. ζαχαρότευτλα (Buddemeyer *et al.*, 2004), *Brassicaceae* πχ. κανόλα (Kataria & Verma, 1992), *Rubiaceae* πχ. καφές (Ren *et al.*, 2018), *Malvaceae* πχ. βαμβάκι (Howell *et al.*, 2000), *Asteraceae* πχ. μαρούλι (Grosch & Schneider 2004), *Araceae* πχ. ποθός (Norman & Ali, 2018), *Moraceae* πχ. φίκος (Norman & Ali, 2013), *Linaceae* πχ λινάρι (Gruzdeviene *et al.*, 2008), αλλά και σύμφωνα με την παρούσα μελέτη σε βιομηχανική κάνναβη ποικιλίας Futura 75 (οικογένεια *Cannabaceae*).

Τα συμπτώματα σε ποικίλους ξενιστές περιλαμβάνουν, σήψεις σπόρου, ρίζας, υποκοτυλίου, λαιμού, μίσχου, άκρων, λοβών, σποροφύτων, καρκίνωμα στελέχους, μαύρη κηλίδωση και πρώιμο και όψιμο πλάγιασμα στελέχους. Τα συμπτώματα γενικά εξαρτώνται και από την ομάδα αναστόμωσης (AGs) του μύκητα που είναι παρούσα κατά τη μόλυνση. Στην βιομηχανική κάνναβη η μόλυνση με την AG1-IC επιφέρει πλάγιασμα στελέχους και καφέ σήψη λαιμού (Εικόνα 29).

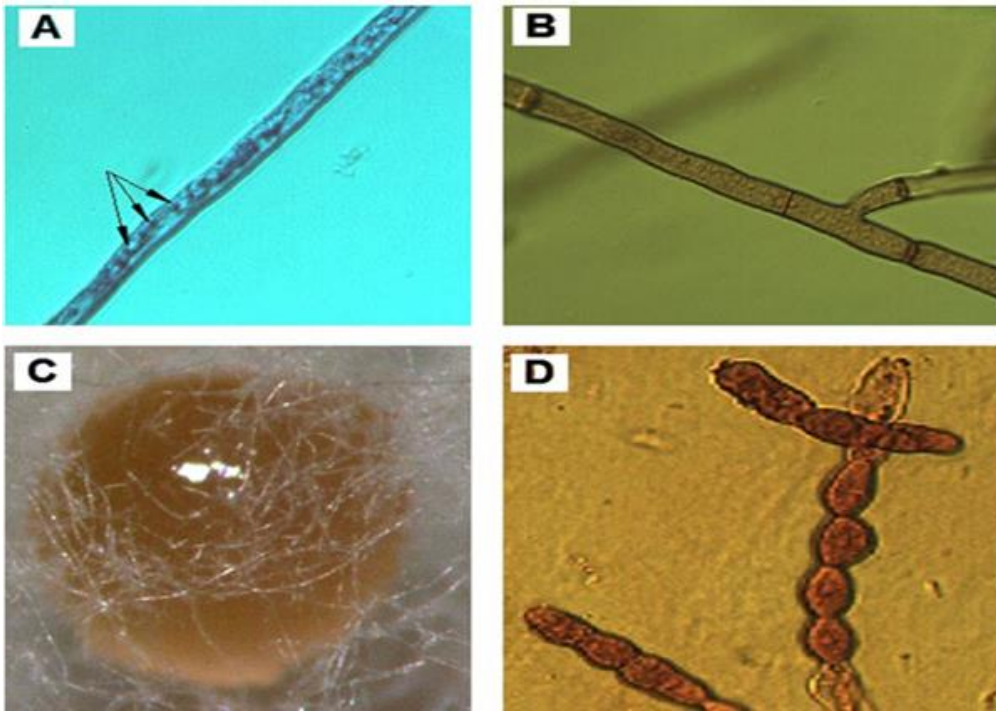


Εικόνα 29 : Σήψη λαιμού βιομηχανικής κάνναβης σε πείραμα τεχνητής μόλυνσης υπό εργαστηριακές συνθήκες. Αριστερά: επικάλυψη τύπου σάντουιτς λαιμού φυτών κάνναβης με λωρίδες *Rhizoctonia solani* AG-1-IC αναπτυσσόμενο σε θρεπτικό υλικό PDA. Δεξιά: κοντινή λήψη της καφέ σήψης του λαιμού των φυτών με παρουσία μυκηλίου και σκληρωτίων ως αποτέλεσμα της μόλυνσης από το *Rhizoctonia solani* AG-1-IC όπως εφαρμόστηκε σύμφωνα με την αριστερή εικόνα

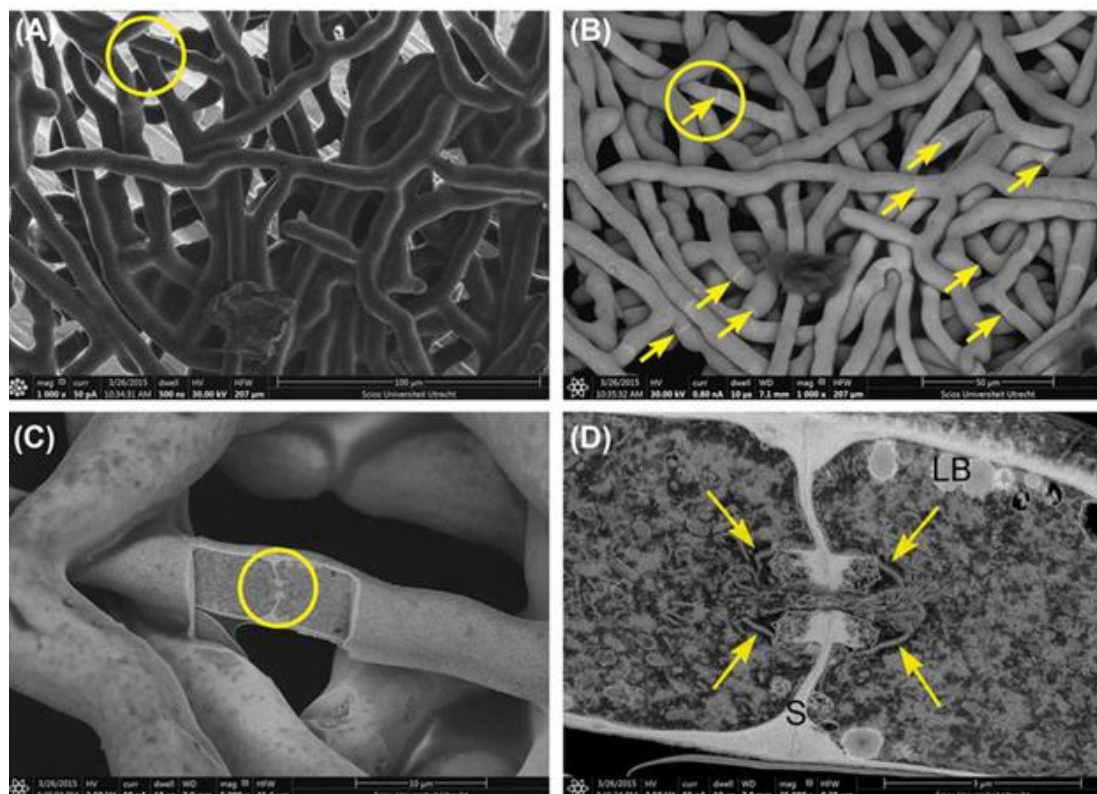
1.2.1 Περιγραφή του γένους *Rhizoctonia* και ταξινομική ομαδοποίηση του *Rhizoctonia solani*

Κατά την μελέτη της παθολογίας ενός αγνώστου μύκητα που επιτέθηκε στα φυτά αλφαλα (*Medicago sativa*) και κρόκο (*Crocnus sativus*), ο de Candolle (1815) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε το γένος *Rhizoctonia*. Ανέφερε δύο είδη εντός του γένους: *R. crocorum* και *R. medicaginis* που προσβάλλουν τα αλφαλα και κρόκο αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον de Candolle, τα δύο βασικά χαρακτηριστικά του γένους είναι η παραγωγή σκληρωτίων διαφορετικών από αυτών του γένους *Sclerotium*, αλλά και η σύνδεση των μυκηλίων με ρίζες των φυτών. Το γένος *Rhizoctonia* περιλαμβάνει μια πανταχού παρούσα ομάδα από μύκητες που υφίστανται με φυσικό τρόπο ταυτόχρονα σε καλλιεργήσιμα (Ogoshi, 1987) και σε ακαλλιέργητα εδάφη διαφορετικών τοποθεσιών παγκοσμίως. Υπάρχουν ως φυτοπαθογόνα προκαλώντας οικονομικές απώλειες γεωργικών καλλιεργειών μείζονος σημασίας και ως σαπρόφυτα που επιβιώνουν σε νεκρή οργανική ύλη στο έδαφος. Επιπλέον έχουν επίσης βρεθεί και ως ενδοφυτικά συμβιωτικά σε ορχιδέες και βρύα (Warcup & Talbot, 1966; Currah *et al.*, 1987).

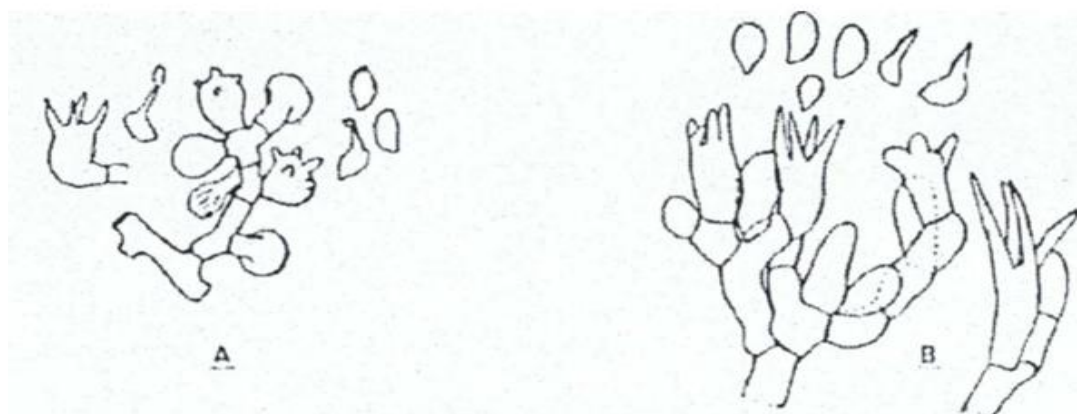
Κατά το παρελθόν οι μύκητες που ταξινομούνταν με το αναμορφικό (ασεξουαλικό) γένος *Rhizoctonia*, αποτελούνταν από είδη εχόντων διαφορετικά τελειομορφικά (σεξουαλικά) γένη και ανήκαν σε διαφορετικές οικογένειες και τάξεις. Ένα από τα πιο σημαντικά τελειόμορφα γένη που προκαλεί φυτικές ασθένειες και μεγαλύτερου ενδιαφέροντος στους φυτοπαθολόγους αποτελούσε το *Thanatephorus* (ανάμορφο: *R. solani*) (Vilgalys & Cubeta, 1994). Σε σχέση με τα μυκηλιακά χαρακτηριστικά το συγκεκριμένο γένος στερείται κρίκους, αλλά διαθέτει ευρείες μονιλοειδείς υφές, σκληρώτια (Εικόνα 30) και δολίπορα διαφράγματα (Εικόνα 31). Επιπλέον οι νεαρές βλαστικές υάλινες υφές του *Thanatephorus* γίνονται καφετί με την πάροδο της ηλικίας. Τα καφετί σκληρώτια του *R. solani* αναγνωρίζονται εύκολα σε σχέση με σκληρώτια άλλου χρώματος όπως πχ. κοκκινωπά του *R. zaeae*. Εξάλλου η παρουσία των πολυπύρηνων κυτταρικών διαμερισμάτων στο *Thanatephorus* το βοηθά συχνά στην διαφοροποίησή του από το διπύρηνο *Ceratobasidium* (Parmeter *et al.*, 1967; Andersen, 1996), παρά την πανομοιότυπη μορφολογικά βασιδιοματική δομή τους (Εικόνα 32).



Εικόνα 30: (A) Υφές του *Rhizoctonia solani* που δείχνουν πολλαπλούς πυρήνες, (B) Υφές με μοτίβο δεξιάς γωνίας διακλάδωσης και διαφράγματα, (C) Μυκήλια και σκληρώτια που σχηματίζονται σε PDA, (D) Μονλιοειδή κύτταρα σχήματος βαρελιού σε αλυσίδα, 14 μέρες στους 28°C σε PDA. Πηγή: Alghuthaymi, (2018).



Εικόνα 31 : Υφές του νηματοειδούς μύκητα *Rhizoctonia solani* μετά τη μέθοδο ELP και σάρωση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας εστιασμένου-ιόντος ακτίνας (FIB-SEM). (A) Στον τρόπο σάρωσης SE η περιοχή του ενδιαφέροντος υποδεικνύεται από τον κίτρινο κύκλο. (B) Η περιοχή του ενδιαφέροντος όπως αποικονίζεται στον τρόπο σάρωσης BSE. Τα βέλη σημειώνουν επακριβώς την τοποθεσία των διαφραγμάτων του νηματοειδούς μύκητα. (C) Η περιοχή του ενδιαφέροντος όπως αποικονίζεται στις (A), (B) από ένα μέρος των υφών του *Rhizoctonia solani* μετά από FIB-SEM σε τρόπο σάρωσης BSE. Σε αυτή τη χαμηλή μεγέθυνση η εικόνα δείχνει ξεκάθαρα τα δολιπόρα διαφράγματα (κύκλος). (D) Υψηλότερη μεγέθυνση του (C) που δείχνει ένα μέρος του μυκητιακού κυττάρου, με μεταξύ άλλων τα δύο διατηρητά καλύματα των διαφραγματικών πόρων (βέλη) να υπερφαλαγγίζουν (flanking) το δολιπόρο διάφραγμα (S) και τα σώματα των λιπιδίων (LB). Πηγή: Van Donselaar *et al.*, (2018).



Εικόνα 32: (A) Βασίδια και βασιδιοσπόρια του *Ceratobasidium* sp. (B) Βασίδια και βασιδιοσπόρια του *Thanatephorus cucumeris*. Πηγή: Γιανακοπούλου (2005).

Το *Rhizoctonia solani* (συν. *Thanatephorus cucumeris*) εκ των πιο μελετημένων ειδών του γένους *Rhizoctonia* (Sneh *et al.*, 1991), εμφανίστηκε και περιγράφηκε από τον Kuhn (1858) ως μύκητας που παρατηρήθηκε σε άρρωστους κονδύλους πατάτας. Η περιγραφή του Kuhn για τα είδη, καθώς και τα συμπτώματα που προκάλεσαν στους κονδύλους, ήταν ασαφής από άποψη ορισμένων στοιχείων μόλυνσης βάσει της αναφοράς του ως «σώματα σαν σπόρια» (Parmeter & Whitney, 1970). Αυτή η έλλειψη ευκρίνειας στη ταυτοποίηση του μύκητα σε συνδυασμό με ένα μη υπάρχον τύπο υλικού που θα επέτρεπε την ορθή ταυτοποίηση του μύκητα, κατέληξε σε σύγχυση μεταξύ μεταγενέστερων επιστημόνων που περιέγραψαν τα είδη εντός του γένους *Rhizoctonia* (Duggar, 1915).

Ο Duggar (1915) στην προσπάθειά του για ορθή ταυτοποίηση εκπόνησε μια πλήρη ανασκόπηση της έννοιας του είδους, παρέχοντας αναλυτικές πληροφορίες στα σημαντικά μορφολογικά χαρακτηριστικά διαχωρίζοντας το αφενώς από άλλα είδη μυκήτων, αφετέρου περιγράφοντας και τα είδη των ασθενειών που προκαλεί. Επομένως βάσει της έρευνας των Duggar (1915) και Parmeter & Whitney (1970), τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν το *R. solani* περιλαμβάνουν υφές με διαφράγματα, πολυπύρρηνα κύτταρα σε νεαρές υφές, ορθογώνια διακλάδωση υφών, καφέ χρωματισμό των ώριμων υφών, κατασκευή στο σημείο της διακλάδωσης, δολίπορα διαφράγματα που επιτρέπουν την απεριόριστη μετακίνηση του κυτοπλάσματος, μιτοχονδρίων και πυρήνων, από κύτταρο σε κύτταρο, την παραγωγή μονιλιοειδών κυττάρων και σκληρωτίων ομοιόμορφης υφής. Τα κονίδια, οι κρίκοι, τα ριζόμορφα, οι χρωματισμοί των υφών πέραν του καφέ και οι σεξουαλικές καταστάσεις πέραν του *T. cucumeris* είναι χαρακτήρες που δεν είχαν παρατηρηθεί.

Κατά τη πάροδο των χρόνων ανατέθηκαν περισσότερα του ενός ονόματα σε σε πολλούς μύκητες όπως οι φυτοπαθογόνες ομάδες εξαιτίας της ταυτοποίησης των σεξουαλικών και ασεξουαλικών σταδίων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή σε περιόδους κατά την ανακάλυψη. Το σύστημα ονοματολογίας για αυτούς τους πλειομορφικούς μύκητες έχει αναμφίβολα γίνει ένα ζήτημα αντιπαράθεσης μεταξύ των μυκητολόγων, καθώς πρόσφατα μοριακά δεδομένα ξεκίνησαν να επισημαίνουν τη αδυναμία της χρήσης μορφολογικών χαρακτηριστικών για την απόδοση επιστημονικών ονομάτων στους μύκητες. Σύμφωνα με τους νέους κανόνες ταξινόμησης που καθιερώθηκαν από το συνέδριο του Άμστερνταμ (Hawksworth, 2011), αποφασίστηκε ότι τα μελετημένα είδη εντός του γένους *Rhizoctonia* περιγράφηκαν αρχικά από τον de Candolle (1815), ενώ το *T. cucumeris* από τον Donk (1956).

1.2.2 Αναπαραγωγή στο *Rhizoctonia solani* και μηχανισμός της παραλλαγής

Στην προσπάθεια να ξετυλίξουν τις βάσεις για την κατανόηση των παραλλαγών που παρατηρούνται σε αυτό το είδος, οι Flentje *et al.*, (1963, 1970) μελέτησαν την συμπεριφορά του πυρήνα κατά την μιτωτική και μειωτική διαίρεση και παρείχαν μια λεπτομερή περιγραφή των διαδικασιών οδηγώντας στην διαίρεση των πολυπύρηνων βλαστικών κυττάρων και αυτών που σχετίστηκαν στον σχηματισμό των σεξουαλικών σπορίων από τις βλαστικές δομές. Εν ολίγοις στις βλαστικές υφές η διαίρεση του πυρήνα είναι κυρίως συζευγμένη, υπονοώντας ότι η ταυτόχρονη διαίρεση των πυρήνων υφίσταται μέσα σε κάθε κυττάρου, παράγοντας εις διπλούν τον αριθμό των θυγατρικών κυττάρων όπως του διαιρούμενου πυρήνα, εκ των οποίων οι μισοί παρατηρήθηκαν να μεταναστεύουν ενώπιον του νεοαναπτυσσόμενου πλευρικού κλάδου, με το διάφραγμα να διαχωρίζει το άλλο μισό καθώς μετακινούνται ενώπιον της κύριας υφής. Για την πιθανή εξήγηση των διαφορών στον παρατηρούμενο αριθμό πυρήνων μεταξύ νεαρών και γηραιότερων κυττάρων προτάθηκε ο άνισος διαχωρισμός των θυγατρικών πυρήνων κατά την μιτωτική διαίρεση σε κάθε μεμονωμένο κύτταρο.

Για να ξεκινήσει η σεξουαλική αναπαραγωγή γενετικά συμβατοί πυρήνες που είναι παρόντες στα πολυπύρηννα βλαστικά κύτταρα συζεύγονται στα αρχικά στάδια καταλήγοντας στον σχηματισμό βασιδίων, τα κύτταρα εκ των οποίων γεννώνται αργότερα τα σεξουαλικά σπόρια (*βασιδιοσπόρια*). Αυτή η σύζευξη παράγει διπύρηννα προ-βασιδιακά κύτταρα τα οποία διαχωρίζονται από διαφράγματα. Υπό των σχηματισμό των βασιδίων, οι συζευγμένοι πυρήνες μέσα σε κάθε βασίδιο υποβάλλονται σε καρυογαμία, μια διαδικασία του που σχετίζεται με την ένωση των σεξουαλικά συμβατών πυρήνων για τον σχηματισμό διπλοειδών πυρήνων. Η εν τέλει μείωση των διπλοειδών πυρήνων καταλήγει στον σχηματισμό τεσσάρων απλοειδών πυρήνων, οι οποίοι αργότερα αναπτύσσονται σε απύρηννα βασιδιοσπόρια, γεννημένα στο βασίδιο μέσω τεσσάρων δομών σαν βλαστοί εν ονόματι στερίγματα. Όπως ακριβώς συμβαίνει και σε άλλους βασιδιομύκητες η πλασμογαμία των βλαστικών απύρηννων σπορίων παράγει πολυπύρηννα κύτταρα.

Οι απομονώσεις πεδίων (*fields*) του *R. solani* είναι κυρίως ετεροκαρυστικές δηλαδή διαφορετικού πυρήνα, υπονοώντας την παρουσία τουλάχιστον δύο γενετικά διαφορετικών πυρήνων μέσα σε κάθε διαμέρισμα πολυπύρηνου κυττάρου. Ο σχηματισμός ετεροκαρύου πιθανότατα λόγω της πλασμογαμίας μεταξύ γενετικά διαφορετικών ομοκαρυστικών μυκηλίων, έχει εμπλακεί ως πιθανός μηχανισμός της παραλλαγής σε αυτά τα είδη (Flentje & Stretton, 1964). Τα πρώτα δεδομένα προς απόδειξη της ετεροκαρυστικής φύσης του *R. solani* επήλθαν από πειράματα των Whitney & Parmeter (1963) και Anderson *et al.*, (1972), όπου καλλιέργειες μεμονωμένων σπορίων από απομονώσεις *field* επέφεραν τον σχηματισμό ετεροκαρύων δείχνοντας διαφορετικά χαρακτηριστικά καλλιέργειας από αυτά των γονικών ομοκαρύων.

Περαιτέρω ενίσχυση αυτής της θεωρίας παρουσιάστηκε από τους Bolkan & Butler (1974), όπου οι ετεροκαρυστικές απομονώσεις πεδίων παρατηρήθηκαν όχι μόνο να σχηματίζουν μορφολογικά και παθογενετικά διακριτά ετεροκάρυα όταν συζεύγονταν με συμβατά ετεροκάρυα, αλλά και να σχηματίζουν ορατά ετεροκάρυα όταν συζεύγονταν με συμβατά ομοκάρυα. Πέραν της ετεροκαρύωσης, ο σεξουαλικός ανασυνδυασμός (*μείωση*) και η μετάλλαξη μπορούν επίσης να συνεισφέρουν σημαντικά στην γενετική παραλλαγή του *R. solani* (Flentje & Stretton, 1964), αν και τα δεδομένα για αυτούς τους δύο μηχανισμούς υπό φυσικές συνθήκες field είναι περιορισμένα.

Κάποιες μελέτες που διευκρινίζουν τον ρόλο των σεξουαλικών ανασυνδυασμών στην δημιουργία παραλλαγής αναιρέθηκαν κυρίως από την ανικανότητα να επάγει υπό εργαστηριακές συνθήκες την σπορίωση των περισσότερων απομονώσεων πεδίων για γενετική ανάλυση. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην κυρίαρχη λειτουργικότητα των ειδών ως ασεξουαλικοί οργανισμοί στη φύση (Adams, 1996; Cubeta & Vilgalys, 1997), όσο και στις αυτο-στείρες συνθήκες πολλων field απομονώσεων (Ogoshi, 1987).

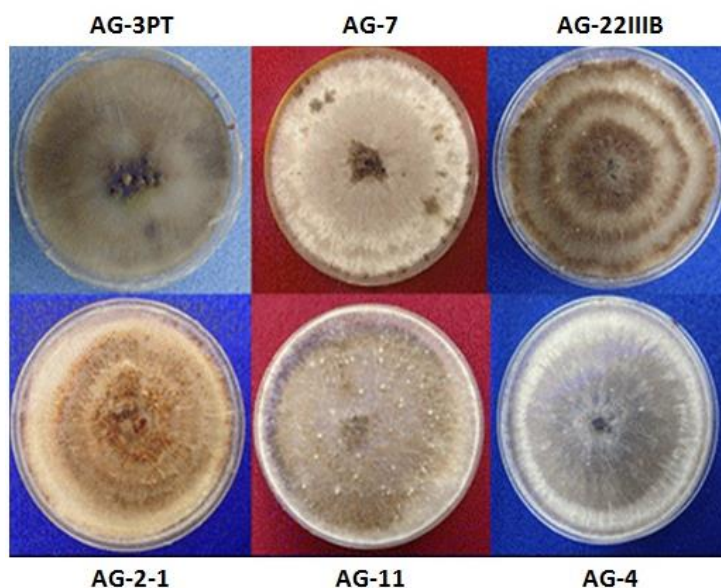
1.2.3 Ομάδες Αναστόμωσης (AGs) και σχηματισμός ετεροκαρύων

Η εντυπωσιακή παραλλαγή στην μορφολογία των αποικιών, εύρος ξενιστών, επιθετικότητα, διατροφικών απαιτήσεων και άλλων χαρακτηριστικών των απομονώσεων που αναγνωρίζονται ως *R. solani*, οδήγησε σε ένα σύστημα ταξινόμησης βάσει της αναστόμωσης των υφών. Αυτό το σύστημα ομαδοποίησης χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να ομαδοποιήσει απομονώσεις αυτών των ειδών περίπου οκτώ δεκαετίες πριν (Matsumoto *et al.*, 1932) και από τότε έχει τροποποιηθεί από διάφορους συγγραφείς (Richter & Schneider, 1953), (Parmeter *et al.*, 1969) για να καθιερωθεί επί του παρόντος η έννοια των ομάδων αναστόμωσης (AGs).

Η ομαδοποίηση αναστόμωσης όχι μόνο εξυπηρέτησε ως το πιο σημαντικό κριτήριο για την οριοθέτηση των απομονώσεων που αναγνωρίζονται ως μέλη αυτού του είδους, αλλά αποκάλυψε επίσης ότι ο *R. solani* είναι ένα σύμπλοκο ειδών αποτελούμενο από μη-διασταυρούμενους (Anderson *et al.*, 1972) ή αναπαραγωγικά απομονωμένους (Anderson, 1984) πλυθησμούς. Χρησιμοποιώντας αυτό το σύστημα ομαδοποίησης οι γενετικά πανομοιότυπες απομονώσεις που υποβάλλονται εύκολα σε ένωση υφών και η ανταλλαγή πυρήνων και κυτοπλασμάτων τοποθετούνται στην ίδια AG, ενώ οι απομονώσεις που αποτυγχάνουν να επιτεύξουν επαφή υφών, ένωση υφών και πυρηνική ανταλλαγή θεωρούνται μέλη διαφορετικών AGs. Επί του παρόντος έχουν ταυτοποιηθεί για το *R. solani* 14 ομάδες αναστόμωσης (AGs 1 έως 13 και AG-BI) και κάποιες από τις ομάδες (AGs 1,2,3,4,6,8,9) έχουν περεταίρω διαιρεθεί σε υποομάδες βάσει των διαφορών τους σε χαρακτηριστικές καλλιέργειας, ξενιστή, φυσιολογία και βιολογία (Anderson *et al.*, 2017)

(Πίνακας 15), δηλαδή ως επί το πλείστον βάσει των χαρακτηριστικών πέραν των αντιδράσεων υφικής αναστόμωσης, με την εξαίρεση του AG-2 το οποίο υποδιαιρείται βάσει της συχνότητας των ενώσεων μεταξύ των απομονώσεων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το χαρακτηριστικό κάποιων μελών διαφορετικών AG του *R. solani* που βρέθηκαν στο παρελθόν να έχουν το *T. cucumeris* σαν δικά τους τελειόμορφα (Ogoshi, 1975, 1984), (Kuninaga *et al.*, 1978), (Homma *et al.*, 1983), (Neate & Warcup, 1985), (Carling *et al.*, 1987, 1994) και η διαφοροποίηση βάσει των σεξουαλικών χαρακτήρων δεν είχε αναφερθεί.

Σύμφωνα με τον Ogoshi (1987), αυτή η ανικανότητα διαφοροποίησης των AGs με τη σεξουαλική κατάσταση, μπορεί να αποτελέσει έναν από τους πολλούς λόγους που ο *R. solani* θεωρείται ακόμα ως ξεχωριστό είδος. Στον Πίνακα 14 της λίστας των AGs αναφέρονται και τα συμπτώματα της ασθένειας κάθε AG που καταγράφηκαν σε συγκεκριμένα φυτά ξενιστές. Στην Εικόνα 33 φαίνονται κάποιες AGs που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA και στην Εικόνα 34 η AG-1-IC της παρούσας μελέτης.



Εικόνα 33: Ενδεικτικές ομάδες αναστόμωσης (AGs) του *Rhizoctonia solani* που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA



Εικόνα 34: *Rhizoctonia solani* AG-1-IC που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA

Πίνακας 15: Ομάδες Αναστόμωσης (AGs) και υποομάδες του *Rhizoctonia solani* και οι διάφορες ζημιές που προκαλούν στα φυτά

Ομάδες Αναστόμωσης (υποομάδες)	Βιβλιογραφία AG και καθορισμός υποομάδων	Ασθένειες στα φυτά
AG-1 (IA, IB, IC, ID, IE, IF)	Kuninaga <i>et al.</i> , (2002), Ogoshi (1972), Parmeter <i>et al.</i> , (1969), Priyatmojo <i>et al.</i> , (2001), Richter & Schneider (1953), Watanabe & Matsuda (1966)	Ρύγχος θήκης σόγιας (AG-1-IA, AG-1-IB) (Jones & Belmar, 1989), (Yang <i>et al.</i> , 1990), ρυζιού, βραχάφιας (φύκι mizu) (AG-1-IA) (Ramos-Molina <i>et al.</i> , 2016), καλαμποκιού (AG-1-IA) (Pascual <i>et al.</i> , 2000), πλάγιασμα σε σπυρορόφυτα καρότου (AG1-IC) (Misawa <i>et al.</i> , 2013), κάτω σήψη μαρουλιού (AG1-IB) (Wallon <i>et al.</i> , 2021)
AG-2 (1, t, Nt, 2IIIB, 2IV, 2LP, 3, 4)	Carling <i>et al.</i> , (2002), Hyakumachi <i>et al.</i> , (1998), Kuninaga <i>et al.</i> , (2000), Liu & Sinclair (1991), Ogoshi (1972, 1987), Parmeter <i>et al.</i> , (1969), Richter & Schneider (1953), Watanabe & Matsuda (1966)	Σήψη σπόρου και πρώιμο και όψιμο πλάγιασμα στελέχους, σήψη υποκοτυλίου και ρίζας σόγιας (AG-2-2IIIB) (Dorance <i>et al.</i> , 2003), (Mayolo <i>et al.</i> , 1993a), (Nelson <i>et al.</i> , 1996), σήψη φυλλώματος σόγιας (AG-2-3) (Naito & Kanematsu, 1994), σήψη λαιμού και ρίζας ζαχαροτεύλων (AG-2-2IIIB) (Bolton <i>et al.</i> , 2010), γυμνή έκταση μεγάλης κηλίδας χλοοτάπητα zosia (AG-2-2LP) (Aoyaki <i>et al.</i> , 1998)
AG-3 (TB, PT, TM)	Kuninaga <i>et al.</i> , (2000, 2007), Ogoshi (1972), Parmeter <i>et al.</i> , (1969), Richter & Schneider (1953), Steven-Jonhk <i>et al.</i> , (1993), Watanabe & Matsuda (1966)	Μικρές βλάβες στις ρίζες σόγιας (Nelson <i>et al.</i> , 1996), σήψη λαιμού τομάτας (AG-3- TM) (Misawa & Kuninaga, 2010), σήψη βάσης στελέχους και ρίζας αραβοσίτου, μελιτζάνας (AG-3-PT) (Macormac <i>et al.</i> , 2013) μαύρη κηλίδωση κονδύλου και καρκίνωση στελέχους πατάτας (AG-3-PT) (Tserog, 2010), εναέρια σήψη φύλλων καπνού (AG-3-TB) (Ceresini <i>et al.</i> , 2002)
AG-4 (HGI, HGII, HGIII)	Kuninaga & Yokusawa (1984a), Ogoshi (1972), Parmeter <i>et al.</i> , (1969), Richter & Schneider (1953), Steven-Jonhk <i>et al.</i> , (1993), Watanabe & Matsuda (1966)	Σήψη υποκοτυλίου και πλάγιασμα σόγιας (Yang <i>et al.</i> , 2015), νέκρωση σποροφύτων βαμβάκιου (Rothrock, 1996), σκούρα καφέ κηλίδωση βάσης στελέχους και ρίζας, φαγόπυρου (AG-4-HGIII) (Zhou <i>et al.</i> , 2015), σήψη ρίζας και υποκοτυλίου κρεμμυδιού (Erper <i>et al.</i> , 2006)
AG-5	Ogoshi (1972), Richter & Schneider (1953)	Όψιμο πλάγιασμα στελέχους σόγιας (Zhao <i>et al.</i> , 2005a), σήψη ρίζας και υποκοτυλίου ξηρού φασολιού (karaca <i>et al.</i> , 2002), κηλίδωση φύλλων και σηψηρριζία καπνού (Gonzalez <i>et al.</i> , 2011)
AG-6 (HG-1, GV)	Kuninaga & Yokusawa (1984b), Kuninaga <i>et al.</i> , (1978)	Μη παθογόνο
AG-7	Homma <i>et al.</i> , (1983)	Βλάβες στις ρίζες σόγιας (Baird <i>et al.</i> , 1996)
AG-8-Zg^a (1, 2, 3, 4, 5)	MacNish <i>et al.</i> , (1993), Neate & Warcup (1985)	Σηψηρριζία και έκταση γυμνής λωρίδας σε σιτηρά δημητριακών (σιτάρι, κριθάρι) (Murray & Brennan, 2009, 2010), (Paulitz <i>et al.</i> , 2010), έκταση γυμνής λωρίδας στα όσπρια (ZG1-1), καθυστέρηση εμφάνισης σπορόφυτου, σημαντική σήψη υποκοτυλίου και ρίζας (ZG1-1, ZG5) και όψιμο πλάγιασμα κανόλας (Khangura <i>et al.</i> , 1999)
AG-9 (TP, TX)	Carling & Kuninaga (1990), Carling <i>et al.</i> , (1987)	Αδύναμο παθογόνο, βλάβες στα εναέρια στελέχη πατάτας (Carling <i>et al.</i> , 1987), ζημιά στα σταυρανθή λαχανικά (Sneh <i>et al.</i> , 1991)
AG-10	MacNish <i>et al.</i> , (1995)	Μη παθογόνο
AG-11	Carling <i>et al.</i> , (1994)	Μικρή ζημιά στα σπορόφυτα σόγιας (Carling <i>et al.</i> , 1994), Σηψηρριζία και πλάγιασμα σποροφύτων ζαχαροτεύλων (Moliszewska <i>et al.</i> , 2020)
AG-12	Carling <i>et al.</i> , (1999)	Αποχρωματισμός ιστού και έναρξη νέκρωσης από υποκοτύλιο με περιπτώσεις επέκτασης κάτωθεν της ρίζας ή άνωθεν του στελέχους κουνουπιδιού και ραπανακίου (Carling <i>et al.</i> , 1999)
AG-13	Carling <i>et al.</i> , (2002)	Μη παθογόνο
AG-BI (bridging isolate)	Kuninaga <i>et al.</i> , (1978)	Μη παθογόνο

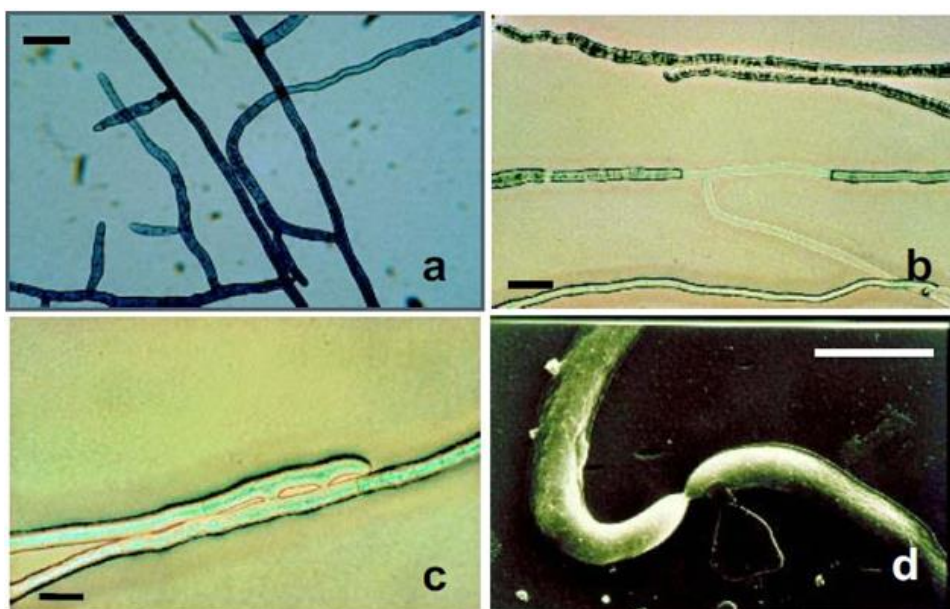
^aZG ομάδα zymogram

1.2.4 Συστήματα ασυμβατότητας και δομή πληθυσμού στο *Rhizoctonia solani*

Παρόλο που η γενετική βάση της αναστόμωσης στο *R. solani* δεν είναι πλήρως κατανοητή, έχει περιγραφεί ως σωματικό ή βλαστικό (ετερογενές) σύστημα ασυμβατότητας (Anderson, 1984), (Worrall, 1997) που περιορίζει την ένωση των γενετικά διαφορετικών ατόμων / απομονώσεων ενός είδους, ως εκ τούτου διατηρώντας την ταυτότητα κάθε ατόμου (Rayner, 1991) και διασφαλίζοντας ένα σταθερό ετεροκάρυο (Anderson, 1982). Η ετερογενής ασυμβατότητα δεν περιορίζεται μόνο στις ετεροκαρυοτικές απομονώσεις πεδίων του *R. solani*, αλλά υφίσταται επίσης και σε συζεύξεις ετεροκαρύου-ομοκαρύου και ομοκαρύου-ομοκαρύου (Anderson, 1984). Στο *R. solani* η ετερογενής και ομογενής ασυμβατότητα είναι γνωστές για την ανεξάρτητη δράση μεταξύ τους (Julian et al., 1996). Ως ετερογενείς λειτουργίες ασυμβατότητας για να αποτρέψουν την ένωση των γενετικά διαφορετικών δευτερογενών (ετεροκαρυοτικών) μυκηλίων, η ετερογενής ασυμβατότητα η οποία ελέγχει την σεξουαλική σύζευξη, λειτουργεί προς περιορισμό του σχηματισμού ενός ετεροκαρύου από δύο πρωτεύοντα (ομοκαρυοτικά) μυκήλια μεταφέροντας πανομοιότυπα αλληλόμορφα στο συγκεκριμένο σημείο του ζευγαρώματος (Worrall, 1997). Ενώ η ετερογενής ασυμβατότητα περιορίζει την μη συγγενική αναπαραγωγή (outbreeding) αποτρέποντας την ύπαρξη γενετικά διαφορετικών πυρήνων μέσα σε ένα κοινό κυτόπλασμα, η ομογενής ασυμβατότητα προωθεί την μη συγγενική αναπαραγωγή και συνεπώς τα απαραίτητα για απόκλιση συμβάντα ανασυνδυασμού (Esser, 2006).

Τα ομογενή ή ετερογενή συστήματα ασυμβατότητας στο *R. solani* έχουν μελετηθεί εκτενώς (Yang et al., 1992) και έχει αναφερθεί ένα σύστημα διπολικής σύζευξης στο οποίο ένα μεμονωμένο ακριβές σημείο με πολλαπλά αλληλόμορφα ελέγχει την σεξουαλική ασυμβατότητα και υπάρχουν δεδομένα ύπαρξης στις AGs 1,4 και 8 (Anderson et al., 1972; Yang et al., 1992). Στην AG-4 δύο στενά συνδεδεμένα γονίδια, συλλογικά αναφερόμενα με τον όρο παράγοντα ασυμβατότητας ετεροκαρύου (παράγων H), ταυτοποιήθηκαν ως γενετικοί καθοριστές για ομογενή ασυμβατότητα, και υπολογίστηκαν 17 διαφορετικοί παράγοντες H να υφίστανται σε φυσικούς πληθυσμούς (Anderson et al., 1972). Ο επιτυχής σχηματισμός ετεροκαρύου υφίσταται ανάμεσα σε συζευγμένα ομοκάρυα που μεταφέρουν διαφορετικούς παράγοντες H και η ετεροκαρυοποίηση χαρακτηρίζεται από την παραγωγή τουφών (tufts) των ετεροκαρυοτικών υφών στον κόμβο της σύζευξης, αν και μεταγενέστερες μελέτες υπέδειξαν την μη αξιοπιστία της παραγωγής τουφών σαν μέτρο σχηματισμού ετεροκαρύου (Cubeta et al., 1993). Η συνεισφορά των παραγόντων H στην μη συγγενική αναπαραγωγή, πυρηνική σύζευξη και σταθερότητα ετεροκαρύου μέσα στην ίδια AG, όπως ομοκάρυα των AG-1 και AG-4, κάθε ένα μεταφέροντας διαφορετικούς παράγοντες H, απέτυχαν να υποβληθούν σε ετεροκαρύωση (Anderson et al., 1972).

Μελέτες που επεξηγούν συστήματα σύζευξης στο *R. solani* έχουν αναιρεθεί από την αδυναμία να επάγουν την καρποφορία σε απομονώσεις πεδίων *in vitro* (Ogoshi, 1987), τις πολυπύρηνες συνθήκες των ετεροκαρυστικών και ομοκαρυστικών στελεχών ταυτόχρονα, καθώς και την έλλειψη των κρίκων (Cubeta & Vilgalys, 1997), χαρακτηριστική ιδιότητα σε όλους τους βασιδιομύκητες που ενίσχυσε την κατανόησή μας στα συστήματα σύζευξης. Πέραν αυτών των περιορισμών μερικές μελέτες ήταν επιτυχείς στην αποκρυπτογράφηση της συμπεριφοράς σύζευξης σε αυτό το σύμπλοκο ειδών. Αρχικές μελέτες ανέφεραν AG-1 και AG-4 να είναι ομοθαλικές ή αυτογόνιμες (Anderson *et al.*, 1972) πιθανότατα λόγω της ομοκαρυστικής καρποφορίας (Adams & Butler, 1982). Μεταγενέστερα πειράματα επιβεβαίωσαν ένα κατά κύριο λόγο ετεροθαλικό διπολικό σύστημα σύζευξης σε αυτές τις AGs (Adams & Butler, 1982) και οι παράγοντες Η θεωρούνται πλέον να είναι το συγκεκριμένο σημείο σύζευξης, συνώνυμα με τα συγκεκριμένα σημεία σύζευξης A και B, χαρακτηρισικά των βασιδιομυκήτων (Adams, 1996). Παρόλο που ο ομοθαλισμός έχει προταθεί στην AG-2 (Stretton *et al.*, 1967; Cubeta & Vilgalys, 1997), ο ομοθαλισμός και ετεροθαλισμός έχουν παρατηρηθεί στην υποομάδα AG-2-2IV (Toda & Hyakumachi, 2006). Επιπλέον παρόλο που ο ετεροθαλισμός προτάθηκε στην AG-8 (Cubeta & Vilgalys, 1997), τα συστήματα σύζευξης σε άλλες AGs είναι επί του παρόντος άγνωστα. Στην **Εικόνα 35** απεικονίζονται οι σχετικές αντιδράσεις αναστόμωσης σε πολυπύρηνη στελέχη *R. solani*.



Εικόνα 35: Αντιδράσεις αναστόμωσης σε πολυπύρηνη στελέχη *Rhizoctonia solani*. (A) Χωρίς ένωση. (B) Ένωση με θάνατο των συντηγμένων κυττάρων. (C),(D) Τέλεια ένωση. Κλίμακες =10 μm . Πηγή: Gonzalez *et al.*, (2006).

Οι Cubeta & Vilgalys (1997) επισήμαναν την σπανιότητα ερευνών που να εστιάζουν στην γενετική πληθυσμών του *R. solani*. Η γενετική δομή έχει καθοριστεί ως «η ποσότητα και η κατανομή της γενετικής παραλλαγής μέσα και μεταξύ πληθυσμών σε ένα είδος» (McDonald & McDermott, 1993), και η αξιολόγηση της γενετικής δομής των μυκητιακών πληθυσμών έχει σοβαρές επιπτώσεις στην πρόβλεψη πως τα παθογόνα θα εξελιχθούν σε ανταπόκριση των πρακτικών διαχείρισης. Μελέτες που διευκρινίζουν την γενετική δομή του πληθυσμού απομονώσεων του *R. solani* δεν είναι μόνο κρίσιμες για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου της σύζευξης και άλλων συστημάτων ασυμβατότητας στην δημιουργία απόκλισης, αλλά μπορούν επίσης να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για το ρίσκο της ανάπτυξης των φυλών, προσαρμογή σε γονίδια ανθεκτικότητας και επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα, ένα φαινόμενο το οποίο γίνεται εκτενές σε άλλα είδη μυκήτων με αυξημένη χρήση μυκητοκτόνων.

Στο *R. solani* έχουν επιτευχθεί μελέτες εκτεταμένης γενετικής απόκλισης πληθυσμού σε έναν αριθμό AGs χρησιμοποιώντας διαφορετικούς γενετικούς δείκτες. Για παράδειγμα η AG-8 αναφέρθηκε να είναι κυρίως κλωνική, αν και μια σημαντική ποσότητα της γονοτυπικής παραλλαγής θα μπορούσε να υπάρξει μεταξύ απομονώσεων που ανακτήθηκαν από την ίδια γεωγραφική τοποθεσία (MacNish *et al.*, 1993; Mathew *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995). Στοιχεία για ταυτόχρονη κλωνική και σεξουαλική αναπαραγωγή έχουν αναφερθεί για πληθυσμούς AG-3 (Justesen *et al.*, 2003; Fiers *et al.*, 2011; Ferrucho *et al.*, 2013). Στην AG-1 η δομή του πληθυσμού έχει αξιολογηθεί σε επίπεδα υποομάδας, ιδίως στους πληθυσμούς της AG-1-IA (παθογόνου σήψης φυταρίων) επηρεάζοντας το ρύζι, αραβόσιτο ή σόγια σε πολλά κράτη της Βόρειας και Νότιας Αμερικής. Επιπλέον διαφορετικοί πληθυσμοί σε αυτή την υποομάδα έχουν δείξει να εκθέτουν δομές πληθυσμού που ποικίλουν από συγγενική σύζευξη (inbreeding) έως μη συγγενική διαστάυρωση (outcrossing) (Rosewich *et al.*, 1999; Bernardes-de-Assis *et al.*, 2008; Gonzalez-Vera *et al.*, 2010). Η δομή πληθυσμών στην AG-4 είναι κυρίως (Cubeta & Vilgalys, 1997), παρόλο που τόσο η σεξουαλική όσο και η ασεξουαλική αναπαραγωγή έχουν αναφερθεί σε απομονώσεις πεδίων από το Ιράν (Haratian *et al.*, 2013). Τέλος, ενώ υπάρχουν διαθέσιμες περιορισμένες πληροφορίες που αφορούν τη δομή πληθυσμού στις υποομάδες της AG-2, έχει προταθεί ένας ανάмикτος τρόπος αναπαραγωγής (Cubeta & Vilgalys, 1997).

1.2.5 Μηχανισμός παθογένειας στο *Rhizoctonia solani*

Τα συμβάντα που τυγχάνουν κατά τη διαδικασία μόλυνσης από *R. solani* περιλαμβάνουν προσκόλληση, διείσδυση, αποίκιση και αντίδραση του ξενιστή (Gonzalez et al., 2006). Στη συγκεκριμένη μελέτη υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα που αποκαλύπτουν τις ομοιότητες επί της μόλυνσης μεταξύ διαφόρων AGs *R. solani* ή παθογόνων ειδών *Ceratobasidium*, οπότε βάσει αυτής θα επισημανθεί μια γενικευμένη περιγραφή στην διαδικασία μόλυνσης.

Όταν οι υφές του *Rhizoctonia* έρθουν σε επαφή με την εξωτερική επιφάνεια ενός συμβατού ξενιστή, υφίσταται ένα φαινόμενο αναγνώρισης που καταλήγει σε άφθονη υφική διακλάδωση και σχηματισμό δομών μόλυνσης. Τα αρχικά βήματα της διαδικασίας μόλυνσης χαρακτηρίζονται από την ταυτόχρονη προσκόλληση των υφών και ενός τροποποιημένου μοτίβου ανάπτυξης, καταλήγοντας σε κατευθυνόμενη ανάπτυξη υφών και σχηματισμό διεισδυτικών υφικών δομών. Οι δομές μόλυνσης που σχηματίζονται μεταγενέστερα επιτρέπουν στον μύκητα να διεισδύσει άθικτο φυτικό ιστό. Η εξειδίκευση ξενιστή καθόρισε τον σχηματισμό βραχέων εξογκωμένων υφών, *appressoria* ή επαναλαμβανόμενων υφικών κλάδων σχήματος T. Σε ακραία μορφή μόλυνσής τους, μπορούν να φανούν σύμπλοκες δομές μόλυνσης ως μαζικά στρώματα μόλυνσης σχήματος θόλου (Εικόνα 36). Στο επόμενο βήμα αρκετά από τα εξογκωμένα άκρα σχηματίζουν ταυτόχρονα «πασσάλους» (pegs) μόλυνσης. Αυτοί οι πάσσαλοι μόλυνσης θα διεισδύσουν την εφυμενίδα και τον επιδερμικό ιστό του κυτταρικού τοιχώματος των φύλλων (Keijer, 1996).

Οι περισσότερες μελέτες της μόλυνσης του *R. solani* έχουν εκπονηθεί με αντιπροσώπους των AG1, 2, 3 και 4. Στην πορεία της μόλυνσης ανταλλάσσονται ουσίες μεταξύ του παθογόνου και του φυτού ξενιστή. Αυτές περιλαμβάνουν υλικά όπως εξωκυτταρικά μυκητιακά ένζυμα και εκκρίματα του ξενιστή. Υπό αυτή την έννοια έχει φανεί ότι κατά τα πρώιμα στάδια μόλυνσης το *R. solani* AG-4 παράγει πηκτινολυτικά και κυτταρολυτικά ένζυμα. Επιπλέον η ενδοπηκτινάση έχει αναφερθεί να σχετίζεται με την αποδόμηση του ιστού σε μετέπειτα στάδια της μόλυνσης (Marcus et al., 1986). Οι Bertagnolli et al., (1996) έχουν ταυτοποιήσει τουλάχιστον 10 διαφορετικά εξωκυτταρικά ένζυμα που παράγονται από το *R. solani* AG 2-2III B σε διαδικασίες μόλυνσης που σχετίζονται με την σηψιρριζία σποροφύτων σόγιας. Εν τέλει έχουν αναφερθεί να εκκρίνονται από αρκετές AGs *R. solani* κι άλλα εξωκυτταρικά ένζυμα όπως πηκτινάση, λυάση πηκτίνης, κυτταράση, φωσφατάση ή μεθυλεστεράση της πηκτίνης (Sherwood, 1966; Lister et al., 1975; Bateria & Basham, 1976; Rioux et al., 2011; Copley et al., 2017) και πολλά άλλα που παρατίθενται στον Πίνακα 16. Επιπλέον τα δεδομένα για τον ρόλο που παίζουν τα πηκτινολυτικά ένζυμα στην διαδικασία μόλυνσης προήλθαν από τις παρατηρήσεις των Weinhold & Bowman (1974), οι οποίοι ανέφεραν ότι μια εξωγενής προμήθεια

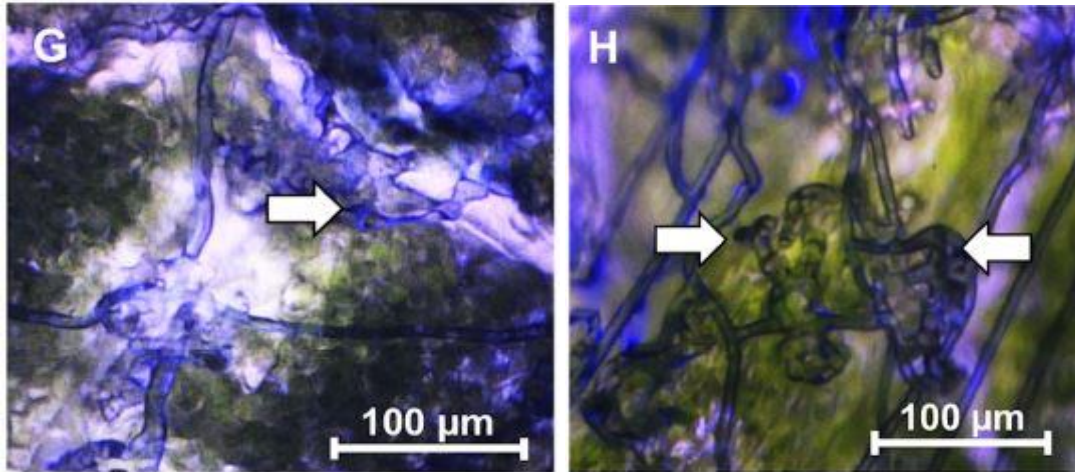
γλυκόζης θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την ανάπτυξη βλάβης στο βαμβάκι.

Επιπλέον η παθογενετική διαδικασία μπορεί να παρεμβληθεί και από την μεθυλ γλυκόζη, προτείνοντας την απόδοση του φαινομένου στην παρεμβολή με βλεννογόνο σχηματισμό και προσκόλληση έτσι ώστε η φυσική επαφή με το φυτό να είναι ανεπαρκής για τη διέγερση του σχηματισμού στρώματος-μόλυνσης (Weinhold & Sinclair, 1996).

Μετά τον σχηματισμό δομής μόλυνσης τα συμβάντα διείσδυσης πραγματοποιούνται άμεσα μέσω της εφυμενίδας και των επιδερμικών κυτταρικών τοιχωμάτων ή πιο σπάνια (όπως στη περίπτωση του *R. solani* AG 1) κατά μήκος των στομάτων, δια λεπτών πασσάλων διείσδυσης διαμέτρου 1,2 μm (Weinhold & Sinclair, 1996). Οι μολύνσεις του *R. solani* μπορούν να παραγάγουν εφυμενάση συνιστώντας την ύπαρξη ενζυματικής συμμετοχής στην διείσδυση της εφυμενίδας. Ωστόσο τα επίπεδα παραγωγής της εφυμενάσης πρέπει να είναι χαμηλά, καθώς η εφυμενίδα του φυτού παραμένει σε γενικές γραμμές άθικτη μετά την διείσδυση, με εξαίρεση των περιοχών της διέλευσης των υφών. Μετά την διείσδυση επιτυγχάνεται η αποίκιση του φυτικού ιστού από την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων ικανών για αποδόμηση αρκετών κυτταρικών τοιχωμάτων πέραν της προώθησης των υφών. Οι Weinhold & Motta (1973) ανέφεραν δεδομένα για ενζυμική δράση αποδόμησης κυτταρικού τοιχώματος πριν την διείσδυση στο *R. solani* AG-4.

Μαζί με την ζημιά στο κυτταρικό τοίχωμα μπορούν να ανιχνευτούν και αλλαγές στο κυτόπλασμα των φλοιωδών κυτάρων πριν παραχθούν συμβάντα αποίκησης. Ως εκ τούτου, επιπροσθέτως της εξώγκωσης και ενζυματικής αποδόμησης των κυτταρικών τοιχωμάτων, οι κυτταρολογικές αλλαγές στα μολυσμένα φυτά περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ζωνών αντίδρασης, πλασμόλυσης και κατάρρευσης ολόκληρου του κυτοπλάσματος.

Από κυτταρολογική άποψη η παθογένεια στο *R. solani* χαρακτηρίζεται από σοβαρή ζημιά ή θανάτωση των φυτικών κυτάρων, πριν ή άμέσως μετά την διείσδυση και αποίκιση. Συνεπώς όπως και σε άλλα μοντέλα παθογόνων μυκήτων η διείσδυση και η αποίκιση του *R. solani* θεωρείται ως πρωταρχική διαδικασία της ανάπτυξης υφών μέσα σε υψηλώς αποδομημένου ή ετοιμοθάνατου φυτικού ιστού, συνιστώντας έναν συνδυασμό ταυτόχρονα από νεκροτροφική και ημι-βιοτροφική συμπεριφορά αυτού του μύκητα έναντι των συμβατών ξενιστών. Τέλος θα μπορούσαν μελλοντικές μελέτες πάνω στην αποίκιση των απομονώσεων *R. solani* από μη συμβατούς ξενιστές να βοηθήσουν στον καθορισμό του πιο ακριβή τύπου τροφικής συμπεριφοράς.



Εικόνα 36: Μικροσκοπικές φωτογραφίες σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης από φύλλα σόγιας κατά την έναρξη νέκρωσης (G) και σε 24 ώρες μετά την έναρξη της νέκρωσης (H) από *Rhizoctonia solani* AG-1-IA όπου τα βέλη δείχνουν τις δομές στρωμάτων μόλυνσης σε ακραία κατάσταση μόλυνσης από τον μύκητα. Πηγή: Corpley *et al.*, (2017).

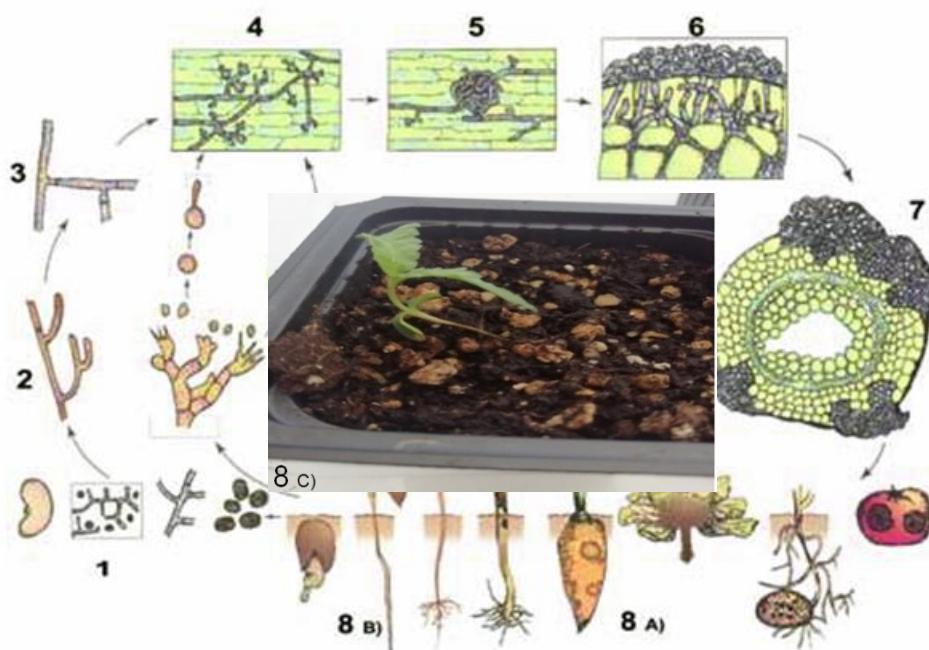
Πίνακας 16: Μοντέλο παθογένεσης στο *Rhizoctonia solani* και τα υποθετικά γονίδια που σχετίζονται με αυτήν σύμφωνα με τις μελέτες των (Rioux *et al.*, 2011; Copley *et al.*, 2017)

Φάση	Υποθετικά γονίδια συσχέτισης παθογένειας	Λειτουργία
Επαφή στον ξενιστή και διείσδυση	Polysaccharide synthase/glycosyltransferase family RAB GTPase Ricin-type-beta-trefoil lectin domain-containing protein Velvet domain-containing protein Pectate lyase domain-containing protein, lipase esterase, polysaccharide esterase, cutinase domain-containing	Επαφή και σχηματισμός appressorium Έκκριση αποδομητικών ενζύμων κυτταρικού τοιχώματος και διακίνηση κυστιδίου Σύνθεση τοξίνης Σύνθεση τοξίνης και δευτερογενών μεταβολιτών, εισβολή στο φυτό Σύνθεση αποδομητικών ενζύμων κυτταρικού τοιχώματος και υδατανθράκων
Προσαρμογή στο περιβάλλον ξενιστή	Glutathione-S-transferase 1 kappa Pyruvate carboxylase ABC μεταφορέας	Απενεργοποίηση και αποδόμηση των τοξικών συστατικών Μεταβολισμός και γλυκονεογένεση Εκροή και προστασία έναντι φυτικών αμυνών
Ανάπτυξη σε νεκρωτικό φυτικό ιστό	Glutathione-S-transferase 1 kappa Pyruvate carboxylase Κύριος διαμεσολαβητής οικογένειας multidrug-υποοικογένειας πρωτεϊνών DHA1 Laccase Glucoside hydrolase	Απενεργοποίηση και αποδόμηση των τοξικών συστατικών Μεταβολισμός και γλυκονεογένεση Εκκριση τοξινών, εκροή και προστασία έναντι φυτικής άμυνας Αποδόμηση λιγνίνης του κυτταρικού τοιχώματος Αποδόμηση κυτταρικού τοιχώματος, αποθήκευση και ανάκτηση ενέργειας
Αξιοποίηση εναλλακτικών πηγών άνθρακα	Isocitrate lyase, malate lyase Glutamate decarboxylase	Απόκτηση ενέργειας κατά την μόλυνση Παρακαμπτικό μονοπάτι GABA επαγωγής αποδομητικών ενζύμων κυτταρικού τοιχώματος

1.2.6 Βιολογικός κύκλος του *Rhizoctonia solani*

Σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής της ασθένειας παίζουν τα σκληρώτια ως διαχειμάζουσα δομή του παθογόνου αλλά και τα χημικά ερεθίσματα που παράγονται από τις ρίζες αναπτυσσόμενου φυτού ξενιστή ή/και από τα φυτικά υπολείμματα που αποσυντίθενται. Ο κύκλος (Εικόνα 37) ξεκινά ως εξής σύμφωνα με τον Ceresini, (2011):

Τα σκληρώτια είτε το μυκήλιο διαχειμάζουν στα φυτικά υπολείμματα, έδαφος ή φυτά ξενιστές. Οι νεαρές υφές και σπανίως τα καρποφόρα βασίδια αναδύονται και παράγουν μυκήλια και σπανίως βασιδιοσπόρια. Η πολύ σπάνια παραγωγή βλαστούμενων βασιδιοσπορίων διεισδύει το στόμα, όπου τα μυκήλια προσγειώνονται πάνω στην φυτική επιφάνεια και εκκρίνουν τα απαραίτητα ένζυμα πάνω στην επιφάνεια του φυτού για να ξεκινήσει η εισβολή στο φυτό ξενιστή. Μετά την επιτυχή εισβολή των μυκηλίων στον ξενιστή σχηματίζονται νεκρώσεις και σκληρώτια εντός και γύρω από τον προσβεβλημένο ιστό, οδηγώντας στα διάφορα συμπτώματα που σχετίζονται με την ασθένεια όπως σήψη ριζικών οργάνων, λαιμού, πλάγιασμα στελέχους και σήψη εναέριων τμημάτων του φυτού και η διαδικασία επαναλαμβάνεται εκ νέου.



Εικόνα 37: Κύκλος ζωής του *Rhizoctonia solani*. (1) Το μυκήλιο και τα σκληρώτια διαχειμάζουν στα φυτικά υπολείμματα, έδαφος ή φυτά ξενιστές. (2) Οι νεαρές υφές αναπτύσσονται σταδιακά σε (3) παλαιότερο μυκήλιο που (4) αποικίζει στην επιφάνεια του φυτού και (5) παράγει στρώματα μόλυνσης. Αυτό επιτρέπει (6) στο μυκήλιο να εισβάλλει στον ξενιστή. (7) Νεκρώσεις και σκληρώτια σχηματίζονται μέσα και πάνω στους ιστούς του φυτού ξενιστή που μπορεί να οδηγήσει σε (8A) σήψη λαιμού και ρίζας ή (8B) πλάγιασμα στελέχους (8C). Πηγή: Agrios, (2006).

1.2.7 Φυτοπροστασία έναντι του *Rhizoctonia solani*

Η προστασία των φυτών από την δράση του *R. solani* σχετίζεται με μεθόδους διαχείρισης και ελέγχου του μύκητα που αφορούν κατά κύριο λόγο προληπτικά μέτρα και δευτερευόντως κατασταλτικά μέτρα. Η υιοθέτηση αρκετών μέτρων ελέγχου περιλαμβάνει τη χρήση καθαρών πιστοποιημένων σπόρων, απαλλαγμένων από μολύσματα, απολυμασμένων γεωργικών εργαλείων και υλικών, καθαρισμός υπολειμμάτων προηγούμενης καλλιέργειας, η διαχείριση σπόρων με μυκητοκτόνα. Επιπλέον υπάρχει η περιορισμένη δυνατότητα χημικής φυτοπροστασίας. Πολύ σημαντική είναι η εφαρμογή φυσικών βιοδιεγερτών όπως εξετάζονται στη παρούσα μελέτη και αφορούν μεθόδους βελτίωσης θρέψης των φυτών ή βιολογικής αντιμετώπισης εκμεταλλεόμενες τις κατασταλτικές ιδιότητες των εδαφών με την εφαρμογή ανταγωνιστικών μικροοργανισμών προς τον *R. solani*, στις οποίες εκπονήθηκαν πολλές έρευνες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και θα αναφερθούν παρακάτω.

Για ένα νεκροτροφικό παθογόνο όπως ο *R. solani* με ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, η προσέγγιση της ολοκληρωμένης διαχείρισης είναι αναμφίβολα αναποτελεσματική για διάφορους λόγους. Πρώτον η δυνατότητα διαχείμασης ως μακράς διάρκειας σκληρώπια στο έδαφος ή ως μυκήλια στα υπολείμματα της καλλιέργειας είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα του μύκητα. Δεύτερον οι απομονώσεις από μια ομάδα AG μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές μολύνσεις σε ένα μεγάλο εύρος καλλιεργειών, κάτι που παρατηρήθηκε κυρίως σε καλλιέργειες που διατηρούνται μέσω συστήματος εναλλαγής. Για παράδειγμα ορισμένες AGs που ήταν παθογόνες στη σόγια, προκάλεσαν σημαντικές μολύνσεις στα ζαχαρότευτλα, ξηρά φασόλια, μουστάρδα και λινάρι, όλα εκ των οποίων καλλιεργήθηκαν με σύστημα εναλλαγής στη σόγια (Nelson et al., 1996). Στην ίδια μελέτη βρέθηκαν απομονώσεις του AG-2-2III B να παράγουν σοβαρά συμπτώματα στον αραβόσιτο που αποτελεί σημαντική καλλιέργεια συστήματος εναλλαγής για τις περιοχές των βόρειων και κεντρικών περιοχών Η.Π.Α όπου καλλιεργείται η σόγια. Παρόλο που η εναλλαγή καλλιέργειας μπορεί να εξυπηρετήσει στην μείωση του μολυσματικού φορτίου στο έδαφος, οι παραπάνω λόγοι της δυνατότητας διαχείμασης σε σκληρώπια και εύρους ξενιστών καθιστούν όλη αυτή την ιδέα ως αναποτελεσματική στρατηγική διαχείρισης και επισημάνουν την ανάγκη για άλλες αποτελεσματικές επιλογές διαχείρισης.

1.2.7.1 Ενδεχόμενο χρήσης ανθεκτικών ποικιλιών

Η χρήση ανθεκτικών ποικιλιών όπου καθίσταται εφικτή δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για την διαχείριση του *R. solani* (Ayayi-Oyentude & Bradley 2017). Για την βιομηχανική κάνναβη δεν έχουν γίνει μελέτες προτίμησης συγκεκριμένων ποικιλιών με ενδεχόμενη ανθεκτικότητα στο *R. solani*. Ωστόσο σε διάφορες χώρες κυκλοφορούν εμπορικές ποικιλίες φυτών μεγάλης οικονομικής σημασίας πχ. σόγιας που πωλούνται από εταιρείες σπόρων και αγοράζονται από τους παραγωγούς με την ιδιότητα της ανθεκτικότητας σε ορισμένους εχθρούς και ασθένειες (Chawla *et al.*, 2013). Ωστόσο δεν διατίθενται επί του παρόντος ποικιλίες σόγιας εμπορεύσιμες ως ανθεκτικές στη σήψη υποκοτυλίου και ρίζας από ριζοκτονίαση (Bradley *et al.*, 2001).

Παρόλο που ταυτοποιήθηκαν σε θερμοκήπια και δοκιμές πειραμάτων αγρού φυτά με προσθήκες μικροβιακών παραγόντων και εμπορικές ποικιλίες με μέτρια ή εν μέρει ανθεκτικότητα, που θα μπορούσαν να εξυπηρετήσουν ως ενδεχόμενες πηγές γονιδίων ανθεκτικότητας (Bradley *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2005b), δεν ταυτοποιήθηκαν τα υποθετικά αυτά γονίδια ανθεκτικότητας καθώς και οι αντίστοιχες τοποθεσίες των χρωμοσωμάτων, καθιστώντας πολύ δύσκολη την καθιέρωση αυτών των δυνητικά ανθεκτικών πηγών. Το γονίδιο R που εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα σε κάθε ασθένεια ριζοκτονίασης είναι απόν (Sweetingham, 1996) και η ανθεκτικότητα στη σήψη ρίζας και υποκοτυλίου ριζοκτονίασης κληρονομείται ποσοπικά (Bradley *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005b). Παρόλο που ταυτοποιήθηκαν στο «*Plant Introduction*» (*PI*) σόγιας 442031 (Zhao *et al.*, 2005b) κάποιοι σημαντές απλών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (*SSR*) με μέτρια ανθεκτικότητα στη σήψη υποκοτυλίου και ρίζας από ριζοκτονίαση (*Satt281*, *Satt177*, *Sat245*), αυτοί σχετίστηκαν μόνο με την ανθεκτικότητα σε μια απομόνωση του AG-4. Σε γενικές γραμμές οι σημαντές που αναπτύσσονται για έναν παθότυπο, μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμοι σε τοποθεσίες που υφίστανται άλλοι παθότυποι, εκτός όταν η ανθεκτικότητα απονέμεται από το ίδιο γονίδιο (Mohan *et al.*, 1997).

Παρόλο που σε παραδείγματα μελετών έχουν αναφερθεί απομονώσεις του AG-2-2IIIΒ στις περιοχές των Ιλινόι, Οχάιο και στο Οντάριο από τους (Liu & Sinclair, 1991; Dorrance *et al.*, 2003), (Zhao *et al.*, 2005a), ανακτήθηκαν με μεγάλη συχνότητα από τα νεκρά φυτά σόγιας και παθογενετικές απομονώσεις του AG-4 στη Φλόριντα, Αϊόβα, Βόρεια Ντακότα και Μινнесότα (Ploetz *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1996; Rizvi & Yang, 1996; Zhao *et al.*, 2005a). Οι Απομονώσεις AG-5 της ίδιας μελέτης (Zhao *et al.*, 2005a) σχετίστηκαν και αυτές με την μόλυνση σόγιας στη Καναδέζικη επαρχία του Οντάριο, Μινнесότα και Βόρεια Ντακότα αν και βρέθηκαν να είναι λιγότερο επιθετικές στο φυτό από ότι άλλες AGs (Nelson *et al.*, 1996). Δεδομένης της δυναμικής των ποικίλων τύπων AG να προκαλούν σοβαρή ζημιά σε σπορόφυτα σόγιας, αλλά και των διαφορών στην επιθετικότητα εντός και μεταξύ των AGs (Bolkan & Ribeiro, 1985; Muyolo *et al.*, 1993a; Nelson *et al.*, 1996; Dorrance

et al., 2003; Zhao *et al.*, 2005a), είναι πολύ πιθανό ότι η ανθεκτικότητα σε αυτές τις διαφορετικές AGs μπορεί να απονέμεται από διαφορετικά γονίδια. Επιπλέον μπορεί να υπάρχουν επιπρόσθετα γονίδια παρόντα σε άλλους γονοτύπους σόγιας πέραν της *PI 442031* όπου ταυτοποιήθηκαν οι τρεις σημαντές SSR.

Άλλη μία λεπτομέρεια άξια αναφοράς είναι εν αντιθέσει της μέτριας ανθεκτικότητας του γονιδίου R η οποία παρατηρείται να είναι εξειδικευμένη από τη φυλή, η ποσοτική ανθεκτικότητα θεωρείται μη εξειδικευμένη από τη φυλή (Vanderplank, 1968). Ωστόσο σε κάποια συστήματα παθογένειας έχει ταυτοποιηθεί η ποιοτική απομόνωση (specificity isolation) μέσω της χαρτογράφησης θέσεων ποσοτικών χαρακτήρων (QTL) (Arru *et al.*, 2003; Calenge *et al.*, 2004; Darvishzadeh *et al.*, 2007; Marcel *et al.*, 2008) καθιστώντας το ενδεχόμενο ανίχνευσης των *R. solani* AG-εξειδικευμένων QTLs στη σόγια εφικτό.

Εν κατακλείδι η ανθεκτικότητα των φυτών στο *R. solani* είναι βραχυπρόθεσμη και ελάχιστα κατανοητή και ως εκ τούτου χρίζεται αναποτελεσματική.

1.2.7.2 Καλλιεργητικά μέτρα διαχείρισης

Τα καλλιεργητικά μέτρα που εφαρμόζονται για την διαχείριση του *Rhizoctonia solani* είναι:

1. Ηλιοαπολύμανση του εδάφους για καταστροφή των υπολειμμάτων και σκληρωτίων του μύκητα που διαχειμάζουν στο έδαφος και στα φυτικά υπολείμματα.
2. Αποφυγή επαφής των καρπών στο έδαφος με κατάλληλη υποστύλωση των σολανωδών φυτών, δεδομένου ότι ο *R. solani* έχει ταυτόχρονη υπόγεια και επίγεια δράση.
3. Μείωση της υγρασίας του σπορείου, αγρού και θερμοκηπίου με α) αραιή σπορά και φύτευση, β) σωστή χρήση του νερού άρδευσης (δόση, συχνότητα) και γ) καλό αερισμό.
4. Χρησιμοποίηση φυσικών κατασταλτικών εδαφών στα οποία η κατασταλτική ιδιότητα στη ριζοκτονία σχετίζεται με την παρουσία αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων όπως ανταγωνιστικών προς τον *R. solani* μικροοργανισμών, παραδείγματα των οποίων αναφέρονται στην ενότητα 1.5.2.

1.2.7.3 Χημική καταπολέμηση

Σε γενικές γραμμές η χημική καταπολέμηση του *R. solani* είναι δύσκολη και περιορισμένη. Όπως πολλά παραδοσιακά απολυμαντικά εδάφους σαν το βρωμιούχο μεθύλιο έχουν καταργηθεί για χρήση λόγω της υψηλής τοξικότητας για τα έμβια όντα πανίδας και μικροβιακής χλωρίδας του εδάφους και του περιβάλλοντος, έτσι και διάφορα τοξικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανακαλούνται της άδειας διάθεσης και εφαρμογής.

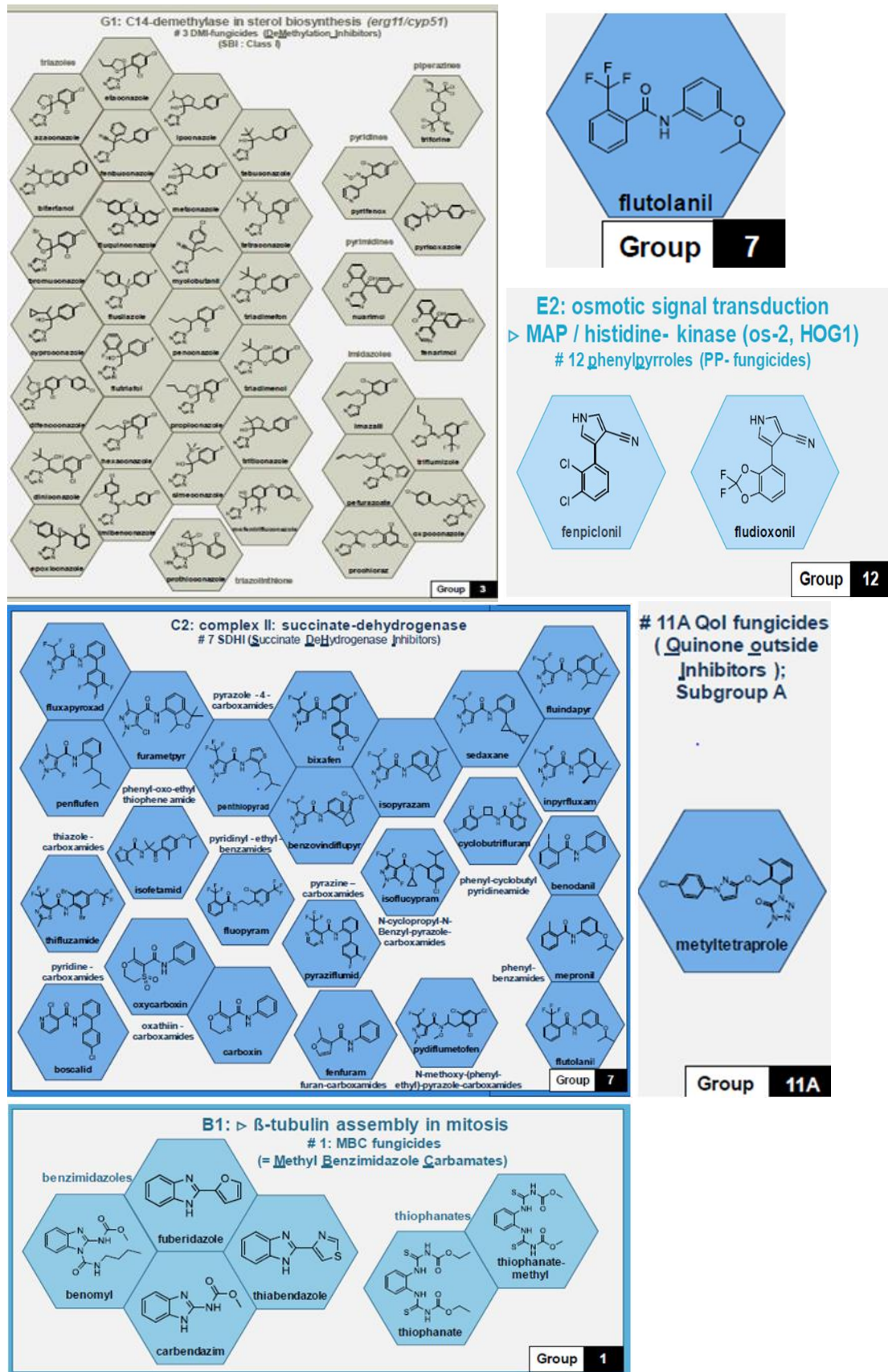
Επιπλέον η έλλειψη εμπορικά διαθέσιμων ποικιλιών με υψηλή ανθεκτικότητα και η μη ύπαρξη προσπαθειών ανάπτυξης ανθεκτικών γονοτύπων καθιστούν πιο διαδεδομένη την διαχείριση των σπόρων με μυκητοκτόνα, η οποία προσφέρει προστασία τόσο στον σπόρο όσο και στα σπορόφυτα κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης (Kataria & Gisi, 1996; Dorrance *et al.*, 2003). Οι μεταχειρίσεις σπόρων όχι μόνο προστατεύουν τα βλαστάνοντα σπορόφυτα από πρώιμα πλαγιάσματα, αλλά επίσης βοηθούν στην εξασφάλιση της ανάπτυξης υγιούς ριζικού συστήματος που επιταχύνει την ανάπτυξη και ευδοκίμηση, καθιστώντας τα φυτά λιγότερο ευάλωτα στη μόλυνση. Παρομοίως η ραγδαία καθιέρωση των μεταχειρισθέντων σπόρων μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση διακοπής του φωτός, στην επισκίαση ζιζανίων, στη μείωση απώλειας υγρασίας και στην αύξηση της απόδοσης.

Υπάρχουν μυκητοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες που ποικίλουν στους βιοχημικούς μηχανισμούς δράσης και έχουν άδεια έγκρισης για την διαχείριση ασθενειών σε σπορόφυτα κάποιων φυτών. Στην περίπτωση της σόγιας υπάρχουν τέσσερις χημικές ομάδες που επιτρέπονται στην Αμερική και επί του παρόντος χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο σήψης ρίζας/υποκοτυλίου από ριζοκτονία, οι οποίες περιλαμβάνουν τους **εξωτερικούς αναστολείς κινόνης (QoIs)** όπως azoxystrobin, pyraclostrobin και trifloxystrobin, **αναστολείς δι-υδρογονάσης του σουκινικού οξέος (SDHIs)** όπως carboxin, penflufen και sedaxane, **αναστολείς διμεθυλίωσης (DMIs)** όπως ipconazole και prothioconazole και **φαινυλοπυρρόλες (PP)** όπως fludioxonil (της ομάδας 12, E2: **μεταγωγής οσμωτικού σήματος**) (Εικόνα 38).

Κάποια χημικά μυκητοκτόνα που εφαρμόζονται σε περιπτώσεις εκδήλωσης συμπτωμάτων που επιτρέπονται προς το παρόν στην Ελλάδα είναι οι δ.ο. **flutolanil** διασυστηματικής δράσης, χημικής ομάδας 7 των benzanilide· μυκητοκτόνων μηχανισμού δράσης *SDHIs* (βάση δεδομένων μυκητοκτόνων *Frac.info/mode-of-action*) με εφαρμογή σε πιπεριές υπαίθρου, πατάτες και αγκινάρες θερμοκηπίου ή υπαίθρου (ΥΠΑΑΤ, 2016) της οποίας η άδεια τροποποιήθηκε ως προς το φάσμα δράσης σε ήσσονος σημασίας χρήση (άρθρο 51 του Ν. 4036/2012) προσθέτοντας τα ψυχανθή κουκιά, φακές, αρακά και φασόλια υπαίθρου και η δραστική ουσία **thiophanate methyl** διασυστηματικής δράσης, χημικής ομάδας 1 των Methyl Benzimidazole Carbamates (*MBC*)· **πρωτεϊνών κυτταροσκελετού και κίνησης** που αφορούν την **συναρμολόγηση b-tubulin στην μίτωση** (βάση δεδομένων

μυκητοκτόνων *Frac.info/mode-of-action*), με εφαρμογή σε πεπόνι, καρπούζι και καλλωπιστικά φυτά έναντι διαφόρων ειδών *Rhizoctonia* της οποίας η άδεια αρχικά ανακαλείται τον 04/2021 (ΥΠΑΑΤ, 2020) (Εικόνα 38). Επιπλέον υπάρχει και η δραστική ουσία **8-hydroxyquinoline** διασυστηματικής δράσης για προληπτική και κατασταλτική εφαρμογή με τρόπο δράσης την χηλοποίηση διαφόρων μετάλλων, απαραίτητων για τον μεταβολισμό του *R. solani* (University of Hertfordshire, 2021) και εφαρμόζεται σε θερμοκηπιακές καλλιέργειες όπως πατατοσπόρου (*απολύμανση*), πατάτας, φακών, αγγουριού, αρακά, αγκινάρας, καρπουζιού, πεπονιού, κολοκύθας, πιπεριάς, ξηρού φασολιού, πράσινου φασολιού, κουκιών, μπιζελιού και κολοκυθιού (ΥΠΠΑΤ, 2016) της οποίας η άδεια ανακαλείται τον 02/2022.

Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 1.1.2 στην Ελλάδα δεν υπάρχει εγκεκριμένο κάποιο μυκητοκτόνο σκεύασμα που να εφαρμόζεται στην βιομηχανική ή φαρμακευτική κάνναβη, ενώ σε κάποιες πολιτείες των Η.Π.Α. όπως στην Καλιφόρνια επιτρέπονται μόνο αυτά τα οποία ταξινομούνται σε ασφαλείς χρήσεις για τον άνθρωπο και το περιβάλλον ή μειωμένης επικινδυνότητας, καθιστώντας τα κατάλληλα εφαρμογής σε βιολογικές καλλιέργειες. Η λίστα του σχετικού Πίνακα 2 περιλαμβάνει βότανα, βοτανικά εκχυλίσματα, έλαια φυτών, άλατα ανόργανων συστατικών και μικροοργανισμούς για βιολογική αντιμετώπιση.



Εικόνα 38: ταξινόμηση μυκητοκτόνων κατά FRAC που εφαρμόζονται έναντι του *Rhizoctonia solani*. Ομάδες: 3 (DMIs), 12 (φαινολοπυρρόλες) 7 (SDHIs), 11A (QoIs). Δ.ο: thiophanate methyl, flutolanil, fludioxonil. Πηγή: FRAC.info.

1.2.7.4 Βιολογική αντιμετώπιση

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί που δρουν ανταγωνιστικά του *R. solani* στην εξάπλωση και πρόσληψη θρεπτικών συστατικών στο εδαφικό περιβάλλον.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μύκητας *Trichoderma* (*harzianum* και *hamatum*) με μεγάλη επιθετική δράση έναντι του *R. solani* (Osbey & Newman, 2004) ενισχύοντας παράλληλα την ανάπτυξη και την ρίζα του φυτού μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν ανταγωνισμό για χώρο και θρεπτικά συστατικά (Elad *et al.*, 1999), μυκοπαρασπισμό (Haran *et al.*, 1996; Lorito *et al.*, 1993, 1996), παραγωγή συστατικών αναστολής (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998), απενεργοποίηση των ενζύμων του παθογόνου (Roco & Perez, 2001) και επαγόμενη αντίσταση (Yedidia *et al.*, 1999, 2000). Η εφαρμογή του ως ανταγωνιστής σε πειράματα αγρού (Montealegre *et al.*, 2010; Howell *et al.*, 2000) συνετέλεσε σε αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας καλλιεργειών τομάτας και βαμβακιού αντίστοιχα μειώνοντας το δυναμικό του μολύσματος και ανάπτυξης του μύκητα τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο.

Επιπλέον έχουν γίνει πειράματα αγρού βιολογικού ελέγχου *R. solani* όπου εφαρμόζονται και ωφέλιμα ριζοσφαιρικά βακτήρια που προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, βοηθώντας τα να αμυνθούν πιο αποτελεσματικά έναντι του *R. solani* όπως ο *Bacillus subtilis* της οικογένειας *Bacillaceae* που συνδυάστηκε με το *T. harzianum* σε καλλιέργειες μελιτζάνας και πιπεριάς (Abeyasinghe, 2009). Οι Abdeljali *et al.*, (2016) εφαρμόσαν μεμονωμένα ή συνδυαστικά στελέχη *Enterobacter cloacae* (*Proteobacteria*), *Bacillus subtilis* και *Bacillus thuringiensis* με τα δύο πρώτα να εμφανίζουν παράγοντες ανάπτυξης φυτού όπως παραγωγή σιδηροφόρων παραγόντων, τη φυτοορμόνη ινδολικό οξικό οξύ (*αυξίνες*) και ιδιότητα διαλυτοποίησης φωσφόρου, αλλά και βιοσύνθεση αντιβιοτικών *Fengycin A* και *Bacillomycin D* που συνετέλεσαν στην καταστολή της ασθένειας από *R. solani*.

Πειράματα *in vitro* με απομονώσεις βακτηρίων *Proteobacteria* και συγκεκριμένα με στέλεχος του *Stenotrophomonas maltophilia* που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα ελαιοκράμβης, έδειξαν ανταγωνιστική δράση έναντι του *R. solani* (Berg *et al.*, 1995), όπως και των (Adesina *et al.*, 2007). Οι Garbeva *et al.*, (2008) μελέτησαν την δομή της μικροβιακής δραστηριότητας σε εδάφη με διαφορετική χρήση ιστορικά, φυτεύοντας βρώμη, αραβόσιτο, κριθάρι και εμπορικό χλοοτάπητα, εξετάζοντας παράλληλα τον ανταγωνισμό στο *R. solani* AG-3. Τα αποτελέσματα έδειξαν παρεμπόδιση με φωτοστέφανο 1-3 cm *Bacillus firmus* και >3 cm για *Bacillus niacini* και *Agrobacterium tumefaciens* (*Proteobacteria*). Τέλος οι (Jurado *et al.*, 2019) για βακτήρια που απομονώθηκαν από compost αποβλήτων βρήκαν παρεμπόδιση >50% για τα *Rhodococcus pyridinovorans* (*Nocardiaceae*), *Brevibacterium frigiditolerans*, *B. halotolerans* (*Brevibacteriaceae*) και *Glycomyces mongolensis* (*Glycomecetaceae*) έναντι στον *R. solani*.

Τέλος η ανάγκη για νέα καινοτόμα Φ.Π. οδήγησε σε σκευάσματα με δ.ο. κάποιων στελεχών τέτοιων μικροοργανισμών κατασταλτικής δράσης στον *R. solani* από τα γένη *Bacillus* όπως *B. amyloliquefaciens* (πρώην *subtilis*) QST 713, *Pseudomonas* όπως στέλεχος DSMZ 13134 και *Trichoderma* όπως *T. asperellum* (πρώην *harzianum*) στελέχη T25, και ICC012, *T. atroviride* (πρώην *harzianum*) στελέχος T11 και *T. gamsii* (πρώην *viride*) στέλεχος ICC080 που ενδείκνυνται για θερμοκηπιακές καλλιέργειες διαφόρων λαχανικών (ΥΠΑΑΤ, 2021).

1.3 Βιοδιεγέρτες φυτών

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.1.2 δεν επιτρέπεται η χρήση κάποιου φυτοπροστατευτικού προϊόντος για προστασία της κάνναβης στα Ευρωπαϊκά κράτη μέλη, συνεπώς τα ανώτατα επιτρεπόμενα υπολείμματα (MRLs) για προϊόντα της κάνναβης καθίστανται μηδενικά με μοναδική εξαίρεση των σπόρων, εκ των οποίων μερικά αναφέρονται στον Πίνακα 17 σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό (EC) No 396/2005 της Ευρωπαϊκής βουλής και Συμβουλίου περί MRLs, τα οποία καθίστανται υπό ανίχνευση χαμηλής συγκέντρωσης σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm). Ως εκ τούτου η απουσία και αντίστοιχα η αυστηροποίηση των MRLs στα παραγόμενα προϊόντα κάνναβης, οδηγεί σε μια νέα τάση «φυτοπροστασίας» με προϊόντα που είτε θρέφουν τα φυτά, εμπλουτίζοντάς τα με απαραίτητα κύρια, δευτερεύοντα και ιχνοστοιχεία θρεπτικών συστατικών, είτε προωθούν έμμεσα την ανάπτυξη τους για καλή ευρωστία και αντοχή τους σε συνθήκες βιοτικού και αβιοτικού στρες, με την προσθήκη ωφέλιμων μικροοργανισμών PGPA στο εδαφικό τους περιβάλλον ή τοπικά και διασυστηματικά στους φυτικούς ιστούς τους. Τέτοια προϊόντα όχι μόνο καθιστούν τα φυτά πιο υγιή και ανθεκτικά σε δυσμενείς συνθήκες, παθογόνα και εχθρούς, αλλά και εξαιρούνται από τους περιορισμούς MRLs καθώς δεν επιβαρύνουν με αυτά τα προϊόντα της κάνναβης. Τα προϊόντα τα οποία παίζουν αυτό τον ρόλο και στρέφεται πλέον η αγορά είναι οι φυσικοί βιοδιεγέρτες.



Εικόνα 39: Αριστερά, ριζικό σύστημα φυτού στο οποίο έγινε εφαρμογή βιοδιεγέρτη. Δεξιά, σύγκριση ανάπτυξης φυτών εφαρμογής προϊόντος πολυδραστικού βιοδιεγέρτη «Nexia» (δεξιά) με εμφανείς διαφορές στο ριζικό σύστημα και το άνω μέρος σε σχέση με την ανάπτυξη φυτών μη εφαρμογής βιοδιεγερτών (μέση, αριστερά). Πηγή: Heascox, (2018) προσφοράς του J. R. Simplot.

Πίνακας 17: Ορισμένα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRLs) στους σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (EC) No 396/2005 της Ευρωπαϊκής Βουλής και του Συμβουλείου

Δραστικές ουσίες για σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με αντίστοιχο κανονισμό (κωδικός 0401140)	MRLs (ppm)	Δραστικές ουσίες για σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με αντίστοιχο κανονισμό (κωδικός 0401140)	MRLs (ppm)
1,4-Dimethylnaphthalene Regulation (EU) 2015/399 (Tab A)		2,4-D (sum of 2,4-D, its salts, its esters and its conjugates, expressed as 2,4-D) Reg. (EU) 2019/1791 (Tab A)	0.05*
1-Decanol Reg. (EU) 2019/1791 (Tab B)	No MRL value	2,4-DB (sum of 2,4-DB, its salts, its esters and its conjugates, expressed as 2,4-DB) (R) Reg. (EU) No 668/2013 (Tab B)	0.05*
1-methylcyclopropene Reg. (EU) 2020/1565 (Tab C)	0.02*	2,5-dichlorobenzoic acid methylester (sum of 2,5-dichlorobenzoic acid and its ester expressed as 2,5-dichlorobenzoic acid methylester) Reg. (EU) 2019/1176 (Tab C)	0.01*
1-Naphthylacetamide and 1-naphthylacetic acid (sum of 1-naphthylacetamide and 1-naphthylacetic acid and its salts, expressed as 1-naphthylacetic acid) Reg. (EU) 2016/1015 (Tab D)	0.06*	2-amino-4-methoxy-6-(trifluoromethyl)-1,3,5-triazine (AMTT), resulting from the use of tritosulfuron (F) Reg. (EU) 2016/1002 (Tab D)	0.01*
2,4,5-T (sum of 2,4,5-T, its salts and esters, expressed as 2,4,5-T) (F) Reg. (EU) 2015/868 (Tab E)	0.02*	2-naphthoxyacetic acid Reg. (EU) 2015/603 (Tab E)	0.02*
1,1-dichloro-2,2-bis(4-ethylphenyl)ethane (F) Reg. (EC) No 149/2008 (Tab A)	0.01*	2-phenylphenol (sum of 2-phenylphenol and its conjugates, expressed as 2-phenylphenol) (R) Reg. (EU) 2018/78 (Tab A)	0.01*
1,2-dibromoethane (ethylene dibromide) (F) Reg. (EC) No 149/2008 (Tab B)	0.02	24-epibrassinolide Reg. (EU) 2021/1098 (Tab B)	No MRL value

Πίνακας 17 (συνέχεια): Ορισμένα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRLs) στους σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (ΕΚ) Νο 396/2005 της Ευρωπαϊκής Βουλής και του Συμβουλείου

Δραστικές ουσίες για σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με αντίστοιχο κανονισμό (κωδικός 0401140)	MRLs (ppm)	Δραστικές ουσίες για σπόρους βιομηχανικής κάνναβης σύμφωνα με αντίστοιχο κανονισμό (κωδικός 0401140)	MRLs (ppm)
1,4-Diaminobutane (aka Putrescine)(++) Reg. (EU) 2020/1565 (Tab E)	No MRL value	Abamectin (sum of avermectin B1a, avermectin B1b and delta-8,9 isomer of avermectin B1a, expressed as avermectin B1a) (R) (F) Reg. (EU) 2018/1514 (Tab E)	0.01*
ABE-IT 56 Reg. (EU) 2019/1791 (Tab A)	No MRL value	Acetochlor Reg. (EU) 2015/603 (Tab A)	0.01*
Acephate Reg. (EU) No 899/2012 (Tab B)	0.02*	Azoxystrobin Reg. (EU) 2019/552 (Tab B)	0.01*
Acequinocyl Reg. (EU) 2017/623 (Tab C)	0.01*	Bacillus amyloliquefaciens strain FZB24 Reg. (EU) 2017/1777 (Tab C)	No MRL value
Acetamiprid (R) Reg. (EU) 2019/88 (Tab D)	0.01*	Bacillus amyloliquefaciens strain MBI 600 Reg. (EU) 2017/1777 (Tab D)	No MRL value
Acetic acid (++) Reg. (EC) No 839/2008 (Tab E)	No MRL value	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain D747 Reg. (EU) 2016/143 (Tab E)	No MRL value
Bacillus firmus I-1582 Reg. (EU) No 588/2014 (Tab A)	No MRL value	Beauveria bassiana PPRI 5339 Reg. (EU) 2019/977 (Tab A)	No MRL value
Bacillus pumilus QST 2808 Reg. (EU) 2021/1531 (Tab C)	No MRL value	Beauveria bassiana strain ATCC 74040 Reg. (EU) 2016/439 (Tab B)	No MRL value
Bacillus subtilis strain QST713 Reg. (EC) No 839/2008 (Tab D)	No MRL value	Beauveria bassiana strain GHA Reg. (EU) 2016/439 (Tab C)	No MRL value
Barban (F) Reg. (EU) 2015/868 (Tab E)	0.02*	Beer Reg. (EU) 2018/685 (Tab D)	No MRL value
Benfluralin (F) Reg. (EU) No 1146/2014 (Tab B)	0.02*	Beflubutamid Reg. (EU) No 1317/2013 (Tab E)	0.02*

Σύμφωνα με τον du Jardin (2012) ένας βιοδιεγέρτης φυτών ορίζεται ως οποιαδήποτε ουσία ή μικροοργανισμός που εφαρμόζεται στα φυτά με σκοπό την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας θρέψης, της ανοχής στο αβιοτικό στρες και/ή των χαρακτηριστικών ποιότητας της καλλιέργειας, ανεξαρτήτου του θρεπτικού περιεχομένου του. Κατ' επέκταση οι βιοδιεγέρτες φυτών καθορίζουν επίσης εμπορικά προϊόντα που περιέχουν μίγματα τέτοιων ουσιών και/ή μικροοργανισμών.

1.3.1 Το χρονικό καθορισμού της έννοιας των βιοδιεγερτών

Η λέξη βιοδιεγέρτης επινοήθηκε προφανέστατα από ειδικούς φυτοκομίας για την περιγραφή ουσιών που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών όντας μη θρεπτικές συστατικά, εδαφοβελτιωτικά ή γεωργικά φάρμακα. Παρακολουθώντας τον πρώτο ορισμό της λέξης «βιοδιεγέρτης», η πρώτη ερμηνεία δόθηκε από ένα διαδικτυακό περιοδικό αφιερωμένο σε επαγγελματίες συντήρησης χλοοτάπητα εν ονόματι Ground Maintenance (grounds-mag.com), στο οποίο οι Zhang & Schmit (1994) από το τμήμα των Καλλιεργειών και Περιβαλλοντικών Επιστημών Εδάφους του Πολυτεχνικού Ινστιτούτου της Βιρτζίνια και Πανεπιστημίου της Πολιτείας όρισαν τους βιοδιεγέρτες ως «*υλικά που σε μικροσκοπικές ποσότητες προωθούν την ανάπτυξη των φυτών*». Συγκεκριμένα με την λέξη «*μικροσκοπικές ποσότητες*» για τη περιγραφή των βιοδιεγερτών οι συγγραφείς στόχευσαν στον διαχωρισμό τους από τις έννοιες των θρεπτικών συστατικών ή τροποποιητών εδάφους, τα οποία προωθούν επίσης την ανάπτυξη αλλά εφαρμόζονται σε μεγαλύτερες ποσότητες. Οι βιοδιεγέρτες που αναφέρθηκαν σε αυτό το διαδικτυακό άρθρο ήταν τα χουμικά οξέα και εκχυλίσματα φυκιών. Αργότερα άρθρα ίδιας χρονολογίας αυτών των συγγραφέων πάνω στην ίδια έρευνα δεν χρησιμοποίησαν απαραίτητα τον όρο βιοδιεγέρτης. Για παράδειγμα ένα άρθρο που περιέγραφε την χρήση των χουμικών οξέων και των εκχυλισμάτων φυκιών για την αύξηση αντοχής του χλοοτάπητα στην ξηρασία, δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου ο όρος βιοδιεγέρτης (Zhang & Schmit, 2000). Το άρθρο εστίασε στις δράσεις αυτών των συστατικών που έμοιαζαν με των ορμονών και εν τέλει χρησιμοποίησαν τον όρο «*προϊόντα που περιέχουν ορμόνες*» αντί των βιοδιεγερτών. Η συγκεκριμένη επιλογή μπορούσε επίσης να επεξηγηθεί από την νομοθεσία των Η.Π.Α., όπου το Υπουργείο Περιβαλλοντικής Προστασίας (EPA) εξαιρεί τα «*Φυτοκομικά προϊόντα βιταμίνης-ορμονών*» από την έγκρισή τους υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Οι Zhang & Schmit εξήγησαν την δράση βιοδιεγερσης πρωτίστως μέσω ορμονικών επιδράσεων και δευτερευόντως μέσω προστασίας έναντι αβιοτικού στρες από αντιοξειδωτικά, ενώ ο όρος «*μεταβολικοί ενισχυτές*» χρησιμοποιήθηκε σε μεταγενέστερες μελέτες (Zhang & Schmit, 2003.)

Στην επιστημονική βιβλιογραφία η λέξη βιοδιεγέρτης ορίστηκε αρχικά από τους Kauffman *et al.*, (2007) σε μια μελέτη ανασκόπησης με τις τροποποιήσεις: «Οι βιοδιεγέρτες είναι υλικά πέραν των λιπασμάτων που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών όταν εφαρμόζονται σε μικρές ποσότητες». Ενώ η αξίου αναφοράς προσθήκη των λέξεων «πέραν των λιπασμάτων» οι οποίες συμβαδίζουν με την περιγραφή των Zhang & Schmit αλλά δεν είχαν συμπεριληφθεί στον αρχικό τους ορισμό (Kauffman *et al.*, 2007), επιχείρησε να συνοψίσει τι είναι οι βιοδιεγέρτες εισαγάγοντας την ταξινόμηση: «οι βιοδιεγέρτες είναι διαθέσιμοι σε μια ποικιλία σχηματισμών και με ποικίλα συστατικά αλλά ταξινομούνται γενικά σε τρεις κύριες ομάδες βάσει προέλευσης και περιεχομένου. Αυτές οι ομάδες περιλαμβάνουν χουμικές ουσίες (HS), προϊόντα που περιέχουν ορμόνες (HCP) και προϊόντα που περιέχουν αμινοξέα (AACP). Τα HCPs όπως τα εκχυλίσματα φυκιών περιέχουν ταυτοποιήσιμες ποσότητες από δ.ο. ανάπτυξης φυτών όπως αυξίνες, κυτοκινίνες ή τα παράγωγά τους».

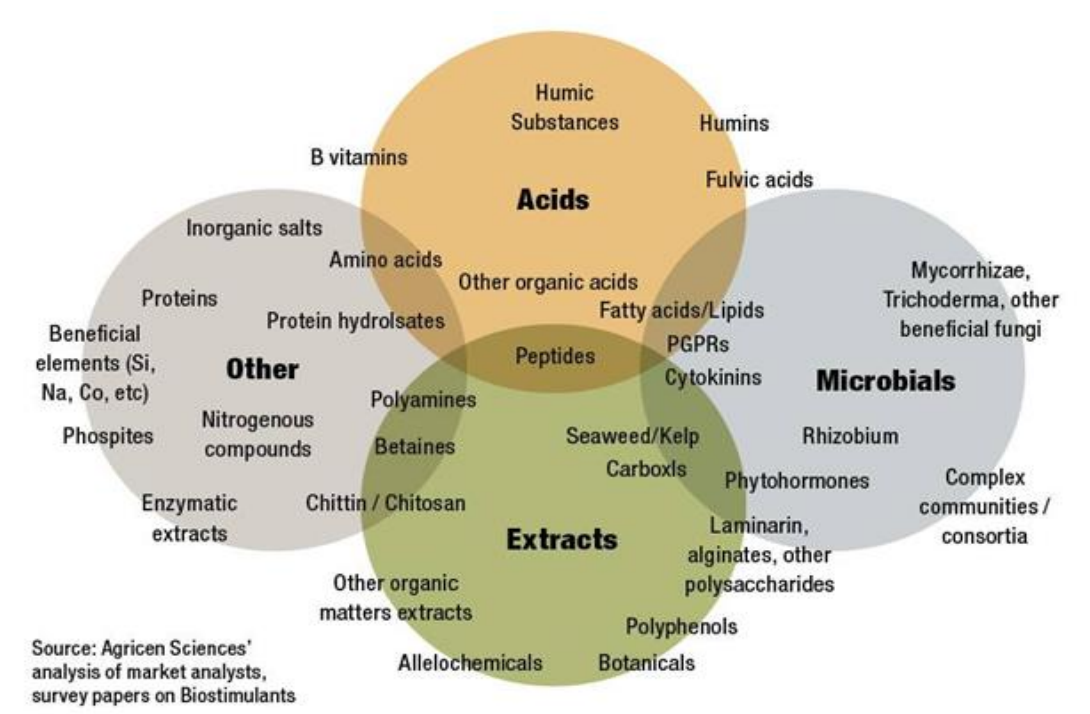
Η λέξη βιοδιεγέρτης χρησιμοποιούνταν αυξανόμενα από την επιστημονική βιβλιογραφία τα επόμενα χρόνια, επεκτείνοντας το εύρος των ουσιών και μηχανισμών δράσης (du Jardin, 2012), (Calvo *et al.*, 2014; Halpern *et al.*, 2015). Στην πραγματικότητα ο «βιοδιεγέρτης» εμφανίζεται ως ένας πολύπλευρος περιγραφέας οποιασδήποτε ευεργετικής ουσίας προς τα φυτά όντας μη θρεπτικό συστατικό, γεωργικό φάρμακο ή εδαφοβελτιωτικό. Σε κάποιο βαθμό οι βιοδιεγέρτες καθορίζονται πρωτίστως από το τι δεν είναι, σχεδιάζοντας τα όρια μεταξύ βιοδιεγερτών και άλλων ευρέως χρησιμοποιούμενων κατηγοριών ουσιών που εφαρμόζονται στα φυτά και στις καλλιέργειες, δηλαδή τα λιπάσματα και τα γεωργικά φάρμακα. Κατά δεύτερο βαθμό, αποδείχτηκε ότι οι θετικές δράσεις που αποδόθηκαν στους χημικούς βιοδιεγέρτες (φυσικής ή συνθετικής προέλευσης) όπως προώθησης ανάπτυξης, διαμόρφωσης της ανάπτυξης και χαρακτηριστικών ποιότητας αύξησαν την ανοχή στο περιβαλλοντικό στρες, κάτι που μπορεί επίσης να εκπονηθεί και από βακτήρια και μύκητες. Σαν παράδειγμα οι PGPRs ή αλλιώς «Ριζοβακτήρια που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών» καθορίζονται από ωφέλιμες επιδράσεις στα φυτά όντας μη θρεπτικά συστατικά, γεωργικά φάρμακα ή εδαφοβελτιωτικά. Όπως οι χημικές ουσίες, η φύση τους (πχ. η ταξινομική τους κατάσταση σε αυτή την περίπτωση) μπορεί να είναι πολύ ποικίλη και η κατηγορία PGPR καθορίζεται κατά βάση στις αγροτικές/φυτοκομικές παραγωγές. Τα «βιολιπάσματα» και οι «παράγοντες βιολογικού ελέγχου» χρησιμοποιούνται εξίσου για την περιγραφή PGPRs, αναφερόμενοι στις αναμενόμενες αγροτικές/φυτοκομικές παραγωγές. Οι σχέσεις μεταξύ αυτών των εννοιών και όρων περιγράφονται στις παρακάτω ενότητες.

Η βιομηχανία είναι ένας παράγων κλειδί για τον ορισμό και προώθηση της έννοιας των βιοδιεγερτών, συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών. Οι εταιρείες αυτού του τομέα δημιούργησαν συνδέσμους όπως το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Βιομηχανίας Βιοδιεγερτών (EBIC) στην Ευρώπη και τον

Συνασπισμό Βιοδιεγερτών στις Η.Π.Α., συζητώντας με άλλους ενδιαφερόμενους, νομοθέτες και επιστήμονες. Ο εταιρικός τομέας έχει επίσης υποστηρίξει τον οργανισμό των διεθνών συνεδρίων. Το «*πρώτο παγκόσμιο συνέδριο πάνω στη χρήση των βιοδιεγερτών στην γεωργία*» που διεξήχθη στο Στρασβούργο το 2012 μπορεί να θεωρηθεί ως ένα επίτευγμα στην αποδοχή των βιοδιεγερτών στον ακαδημαϊκό τομέα.

1.3.2 Κύριες κατηγορίες των φυτικών βιοδιεγερτών

Παρά τις πρόσφατες προσπάθειες για αποσαφήνιση της νομοθετικής κατάστασης των βιοδιεγερτών δεν υπάρχει νομοθετικός ή κανονιστικός ορισμός των φυτικών βιοδιεγερτών οπουδήποτε στον κόσμο, συμπεριλαμβανομένης της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των Η.Π.Α. Αυτή η κατάσταση αποκλείει μια λεπτομερή καταχώρηση και κατηγοριοποίηση των ουσιών και μικροοργανισμών που καλύπτονται από την έννοια. Παρόλα αυτά αναγνωρίζονται ευρέως κάποιες κύριες κατηγορίες από τους επιστήμονες, νομοθέτες και ενδιαφερόμενους (Calvo *et al.*, 2014), (du Jardin, 2012), (Halpern *et al.*, 2015), καλύπτοντας ταυτόχρονα και τις ουσίες και τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν ωφέλιμα βακτήρια κυρίως PGPRs και ωφέλιμους μύκητες. Μπορεί να είναι ελευθέρως ζώσης, ριζοσφαιρικοί ή ενδοσυμβιοτικοί. Αυτές οι κατηγορίες (Εικόνα 40) περιγράφονται συντόμως στις παρακάτω ενότητες και θα γίνει μια περεταίρω περιγραφή αυτού του εξειδικευμένου θέματος των φυτικών βιοδιεγερτών στην γεωπονία.



Εικόνα 40: Το ευρύ τοπίο των αναδυόμενων κατηγοριών βιοδιεγερτών. Πηγή: <https://www.croplife.com/special-reports/biologicals/biostimulants-gaining-ground/>, αναδημοσίευση από Agricen Sciences, analysis of market analysts, survey papers on Biostimulants.

1.3.2.1 Χουμικά και φουλβικά οξέα

Οι χουμικές ουσίες (HS) είναι φυσικά συστατικά του εδάφους, οργανική ουσία προερχόμενη από την αποσύνθεση των φυτικών, ζωικών και μικροβιακών υπολειμμάτων, αλλά επίσης και από την μεταβολική δράση του εδαφικού μικροβιώματος χρησιμοποιώντας αυτά τα υποστρώματα. Οι HS είναι συλλογές από ετερογενή συστατικά, αρχικώς κατηγοριοποιημένα σύμφωνα με το μοριακά τους βάρη και διαλυτότητα σε χουμίνες, χουμικά οξέα και φουλβικά οξέα. Αυτά τα συστατικά επιδεικνύουν επίσης πολύπλοκη δυναμική από σύνδεση/διάσταση σε υπερμοριακά κolloειδή και αυτή επηρεάζεται από τις ρίζες των φυτών δια της απελευθέρωσης πρωτονίων και εκκριμάτων. Ως εκ τούτου οι χουμικές ουσίες και τα σύμπλοκά τους καταλήγουν από την αλληλεπίδραση μεταξύ της οργανικής ύλης, μικροβίων, φυτικών ριζών. Κάθε προσπάθεια χρήσης των χουμικών ουσιών για την προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και των αναγκών απόδοσης της καλλιέργειας για να βελτιστοποιήσουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις για την επίτευξη τα επιθυμητά αποτελέσματα. Αυτό εξηγεί γιατί η εφαρμογή των χουμικών ουσιών- διαλυτών χουμικών και φουλβικών κλασμάτων- φαίνεται ασυνεπής, αν και θετική σε παγκόσμιο επίπεδο, καταλήγει σε ανάπτυξη των φυτών. Μια πρόσφατη μετά-ανάλυση τυχαίας-επίδρασης των HS που εφαρμόζονται στα φυτά (Rose *et al.*,

2014) κατέληξε σε μια συνολική αύξηση ξηρού βάρους των $22 \pm 4\%$ για τους βλαστούς και των $21 \pm 6\%$ για τις ρίζες.



Εικόνα 41: Κατηγορίες βιοδιεγερτών με φουλβικό οξύ (αριστερά) και χουμικό οξύ (δεξιά).
Πηγή: <https://healthjade.net/fulvic-acid-reviews/>.

Η μεταβλητότητα στις επιδράσεις των HS οφείλεται στην προέλευση των HS, των περιβαλλοντικών συνθηκών, το λαμβάνον φυτό και η δόση και τρόπο εφαρμογής των HS (Rose *et al.*, 2014). Σχετικά με τις προελεύσεις των HS (du Jardin, 2012) αυτές αποσπώνται από φυσικώς χουμοποιημένη οργανική ουσία (πχ. από τύρφη ή από ηφαιστειακά εδάφη), από κομπόστ και κομπόστ βερμικουλίτη ή από εναποθέσεις ορυκτών (*λεοπαρδίτης' μια μορφή οξειδωσης του λιγνίτη*). Επιπλέον τα γεωργικά παραπροϊόντα αντί να αποσυντεθούν σε ένα έδαφος ή να κομποστοποιηθούν, επιδέχονται ελεγχόμενη κατάρρευση και οξείδωση μέσω χημικών διεργασιών, οδηγώντας σε «ουσίες παρόμοιες με χουμικές» οι οποίες προτείνονται ως υποκατάστατα φυσικών HS (Eyheraguibel *et al.*, 2008).

Οι χουμικές ουσίες έχουν αναγνωρισθεί προ πολλού ως απαραίτητες συνεισφέρουσες στην γονιμότητα του εδάφους, δρώντας πάνω στις φυσικές, φυσικοχημικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους. Οι περισσότερες επιδράσεις των HS απευθύνονται στη βελτίωση θρέψης της ρίζας μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Ένας εκ των οποίων είναι η αυξημένη απορρόφηση των μακρο και μικροθρεπτικών συστατικών, εξαιτίας την αυξημένης ικανότητας ανταλλαγής κατιόντος του εδάφους που περιέχει τις πολυανοντικές HS, αλλά και η αυξημένη διαθεσιμότητα του φωσφόρου μέσω της παρεμβολής των HS με την κατακρίμνηση του φωσφορικού ασβεστίου. Μία ακόμα σημαντική συνεισφορά των HS στη θρέψη της ρίζας είναι η διέγερση των H^+ -ATPασών μεμβρανών πλάσματος, οι οποίες μετατρέπουν την ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται από την υδρόλυση του ATP σε ένα διαμεμβρανικό ηλεκτροχημικό δυναμικό που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή νιτρικού ανιόντος και άλλων θρεπτικών συστατικών. Πέραν της απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών, η άντληση πρωτονίων από τις ATPάσες μεμβρανών πλάσματος συνεισφέρει επίσης στην χαλάρωση (loosening) του κυτταρικού τοιχώματος, στη διεύρυνση των κυτάρων και

ανάπτυξη οργάνων (Jindo *et al.*, 2012). Οι HS φαίνεται να ενισχύουν την αναπνοή και τις δράσεις ινβερτάσης παρέχοντας υποστρώματα άνθρακα.

Επίσης περιγράφονται και ορμονικές επιδράσεις, αλλά όπου υπάρχουν λειτουργικές ομάδες περιέχουσες HS που αναγνωρίζονται από τα σύμπλοκα υποδοχής/σηματοδότησης των ορμονικών μονοπατιών των φυτών, η απελευθέρωση των παγιδευμένων ορμονικών συστατικών ή η διέγερση μικροοργανισμών που παράγουν ορμόνες είναι συχνά ασαφής (du Jardin, 2012). Η προτεινόμενη δράση βιοδιέγερσης των HS απευθύνεται επίσης στην προστασία από το στρες. Ο μεταβολισμός φαινυλοπροπανοειδών είναι κεντρικός στη παραγωγή φαινολικών συστατικών που σχετίζονται με τον δευτερογενή μεταβολισμό και σε ένα ευρύ φάσμα αποκρίσεων στο στρες. Οι HS υψηλής μοριακής μάζας έχουν φανεί να ενισχύουν την δράση ενζύμων κλειδιών αυτού του μεταβολισμού σε υδροπονικά αναπτυσσόμενα σπορόφυτα αραβοσίτου, συνιστώντας τη διαμόρφωση ανταπόκρισης στο στρες από τις HS (Olivares *et al.*, 2015; Schiavon *et al.*, 2010).

1.3.2.2 Υδρολύματα πρωτεϊνών και άλλες αζωτούχες ενώσεις

Τα μίγματα αμινοξέων και πεπτιδίων αποκτώνται από τη χημική και ενζυματική υδρόλυση των πρωτεϊνών μέσω αγρο-βιομηχανικών παραπροϊόντων, φυτικών (*υπολείμματα καλλιέργειών*) και ζωικών αποβλήτων (πχ. *κολλαγόνο, επιθηλιακοί ιστοί*) (du Jardin, 2012; Calvo *et al.*, 2014; Halpern *et al.*, 2015). Η χημική σύνθεση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για μεμονωμένες ή αναμιγμένες ενώσεις. Άλλα αζωτούχα μόρια περιλαμβάνουν βεταΐνες, πολυαμίνες και «μη πρωτεϊνικά αμινοξέα» τα οποία διαφοροποιούνται σε ανώτερα φυτά αλλά κακώς χαρακτηρίζονται σε σχέση με τους φυσιολογικούς και οικολογικούς τους ρόλους (Vranova *et al.*, 2011). Η βεταΐνη γλυκίνης είναι μια ειδική περίπτωση παραγώγου αμινοξέος με πασίγνωστες αντιστρεσογόνες ιδιότητες (Chen & Murata, 2011).

Κατά περίπτωση αυτές οι ενώσεις έχουν δείξει να παίζουν πολλαπλούς ρόλους ως βιοδιεγέρτες της φυτικής ανάπτυξης (du Jardin, 2012; Calvo *et al.*, 2014; Halpern *et al.*, 2015). Οι άμεσες επιπτώσεις στα φυτά περιλαμβάνουν τη διαμόρφωση της πρόσληψης και αφομοίωσης αζώτου, από τη ρύθμιση των ενζύμων που σχετίζονται στην αφομοίωση αζώτου και των δομικών γονιδίων τους, αλλά και από τη δράση επί των σηματοδοτικού μονοπατιού της απόκτησης αζώτου στις ρίζες. Με την ρύθμιση ενζύμων του κύκλου TCA, αυτά συνεισφέρουν επίσης στη διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των μεταβολισμών άνθρακα και αζώτου. Οι ορμονικές δράσεις έχουν επίσης αναφερθεί σε σύμπλοκη πρωτεΐνη και σε ιστούς υδρολασών (Colla *et al.*, 2014). Επιπλέον αναφέρονται και χηλικές επιδράσεις για κάποια αμινοξέα (*όπως προλίνη*) τα οποία μπορεί να προστατεύουν τα φυτά ενάντια στα βαρέα μέταλλα, αλλά συνεισφέρουν επίσης στη κινητικότητα και απόκτηση των

μικροθρεπτικών συστατικών. Η ανποξειδωτική δράση απονέμεται στην απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών μέσω κάποιων αζωτούχων ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων της βεταΐνης, γλυκίνης και προλίνης οι οποίες συνεισφέρουν στη μετανάστευση του περιβαλλοντικού στρες.



Εικόνα 42: Αριστερά, βιοδιεγέρτης αποτελούμενος από μίγματα αμινοξέων προερχόμενα από βιοδραστικά συστατικά που παράγονται από υδρολύματα πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης με τη χρήση της μεθόδου υδρόλυσης ενζύμων. Δεξιά, σκόνη βιολογικού βιοδιεγέρτη μικροθρεπτικών συστατικών από υδρολυμένες πρωτεΐνες. Πηγή: <http://www.nextnodebioscience.com/AminoAcidBasedBiostimulant.aspx>. και <https://www.indiamart.com/proddetail/hydrolyzed-proteins-micronutrient-fertilizers-1160215662.html>.

Οι έμμεσες επιπτώσεις στη φυτική θρέψη και ανάπτυξη είναι εξίσου σημαντικές στην αγροτική πρακτική όταν τα υδρολύματα πρωτεϊνών εφαρμόζονται στα φυτά και στα εδάφη. Τα υδρολύματα πρωτεϊνών είναι γνωστά για την αύξηση της μικροβιακής βιομάζας και δράσης, την αναπνοή εδάφους και συνολικά για τη γονιμότητα. Οι δράσεις χηλίωσης και συμπλοκοποίησης συγκεκριμένων αμινοξέων και πεπτιδίων θεωρούνται να συνεισφέρουν στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και στην απόκτησή τους από τις ρίζες.

Στην αγορά έχουν διατεθεί διάφορα εμπορικά προϊόντα που αποκτώνται από υδρολύματα πρωτεϊνών φυτικής και ζωικής προέλευσης. Αν και ευμετάβλητες έχουν αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις να επιφέρουν σημαντικές βελτιώσεις στην απόδοση και στα χαρακτηριστικά ποιότητας στη γεωργία και σε φυτοκομικές καλλιέργειες (Calvo *et al.*, 2014). Η ασφάλεια των υδρολυμένων πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης αξιολογήθηκε πριν μερικά χρόνια και δεν αναφέρθηκε γονοτοξικότητα, οικοτοξικότητα ή φυτοτοξικότητα επί τη βάση των βιοδοκιμών χρησιμοποιώντας μαγιές και φυτά για υπό εξέταση οργανισμούς (Corte *et al.*, 2014). Παρόλα αυτά υπάρχει ένα αυξανόμενο ζήτημα ασφάλειας στη τροφική αλυσίδα από τη χρήση υδρολυμάτων πρωτεϊνών που παράγονται από ζωικά παραπροϊόντα. Η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγόρευσε την εφαρμογή τέτοιων ζωικών υδρολυμάτων πρωτεϊνών πάνω σε εδάφιμα μέρη βιολογικών καλλιεργειών, μέσω του

Εκτελεστικού Κανονισμού της Επιτροπής (ΕΥ) 354/2014 με βάση την βιολογική παραγωγή, σήμανση και έλεγχο.

1.3.2.3 Εκχυλίσματα φυκιών και Βοτανικά προϊόντα

Η χρήση φρέσκων φυκιών ως πηγή οργανικής ουσίας και ως λίπανση είναι πανάρχαιες τακτικές στην γεωργία, αλλά οι επιδράσεις βιοδιέγερσης καταγράφηκαν πριν λίγα χρόνια. Αυτό προτρέπει την εμπορική χρήση των εκχυλισμάτων φυκιών και καθαρών ενώσεων, τα οποία περιλαμβάνουν τους πολυσακχαρίτες λαμιναρίνη, άλγες και καραγενάνες αλλά και τα προϊόντα διάσπασής τους. Άλλα συστατικά που συνεισφέρουν στην προώθηση ανάπτυξης της δράσης περιλαμβάνουν μικρο και μακροθρεπτικά συστατικά, στερόλες, αζωτούχες ενώσεις όπως βεταΐνες, και ορμόνες (Craigie, 2011), (Khan *et al.*, 2009). Διάφορα εξ αυτών των συστατικών είναι πράγματι μοναδικά στην πηγή άλγεων ανήκοντα στο φύλλο των καφέ άλγεων με κύρια γένη τα *Ascophyllum*, *Fucus*, *Laminaria*, αλλά οι καραγενάνες προέρχονται εκ των κόκκινων φυκιών τα οποία ανταποκρίνονται σε μια ξεχωριστή φυλογενετική γραμμή. Τα ονόματα των προϊόντων που χρησιμοποιούνται σαν φυσικοί βιοδιεγέρτες όντας περισσότερα από 20, έχουν καταχωρηθεί από τους Khan *et al.*, (2009).

Τα φύκια δρουν στα εδάφη και στα φυτά (Craigie *et al.*, 2008, 2011), (Khan *et al.*, 2009). Μπορούν να εφαρμοστούν σε εδάφη, υδροπονικά διαλύματα ή σαν μεταχειρίσεις φυλλώματος. Στα εδάφη οι πολυσακχαρίτες τους συνεισφέρουν στο σχηματισμό γέλης, συγκράτησης νερού και αερισμού του εδάφους. Τα πολυανιόντικά συστατικά συνεισφέρουν στη στερέωση (fixation) και ανταλλαγή των κατιόντων, τα οποία είναι επίσης άμεσου ενδιαφέροντος για τη στερέωση των βαρέων μετάλλων και για την αποκατάσταση του εδάφους. Επίσης περιγράφονται εξίσου και οι θετικές επιπτώσεις δια της εδαφικής μικροχλωρίδας, με την προώθηση των βακτηρίων προώθησης ανάπτυξης των φυτών και των αναγωνιστών των παθογόνων σε κατασταλτικά εδάφη. Στα φυτά οι θρεπτικές επιπτώσεις δια του εφοδιασμού μικρο και μακροθρεπτικών συστατικών υποδεικνύουν ότι δρουν ως λιπάσματα, πέραν των άλλων ρόλων τους. Το αντίκτυπο που έχουν στη βλάστηση σπόρων, στην εγκατάσταση των φυτών και στη περεταίρω ανάπτυξη, σχετίζεται με ορμονικές επιδράσεις οι οποίες προβάλλονται ως κύριες αιτίες της δράσης βιοδιέγερσης σε φυτικές καλλιέργειες. Παρόλο που οι κυτοκινίνες, αυξίνες, αμπσισικό οξύ, γιββερελλίνες και άλλες κλάσεις από ενώσεις που μοιάζουν με ορμόνες (όπως στεροειδή και πολυαμίνες) έχουν ταυτοποιηθεί σε εκχυλίσματα φυκιών μέσω βιοδοκιμών και ανοσολογικών εργαλείων (Craigie, 2011), υπάρχουν στοιχεία ότι οι ορμονικές επιπτώσεις των εκχυλισμάτων του καφέ φυκιού *Ascophyllum nosodum* εξηγούνται σε μεγάλο βαθμό από την υπο και υπερέκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων

ορμονών στους φυτικούς ιστούς και σε μικρότερο βαθμό από τα ορμονικά περιεχόμενα των ίδιων των εκχυλισμάτων φυκιών (Wally *et al.*, 2013a, b). Επιπλέον για να παρθεί αυτό το συμπέρασμα, εφαρμόστηκαν και μέθοδοι μοριακής γενετικής όπως μεταλλαγές ορμονών στη Αραβίδοψη και ανάλυσης μεταγραφώματος από RT-qPCR.



Εικόνα 43: Αριστερά, εδώδιμα κόκκινα φύκια καρραγενάνων. Μέση, πράσινο φύκι για παρασκευή βιοδιεγέρτη εκχυλίσματος φυκιού υγρής μορφής ή σκόνης. Δεξιά, βοτανικά προϊόντα ως πρώτες ύλες παρασκευής βιοδιεγερτών. Πηγή: <https://www.kappacarrageenansuppliers.com/2017/09/health-benefits-of-carrageenan.html>, <https://www.indiamart.com/proddetail/seaweed-extract-liquid-powder-3737382230.html> και <https://www.vitafoodsinsights.com/regulation/future-health-claims-botanicals-eu>

Έχουν αναφερθεί επίσης ανπ-στρεσογόνες επιπτώσεις και αμφότερες οι προστατευτικές ενώσεις εντός των εκχυλισμάτων των φυκιών όπως ανποξειδικά και ρυθμιστές ενδογενών γονιδίων που ανταποκρίνονται στο στρες, θα μπορούσαν να εμπλέκονται (Calvo *et al.*, 2014).

Τα βοτανικά προϊόντα περιγράφουν ουσίες που απομονώνονται από τα φυτά και χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα, σαν συστατικά τροφίμων και επίσης σε Φ.Π. (Seiber *et al.*, 2014). Εν συγκρίσει με τα φύκια, λίγα είναι γνωστά σχετικά με τις βιοδιεγερτικές δράσεις τους, των οποίων η προσοχή στρέφεται στις παρασιποκτόνες δράσεις τους μέχρι στιγμής. Ωστόσο φαίνονται να παρουσιάζονται ευκαιρίες για χρήση τους εξίσου ως βιοδιεγέρτες (Ziosi *et al.*, 2012; Ertani *et al.*, 2013). Επιπλέον οι αλληλεπιδράσεις των φυτών στα οικοσυστήματα είναι γνωστό ότι μεσολαβούνται από τα ενεργά φυτικά συστατικά, αναφερόμενα ως αλληλοχημικά τα οποία υφίστανται αυξανόμενη προσοχή στο περιεχόμενο της διαχείρισης αειφόρων καλλιεργειών. Παρόλο που οι εναλλαγές καλλιέργειας, η διαστάυρωση, οι επικαλυμένες καλλιέργειες και η επίστρωση χρησιμοποιούνται στη πρώτη περίπτωση για την εκμετάλλευση των αλληλοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φυτών (εν ονόματι φαινομένου της αλληλοπάθειας), πρέπει να δοθεί περεταίρω προσοχή σε αυτές τις χημικές αλληλεπιδράσεις για την ανάπτυξη νέων βιοδιεγερτών.

1.3.2.3.1 Η καφέ άλγη *Ascophyllum nosodum*

Το φύκι θαλάσσης *Ascophyllum nosodum* εντοπίζεται κυρίως σε προστατευόμενες τοποθεσίες στις ακτές της μεσοπαραλιακής ζώνης όπου μπορεί να γίνει το κυρίαρχο είδος στην παράκτια ζώνη (Morton, 1994), (Lewis, 1964) και οι βιολογικά ενεργές φλωτοταννίνες του (*tetraphlorethol C* και *tetrafulcol*) (Wang, 2008) δρουν ως χημική άμυνα ενάντια σε υδρόβια φυτοφάγα σαλιγκάρια *Littorina littorea* (Geiselman & Mcconell, 1981).

Συγκομίζεται και χρησιμοποιείται διατροφικά ως γεύμα φυκιών για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση (fao.org), σε αλγινικά άλατα και ως λίπασμα. Στη τελευταία κατηγορία χρησιμοποιείται σαν οργανικό και κύριο λίπασμα για πολλές ποικιλίες καλλιεργειών λόγω του συνδυασμού των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών. Επιπλέον περιέχει κυτοκινίνες, γιββερελλίνες, ουσίες σαν αυξίνες, βεταΐνες, μαννιτόλη, οργανικά οξέα, πολυσακαχαρίτες, αμινοξέα και πρωτεΐνες, τα οποία είναι όλα πολύ ωφέλιμα και ευραίως χρησιμοποιούμενα στη γεωργία (Norrie & Hiltz, 1999).

Μια ακόμη σημαντική ιδιότητα του *A. nosodum* είναι η εκτίμηση της ηλικίας των διαφορετικών μερών του μέσω των βλαστών του, καθιστώντας το κατάλληλο για τοξικολογικές χρήσεις όπως στην παρακολούθηση των συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων στο θαλασσινό νερό (Melhus et al., 1978; Seip, 1979).



Εικόνα 44: Αριστερά, φύκι θαλάσσης *Ascophyllum nosodum* στη φυσική του μορφή. Δεξιά, φύκι *Ascophyllum nosodum* αλεσμένο σε σκόνη. Πηγή: Weissinger (2012) και <https://www.indiamart.com/proddetail/seaweed-extract-ascophyllum-nodosum-11374533873.html>.

1.3.2.4 Χιτοζάνη και λοιπά βιοπολυμερή

Η χιτοζάνη είναι απακετυλιωμένη μορφή του βιοπολυμερούς χιτίνης που παράγεται φυσικώς και βιομηχανικώς. Τα πολυ και ολιγομερή από μεταβλητά, ελεγχόμενα μεγέθη χρησιμοποιούνται στους τομείς τροφίμων, καλλυντικών, γεωργίας. Οι φυσιολογικές επιπτώσεις των ολιγομερών χιτοζάνης στα φυτά είναι τα αποτελέσματα της ικανότητας αυτής της πολυκατιονικής ένωσης να δεσμέυει ένα ευρύ φάσμα από κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του DNA, συστατικών μεβράνης πλάσματος και κυτταρικού τοιχώματος, αλλά επίσης και να δεσμέυει συγκεκριμένους υποδοχείς που σχετίζονται σε ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας με έναν παρόμοιο τρόπο όπως εκκινητές φυτικής άμυνας (El Hadrami *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2010; Hadwiger, 2013; Katiyar *et al.*, 2015). Η χιτίνη και χιτοζάνη χρησιμοποιούν προφανώς χαρακτηριστικούς υποδοχείς και σηματοδοτικά μονοπάτια. Μεταξύ των κυτταρικών επιπτώσεων της δέσμευσης της χιτοζάνης σε περισσότερους ή λιγότερους συγκεκριμένους κυτταρικούς υποδοχείς έχουν αποδειχτεί η συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και η διαρροή ασβεστίου (Ca^{2+}) μέσα στο κύτταρο, οι οποίες αναμένονται να προκαλέσουν μεγάλες φυσιολογικές αλλαγές καθώς αποτελούν παράγοντες κλειδιά στην σηματοδότηση των αποκρίσεων στο στρες και στην ανάπτυξη ρύθμισης. Η ανάλυση του πρωτεώματος (Ferri *et al.*, 2014) ή του γονιδιώματος (Povero *et al.*, 2011) των μεταχειρισθέντων με χιτοζάνη φυτικών ιστών επιβεβαίωσε αυτή την υπόθεση.

Κατά συνέπεια οι αγροτικές εφαρμογές της χιτοζάνης έχουν αναπτυχθεί με τα χρόνια, εστιάζοντας στην φυτοπροστασία ενάντια σε μυκητιακά παθογόνα, αλλά ευρύτερες γεωργικές χρήσεις που φέρουν ανοχή σε αβιοτικό στρες (*ξηρασία, αλατότητα, στρες ψύχους*) και σε ποιοτικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τους πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολισμούς. Το κλείσιμο των στοματίων που επάγει η χιτοζάνη μέσω της εξάρτησης από τον μηχανισμό του αμπισσικού οξέος (*ABA*) (Iriti *et al.*, 2009), συμμετέχει στη προστασία από το περιβαλλοντικό στρες και απονέμεται σε αυτόν τον βιοδιεγέρτη.



Εικόνα 45: Αριστερά, χιτοζάνη προερχόμενη από κέλυφος οστρακόδερμων σε μορφή σκόνης. Δεξιά, σκόνη εκχυλίσματος λαμιναρίνης ως βιοπολυμερές υλικό προερχόμενο από τα καφέ άλγη *Laminaria japonica* Aresch. Πηγή: Agraval (2018) και <http://gr.priusextract.com/herbal-extract/anti-tumor-anti-cancer-herbal-extract/kelp-extract-laminarin.html>.

Διάφορα πολυμερή και ολιγομερή βιολογικής προέλευσης ή (ημι) συνθετικές παραλλαγές χρησιμοποιούνται αυξανόμενα στη γεωργία ως εκκινητές της φυτικής άμυνας, συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών των φυκιών που αναφέρθηκαν ήδη (ενότητα 1.3.2.3). Ένα καλό παράδειγμα είναι η λαμιναρίνη, μια γλυκάνη αποθήκευσης από καστανή άλγη, εκ της οποίας χρησιμοποιούνται καθαρά παρασκευάσματα στις γεωργικές εφαρμογές. Παρόλο που η διάκριση πρέπει να γίνει μεταξύ βιοελέγχου και βιοδιέγερσης (λχ. ενισχύοντας το αβιοτικό στρες), τα σηματοδοτικά μονοπάτια πρέπει να αλληλοσυνδέονται και οι δύο επιπτώσεις να προκύπτουν πρακτικά από την εφαρμογή των ίδιων επαγωγέων (Gozzo & Faoro, 2013).

1.3.2.5 Ανόργανα συστατικά

Χημικά στοιχεία που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών και μπορεί να είναι απαραίτητα σε συγκεκριμένες τάξεις αλλά δεν απαιτούνται από όλα τα φυτά, καλούνται ωφέλιμα στοιχεία (Pilon-Smits *et al.*, 2009). Τα πέντε κύρια ωφέλιμα στοιχεία παρόντα στο έδαφος και στα φυτά είναι τα αργίλιο (Al), κοβάλτιο (Co), νάτριο (Na), σελήνιο (Se) και πυρίτιο (Si) ως ανόργανα άλατα και αδιάλυτες μορφές όπως άμορφο πυρίτιο ($SiO_2 \cdot nH_2O$) στα αγροστώδη είδη. Αυτές οι ωφέλιμες λειτουργίες μπορεί να είναι συστατικές όπως η ενδυνάμωση των κυτταρικών τοιχωμάτων από αποθέσεις πυριτίου, ή να εκφράζονται σε καθορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως στην επίθεση των παθογόνων για σελήνιο και οσμωτικό στρες για νάτριο.



Εικόνα 46: Ανόργανα συστατικά σε μορφή ορυκτών για χρήση τους ως βιοδιεγέρτες. Πηγή: <https://study.com/academy/lesson/what-are-inorganic-compounds-definition-characteristics-examples.html>.

Ο ορισμός των ωφέλιμων στοιχείων δεν είναι συνεπώς περιορισμένος στις χημικές του φύσεις, αλλά πρέπει να απευθύνεται επίσης στα ειδικά περιεχόμενα όπου μπορούν να παρατηρηθούν οι θετικές επιδράσεις στην φυτική ανάπτυξη και ανταπόκριση του στρες. Μπορεί επίσης να υποθεθεί ότι η βιοδραστικότητα κάποιων σύμπλοκων βιοδιεγερτών όπως τα εκχυλίσματα φυκιών, υπολείμματα καλλιεργειών ή ζωικά απόβλητα περιλαμβάνει τις φυσιολογικές λειτουργίες των περιεχόμενων ωφέλιμων στοιχείων.

Στην επιστημονική βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές επιπτώσεις των ωφέλιμων στοιχείων που προωθούν την ανάπτυξη των φυτών, τη ποιότητα των φυτικών προϊόντων και την ανοχή στο αβιοτικό στρες. Αυτό περιλαμβάνει την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος, την ρύθμιση όσμωσης, τη μειωμένη διαπνοή από τα κρυσταλλικά αποθέματα, τη θερμική ρύθμιση μέσω αντανάκλασης της ακτινοβολίας, της ενζυμικής δράσης μέσω συμπαραγόντων, τη φυτική θρέψη δια αλληλεπιδράσεων με άλλα στοιχεία κατά την απορρόφηση και κινητικότητα, την αντιοξειδωτική προστασία, τις αλληλεπιδράσεις με ανταπόκριση συμβιωτικών, παθογόνων και φυτοφάγων οργανισμών, τη προστασία έναντι της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων, τη σύνθεση φυτοορμονών και τη σηματοδότηση (Pilon-Smits *et al.*, 2009).

Τα ανόργανα άλατα ωφέλιμων και απαραίτητων στοιχείων όπως χλωρίδια, φωσφορικά, φωσφίδια, πυριτικά και ανθρακικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως μυκητοκτόνα (Delloroulos *et al.*, 2010). Παρόλο που οι μηχανισμοί δράσης δεν έχουν καθιερωθεί πλήρως, αυτές οι ανόργανες ενώσεις επηρεάζουν την ωσμωτική, ΡΗ και οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, τη σηματοδότηση ορμονών και τα ένζυμα που σχετίζονται στην ανταπόκριση του στρες (πχ. *υπεροξειδάσες*). Η λειτουργία τους ως βιοδιεγέρτης της φυτικής ανάπτυξης δρώντας στην αποτελεσματικότητα θρέψης και στην ανοχή αβιοτικού στρες, διαχωρίζοντάς τα συνεπώς από την μυκητοκτόνο δράση τους και από την λειτουργία τους ως λίπασμα, καθιστώντας τα ως πηγές θρεπτικών συστατικών χρήζει περισσότερης προσοχής.

1.3.2.6 Ωφέλιμοι μύκητες

Οι μύκητες αλληλεπιδρούν με τις ρίζες των φυτών κατά διαφορετικούς τρόπους. Από αμοιβαίες συμβιώσεις (λχ. όταν και οι δύο οργανισμοί ζουν σε άμεση επαφή μεταξύ τους και καθιερώνουν αμοιβαία ωφέλιμες σχέσεις), μέχρι παρασιτισμό (Bechie & Bidochka, 2014). Τα φυτά και οι μύκητες έχουν συνεξελιχθεί από τη προέλευση των επίγειων φυτών, και η έννοια της συνέχισης αμοιβαιότητας-παρασιτισμού είναι χρήσιμη στη περιγραφή του παρατεταμένου εύρους των σχέσεων που αναπτύχθηκαν κατά τους εξελικτικούς χρόνους (Bonfante & Genre, 2010; Johnson & Graham, 2013).

Η μεταγενωμική είναι ένα ενδιαφέρον εργαλείο για την καταγραφή και μελέτη μικροβιακών σχέσεων στη ριζόσφαιρα. Ο εμβολιασμός των φυτών με διαλύματα πολλαπλασιαστικών σωμάτων και των εδαφών συμπληρώνει αυτές τις προσεγγίσεις (Sensoy *et al.*, 2007; Sorensen *et al.*, 2008; Candido *et al.*, 2013, 2015; Colla *et al.*, 2015; Sarkar *et al.*, 2015).

Τα βασιμένα σε μύκητες προϊόντα που εφαρμόζονται στα φυτά για να προωθήσουν την αποτελεσματικότητα θρέψης, την ανοχή στο στρες, την απόδοση καλλιέργειας και τη ποιότητα προϊόντος πρέπει να εμπίπτουν στην έννοια των βιοδιεγερτών.

Βάσει των επιδράσεων των ωφέλιμων ενδοφυτικών μυκήτων που περιγράφονται στις παρακάτω ενότητες, πρέπει αυτοί να λογίζονται ως βιοδιεγέρτες, παρά τις γεωργικές τους χρήσεις που υποστηρίζονται επί του παρόντος ως βιογεωργικά φάρμακα.

1.3.2.6.1 Μυκόρριζα (*Glomus* sp.)

Οι μυκορριζικοί μύκητες είναι είναι μια ετερογενής ομάδα από τάξεις που καθιερώνουν συμβιώσεις με πάνω από το 90% όλων των φυτικών ειδών. Μεταξύ των διαφορετικών μορφών των φυσικών αλληλεπιδράσεων και τάξεων που σχετίζονται, η μυκόρριζα που σχηματίζει θύσανους (arbuslulars) (AMF) είναι ένας ευρέως διαδεδομένος τύπος από ενδομυκόρριζες που σχετίζονται με φυτικές καλλιέργειες και φυτοκομικά φυτά, όπου οι μυκητιακές υφές των ειδών του Glomeromycota διεισδύουν τα φλοιώδη κύτταρα της ρίζας και σχηματίζουν διακλαδισμένες δομές καλούμενες θύσανοι (Bonfante & Genre, 2010), (Bechie & Bidochka, 2014). Υπάρχει ένα αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση μυκόρριζας για την προώθηση αειφόρου γεωργίας, λαμβάνοντας υπόψη τα ευρέως αποδεκτά οφέλη των συμβιώσεων στην αποτελεσματικότητα διατροφής (και για τα μακροθρεπτικά, ιδίως του φωσφόρου, αλλά και για τα μικροθρεπτικά συστατικά), ισορροπία ύδατος και στη προστασία των φυτών έναντι του βιοτικού και αβιοτικού στρες (Auge, 2001), (Gianinazzi *et al.*, 2010), (Hamel & Plenchette, 2007), (Harrier & Watson, 2004), (Siddiqui *et al.*, 2008), (van der Heijden *et al.*, 2004).



Εικόνα 47: Αριστερά, απομόνωση του μυκορριζικού μύκητα *Gamarada debralockiae* απομονωμένο από το ριζικό σύστημα του φυτού *Woollisia pungens* (*Ericaceae*). Δεξιά, ριζικό σύστημα φυτών που αναπτύχθηκαν με τη χρήση μυκόρριζας (αριστερά) σε σχέση με φυτού που αναπτύχθηκε δίχως τη χρήση μυκόρριζας, με εμφανείς μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους. Πηγή: *Midgley et al., (2002)* και https://daoutop.gr/%CE%B1%CE%B5%CE%B9%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE-%CE%B3%CE%B5%CF%89%CF%81%CE%B3%CE%AF%CE%B1/blog-post_22/.

Μια σχετικά πρόσφατη γνώση επισημαίνει την ύπαρξη των υφικών δικτύων που επικοινωνούν όχι μόνο με μυκητιακούς και φυτικούς συνεργάτες, αλλά επίσης και μεμονωμένα φυτά εντός μιας φυτικής κοινότητας. Αυτό μπορεί να έχει σημαντικές οικολογικές και γεωργικές επιπτώσεις μιας και υπάρχουν στοιχεία ότι οι μυκητιακοί αγωγοί επιτρέπουν τη διαφυτική σηματοδότηση (Simard et al., 2012; Johnson & Gilbert, 2015). Ως περαιτέρω πεδίο έρευνας η AMF σχηματίζει τριμερείς σχέσεις (associations) με φυτά και ριζοβακτήρια τα οποία σχετίζονται με καταστάσεις πρακτικού τομέα (Siddiqui et al., 2008). Για να αποκομιστούν τα οφέλη των μυκορριζιακών σχέσεων, πρέπει να υιοθετηθούν στις αλληλεπιδράσεις με μικροοργανισμούς κάποιες πρακτικές διαχείρισης καλλιεργειών και καλλιεργήσιμες ποικιλίες φυτών (Piechette et al., 2005; Hamel & Piechette, 2007; Gianinazzi et al., 2010; Sheng et al., 2011).

Ένα κύριο ζήτημα περιορισμού της χρήσης των βασισμένων σε μύκητες προϊόντων είναι η τεχνική δυσκολία να πολλαπλασιάσουν την AMF σε μεγάλη κλίμακα, λόγω του βιοτροφικού τους χαρακτήρα (Dalpe & Montreal, 2004) και πιο συγκεκριμένα λόγω της έλλειψης κατανόησης των καθοριστικών παραγόντων των εξειδικεύσεων ξενιστού και δυναμικής του πλυθυσμού των μυκορριζιακών κοινοτήτων στα αγροοικοσυστήματα.

1.3.2.6.2 *Trichoderma* spp.

Πέραν των προαναφερθέντων ζητημάτων στην εφαρμογή των βασισμένων σε μύκητες προϊόντων, υπάρχουν και άλλα μυκητιακά ενδόφυτα όπως το *Trichoderma* spp. (Ascomycota) και τα *Sebacinales* (βασιδιομύκητες με οργανισμό μοντέλο τον *Piriformospora indica*), που ξεχωρίζουν από τα μυκορριζιακά είδη και δύνανται να ζουν στο μικρότερο μέρος του ζωτικού του κύκλου μακριά από το φυτό για να αποικίσουν τις ρίζες, και ως προσφάτως γνωστό να μεταφέρουν θρεπτικά συστατικά στους ξενιστές τους χρησιμοποιώντας ελάχιστα κατανοητούς μηχανισμούς (Behie & Bidochka, 2014).



Εικόνα 48: Αριστερά, κονινή λήψη καλλιέργειας του ωφέλιμου μύκητα *Trichoderma harzianum* στελέχους T-22. Δεξιά, το *Trichoderma* δύναται να αναπτυχθεί μεταξύ των πρώτων δύο κυτταρικών στρωμάτων της ρίζας του ξενιστού. Πρωτεΐνες και ένζυμα διεγείρουν την παραγωγή σηματοδοτικών μορίων, τα οποία διαβιβάζονται στο συμβάν της επίθεσης παθογόνου, ενεργοποιώντας μια αμυντική απόκριση στο φυτό. Πηγή: George, (2019) και Harman *et al.*, 2004.

Τα *Trichoderma* υφίστανται αυξανόμενη προσοχή ταυτόχρονα ως εμβολιαστικά φυτών πιο εύκολα στο πολλαπλασιασμό *in vitro*, αλλά και σαν οργανισμοί μοντέλα για τον διαμελισμό (*dissecting*) των μηχανισμών της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών μεταξύ των μυκητιακών ενδοσυμβιωτικών και των ξενιστών τους. Κάποιοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς και κυρίως το *Trichoderma* spp. έχουν μελετηθεί παρατεταμένα και χρησιμοποιηθεί για τις ιδιότητες μυκοπαρσιτισμού (ως βιογεωργικό φάρμακο) και βιοελέγχου (ως επαγωγέας ανθεκτικότητας σε ασθένεια), και χρήζουν εκμετάλλευσης ως πηγές ενζύμων από βιοτεχνολογικές βιομηχανίες (Mukherjee *et al.*, 2012; Nicolas *et al.*, 2014). Τέλος υπάρχουν πειστικές ενδείξεις ότι επάγονται πολλές φυτικές αποκρίσεις συμπεριλαμβανομένων της αυξημένης ανοχής στο αβιοτικό στρες, αποτελεσματικότητα χρήσης θρεπτικών συστατικών και ανάπτυξης οργάνων και μορφογένεσης (Shoresh *et al.*, 2010; Colla *et al.*, 2015),.

1.3.2.7 Ωφέλιμα βακτήρια

Τα ωφέλιμα βακτήρια αλληλεπιδρούν με τα φυτά με όλους τους πιθανούς τρόπους (Ahmad *et al.*, 2008):

- Όπως και στους μύκητες έτσι και στα βακτήρια υπάρχει μια συνέχεια μεταξύ αμοιβαιότητας και παρασιτισμού.
- Οι βακτηριακοί θώκοι (niches) παρατείνονται από το έδαφος προς στο εσωτερικό των κυττάρων, με ενδιάμεσες τοποθεσίες που ονομάζονται ριζόσφαιρα και επιφάνεια ριζών (rhizoplane).
- Οι σχέσεις μπορεί να είναι παροδικές ή μόνιμες με κάποια βακτήρια όντας ακόμη και καθέτως μεταφερόμενα δια του σπόρου.
- Οι λειτουργίες που επηρεάζουν τη ζωή των φυτών καλύπτουν τη συμμετοχή στους βιοχημικούς κύκλους, τη παροχή θρεπτικών συστατικών, την αύξηση στην αποτελεσματικότητα της χρήσης θρεπτικών συστατικών, την επαγωγή ανθεκτικότητας σε ασθένειες, την ενίσχυση ανοχής στο αβιοτικό στρες και τη διαμόρφωση της μορφογένεσης από ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών.

Βάσει της γεωργικής χρήσης των βιοδιεγερτών αναγνωρίζονται δύο τύποι εντός αυτής της ταξινομικής, λειτουργικής και οικολογικής ποικιλομορφίας:

1) αμοιβαία ενδοσυμβιωτικά του τύπου *Rhizobium* και 2) αμοιβαία ριζοσφαιρικά ριζοβακτήρια προώθησης ανάπτυξης των φυτών (PGPRs). Το *Rhizobium* και οι σχετικές τάξεις εμπορευματοποιούνται ως βιολιπάσματα λχ. μικροβιακά εμβόλια που διευκολύνουν τη απόκτηση θρεπτικών συστατικών από τα φυτά. Η βιολογία και οι γεωργικές χρήσεις των συμβιώσεων που βασίζονται στο *Rhizobium* έχουν ανασκοπηθεί από την επιστημονική βιβλιογραφία και σε κείμενα.

Τα PGPRs είναι πολυλειτουργικά και επηρεάζουν όλες τις πτυχές της φυτικής ζωής όπως διατροφή και ανάπτυξη, μορφογένεση και ανάπτυξη, ανταπόκριση σε βιοτικό και αβιοτικό στρες, αλληλεπιδράσεις με άλλους οργανισμούς στα οικοσυστήματα (Ahmad *et al.*, 2008; Babalola, 2010; Berendsen *et al.*, 2012; Bhattacharyya & Jha, 2012; Gaiero *et al.*, 2013; Philippot *et al.*, 2013; Vacheron *et al.*, 2013; Berg *et al.*, 2014). Διάφορες από αυτές τις λειτουργίες εκπληρώνονται γενικά από τους ίδιους οργανισμούς μέσα σε βακτηριακά συμπόσια.

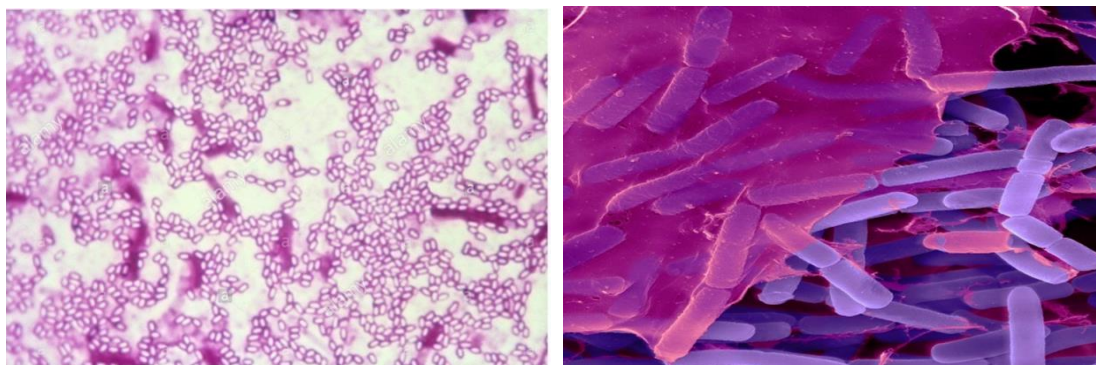
Οι γεωργικές χρήσεις των PGPRs περιορίζονται από αυτή τη πολυπλοκότητα, από τις μεταβλητές αποκρίσεις των καλλιεργήσιμων φυτικών ποικιλιών και από τα λαμβάνοντα περιβάλλοντα. Επίσης οι τεχνικές δυσκολίες που σχετίζονται με τη σύνθεση των εμβολίων δίνουν ασυνεπή αποτελέσματα στη πρακτική (Agora *et al.*, 2011; Brahmaaprakash & Sahu, 2012). Παρόλα αυτά η παγκόσμια αγορά των βακτηριακών βιοδιεγερτών αναπτύσσεται και οι εμβολιασμοί με PGPRs θεωρούνται πλέον σαν κάποιου είδους «προβιοτικά»

πχ. αποτελεσματικοί συντελεστές στη φυτική θρέψη και ανοσία (Berendsen *et al.*, 2012).

1.3.2.7.1 *Bacillus* spp.

Το γένος *Bacillus* αποτελεί μέλος του φύλου *Firmicutes* με 266 αναγνωρισμένα είδη και ανήκουν στα θετικά κατά *Gram* βακτήρια σχήματος ράβδου. Τα είδη του μπορεί να είναι είτε υποχρεωτικά αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια (Baron, 1996).

Οι βάκιλλοι είναι πανταχού παρόντες στο έδαφος και κάποια είδη παράγουν αντιμικροβιακά συστατικά (πχ. *B. siamensis*) τα οποία αναστέλλουν φυτοπαθογόνα όπως τους μύκητες *Rhizoctonia solani* και *Botrytis cinerea* και προωθούν την ανάπτυξη των φυτών μέσω εκκρίσεων πτητικών συστατικών (Jeong *et al.*, 2017), επομένως συμπεριλαμβάνονται στη μικροβιακή κοινότητα εμπορικών σκευασμάτων φυτικών βιοδιεγερτών. Άλλα παραδείγματα βακίλλων αναστολής του *R. solani* αναφέρονται στην ενότητα βιολογικής αντιμετώπισης του μύκητα (1.2.7.4).



Εικόνα 49: Αριστερά, Μικρογραφία φωτός (LM) βακτηρίων *Bacillus* spp. που δείχνει εμφάνιση σπορίων και βλαστικών κυττάρων. Κρυσταλλική ιώδης βαφή. Μεγέθυνση x 1000 σε 35 mm. Δεξιά, Ηλεκτρονική μικροσκόπηση έγχρωμης σάρωσης (SEM) *Bacillus* spp. να σχηματίζει βιοφίλμ (κυρίως συγκεντρώσεις βακτηρίων σε υδατικά περιβάλλοντα). Πηγή: <https://www.alamy.com/stock-photo-bacillus-sp-bacteria-lm-134944421.html> και <https://fineartamerica.com/featured/bacillus-sp-forming-a-biofilm-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html> από τον Kunkel, (2018).

1.3.2.7.2 *Streptomyces*

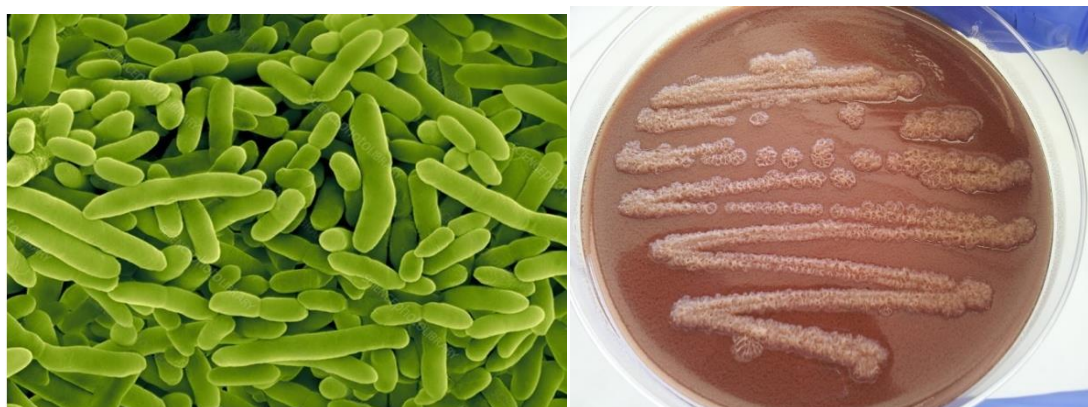


Εικόνα 50: Αριστερά, βακτήρια *Streptomyces* sp. σε Ηλεκτρονική μικροσκόπηση έγχρωμης σάρωσης (SEM). Μεγέθυνση x 2600 σε 5x7 cm, μέγεθος x 4300 σε 4x5. Δεξιά, εξερευνητικά κύτταρα *Streptomyces venezuelae* που αναπτύσσονται πάνω σε πέτρα ενσωματωμένη σε θρεπτικό υλικό PDA. Πηγή: *Sciencephotos.com* και Jones et al., (2017).

Αποτελούν το μεγαλύτερο γένος των *Actinobacteria* και τύπος γένους στην οικογένεια *Streptomyacataceae* (Kampfer, 2006) με πάνω από 500 αναγνωρισμένα βακτήρια (Euzaby, 2008). Αποτελούν αερόβια, θετικά κατά Gram βακτήρια με υψηλό περιεχόμενο αζωτούχων βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης στο γονιδίωμά τους (Madigan & Martinko, 2005). Εντοπίζονται κυρίως στο έδαφος και σε φυτείες που αποσυντίθενται. Παράγουν φυσικούς δευτερογενείς μεταβολίτες που αποτελούν κλινικά χρήσιμα αντιβιοτικά με πιο γνωστό την streptomycin (Kieser et al., 2000). Επομένως η βιοδραστικότητα των αντιβιοτικών τους τα καθιστούν εύχρηστα στη φαρμακευτική βιομηχανία αλλά και στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων (λ.χ. *S. avermitillis* για παραγωγή της δ.ο *ivermectin* που εφαρμόζεται ενάντια σε προσβολές από νηματώδεις και αρθρόποδα και της *bialaphos* ζιζανιοκτόνου δράσης φυσικής προέλευσης) και βιοδιεγερτών λόγω κατάταξής τους σε ριζοβακτήρια προώθησης φυτικής ανάπτυξης (Lehr et al., 2007), (Schrey & Tarkka, 2008) από την 1) συνεισφορά τους σε κατασταλτικά εδάφη, 2) ανιβακτηριακή και ανιμυκητιακή τους δράση, 3) παραγωγή πηπικών συστατικών και 4) ικανότητά τους να ενισχύουν τη φυτική βιομάζα (Viaene et al., 2016).

1.3.2.7.3 *Pseudomonas* spp.

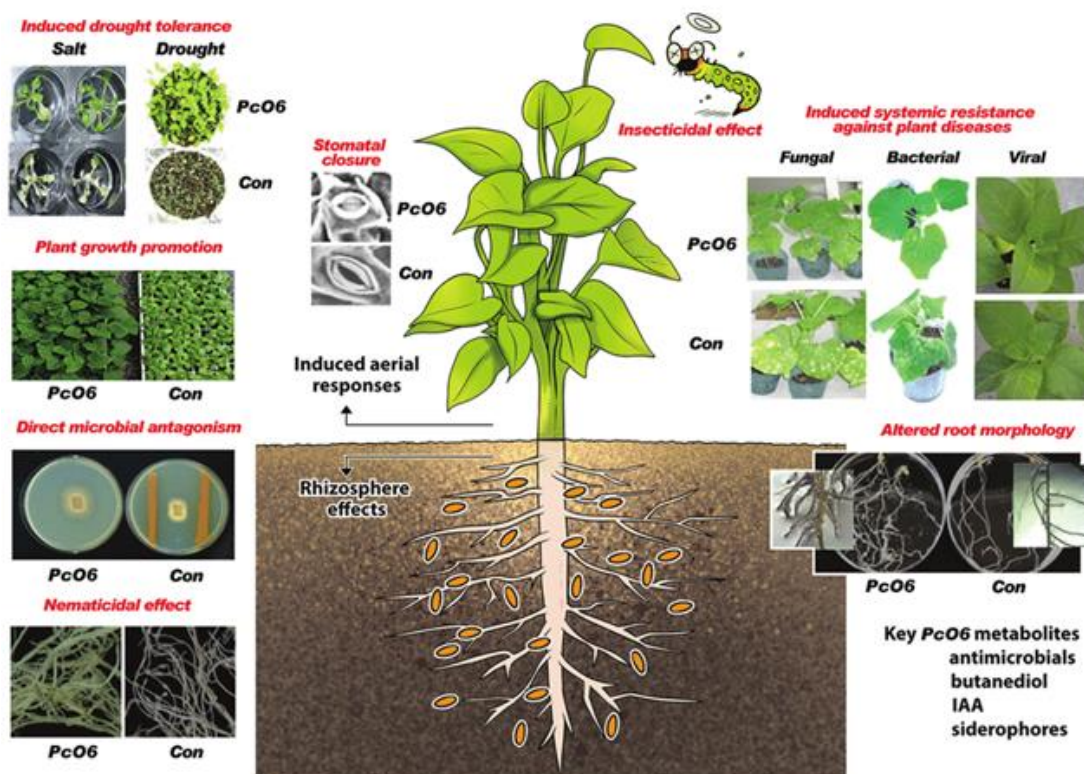
Το γένος *Pseudomonas* αποτελείται από αρνητικά κατά Gram *Gamma*proteobacteria που ανήκουν στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και περιέχουν 191 έγκυρα περιγραφόμενα είδη (Euzeby, 1997), τα οποία επιδεικνύουν μια μεγάλη μεταβολική ποικιλία και συνεπώς μπορούν να αποικίσουν ένα ευρύ φάσμα θωκών (*niches*) (Madigan & Martinko, 2005).



Εικόνα 51: Αριστερά, έγχρωμη σάρωση ηλεκτρονικής μικρογραφίας (SEM) του αερόβιου, αρνητικού κατά Gram και εντερικού βακτηρίου ραβδόμορφου σχήματος *Pseudomonas putida*. Μεγέθυνση x 1600 όταν ο κοντύτερος άξονας εκτύπωσε στα 25 mm. Δεξιά, καλλιέργεια του αρνητικού κατά Gram, εδαφογενούς βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* σε θρεπτικό υλικό εντός τρυβλίου Petri με τη μέθοδο streaking. Πηγή: <https://www.sciencephoto.com/media/798805/view> και https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_stutzeri.

Από γεωπονική άποψη το *Pseudomonas* εφαρμόζεται άμεσα στα εδάφη σαν παράγοντας βιολογικού ελέγχου για παρεμπόδιση της ανάπτυξης ή εγκαθίδρυσης φυτοπαθογόνων των καλλιεργειών (Haas & Defago, 2005). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι ιδιότητες των ειδών *P. fluorescens* και *P. protegens* ως PGPA αλλά χωρίς να είναι σαφής ο τρόπος επίτευξης, με διάφορες θεωρίες εκ πειραμάτων να κάνουν λόγο για επαγωγή διασυστηματικής αντοχής στα φυτά ξενιστές αυτών των βακτηρίων ώστε να αμυνθούν καλύτερα από την επίθεση παθογόνων, για ανταγωνισμό τους με άλλα παθογόνα στο εδαφικό μικροβίωμα μέσω έκκρισης σιδηροφόρων παραγόντων δίνοντάς τους ένα σημαντικό ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην δέσμευση σιδήρου και μέσω παραγωγής ανταγωνιστικών προς τους άλλους μικροβιακούς οργανισμούς εδάφους αντιβιοτικών ενώσεων όπως βουτανοδιόλη (Anderson *et al.*, 2017) (Εικόνα 52) ή τύπου phenazine ή υδροκυανίου (Haas & Defago, 2005). Επιπλέον άλλοι αξιοσημείωτοι παράγοντες βιολογικού ελέγχου αποτελούν τα *P. chlororaphis* που παράγουν αντιβιοτικά τύπου fenazine, τα οποία είναι δραστικά έναντι ορισμένων φυτοπαθογόνων μυκήτων (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000), εντόμων και νηματωδών (Anderson *et al.*, 2017), και τα συγγενικά παρεμφερή *P.*

aurantiaca που παράγουν την αντιβιοτική ένωση δι-2,4-diacetylfluorogluculmethane ενάντια σε αρνητικά κατά *Gram* βακτήρια (Esirpon *et al.*, 1975).



Εικόνα 52: Ωφέλιμες επιπτώσεις της *Pseudomonas chlororaphis* O6 στην υγεία του φυτού από την αποίκισή της στη ρίζα του. Το *P. chlororaphis* O6 παράγει πολλούς μεταβολίτες που είναι άμεσα ανταγωνιστικοί σε φυτοπαθογόνα συμπεριλαμβανομένων των νηματωδών και εντόμων. Η μικροβιακή αποίκιση τροποποιεί τη μορφολογία της ρίζας, αυξάνει την ανάπτυξη του φυτού και επάγει την συστηματική ανοχή έναντι φυτικών ασθενειών. Ο Έλεγχος της διαθεσιμότητας σιδήρου από τους μεταβολίτες του *P. chlororaphis* O6 είναι ένας σημαντικό χαρακτηριστικό στη ριζόσφαιρα. Το μερικό κλείσιμο των στοματίων που επάγεται από τον πτητικό μεταβολίτη του *P. chlororaphis* O6, butanediol, εμπλέκεται στον μηχανισμό που επάγει συστηματική ανοχή έναντι φυτικών ασθενειών και αβιοτικών στρες. Πηγή: Anderson *et al.*, (2017).

1.3.3 Κοινά χαρακτηριστικά των βιοδιεγερτών

Ένας κοινός καθορισμός κάποιων ουσιών ως βιοδιεγέρτες δικαιολογείται μόνο αν οι περιγραφείσες αυτές ουσίες και οι μικροοργανισμοί μοιράζονται κάποια σημαντικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη φύση, τις λειτουργίες και/ή τις χρήσεις τους. Τέτοια χαρακτηριστικά θα αποτελέσουν το έδαφος για κάθε ορισμό. Επομένως από βιβλιογραφική ανασκόπηση, μπορούν να αντληθούν τα επακόλουθα συμπεράσματα:

➤ Η φύση των βιοδιεγερτών είναι ποικίλη. Εμπλέκονται τόσο ουσίες όσο και μικροοργανισμοί. Οι ουσίες μπορεί να είναι ενώσεις (πχ. *βεταΐνη γλυκίνης*) ή ομάδες από ενώσεις μεμονωμένης φυσικής προέλευσης εκ των οποίων η σύσταση και τα βιοδραστικά συστατικά δεν χαρακτηρίζονται πλήρως (πχ. *εκχυλίσματα φυκιών*). Οι ουσίες που σχολιάζονται σε αυτή την ενότητα φυτικών βιοδιεγερτών είναι φυσικά παραγώμενα οργανικά συστατικά ή ανόργανα μόρια, αλλά δεν πρέπει και τα συνθετικά συστατικά να εξαιρεθούν ιδίως αν περιλαμβάνονται εντός των βιοδιεγερτών συγκεκριμένοι ρυθμιστές φυτικής ανάπτυξης (πχ. *τα αζωτο-φαινοξειδία ανιόντα και άλατα περιγράφονται και εμπορευματοποιούνται ως «βιοδιεγέρτες» αλλά είναι συνθετικά φαινορικά συστατικά καταγεγραμμένα ως προϊόντα φυτικής παραγωγής σύμφωνα με τον νόμο της Ε.Ε.*) (Przybysk et al., 2014). Οι μικροβιακοί εμβολιασμοί μπορεί να περιέχουν μεμονωμένα στελέχη (πχ. *Bacillus subtilis*) ή μίγματα μικροοργανισμών που εμφανίζουν προσθετικές ή συνεργιστικές επιπτώσεις (πχ. *αρκετά προϊόντα στην αγορά*). Βάσει σύγχρονης επιστημονικής βιβλιογραφίας η τεκμηρίωση που δίνεται από τις εταιρείες για τους βιοδιεγέρτες μπορεί να απευθύνεται στα βιοδραστικά συστατικά ή στα εμπορευματοποιήσιμα προϊόντα, συνδυάζοντάς τα με λιπάσματα ή φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Κάθε νομοθετικός ορισμός θα πρέπει να ξεκαθαρίζει εάν τα συστατικά ή τα τελικά προϊόντα (ή και τα δύο) καλύπτονται πραγματικά.

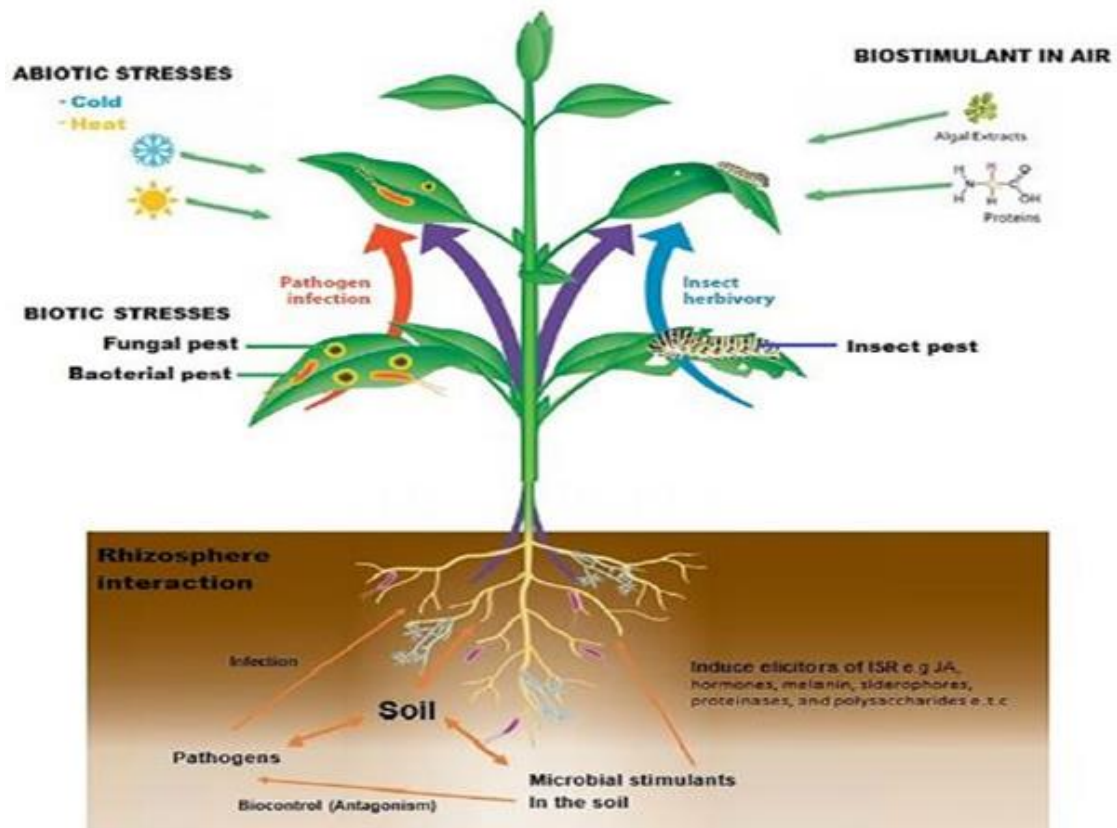
➤ Οι φυσιολογικές λειτουργίες είναι ποικίλες. Ο όρος φυσιολογική λειτουργία αναφέρεται σε οποιαδήποτε δράση των φυτικών διαδικασιών (Πίνακας 18). Παραδείγματα των φυσιολογικών λειτουργιών αποτελούν τη προστασία των φωτοσυνθετικών μηχανημάτων ενάντια στη ζημιά από φως, ή την έναρξη των πλευρικών ριζών. Οι λειτουργίες υποστηρίζονται ασφαλώς από κυτταρικούς μηχανισμούς όπως την απενεργοποίηση ενεργών ριζών οξυγόνου από τα ανποξειδωτικά ή από αυξημένη σύνθεση μεταφορών αυξίνης προς συνέχεια των προηγούμενων δύο παραδειγμάτων. Οι φυσιολογικές λειτουργίες και οι υποκείμενοι κυτταρικοί μηχανισμοί μπορεί να απευθύνονται συλλογικά ως «μηχανισμοί δράσεων» των

βιοδιεγερτών. Εν τέλει αυτοί οι μηχανισμοί δράσεων εξηγούν τις γεωργικές λειτουργίες των βιοδιεγερτών πχ. αυξημένη ανοχή στο αβιοτικό στρες (προκαλώντας οξειδωτικό στρες), ή αυξημένη αποτελεσματικότητα χρήσης αζώτου (η οποία βασίζεται στη ικανότητα συλλογής τροφής των ριζών, συνεπώς στη πυκνότητα των πλευρικών ριζών). Εν κατακλείδι οι γεωργικές λειτουργίες μπορούν να καθοριστούν σε οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη: υψηλότερη αποδοση καλλιέργειας, εξοικονόμηση λιπασμάτων, αυξημένη ποιότητα και κερδοφορία των καλλιεργητικών προϊόντων, ενισχυμένες υπηρεσίες οικοσυστήματος κτλ.

➤ Οι επιστημονικά αποδεδειγμένες επιδράσεις όλων των βιοδιεγερτών συγκλίνουν σε τουλάχιστον μία ή διάφορες από τις εξής γεωργικές λειτουργίες: ενίσχυση αποτελεσματικότητας θρέψης, ανοχή στο αβιοτικό στρες και/ή χαρακτηριστικά ποιότητας καλλιέργειας. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά μπορεί να αναφέρονται στη θρεπτική αξία, στο περιεχόμενο πρωτεΐνης κόκκου, διάρκεια ζωής κτλ. Αυτές οι δράσεις πρέπει να αποτελούν τη βάση κάθε ορισμού των βιοδιεγερτών. Η διέγερση των ανταποκρίσεων στα παθογόνα μέσω εκκινητών και ρυθμιστών γονιδίων των φυτών επιτυγχάνεται εξίσου και από πολλούς περιγράφοντες βιοδιεγέρτες όπως χιτοζάνη, λαμιναρίνη, κάποια PGPRs (Εικόνα 53) κτλ. Ωστόσο υπάρχει μια αυξανόμενη ομοφωνία μεταξύ των νομοθετικών αρχών και ενδιαφερόμενων να διατηρήσουν τη βιοδιέγερση και το βιολογικό έλεγχο χωριστά από νομοθετικής άποψης. Επομένως το βιοτικό στρες αφαιρείται από το πεδίο εφαρμογής του ορισμού.

➤ Ο ορισμός των οικονομικών και περιβαλλοντικών οφελών βασίζεται σε γεωργικές και περιβαλλοντικές πολιτικές τόσο από την άποψη των στόχων όσο και των τελικών σημείων αξιολόγησης. Παρόλο που τα κίνητρα για ανάπτυξη βιοδιεγερτών συνδέονται με αυτές τις πτυχές, δεν πρέπει να θεωρούνται το έδαφος για έναν βασισμένο επιστημονικά ορισμό των βιοδιεγερτών.

Εν κατακλείδι κάθε ορισμός των βιοδιεγερτών πρέπει να εστιάζει στις γεωργικές λειτουργίες τους και όχι στη φύση των συστατικών ή των μηχανισμών δράσεών τους, όπως καθορίστηκε από τα παραπάνω.



Εικόνα 53: Αναπαράσταση επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (μωβ βέλη) με τη βοήθεια των μικροοργανισμών εδάφους ενάντια σε μύκητες/βακτήρια (κόκκινα βέλη), εχθρούς μέσω μιας σειράς ριζοσφαιρικών αλληλεπιδράσεων που φαίνονται από τα καφέ βέλη στη περιοχή του εδάφους. Πηγή: Pieterse *et al.*, (2012).

Πίνακας 18: Επιδράσεις των βιοδιεγερτών στους αποδόσεις των καλλιεργειών, από τους κυτταρικούς τους στόχους στα φυτά προς τις φυσιολογικές λειτουργίες ολόκληρου φυτού, προς τις γεωργικές/φυτοκομικές λειτουργίες και προς τις αναμενόμενες οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη. (Dobbelaere *et al.*, 1999, Huang *et al.*, 2010, Shabala *et al.*, 2012)

	Χουμικά οξέα	Εκχυλίσματα φυκιών	Πρωτεϊνικά υδρολύματα	Βεταΐνη γλυκίνης	ΡΙζοβακτήρια προώθησης ανάπτυξης φυτών
<p>Κυτταρικός μηχανισμός (λ.χ. αλληλεπίδραση με κυτταρικά συστατικά και διεργασίες)</p> <p>↓</p>	<p>Ενεργοποίηση H⁺-ATPασων μεμβράνης πλάσματος και προώθηση χαλάρωσης και επιμήκυνσης κυτταρικού τοιχώματος σε ρίζες αραβοσίτου (<i>Zea mays</i>) (Jindo <i>et al.</i>, 2012)</p>	<p>Τα εκχυλίσματα <i>Ascophyllum nosodium</i> διεγείρουν έκφραση γονιδίων κωδικοποιώντας μεταφορείς μικροθρεπτικών συστατικών (πχ. <i>Cu, Fe, Zn</i>) σε ελαιοκράμβη (<i>Brassica napus</i>) (Billard <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>Το ενζυματικό υδρόλυμα από αλφαλφα (<i>Medicago sativa</i>) διεγείρει το ένζυμο λυάσης-φαινυλαλανίνης αμμωνίας, την έκφραση γονιδίων και τη παραγωγή φλαβονοειδών υπό στρες άλατος (Ertani <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>Προστασία φωτοσυστήματος II έναντι αλατο-επαγόμενης φωτοζημιάς στη κινόα (Shabala <i>et al.</i>, 2012), πιθανότατα δια την ενεργοποίηση των απενεργοποιητών ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Chen & Murata, 2011)</p>	<p>Το <i>Azospirillum brasilense</i> απελευθερώνει σηματοδοτικά μονοπάτια αυξίνης που σχετίζονται στη μορφογένεση της ρίζας στο χειμερινό σπάρι (<i>Triticum aestivum</i>) (Dobbelaere <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p>Φυσιολογική λειτουργία (πχ. Δράση σε διεργασίες ολόκληρου του φυτού)</p> <p>↓</p>	<p>Αυξημένη γραμμική ανάπτυξη των ριζών, ριζικής βιομάζας</p>	<p>Αυξημένες συγκεντρώσεις ιστών και μεταφορά μικροθρεπτικών συστατικών από τη ρίζα στους βλαστούς</p>	<p>Προστασία μέσω φλαβονοειδών έναντι στη οξειδωτική και UV ζημιά (Huang <i>et al.</i>, 2010)</p>	<p>Συντήρηση της φωτοσυνθετικής δράσης των φύλλων υπό συνθήκες στρες άλατος</p>	<p>Αυξημένη πυκνότητα πλευρικής ρίζας επιφάνεια ριζικών τριχών</p>
<p>Γεωργική/Φυτοκομική λειτουργία (πχ. Χαρακτηριστικά εκρών που σχετίζονται με την απόδοση των καλλιεργειών)</p> <p>↓</p>	<p>Αυξημένη ικανότητα συλλογής τροφής της ρίζας, ενισχυμένη αποτελεσματικότητα χρήσης θρεπτικών συστατικών</p>	<p>Βελτιωμένη σύσταση μεταλλικών στοιχείων των φυτικών ιστών</p>	<p>Αυξημένη ανοχή της καλλιέργειας στο αβιοτικό στρες (πχ. άλας)</p>	<p>Αυξημένη ανοχή καλλιέργειας στο αβιοτικό στρες (πχ. υψηλή αλατότητα)</p>	<p>Αυξημένη ικανότητα συλλογής τροφής της ρίζας, ενισχυμένη αποτελεσματικότητα χρήσης θρεπτικών συστατικών</p>
<p>Οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη (πχ. Αλλαγές στην απόδοση, ποιότητας προϊόντων, υπηρεσιών οικοσυστήματος)</p>	<p>Υψηλότερη απόδοση καλλιέργειας, εξοικονόμησης λιπασμάτων και μειωμένες απώλειες προς το περιβάλλον</p>	<p>Ενισχυμένη θρεπτική αξία, βιο-οχύρωση των φυτικών ιστών (αυξημένα περιεχόμενα σε S, Fe, Zn, Mg, Cu)</p>	<p>Υψηλότερη απόδοση καλλιέργειας υπό συνθήκες στρες (πχ. Υψηλή αλατότητα)</p>	<p>Υψηλότερη απόδοση καλλιεργειών υπό συνθήκες στρες (πχ. Υψηλή αλατότητα)</p>	<p>Υψηλότερη απόδοση καλλιέργειας, εξοικονόμηση λιπασμάτων και μειωμένες απώλειες προς το περιβάλλον</p>

1.3.4 Η έννοια του τρόπου/μηχανισμού δράσης των βιοδιεγερτών

Η προσπάθεια κατανόησης του τρόπου δράσης ενός χημικού γεωργικού φαρμάκου έχει αποτελέσει μια θεμελιώδη απαίτηση για μια αποτελεσματική εμπορία και συχνά για μία νομοθετική απαίτηση των κατασκευασμένων προϊόντων που χρησιμοποιούνται στη γεωργία. Παρόλο που στη περίπτωση των γεωργικών φαρμάκων ο τρόπος δράσης εννοεί μια «συγκεκριμένη επίδραση πάνω σε μια ξεχωριστή βιοχημική ή νομοθετική ρυθμιστική διεργασία» (πχ. η δραστική ουσία *glyphosate* αναστέλλει την δράση του ενζύμου *enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*, EPSPS), στη περίπτωση των βιοδιεγερτών συχνά δεν τηρούνται αυτά τα πρότυπα της εξειδίκευσης και πράγματι υπάρχουν μερικά προϊόντα βιοδιεγερτών για τα οποία έχει ταυτοποιηθεί ένα συγκεκριμένο βιοχημικό πεδίο στόχου και ο γνωστός τρόπος δράσης. Ωστόσο για ένα μικρό υποσύνολο βιοδιεγερτών έχει ταυτοποιηθεί ένα αποδεδειγμένο αντίκτυπο σε γενικά βιοχημικά ή μοριακά μονοπάτια ή φυσιολογικές διεργασίες με τον όρο «μηχανισμός δράσης», παρόλο που εμφανής «τρόπος δράσης» μπορεί να μην είναι γνωστός. Ένα παράδειγμα «μηχανισμού δράσης» θα ήταν η διέγερση της φωτοσύνθεσης ή η υποέκφραση του εμφανούς βιοχημικού ή μοριακού «τρόπου δράσης».

Ωστόσο για πολλά προϊόντα βιοδιεγερτών δεν έχουν ταυτοποιηθεί ούτε ο τρόπος δράσης, ούτε ο μηχανισμός δράσης. Η παρουσία κάποιων πλαστών προϊόντων στην αγορά αφήνει υπόνοιες ότι οι βιοδιεγέρτες είναι εξολοκλήρου απάτη (Basak, 2008), ένας υποτιμητικός όρος που υπονοεί ότι το προϊόν δεν έχει καμία αξία. Οι πολυσυστατικοί βιοδιεγέρτες είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αναγνωριστούν μιας και μπορεί να έχουν συστατικά για τα οποία ο τρόπος δράσης είναι γνωστός και συστατικά δίχως αναγνωρισμένου λειτουργικού οφέλους. Επιπλέον οι πολυσυστατικοί βιοδιεγέρτες συχνά θα περιέχουν μετρήσιμες αλλά βιολογικώς μη συναφείς συγκεντρώσεις γνωστών απαραίτητων στοιχείων, αμινοξέων και φυτοορμονών κτλ, για τα οποία ο τρόπος δράσης είναι μεν γνωστός αλλά οι συγκεντρώσεις είναι μη σχετικές όταν χρησιμοποιούνται στις συνιστώμενες αναλογίες. Επομένως για πολλούς πολυσυστατικούς βιοδιεγέρτες στην αγορά σήμερα οι Yakhin et al., (2016) πρότειναν ότι η επίδειξη ενός σαφούς «μηχανισμού δράσης» είναι πιο λογικός και επιτεύξιμος κανονιστικός στόχος (regulatory goal), παρά απαιτώντας μία ξεκάθαρη επίδειξη του «τρόπου δράσης».

Η διορατικότητα της χρήσης των όρων «τρόπος και μηχανισμός δράσης» μπορεί να αντληθεί από την επιστήμη των γεωργικών φαρμάκων και από την ανάπτυξη των γεωργικών φαρμάκων. Στη πρώτη ο «μηχανισμός δράσης» περιγράφει την ολοκλήρωση όλων των βιοχημικών συμβάντων ακολουθουμένων της εφαρμογής, ενώ ο «τρόπος δράσης» χαρακτηρίζει τα κύρια χαρακτηριστικά ενός βιοδραστικού μορίου οδηγώντας στην επίδρασή του στα διαχειρισθέντα φυτά (Aliferis & Jabaji 2011). Με βάση τη βιβλιογραφία φυτικών βιορυθμιστών ο Halmann (1990) πρότεινε ότι ένας ιδανικά

κατανοητός τρόπος δράσης στους βιορυθμιστές φυτών σε μοριακό επίπεδο απαιτεί την ταυτοποίηση της θέσης υποδοχέα για κάθε ρυθμιστή, καθώς και τη διευκρίνηση των μεγενέστερων ανπιδράσεων. Στη πραγματικότητα όμως αυτό το πρότυπο δεν χρησιμοποιείται συχνά στο βιογεωργικό φάρμακο ή στα προϊόντα βιοδιεγερτών, όπου δεν μπορούν εύκολα να επιτευχθούν οι ταυτοποιήσεις των μοριακών στόχων όλων των βιοδιαθέσιμων (και συχνά *αχαρακτήριστων*) συστατικών εντός δεδομένου εκχυλίσματος.

Επί του παρόντος και δεδομένης της δυσκολίας καθορισμού του «*τρόπου δράσης*» για ένα πολύπλοκο πολυσυστατικό προϊόν όπως ο βιοδιεγέρτης, και αναγνωρίζοντας την ανάγκη της αγοράς στην επίτευξη νομιμότητας των βιοδιεγερτών, οι Yakhin *et al.*, (2016) πρότειναν η εστίαση της έρευνας και νομιμοποίησης των βιοδιεγερτών πρέπει να γίνεται υπό του καθορισμού του μηχανισμού δράσης, δίχως απαίτηση για το καθορισμό του τρόπου δράσης. Αυτό είναι και το πρότυπο πρακτικής για πολλά φαρμακευτικά προϊόντα. Με την ανάπτυξη προηγμένου αναλυτικού εξοπλισμού, βιοπληροφορικής, βιολογία συστημάτων και άλλων νέων μεθοδολογιών μπορεί να επιτευχθεί στο μέλλον μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των μηχανισμών, ακόμα και των πιθανών τρόπων δράσης αυτών των υλικών. Ενώ αυτή η πρόταση συνιστά ότι η ανάπτυξη και η εμπορία ενός βιοδιεγέρτη μπορεί να μην απαιτήσει επίδειξη του τρόπου δράσης, υφίσταται ακόμα το ενδιαφέρον των κατασκευαστών για την επίτευξη της κατανόηση του τρόπου δράσης αυτών των προϊόντων, έτσι ώστε αυτό να δύναται βελτίωσης και η χρήση του να δύναται βελτιστοποίησης για ποικίλα περιβάλλοντα και καλλιεργητικά συστήματα.

Οι μηχανισμοί δράσεις όλων πλην λίγων βιοδιεγερτών παραμένουν επί το πλείστον άγνωστοι (Rayorath *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2009; Rathore *et al.*, 2009). Αυτό οφείλεται πρωταρχικώς στην ετερογενή φύση των ακατέργαστων υλικών που χρησιμοποιούνται για παραγωγή και στα πολύπλοκα μίγματα των συστατικών που περιέχονται στα προϊόντα βιοδιεγερτών, κάτι που καθιστά σχεδόν αδύνατον να ταυτοποιηθούν τα ακριβή στοιχεία (ο) υπεύθυνα για τη βιολογική δράση, και να καθοριστούν οι εμπλεκόμενοι τρόποι(ος) δράσης (Paradikovic *et al.*, 2011). Ως εκ τούτου η εστίαση πρέπει να γίνεται υπό της ταυτοποίησης των «*μηχανισμών δράσης*» των βιοδιεγερτών όπως υποδεικνύεται από τα γενικά θετικά αντίκτυπα στη φυτική παραγωγικότητα μέσω ενίσχυσης διεργασιών όπως φωτοσύνθεσης, γήρανσης, διαμόρφωσης των φυτοορμονών, απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών και ύδατος, και ενεργοποίηση των γονιδίων υπεύθυνων για αντοχή σε αβιοτικά στρες και τροποποιημένη αρχιτεκτονική φυτού και φαινολογία (Khan *et al.*, 2009; Shekhar *et al.*, 2012). Ένα παράδειγμα αυτής της διεργασίας είναι οι εξελίξεις στη χρήση βασισμένων σε πρωτείνες βιοδιεγερτών για τους οποίους πρόσφατες μελέτες ταυτοποίησαν το μεταβολικό μονοπάτι στόχο και κάποιους από τους μηχανισμούς, μέσω των οποίων ασκούν τις επιδράσεις τους στα φυτά (Nardi *et al.*, 2016).

Για την περεταίρω κατανόηση των τρόπων/μηχανισμών δράσης του βιοδιεγέρτη οι Yakhin *et al.*, 2016 συστηματοποίησαν τα στάδια δράσης των βιοδιεγερτών στα φυτά μετά την εφαρμογή τους, ήτοι: 1) διείσδυση εντός των ιστών και μετατόπιση και μετασχηματισμό στα φυτά, 2) έκφραση γονιδίων, φυτική σηματοδότηση και η ρύθμιση της ορμονικής κατάστασης, 3) μεταβολικές διεργασίες και ολοκληρωμένες επιδράσεις ολόκληρου φυτού (integrated whole plant effects).

1.3.4.1 Διείσδυση εντός των ιστών, μετατόπιση, μετασχηματισμός στα φυτά

Η διείσδυση των βιοδιεγερτών που βασίζονται σε αμινοξέα και πεπτιδία εντός των φυτών έχει διερευνηθεί με τη χρήση ραδιοσημασμένων αμινοξέων (Maini, 2006) και μαθηματικής μοντελοποίησης (Kolomaznik *et al.*, 2012; Pecha *et al.*, 2012). Τα συστατικά μιας προετοιμασίας βιοδιεγέρτη ζωικής προέλευσης που σημάνθηκε με ^{14}C προλίνη και γλυκίνη φάνηκαν να διεισδύουν ραγδαία εντός των μεταχειρισθέντων φύλλων και κατανεμήθηκαν μεταγενέστερα σε άλλα φύλλα (Maini, 2006). Ενώ το μαθηματικό μοντέλο βασισμένο στο «μηχανισμό της διάχυσης» επιτρέπει τον υπολογισμό του απαιτούμενου χρόνου για την απορρόφηση μιας ελάχιστης ποσότητας της δραστικής ουσίας ενός βιοδιεγέρτη. Επιπλέον περιγράφει τη διεργασία της μεταφοράς του από τη στιγμή της διείσδυσης εντός του φύλλου μέχρι την άφιξή του και σε περισσότερους πιο μακρινούς ιστούς (Kolomaznik *et al.*, 2012; Pecha *et al.*, 2012). Η διείσδυση των υδρολυμάτων των πρωτεϊνών εντός φυτικού ιστού τυγχάνει δια της διάχυσης των πρωτεϊνικών μορίων μέσω μεμβρανικών πόρων (Kolomaznik *et al.*, 2012) είναι ενεργειακώς εξαρτώμενη (Parrado *et al.*, 2008). Οι βιοδιεγέρτες πρέπει να έχουν μια καλή διαλυτότητα στο νερό ή σε άλλους κατάλληλους διαλύτες. Αυτό είναι μια προϋπόθεση για τους περισσότερους τύπους εφαρμογής και για επαρκή διείσδυση των δραστικών ουσιών εντός εσωτερικών δομών των μεταχειρισθέντων φυτών.

Τέλος για να ξεπεραστούν η διαλυτότητα και οι περιορισμοί απορρόφησης συμπεριλαμβανομένων της λιποφιλίας και του μοριακού μεγέθους των δραστικών ουσιών μπορεί να απαιτούνται επιφανειοδραστικές και άλλες προσθετικές ουσίες (Kolomaznik *et al.*, 2012; Pecha *et al.*, 2012).

1.3.4.2 Έκφραση γονιδίων, σηματοδότηση και αλληλεπιδράσεις ορμονών

Ουσιαστικά η πλήρης κατανόηση της βιολογικής δράσης των προετοιμασιών πολύπλοκων βιοδιεγερτών απαιτεί και μια λεπτομερή κατανόηση του μηχανισμού δράσης και επιδράσεων στη φυτική παραγωγικότητα, καθώς και την ταυτοποίηση των βιολογικά δραστικών μορίων και του μοριακού τρόπου δράσης τους (Hinda & Bordenave-Juchereau, 2014). Όλα αυτά τα χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα μοριακών μεθόδων ως μια προσπάθεια να διακριθούν τα δραστικά συστατικά που βρίσκονται στους βιοδιεγέρτες συμπεριλαμβανομένων και μεθόδων μικροσυτοιχιών, μεταβολομικής, πρωτεομικής και μεταγραφομικής. Αυτές οι τεχνολογίες έχουν εφαρμοστεί στους βιοδιεγέρτες για να διερευνηθούν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων που ακολουθούν την εφαρμογή των βιοδιεγερτών (Jannin *et al.*, 2012, 2013; Santaniello *et al.*, 2013).

Όσotόσο θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα στις επιδράσεις των πολύπλοκων βιοδιεγερτών και συστατικών τους πάνω στο ολοκληρωμένο γονιδίωμα/μεταγράψωμα των φυτών για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης που σχετίζονται στις αποκρίσεις της ανάπτυξης και μείωσης του στρες (Khan *et al.*, 2009). Η έρευνα για τον τρόπο δράσης των βιοδιεγερτών περιπλέκεται από την παρατήρηση ότι πολλοί βιοδιεγέρτες έδειξαν να επάγουν γονίδια και να ωφελούν τη παραγωγικότητα μόνο όταν τα φυτά δοκιμάζονται από το αβιοτικό και βιοτικό στρες. Ως εκ τούτου οι πειραματικές μέθοδοι πρέπει να αναπτυχθούν για να παραγάγουν σχετικές και αναπαραγωγίμες συνθήκες στρες, έτσι ώστε η εφαρμογή οποιουδήποτε μοριακού εργαλείου για τη διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων να παράγει αποτελέσματα που είναι σχετικά προς τις υποτιθέμενες επιδράσεις στη παραγωγικότητα των φυτών.

Ο ρόλος των σηματοδοτικών μορίων στην ανταπόκριση των φυτών προς τα περιβαλλοντικά στοιχεία έχει αποτελέσει πεδίο δραστικής έρευνας στη βιολογία των φυτών. Η διαδικασία της μετάδοσης του σήματος περιλαμβάνει τη σύνθεση των σηματοδοτικών μορίων (*συμπλόκων*), τη μετατόπισή τους, τη δέσμευσή τους στους υποδοχείς, το αποτέλεσμα των κυτταρικών αποκρίσεων και τέλος η αποδόμηση των σηματοδοτικών μορίων (Zhao *et al.*, 2005; Wang & Irving, 2011). Όταν το σηματοδοτικό μόριο δεσμεύεται στον υποδοχέα του, η αρχική κυτταρική απόκριση είναι η ενεργοποίηση των δευτερογενών αγγελιαφόρων, ή των διακυτταρικών σηματοδοτικών διαμεσολαβητών οι οποίοι προκαλούν μια περαταίρω σειρά από κυτταρικές αποκρίσεις. Μεταξύ των ουσιών που μπορεί να δράσουν ως δευτερογενείς αγγελιαφόροι είναι τα λιπίδια, σάκχαρα, ιόντα, νουκλεοτίδια, γάσες, Ca^{2+} , cAMP, cCMP, κυκλική ADP-ριβόζη, μικρή GTPάση, 1-2διακυλογλυκερόλη, ινοσιτόλο-1,4,5-τριφωφορικό οξύ, νιτρικά οξείδια, φωσφοϊνοσιπίδια και άλλα (Zhao *et al.*, 2005; Wang & Irving, 2011). Σε γενικές γραμμές μια μεμβρανομεσολαβούμενη δράση είναι τυπική για υδατοδιαλυτές ενώσεις, ενώ η

κυτοσολο-μεσολαβούμενη δράση πυροδοτείται πρωταρχικά από λιπόφιλες ενώσεις.

Ενώ τα ένζυμα που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματά τους κατά γεωμετρικό τρόπο (*κλειδαριάς και κλειδιού*), τα σηματοδοτικά μόρια πιστεύεται να έχουν μια τοποχημική συγγένεια προς τους υποδοχείς τους. Εικάζεται ότι η αλληλεπίδραση τέτοιων συστατικών στη θέση υποδοχής είναι συνεργιστική και ποσοτικοποιημένη (Gafurov & Zefirov, 2007). Οι βιοδραστικές ενώσεις σε κάποιους βιοδιεγέρτες προτάθηκαν επίσης να επιδεικνύουν σηματοδοτική δράση στα φυτά ή να επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια. Διάφορα αμινοξέα (Brian & Lea, 2007; Arbona et al., 2013) και πεπτιδία (Ivanov, 2010) λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στη ρύθμιση της αύξησης των φυτών και ανάπτυξης (Ertani et al., 2009; Mochida & Shinozaki, 2011). Η σηματοδότηση πεπτιδίων είναι σημαντική σε διάφορες έννοιες της φυτικής ανάπτυξης και ρύθμισης της αύξησης συμπεριλαμβανομένων της οργάνωσης μεριστώματος, μορφογένεσης φύλλων και απόκρισης άμυνας στο βιοτικό και αβιοτικό στρες (Schiavon et al., 2008). Επίσης συγκεκριμένα σηματοδοτικά πεπτιδία που περιέχονται σε ένα φυτο-παραγώμενο πρωτεϊνικό υδρόλυμα έδειξαν να επηρεάζουν την φυτική αύξηση και ανάπτυξη, τις αποκρίσεις άμυνας, οργάνωσης μεριστώματος, αύξηση φυτικού τύλου (*callus*), αύξηση ρίζας, ρύθμιση σχήματος φύλλου και ανάπτυξης φυματίων (Matsubayashi & Sakagami, 2006; Colla et al., 2013). Τα πρωτεϊνικά υδρόλυμα από σόγια και καζεΐνη έχουν δείξει να δρουν ως εκκινητές ενίσχυσης ανοσίας της αμπέλου έναντι του *Plasmopara viticola* (*περονόσπορου της αμπέλου*) (Lachhab et al., 2014).

Οι πρωτεΐνες μπορεί επίσης να περιέχουν κρυφές τοποθεσίες πεπτιδίων («*κρυπτιδία*» ή «*κρυπτεΐνες*») στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, οι οποίες μπορεί να έχουν τις δικές τους βιολογικές δράσεις και ξεχωριστές από τον προκάτοχό τους (Ivanov 2010; Samir & Link 2011). Επιπλέον έχουν αποδειχτεί στο παρελθόν ότι τα κρυπτιδία μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις άμυνας φυτών (Yamaguchi & Hutfaker, 2011) και υπάρχουν αναφορές από την απομόνωση των κρυπτιδίων μέσω υδρόλυσης πρωτεϊνών από υδρόβιους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των φυκιών, και ότι τα κρυπτιδία μπορεί να είναι παρόντα στη φύση σε μια ποικιλία από βιολογικά παραγώμενα προϊόντα (Henda & Bordenave-Juchereau 2014; Hayes et al., 2015).

Είναι γνωστό ότι πολλές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους συμμετέχουν στη σηματοδοτικούς καταρράκτες *in vivo*. Τα εξωγενή αμινοξέα μπορεί να επηρεάσουν τις βιολογικές διεργασίες δρώντας άμεσα ως μόρια σήματος ή επηρεάζοντας τη δράση ορμόνης δια της σύζευξης αμινοξέων (Tegeder 2012). Έχει επίσης προταθεί ότι οι βασισμένοι σε αμινοξέα βιοδιεγέρτες απορροφώνται εύκολα και μετατοπίζονται από τους φυτικούς ιστούς και μόλις απορροφηθούν, έχουν την ικανότητα να λειτουργούν ως συμβατά ωσμωτικά, ρυθμιστές μεταφορών, σηματοδοτικά μόρια, ρυθμιστές ανοίγματος στοματίων

και μεταξύ άλλων οφέλων μπορεί να αποτοξικοποιούν τα βαρέα μέταλλα (Kauffman *et al.*, 2007).

Τα σάκχαρα (Eveland & Jackson, 2012), τα λιπαρά οξέα και φυτικά λιπίδια (Kachroo & Kachroo, 2009) είναι επίσης γνωστά για την δράση τους σηματοδοτικά μόρια και μετριαστές απόκρισης του στρες στα φυτά (Okazaki & Saito, 2014). Τα διαλυτά κλάσματα βασισμένων σε ζώα λιπιδίων έχουν επίσης παρατηρηθεί να παράγουν απόκριση τύπου αυξίνης (Kauffman *et al.*, 2007), ενώ τα σάκχαρα σακχαρόζη και τα προϊόντα διάσπασης (εξόζες) είναι επίσης γνωστά για τη δράση τους ως σηματοδοτικά μόρια μέσω της ρύθμισης έκφρασης γονιδίων και μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες ορμόνες σήματα όπως τις αυξίνες. Σε ένα γεύμα ηλίανθου τα υδρολύματα, αμινοξέα, χουμικές ουσίες, μικροστοιχεία και σάκχαρα που είναι παρόντα στη βιοδιέγερση, φάνηκαν να συντονίζονται με τις ενώσεις τύπου αυξίνης σε πολύπλοκη σηματοδοτική στοιχομυθία προωθώντας την φυτική αύξηση, ενισχύοντας την επιτυχία μεταφύτευσης φυτών και αυξάνοντας την τελική απόδοση της καλλιέργειας (Ugolini *et al.*, 2015).

Οι ορμόνες είναι κεντρικής σημασίας για την ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών και φυτικής ανάπτυξης σε ένα πολύπλοκο σύστημα από αλληλεπιδρώμενες ορμόνες και συμπαράγοντες, των οποίων οι λειτουργίες είναι στενά συνυφασμένες και αμοιβαία εξαρτώμενες (Wang & Irving, 2011). Οι βιοδιεγέρτες που αναπτύχθηκαν από χουμικές ουσίες, πολύπλοκα οργανικά υλικά, φύκια, αντισταπνευστικά (*antitranspirants*), ελεύθερα αμινοξέα (Du jardin, 2012) και ακατέργαστα εκχυλίσματα κατώτερων (Rathore *et al.*, 2009) και ανώτερων φυτών (Yakhin *et al.*, 2012) έχουν συχνά επιδείξει επίδραση στην ορμονική κατάσταση των φυτών (Kurepin *et al.*, 2014). Ενώ οι ενώσεις τύπου ορμονών μπορεί να είναι παρόντες στους βιοδιεγέρτες, είναι εξίσου πιθανό ότι η σύνθεση *de novo* των ορμονών μπορεί να επάγεται από τέτοιες προετοιμασίες στα μεταχειρισθέντα φυτά (Jannin *et al.*, 2012), και τα αμινοξέα, οι γλυκοζίτες, οι πολυσακχαρίτες και τα οργανικά οξέα να περιέχονται σε πολλούς βιοδιεγέρτες και μπορεί να δρουν ως πρόδρομοι ή ενεργοποιητές ενδογενών φυτικών ορμονών (Paradikovic *et al.*, 2011). Επομένως οι επιδράσεις ορμονών ή τύπου ορμονών μπορούν να είναι υπεύθυνες για τη δράση φυσικών βιοδιεγερτών παραγόμενων από μικροοργανισμούς, άλγες, ανώτερα φυτά, ζώα και χουμικά οξέα βασισμένα σε ακατέργαστα υλικά.

1.3.4.3 Μεταβολικές επιδράσεις

Οι πληροφορίες που υπάρχουν πάνω στους επί του παρόντος διαθέσιμους βιοδιεγέρτες δίνουν κάποια διορατικότητα για τις πιθανές βιοχημικές και μοριακές γενετικές επιδράσεις των βιοδιεγερτών που παράγονται από διαφορετικά ακατέργαστα φυσικά υλικά. Συγκεκριμένα είναι διαθέσιμες πολλές δημοσιευμένες αναφορές προτείνοντας ότι διάφοροι βιοδιεγέρτες βελπώνουν την παραγωγικότητα των φυτών μέσω της αυξημένης αφομοίωσης του αζώτου, θείου και φωσφόρου (Jannin *et al.*, 2012, 2013), βελτιωμένης φωτοσύνθεσης, βελτιωμένων αποκρίσεων στο στρες, αλλοιωμένης γήρανσης και ενισχυμένης μεταφοράς ιόντων (Gajic, 1989; Khan *et al.*, 2009; Paradikovic *et al.*, 2011). Οι βιοδιεγέρτες έχουν επίσης αναφερθεί να αυξάνουν τα ελεύθερα αμινοξέα, πρωτεΐνες, φαινολικά συστατικά, υδατάνθρακες, επίπεδα χρωστικών και διάφορα ένζυμα, (Abbas, 2013; Kaluzewicz *et al.*, 2017; Yakhin *et al.*, 2017; Bryndina *et al.*, 2019; Kocira *et al.*, 2020). Η προστατευτική επίδραση πολλών βιοδιεγερτών ενάντια στα βιοτικά και αβιοτικά στρες έχει συσχεπιστεί με τη μείωση των ενεργών ριζών οξυγόνου που επάγουν στρες, ενεργοποίησης του συστήματος αντοξειδωτικής άμυνας των φυτών ή αυξημένα επίπεδα φαινολικών συστατικών (Ertani *et al.*, 2011a, 2013a).

Παρόλο που είναι σαφές ότι πολλοί βιολογικά παραγόμενοι βιοδιεγέρτες περιέχουν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που σχετίζονται σε σηματοδοτικά συμβάντα και μπορεί να επηρεάσουν άμεσα τις φυτικές μεταβολικές διεργασίες, παραμένει ασαφές πως μια εξωγενής εδαφική εφαρμογή ή φυλλώματος ενός μη χαρακτηρισμένου προϊόντος, μπορεί να έχει προβλέψιμες και ωφέλιμες αποκρίσεις στα φυτά. Είναι πολύ γνωστό για παράδειγμα ότι η εφαρμογή εξωγενών φυτοορμονών ή ενώσεων που διακόπτουν την ορμονική λειτουργία (*PGR's*) μπορεί να έχει αξιοσημείωτες αρνητικές επιπτώσεις στα φυτά και ότι η βελτιστοποίηση των *PGR* υλικών και των εφαρμογών τους απαιτεί ακριβείς πληροφορίες στη δοσολογία και συγχρονισμού εφαρμογής. Η εφαρμογή των βιοδιεγερτών για τους οποίους η δοσολογία και η αποτελεσματικότητα των λειτουργικών συστατικών είναι άγνωστες, ως εκ τούτου δεν αναμένεται κατάληξη με προβλέψιμες αποκρίσεις των φυτών και η ταυτοποίηση των μορίων με επιδράσεις στις φυτικές μεταβολικές διεργασίες δεν αποτελεί από μόνη της μια επαρκή εξήγηση για τη λειτουργία ενός βιοδιεγέρτη. Επίσης είναι αβέβαιο γιατί η εφαρμογή ενός βιοδιεγέρτη με μια υποτιθέμενη λειτουργία ως *PGR*, σηματοδοτικό μόριο ή άλλη διακεκριμένη ένωση θα ήταν ανώτερη ή πιο εύκολα ελεγχόμενη, από ότι μια άμεση εφαρμογή του αυτού καθαυτού καθαρού προϊόντος.

1.3.5 Κανονισμός των φυτικών βιοδιεγερτών

Η κατάσταση του κανονισμού των βιοδιεγερτών είναι πολύπλοκη στη σημερινή ημέρα, ελλείπει οποιονδήποτε συγκεκριμένου και εναρμονισμένου πλαισίου είτε στην Ε.Ε., είτε στις Η.Π.Α. Ένας από τους κύριους λόγους για αυτή την κατάσταση είναι η έλλειψη του επίσημου ορισμού και αποδοχής της έννοιας των ρυθμιστικών αρχών. Στην Ευρώπη σήμερα οι βιοδιεγέρτες τοποθετούνται στην αγορά ακολουθώντας δύο διαδρομές: η μία είναι οι εθνικές νομοθεσίες στα λιπάσματα και η άλλη είναι η ευρωπαϊκή νομοθεσία των γεωργικών φαρμάκων, η οποία συνδυάζει τόσο τις υπερεθνικές όσο και τις εθνικές διατάξεις για την εισαγωγή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά. Στην Ευρώπη η τρέχουσα κατάσταση είναι ότι ο κανονισμός της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 1107/2009 Φ.Π. είναι εφαρμόσιμος σε όλες τις κατηγορίες των βιοδιεγερτών, λαμβάνοντας υπόψη τον πολύ ευρύ ορισμό των Φ.Π.. Πράγματι το άρθρο 2 του κανονισμού αναφέρει: *«Αυτός ο Κανονισμός θα εφαρμόζεται σε προϊόντα στην μορφή των οποίων διατίθενται στον χρήση, αποτελούμενα από ή περιέχοντας δραστικές ουσίες, προστατευτικά ή συνεργιστικά και προορισμένα για μία εκ των ακόλουθων χρήσεων»:*

➤ *να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν η δράση των οργανισμών αυτών, εκτός αν τα προϊόντα αυτά θεωρείται ότι χρησιμοποιούνται για λόγους υγιεινής και όχι για την προστασία των φυτών ή των φυτικών προϊόντων.*

➤ *να επηρεάζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, όπως τις ουσίες ή προϊόντα που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους, εκτός αν πρόκειται για θρεπτικά στοιχεία.*

Όπως κάθε βιοδιεγέρτης προορίζεται να επηρεάσει τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών με άλλους τρόπους πέραν του θρεπτικού συστατικού, μπορεί να θεωρηθεί ως «φυτοπροστατευτικό προϊόν» από αυστηρή κανονιστική άποψη. Οι συνθετικές και φυσικές ουσίες (*συμπεριλαμβανομένων και των βοτανικών προϊόντων και βασικών ουσιών που προαναφέρθηκαν*) και οι μικροοργανισμοί καλύπτονται εξ ολοκλήρου από αυτόν τον κανονισμό. Όλοι οι ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών και οι ζιζανιοκτόνες προστατευτικές ουσίες έχουν καταγραφεί υπό του συγκεκριμένου κανονισμού Φ.Π. μέχρι στιγμής και θεωρούνται ουσίες που αλληλεπιδρούν με την φυσιολογία του φυτού, παρόλο που δεν προστατεύουν τα φυτά έναντι εχθρών ή ασθενειών.

Εξαιτίας των μακροσκελών και δαπανηρών διαδικασιών για την εναπόθεση ενός Φ.Π. στην Ευρωπαϊκή αγορά, λαμβάνοντας υπόψη ότι πολλές εταιρείες που αναπτύσσουν βιοδιεγέρτες είναι μικρομεσαίες επιχειρήσεις και ότι η βελτιωμένη θρέψη και ανάπτυξη είναι το κύριο πεδίο εφαρμογής των βιοδιεγερτών, έχει επιλεγεί μια εναλλακτική διαδρομή εν ονόματι «διαδρομή

λιπασμάτων» στην οποία περίπτωση εφαρμόζεται η εθνική νομοθεσία. Ο λόγος που δεν εφαρμόζεται ο ευρωπαϊκός νόμος στα λιπάσματα Ε.Ε. (κανονισμός Ε.Ε. 2003/2003) είναι επειδή ο ορισμός των λιπασμάτων που καθορίζονται από αυτόν τον κανονισμό είναι πολύ περιορισμένος δεν μπορεί να συμπεριλάβει τους βιοδιεγέρτες. Πράγματι το άρθρο 2 αναφέρει:

Για τους σκοπούς αυτού του Κανονισμού οι ακόλουθοι ορισμοί θα ισχύουν:

- *«Λίπασμα» σημαίνει υλικό, του οποίου η κύρια λειτουργία είναι να παρέχει θρεπτικά συστατικά για φυτά.*

- *«Κύριο θρεπτικό συστατικό» σημαίνουν μόνο τα στοιχεία άζωτο, φώσφορο και κάλιο.*

- *«Δευτερεύοντα θρεπτικά συστατικά» σημαίνουν τα στοιχεία ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο και θείο.*

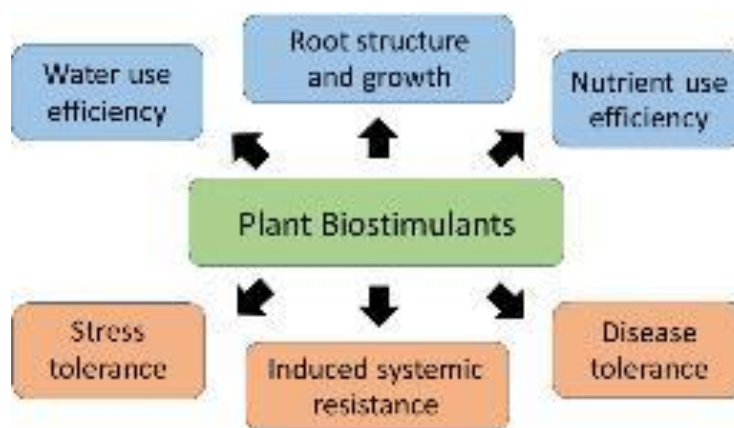
- *«Μικροθρεπτικά συστατικά» σημαίνουν τα στοιχεία βόριο, κοβάλτιο, χαλκός, σίδηρος, μαγγάνιο, μολυβδαίνιο και ψευδάργυρος που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών σε ποσότητες που είναι μικρές σε σύγκριση με αυτές των κύριων και δευτερευόντων θρεπτικών συστατικών.*

Κάθε λίπασμα πρέπει να παρέχει θρεπτικά συστατικά ως κύρια λειτουργία του. Προφανέστατα αυτό δεν υφίσταται στην υπόθεση των βιοδιεγερτών, τα οποία εξ ορισμού προωθούν την ανάπτυξη των φυτών με άλλα μέσα πέραν των παρεχόμενων θρεπτικών συστατικών. Το παράρτημα Ι του κανονισμού λιπασμάτων Ε.Ε. 2003/2003 καταγράφει τύπους λιπασμάτων τα οποία είναι όλα ανόργανα υλικά που παρέχουν μακρο και μικροθρεπτικά συστατικά, αλλά επίσης και παράγοντες χηλίωσης και συμπλοκοποίησης προορισμένες για να βελτιστοποιήσουν την παράδοση των μικροθρεπτικών συστατικών στα φυτά, επιτρέποντας τα χηλικά και συμπλοκοποιημένα μικροθρεπτικά συστατικά να εναποτεθούν στην αγορά κατά τέτοιο τρόπο που διέπει αυτόν τον κανονισμό. Αργότερα θεωρήθηκε ότι τα άλλα συστατικά που χρησιμοποιούνται ως προσθετικά λιπασμάτων (λχ. *αναστολείς νιτροποίησης και ουρεάσης*) πρέπει επίσης να αποκτήσουν άδεια στην αγορά δια αυτού του κανονισμού. Αυτό οδήγησε σε μια ανακάλυψη του κανονισμού των ευρωπαϊκών λιπασμάτων που τροποποιήθηκε από τον κανονισμό Ε.Ε. 1107/2008, με σκοπό να εισαγάγει υλικά τα οποία δεν είναι πάροχοι θρεπτικών συστατικών (*λιπάσματα με την στενή έννοια sensu stricto*) αλλά προσθετικά λιπασμάτων που ενισχύουν την απόδοση των λιπασμάτων.

Πολλοί βιοδιεγέρτες μπορεί να θεωρηθούν ως ενισχυτικά της απόδοσης των λιπασμάτων και αυτό η ρυθμιστική πρόοδος του κανονισμού φάνηκε να ανοίξει ο δρόμος για την συμπερίληψη των βιοδιεγερτών στη νομοθεσία των

λιπασμάτων Ε.Ε. Ωστόσο αυτή η επιλογή δεν είναι ρεαλιστική καθώς οι τροποποιητικοί κανονισμοί είναι μια εργαστηριακή διαδικασία, η οποία δεν μπορεί να ακολουθηθεί για όλους τους βιοδιεγέρτες. Όταν οι εθνικές νομοθεσίες λιπασμάτων χρησιμοποιούνται για εισαγωγή βιοδιεγερτών στην ευρωπαϊκή αγορά (κυρίως αυτών που ενισχύουν τη θρέψη και ανάπτυξη πχ. χουμικά οξέα, εκχυλίσματα φυκιών και υδρολύματα πρωτεϊνών), υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ κρατών μελών εξ απόψεως απαιτήσεων δεδομένων για αξιολόγηση αποτελεσματικότητας, τοξικότητας και οικοτοξικότητας (Traon *et al.*, 2014), (La Torre *et al.*, 2015).

Επιπλέον είναι άξιο αναφοράς ότι οι νομικές διατάξεις υφίστανται εντός της Ε.Ε. για να προωθήσουν την «αμοιβαία αναγνώριση» μεταξύ των κρατών μελών (Κανονισμός ΕΕ 764/2008), που σημαίνει ότι οι fast tracks υφίστανται γύρω από τους βιοδιεγέρτες.



Εικόνα 54: Οι πολλές επιδράσεις των βιοδιεγερτών στα φυτά βάσει του ενεργού συστατικού που εφαρμόζεται, ώστε να αποτελέσουν τις προϋποθέσεις σκευασμάτων για έγκριση στην αγορά σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ε.Ε. 1107/2009 ως Φ.Π. ή 2003/2003 και 1107/2008 ως λιπάσματα. Πηγή: <https://progressivecrop.com/2020/07/making-sense-of-biostimulants-for-improving-your-soil/>, ευγενικής χορηγίας του Ute Albrecht, Southwest Florida Research and Education Center.

1.3.6 Τοξικολογικές και οικολογικές πτυχές των βιοδιεγερτών

Η σύγχρονη παραγωγή καλλιέργειας απαιτεί μια ισορροπία υψηλής και συνεχούς παραγωγικότητας με τη μέγιστη ασφάλεια για τους καταναλωτές, γεωργικούς εργάτες και το περιβάλλον (Rathore *et al.*, 2009; Jannin *et al.*, 2012; Pecha *et al.*, 2012). Ενώ κάποιοι βιοδιεγέρτες δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως αλλά έχουν αναγνωριστεί γενικά ως ασφαλή (GRAS στις Η.Π.Α) βάσει της βιολογικής προέλευσης των συστατικών τους (Thomas *et al.*, 2013). Γενικά οι βιοδιεγέρτες θεωρούνται να είναι βιοδιασπάσιμοι, μη τοξικοί, μη ρυπαίνοντες και μη επιβλαβή σε ποικίλους οργανισμούς. Παρόλο που αυτό μπορεί να αποτελεί λογικό συμπέρασμα για πολλά σκευάσματα όντας

παράγωγα βιολογικών υλικών όπως εκχυλίσματα φυκιών και των συστατικών τους (Turan & Kose, 2004; Rathore *et al.*, 2009; Michalak & Chojnacka, 2014; Stadnik & de Freitas, 2014), ανωτέρων φυτών (Yakhin *et al.*, 2013; Abdalla, 2013), χιτίνης και χιτοζάνης (Falcon-Rodriguez *et al.*, 2012), δεν είναι σαφές ότι αυτό είναι μια έγκυρη υπόθεση για τα μικροβιακά προϊόντα ή για προϊόντα τα οποία κανονικά δεν θα ήταν παρόντα σε γεωργικά χωράφια.

Οι βιοδιεγέρτες έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδιορθωτικά και έχουν δείξει να βελτιώνουν τα επίπεδα ATP και τη δράση φωσφατάσης και ουρεάσης (Tejada *et al.*, 2011a) και συνεπώς ενισχύουν το ρυθμό της αποδόμησης των ξενοβιοτικών στο έδαφος (Tejada *et al.*, 2010, 2011b) και να ενισχύουν τις ωφέλιμες εδαφικές μικροβιακές κοινότητες υπό ημίξηρα κλίματα (Tejada *et al.*, 2011b). Επιπλέον όπως αναφέρθηκε οι βιοδιεγέρτες μπορεί επίσης να βοηθήσουν στη μείωση της ποσότητας των δυνητικά επικίνδυνων αγροχημικών (Kolomaznik *et al.*, 2012) συμπεριλαμβανομένων και των λιπασμάτων και γεωργικών φαρμάκων (Hamza & Suggars, 2001). Οι περισσότερες ενώσεις που περιέχονται στους βιοδιεγέρτες είναι φυσικά συστατικά από εδαφικά και υδάτινα οικοσυστήματα (Jannin *et al.*, 2012) και μεταβολίτες φυτικής και μικροβιακής προέλευσης και ως τέτοια, τα περισσότερα θεωρούνται γενικά ασφαλή, ιδίως στους χαμηλούς ρυθμούς στους οποίους εφαρμόζονται. Συνεπώς έχει προταθεί ότι οι βιοδιεγέρτες μπορούν να τοποθετηθούν στα οικολογικά φιλικά προϊόντα για αειφόρο γεωργία (Ertani *et al.*, 2011a; Ghannam *et al.*, 2013; Vijayanand *et al.*, 2014). Ωστόσο σε πολλές χώρες οι βιοδιεγέρτες δεν υπόκεινται σε αυστηρό τοξικολογικό έλεγχο (Traon *et al.*, 2014) και έτσι παραμένει το ενδεχόμενο για τη παραμονή των ανθρώπινων παθογόνων σε υλικά ζωικής προέλευσης και για τη σύνθεση νέων ενώσεων αγνώστου λειτουργίας ή τοξικολογίας κατά την διαδικασία παρασκευής.

1.3.7 Προβλήματα και προοπτικές των βιοδιεγερτών

Η βιομηχανία των βιοδιεγερτών αντιμετωπίζει πολλά προβλήματα και προκλήσεις. Μέχρι πρόσφατα τα προϊόντα βιοδιεγερτών βασισμένων σε φυσικά ακατέργαστα υλικά και ιδίως τη ροή αποβλήτων αναπτύχθηκαν βάσει παρατηρούμενων και λιγότερο συχνά εμπειρικών δεδομένων. Ενώ πολλοί σύγχρονοι βιοδιεγέρτες έδειξαν να είναι αποτελεσματικοί στην πρακτική, για πολλοί λίγους βιοδιεγέρτες μπορεί να γίνει ο ισχυρισμός κατανόησης των μηχανισμών ή των τρόπων δράσης (Khan *et al.*, 2009). Επιπλέον ενώ οι βιοδιεγέρτες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν από την πηγή προέλευσης, αυτό θεωρείται ανεπαρκές καθώς μπορεί να υπάρχουν πολύ ουσιώδεις διαφορές μεταξύ προϊόντων ακόμη και εντός μια κοινούς προέλευσης ζωοτροφής. Η πρόκληση της επιστήμης των βιοδιεγερτών επιδεινώνεται περεταίρω μιας και η σύσταση και το περιεχόμενο των δραστικών συστατικών

στο αρχικό φυτικό ακατέργαστο υλικό, μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών καλλιέργειας και τοποθεσίας, την εποχή, τα είδη, ποικιλία, το όργανο και τη φάση της ανάπτυξης (Dragonoz *et al.*, 2009; Shekhar *et al.*, 2012). Παρομοίως η ανταπόκριση της καλλιέργειας στόχου αναμένεται να ποικίλει μεταξύ καλλιεργειών και περιβάλλοντων. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι η άντληση των ακατέργαστων υλικών για το βιοδιεγέρτη υπό υψηλά ελεγχόμενες συνθήκες. Αυτή η προσέγγιση έχει εφαρμοστεί επιτυχώς, από κορυφαίους παραγωγούς φυκιών και προϊόντων βασισμένων σε ζύμωση που έχουν αναπτύξει διεργασίες συγκομιδής και κατασκευής, οι οποίες εξασφαλίζουν την ομοιομορφία της απόδοσης του προϊόντος μέσα στο χρόνο. Η ανάπτυξη ενός προϊόντος με ομοιομορφία ανταπόκρισης δεν είναι ωστόσο μια εγγύηση ότι το προϊόν είναι βελτιστοποιημένο για βιολογική αποτελεσματικότητα.

Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων οι εξελίξεις σε προσεγγίσεις -ομικής θα είναι κρίσιμες στην επιτάχυνση της ανακάλυψης του μηχανισμού δράσης των βιοδραστικών ενώσεων (Aliferis & Jabaji, 2011; Cragie, 2011; Jannin *et al.*, 2012) και βελτιστοποίησης της χρήσης τους. Η μεταβολομική, η φαινομική και η αγρονομική αντιπροσωπεύουν την ενσωμάτωση της έκφρασης γονιδίων, των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών και άλλων ρυθμιστικών διεργασιών, καθώς έχουν αντίκτυπο στη παραγωγικότητα των φυτών και ως εκ τούτου είναι καταλληλότερα εργαλεία για ανακάλυψη σε αυτό το πεδίο παρά με mRNA, μεταγραφές ή πρωτεΐνες που αναλύονται στην απομόνωση (Arbona *et al.*, 2013). Οι ολοκληρωμένες και πολυτομεακές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν εργαλεία από μεταγραφομική σε σύνδεση με μεταβολομική και βιοχημική ανάλυση, είναι απαραίτητες στη καθιέρωση των μηχανισμών δράσης και στην ταυτοποίηση των δραστικών συστατικών στα εκχυλίσματα (Lee *et al.*, 2012). Η δυσκολία στη ταυτοποίηση των μηχανισμών δράσης και επακόλουθης τυποποίησης της σύνθεσης των πολυσυστατικών βιοδιεγερτών βασισμένων σε φυσικά ακατέργαστα υλικά θα συνεχίσει να εμποδίζει τη χρήση, πιστοποίηση και έγκριση των βιοδιεγερτών. Η λύση σε αυτό το πρόβλημα θα απαιτήσει τις συνεργατικές προσπάθειες ειδικών από διαφορετικούς τομείς: χημικούς, βιολόγους, φυσιολόγους φυτών, βιομηχανική κατασκευή, πωλήσεις και κατανομή, καθώς και αυτούς με εξειδίκευση στη πρακτική γεωργική παραγωγή (Raldugin, 2004; Craigie, 2011; Jannin *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012).

Τα προϊόντα με ένα μεμονωμένο δραστικό συστατικό αντιπροσωπεύουν μια απλούστερη κατασκευή στην οποία οι φυσιολογικές επιδράσεις και ο μηχανισμός δράσης μπορούν να καθοριστούν πιο εύκολα και συνεπώς η πιστοποίηση και η έγκριση είναι απλούστερη. Η πολυσυστατική σύνθεση πολλών προετοιμασιών ωστόσο είναι πιο δύσκολο να χαρακτηριστεί (Bozkhon *et al.*, 1996), παρόλο που μπορεί να προσφέρουν νέα διορατικότητα στη βιολογική συνεργία (Bulgari *et al.*, 2015), πολυλειτουργικότητα και ανάδυση (emergence) οι οποίες μπορεί να είναι

κρίσιμες στην αποτελεσματικότητα του προϊόντος (Gerhardson, 2002). Εν απουσία λειτουργικής λογικής για κάθε ουσία σε έναν πολυσυστατικό βιοδιεγέρτη, είναι πιθανόν ότι θα υπάρχουν παρόντα μόρια που μπορούν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά την παραγωγικότητα των φυτών. Επί του παρόντος είναι σχεδόν αδύνατον χρησιμοποιώντας διαθέσιμες χημικο-συνθετικές και γενετικής μηχανικής προσεγγίσεις να αναπαραχθούν το πλήρες πρόσωπο των μορίων και συμπλόκων των βιολογικά δραστικών ουσιών (Kershengolts *et al.*, 2008) όντας παρόντα στους περισσότερους βιοδιεγέρτες.

1.3.8 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της επιστήμης και πρακτικής των βιοδιεγερτών

Πολλοί μελετητές έχουν επισημάνει την κατάσταση σύγχυσης στον τομέα των βιοδιεγερτών (Torre *et al.*, 2013; Traon *et al.*, 2014) και αυτό κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι περισσότεροι εκ της αγοράς των βιοδιεγερτών δεν βασίζονται στην επιστήμη και αποτελεσματικότητα και ότι πολλά προϊόντα είναι κάτι λιγότερο από ανακυκλωμένα προϊόντα αποβλήτων που πωλούνται κατά βάση ψευδοεπιστήμης και μάρκετινγκ. Πράγματι η έρευνα σε διάφορα προϊόντα βιοδιεγερτών έδειξε να είναι αναποτελεσματική ή να περιέχει μη δραστικές, ασταθείς ή ασυνεπείς ιδιότητες εκ των οποίων κάποιες να δείχνουν αρνητικές επιπτώσεις σε αντίθεση όταν συγκρίθηκαν με καλοσχεδιασμένους ελέγχους (Di Marco & Osti, 2009), (Banks & Persival, 2012; Cerdan *et al.*, 2013; de Carvalho *et al.*, 2014).

Για παράδειγμα η εφαρμογή ενός προϊόντος στο φύλλωμα και στις ρίζες που περιέχει αμινοξέα ζωικής προέλευσης έχει αναφερθεί να προκαλεί σοβαρή καχεξία φυτικής ανάπτυξης και αρνητικές επιπτώσεις στη θρέψη σιδήρου, ενώ ένα δεύτερο προϊόν που περιείχε αμινοξέα φυτικής προέλευσης, διέγειρε τη φυτική ανάπτυξη (Cerdan *et al.*, 2013). Σε μια άλλη αναφορά που εξέτασε διάφορα προϊόντα βιοδιεγερτών, συμπέρανε ότι «κανένα από τα προϊόντα βιοδιεγερτών που εξετάστηκαν δεν κατόρθωσε να ελέγξει σε επαρκή βαθμό τα παθογόνα και να εγγυηθεί την αντικατάσταση ή τη συμπλήρωση με συμβατικά συνθετικά μυκητοκτόνα» (Banks & Persival, 2012) και επίσης έχουν επιδείξει θετικά και αρνητικά αντίκτυπα και επί συνόλου ερωτήματα για την οικονομική σκοπιμότητα της χρήσης των χουμικών ουσιών για την αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργειών (Rose *et al.*, 2014).

Μιας και τα βιολογικά συστήματα είναι εκ φύσεως πολύπλοκα και δεδομένου ότι πολλά προϊόντα βιοδιεγερτών δεν έχουν χαρακτηριστεί και έχουν λάβει σχετικά μικρή αναπαραγωγική και αυστηρή ανεξαρτησία επικύρωσης, πιθανόν να μην είναι έκπληξη ότι πολλά προϊόντα είναι αναποτελεσματικά ή υψηλώς μεταβλητά σε ανταπόκριση. Παρόλα αυτά υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός από αυστηρές ανεξάρτητες αναφορές από

οφέλη κάποιων σκευασμάτων βιοδιεγερτών και τα δεδομένα ανάπτυξης στην αγορά επιδεικνύουν ότι υπάρχει πολύ υποστήριξη αυτών των προϊόντων μέσα στις κοινότητες γεωργικής παραγωγής. Υφίσταται τέτοιου τύπου ανάπτυξης αγοράς ακομή και εν απουσία ενός γνωστού «μηχανισμού λειτουργίας», συνιστώντας ότι υπάρχουν πτυχές του φυτικού μεταβολισμού και περιορισμοί παραγωγικότητας που δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά είναι ενδεχομένως σημαντικοί αν πρόκειται να επιτευχθεί ο στόχος της αυξημένης παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων.

Η ευφορία της αγοράς που είναι να πάρει θέση στη βιομηχανία βιοδιεγερτών αναγνωρίζει αυτά τα άγνωστα ζητήματα και οι βιοδιεγέρτες προβάλλονται από πολλούς καινοτόμους και επενδυτές ως έναν μηχανισμό διεξαγωγής ευρείας κλίμακας (αν δεν είναι συντονισμένη) ανακάλυψης νέων βιολογικά παραγόμενων μορίων. Όσο η εξευρέυση των υδρόβιων οργανισμών και φυτών και μικροβίων από ποικίλα οικοσυστήματα οδήγησε στην ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών, τόσο και η ανάπτυξη των βιοδιεγερτών από ένα ευρύ φάσμα αρχικών υλικών διατηρεί σημαντικές υποσχέσεις ανακάλυψης.

Πρόσφατα χρόνια έχουν δείξει ραγδαία αύξηση στον αριθμό των δημοσιευμένων μελετών, στον αριθμό των επιστημονικών συνεδρίων και ανάπτυξης νομικών πλαισίων και νομοθεσιών. Αυτές οι τάσεις αναπόφευκτα θα βελτιώσουν την εικόνα αυτής της βιομηχανίας και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων. Δύο σημαντικά προβλήματα υπάρχουν ακόμα εντός της βιομηχανίας γενικά: 1) τις προετοιμασίες των προϊόντων με υψηλά πολύπλοκη πολυσυστατική και ανολοκλήρωτα ταυτοποιημένη σύσταση που κάνουν την ταυτοποίηση ενός πρωταρχικού τρόπου δράσης εξαιρετικά δύσκολο και 2) την τρέχουσα ταξινόμηση και το νομοθετικό/κανονιστικό πλαίσιο για τον κανονισμό των βιοδιεγερτών που βασίζονται κυρίως στα αρχικά υλικά και όχι στον βιολογικό τρόπο δράσης. Συνεπώς υπάρχει μια ανεπαρκής ικανότητα διαφοροποίησης προϊόντων και υπάρχει το ενδεχόμενο για την επιτυχή επίδειξη ενός μεμονωμένου προϊόντος εντός της κατηγορίας βιοδιεγέρτη, για να υποδείξει ψευδώς την αποτελεσματικότητα της ομάδας εξολοκλήρου.

Εν κατακλείδι πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορα τοπικά ερωτήματα στο μέλλον:

- i. Μπορούν οι καλλιέργειες ζωντανών οργανισμών που έχουν την δυνατότητα να διεγείρουν την ανάπτυξη των φυτών, να αναφέρονται ως βιοδιεγέρτες;
- ii. Είναι τα μη απαραίτητα στοιχεία που καταλήγουν σε βελτιωμένη παραγωγικότητα, βιοδιεγέρτες;

-
- iii. Πως πρέπει οι βιοδιεγέρτες με μια πολύπλοκη εξολοκλήρου απροσδιόριστη δομή όπου όλα τα συστατικά και οι τρόποι/μηχανισμοί που σχετίζονται και δεν έχουν καθιερωθεί, να αδειοδοτούνται και να ρυθμίζονται σε εθνική και διεθνή νομοθεσία;

 - iv. Ποιο πρότυπο απόδειξης της αποτελεσματικότητας είναι αρμόζον στο ότι ταυτόχρονα διεγείρει την ανάπτυξη και αποθαρρύνει τη πώληση των υλικών δίχως όφελος;

 - v. Υπό ποιες αρχές πρέπει η τελική ταξινόμηση των βιοδιεγερτών να βασίζεται και ποιες κατηγορίες πρέπει να περιέχει;

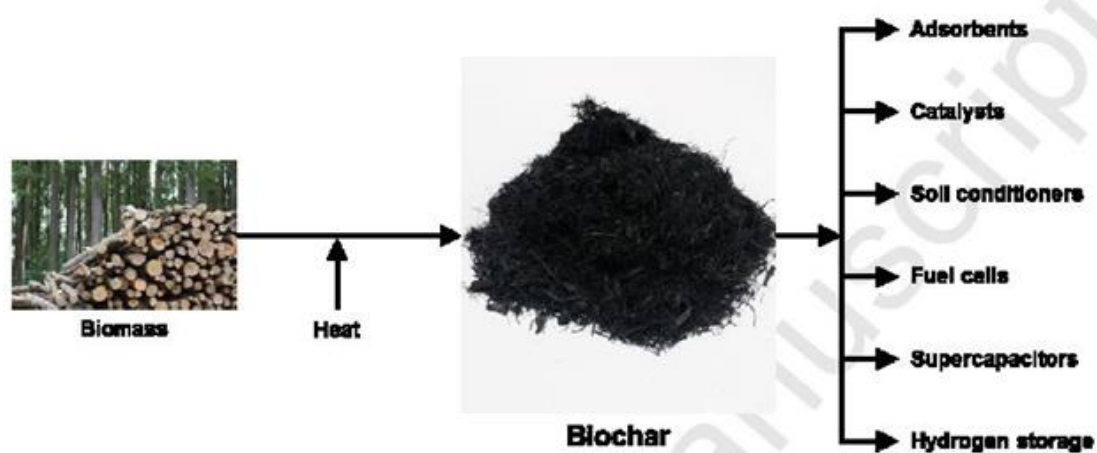
1.4 Το οργανικό προσθετικό εδάφους Biochar

Το biochar είναι ένα υλικό πλούσιο σε άνθρακα το οποίο παράγεται από οργανικές πρώτες ύλες υπό συγκεκριμένη θερμική επεξεργασία καύσης με περιορισμένο οξυγόνο (Lehmann, 2009). Σύμφωνα με την «*International Biochar Initiative*» (Biochar-international.org) το biochar ορίζεται ως «*ένα στερεό υλικό που αποκομίζεται από την ανθρακοποίηση βιομάζας*» καταλήγοντας ουσιαστικά στην έννοια στερεού προϊόντος από την θερμική αποσύνθεση βιομάζας. Επομένως το biochar είναι άνυδρος ξυλάνθρακας και αποτελείται από φυτικά υπολείμματα, ξύλο, οστά ζώων, κοπριά και αστικά απόβλητα.

Το biochar έχει τα πλεονεκτήματά του όντας πλούσιο σε περιεχόμενο άνθρακα, διαθέτοντας υψηλή ικανότητα ανταλλαγής καπόντων, μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας και σταθερότητα στη δομή (Rizwan *et al.*, 2016). Δεδομένου ότι το biochar είναι φθινό σε κόστος και περιβαλλοντικά φιλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικίλους σκοπούς όπως ως τροποποιητής εδάφους, στη διαχείριση αποβλήτων, μείωση αερίων θερμοκηπίου και παραγωγή ενέργειας (Lehmann, 2009).

Παρόλο που το biochar είναι πλούσιο σε άνθρακα, περιέχει επίσης και υδρογόνο (H), οξυγόνο (O), τέφρα και ίχνη από άζωτο (N) και θείο (S) (Liu *et al.*, 2015). Συνεπώς η περιεκτικότητά του biochar σε στοιχεία ποικίλει ανάλογα με τα ακατέργαστα υλικά βιομάζας από τα οποία παράχθηκε και με τα χαρακτηριστικά της διαδικασίας ανθρακοποίησης (Duku *et al.*, 2011; Kambo & Dutta 2015; Ahmad *et al.*, 2014). Ως εκ τούτου συντελείται ερευνητικό έργο ώστε να ανακαλυφθούν νέες εφαρμογές αυτής της βιομάζας (Εικόνα 55). Συγκεκριμένα λόγω φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως του μεγάλου εμβαδού επιφάνειας, δομής πόρων, λειτουργικών ομάδων επιφάνειας και υψηλού περιεχομένου ορυκτών, το biochar χρησιμοποιείται ως απορροφητικό υδάτινων και αερίων ρυπαντών (Ahmad *et al.*, 2014; Mohan *et al.*, 2014)

όπως βαρέων μετάλλων (Shim *et al.*, 2015), οργανικής ύλης (Mubarik *et al.*, 2016) και διοξειδίου του άνθρακα (Creamer *et al.*, 2014), ως καταλύτης για την απομάκρυνση πίσσας ή παραγωγής βιοντίζελ (Shen, 2015; Konwar *et al.*, 2014) και ως τροποποιητής εδάφους (Ahmad 2014; (Najar *et al.*, 2015). Επιπλέον έχουν αναφερθεί και εφαρμογές του biochar ως κυψέλες καυσίμου (Elleuch *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014), υπερπυκνωτές (Jiang *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015) και πηγή παραγωγής υδρογόνου (Choi & Park, 2015) (ως μελλοντικό πλάνο εναλλακτικής ενέργειας με αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων).



Εικόνα 55: Παραγωγή biochar και το πεδίο εφαρμογών του. Πηγή: Cha *et al.*, (2016).

Από άποψη γεωπονικής σημασίας οι μεγάλες προοπτικές του biochar έχουν επισημανθεί σε πολλές μελέτες, προσδίδοντας άμεσες ή έμμεσες ιδιότητες στην καταστολή ασθενειών από εδαφογενή παθογόνα. Αρχικώς το biochar δρα σε έμμεση μορφή λόγω της ικανότητας στην αύξηση της ποιότητας του εδάφους. Συγκεκριμένα οι Ali *et al.*, (2019) επέδειξαν ότι η εφαρμογή του biochar αύξησε την ανάπτυξη των φυτών και την παραγωγικότητα, μαζί με την φωτοσύνθεση και απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, σε εδάφη υπό συνθήκες στρες λόγω νερού ή άλατος. Επιπλέον οι Romdhane *et al.*, (2019) απέδειξαν ότι η χρήση του biochar αυξάνει την αντοχή του καλαμποκιού στην ξηρασία λόγω των βελτιώσεων στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά και αυξάνει επίσης το περιεχόμενο ύδατος στα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με το υπόστρωμα. Επίσης οι Xia *et al.*, (2020) επέδειξαν ότι το biochar αύξησε το μέσο όρο του pH εδάφους, μείωσε οξισιωδώς το περιεχόμενο των Al^{3+} και αύξησε την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, με σημαντικό αντίκτυπο στην ανάπτυξη του καλαμποκιού. Επιπροσθέτως οι Ali *et al.*, (2019) επέδειξαν θετική επίδραση τεσσάρων τύπων biochar στο βάρος φρέσκιας βιομάζας κινέζικου λάχανου και σχοινόπρασου. Συμπερασματικά, δεδομένου των θετικών έμμεσων επιδράσεων του biochar στα γεωργικά εδάφη, μπορεί να θεωρηθεί οικολογικό

λίπασμα για την αειφόρο γεωργία (Chen *et al.*, 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιμετώπισης εδαφογενών ασθενειών είναι η προσθήκη biochar από ευκάλυπτο και απόβλητα θερμοκηπίων επιτυγχάνοντας καταστολή του πλαγιάσματος σε αγγούρι (*Cucumeris sativus*) (Jaiswal *et al.*, 2014a) φασόλι (*Phaseolus vulgaris*) (Jaiswal *et al.*, 2014b) από την προσβολή τους με *Rhizoctonia solani*.

Οι επιδράσεις του biochar στη καταστολή ασθενειών περιλαμβάνουν έξι μηχανισμούς δράσης που έχουν προταθεί σε διάφορες μελέτες αλλά πρέπει να διεξαχθούν περεταίρω έρευνες σε πλήθος που να επιβεβαιώνουν την άμεση ανάμειξη αυτών των μηχανισμών με την καταστολή ασθενειών:

➤ Αύξηση της πυκνότητας και δράσεων ωφέλιμων μικροοργανισμών

Μικροοργανισμοί που δρουν ως αζωτο-ρυθμιστικά βακτηρία (Semida *et al.*, 2019), ριζοβακτήρια προώθησης ανάπτυξης φυτών (Kavitha *et al.*, 2018), *Trichoderma* spp. (De Medeiros *et al.*, 2020) και αποίκιση της ρίζας από μυκορριζικούς μύκητες (Warnock *et al.*, 2007) οι οποίοι προστατεύουν τα φυτά από επιθέσεις παθογόνων. Αυτές οι ευεργετικές επιδράσεις σχετίζονται ταυτόχρονα με φυσικούς και θρεπτικούς παράγοντες. Οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί εκμεταλλεύονται τη δομή των πόρων του biochar για να βρουν καταφύγιο από θηρευτές (Warnock *et al.*, 2007) με χαρακτηριστική περίπτωση αποίκησης βακτηρίων *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Streptomyces* στη δομή των πόρων του biochar, συντελώντας έτσι σε επιτυχή έλεγχο ασθένειας από *Pythium aphanidermatum* και *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε καλλιέργεια τομάτας με εφαρμογή biochar οστών ζώων στα εδάφη (Postma *et al.*, 2013). Από άποψη θρεπτικής επίδρασης όπως και άλλα τροποποιητικά υπολειμμάτων καλλιέργειας και compost, έτσι και το biochar έστω και σε πάρα πολύ μικρό βαθμό συγκρητικά μπορεί να παρέχει οργανικό άνθρακα για να διατηρήσει την μικροβιακή σαπροφυτική ανάπτυξη (Bonanomi *et al.*, 2015).

Επαγωγή της διασυστηματικής αντοχής (ISR) στα φυτά

Αποτελεί την βιολογική, βιοχημική ή χημική διέγερση λανθανόντων μηχανισμών αντοχής, ώστε ένα ευπαθές φυτό σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ξενιστή-παθογόνου να καθίσταται ανθεκτικό στο ίδιο το σύστημα (Τζάμος, 2007). Ουσιαστικά περιγράφεται η διαδικασία κατά την οποία κάποια στελέχη μη φυτοπαθογόνων ριζοβακτηρίων προστατεύουν τα φυτά από επίθεση άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, επάγοντας μηχανισμούς αντοχής στα φυτά. Μπορεί τα ριζοσφαιρικά βακτήρια να μην επιφέρουν κάποιο ορατό σύμπτωμα

στα φυτά ξενιστές, ωστόσο όχι μόνο αυξάνουν το ρυθμό ανάπτυξης των φυτών, αλλά δρουν και ως βιολογικοί παράγοντες, ενεργοποιώντας μηχανισμούς αντίστασης των φυτών έναντι παθογόνων. Αυτός ο υποθετικός μηχανισμός υποστηρίχθηκε κυρίως σε μελέτες των οποίων τα δεδομένα κάνουν λόγο κυρίως για έμμεση απόδειξη ότι επάγεται ανοχή στα φυτά (Elad *et al.*, 2010; Zwart & Kim, 2012) όπου το biochar εφαρμόστηκε σε τοποθεσία διαχωρισμένη από τα πεδία μόλυνσης, συνεπώς αποκλείοντας την ύπαρξη άλλων πιθανών μηχανισμών στην καταστολή ασθένειας. Οι Harel *et al.*, (2012) και Mehari *et al.*, (2015) παρείχαν στοιχεία για πιο άμεση επίδραση, με τους πρώτους να υποστηρίζουν ότι το biochar σχετίστηκε με τα μονοπάτια ISR και επίκτητης διασυστηματικής ανοχής (SAR), ενώ οι δεύτεροι χρησιμοποιώντας το παθοσύστημα τομάτας-*Cinerea botrytis* ανέφεραν ότι η μεσολαβούμενη από το biochar ISR εξαρτιόταν από το ιασμονικό οξύ (JA), χωρίς ωστόσο να διευκρινίζεται αν η επαγόμενη ανοχή του φυτού οφειλόταν άμεσα σε κάποια χημικά συστατικά παρόντα στο biochar ή σε αλλαγές στη σύσταση του ριζοσφαιρικού μικροβιώματος, είτε σε λειτουργίες που προκάλεσε ο τροποποιητής εδάφους biochar.

➤ **Ακίνητοποίηση και απενεργοποίηση των παθογενετικών ενζύμων και τοξικών μεταβολιτών των φυτοπαθογόνων**

Τα εδαφογενή παθογόνα επιτίθενται στις ρίζες των φυτών μέσω αποικοδομητικών ενζύμων κυτταρικού τοιχώματος (CWDEs) που καταλύουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών ιστών (πηκτινάσες, κυτταράσες, ξυλανάσες, φωσφατάσες, κουτινάσες) και τοξινών που παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του παθογόνου συμπεριλαμβανομένων της αναζήτησης θρεπτικών συστατικών (καθώς αποσυνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα φυτών) και διάσπασης της οργανικής ύλης στο έδαφος (Agrios, 2005). Οι Jaiswal *et al.*, (2018) πρότειναν την υπόθεση ότι το biochar (ευκαλύπτου και αποβλήτων θερμοκηπιακής καλλιέργειας πιπεριάς) απορροφά και απενεργοποιεί τα CWDEs και τους τοξικούς μεταβολίτες (μυκοτοξίνες, αντιβιοτικά, χρωστικές), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη απορρόφηση μείωσε τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων που προκάλεσαν τα CWDEs και οι τοξίνες του *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* σε σπορόφυτα τομάτας.

➤ Τροποποίηση του εδάφους από άποψη διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και αβιοτικών συνθηκών

Ο συγκεκριμένος υποθετικός μηχανισμός προτάθηκε από τους Bonanomi *et al.*, (2015) και θεωρούν ότι η τροποποίηση που επιφέρει το biochar στο έδαφος μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων φυτού ξενιστή-παθογόνου. Ο λόγος είναι ότι οι τροποποιητές biochar συνήθως βελτώνουν το περιεχόμενο του εδάφους σε βάσεις (πχ Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+) (Gaskin *et al.*, 2010) και αυξάνουν το εδαφικό pH ιδιαίτερα σε όξινα και ουδέτερα εδάφη (Yuan & Xu, 2011).

➤ Άμεση μυκοτοξική επίδραση

Οι Bonanomi *et al.*, (2015) πρότειναν τον μηχανισμό, δεδομένου ότι κατά την πυρόλυση βιομάζας όπου υφίστανται πολλές χημικές αλλαγές, σχηματίζονται οργανικές ενώσεις από αλειφατικά, αρωματικά και φαινολικά συστατικά τα οποία ενδέχεται να είναι μυκοτοξικά και η διαθεσιμότητά τους να ελέγχει την αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης, όπως εδαφογενών παθογόνων (Spokas *et al.*, 2011).

➤ Απορρόφηση αλληλοπαθητικών φυτοτοξικών ενώσεων

Σε αυτόν τον μηχανισμό αναφέρεται η ικανότητα εξειδικευμένης απορρόφησης τέτοιων ενώσεων, οι οποίες που δρουν άμεσα, βλάπτουν τις ρίζες των φυτών και προωθούν επιθέσεις από παθογόνα (Bonanomi *et al.*, 2015). Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα ότι το biochar προστατεύει άμεσα τις ρίζες των φυτών από φυτοτοξικές ενώσεις που εκκρίνονται δραστήρια μέσω εκκριμάτων ρίζας άλλων φυτικών ειδών (Mahall & Callaway, 1992), ή κατά την αποικοδόμηση φυτικών υπολειμμάτων (Bonanomi *et al.*, 2011) και οργανικών τροποποιητικών.

1.5 Κατασταλτικά εδάφη

Η διαχείριση των παθογόνων μικροβιακών οργανισμών απαιτεί κυρίως τη χρήση τοξικών χημικών μυκητοκτόνων που επηρεάζουν αρνητικά το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, πολλοί από τους φυτοπαθογόνους μύκητες είναι δύσκολο να ελεγχθούν με χημικές μεθόδους λόγω του σχηματισμού ανθεκτικών δομών, όπως οι υφές με παχύ τοίχωμα, τα σκληρώτια, τα χλαμυδόσπορα και ωοσπόρια, που παραμένουν μια δεξαμενή εμβολιασμού σε γεωργικά εδάφη. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των ποικιλιών με γενετική αντίσταση για τον έλεγχο των μυκήτων του εδάφους είναι

περιορισμένη, καθιστώντας την αναζήτηση μη χημικών εναλλακτικών μεθόδων απαραίτητη (Okubara *et al.*, 2014a). Για το λόγο αυτό, τα εδάφη με κατασταλτική δραστηριότητα κατά διαφόρων παθογόνων παρασίτων έχουν διερευνηθεί για να δώσουν μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για τον έλεγχο των ασθενειών των ριζών (Cook & Baker, 1983; Gómez Expósito *et al.*, 2017; Schlatter *et al.*, 2017).

1.5.1. Μηχανισμοί καταστολής

Τα κατασταλτικά εδάφη συμβάλλουν στη μείωση της σοβαρότητας της νόσου και διατηρούν τη συχνότητα εμφάνισης χαμηλά, παρά την παρουσία δηλητηριώδους φυτοπαθογόνου, ευπαθούς φυτού ξενιστή και ευνοϊκού περιβάλλοντος για ανάπτυξη ασθενειών (Cook & Baker, 1983). Γενική και ειδική καταστολή ασθένειας είναι δύο μη αμοιβαία αποκλειστικοί μηχανισμοί που προτείνονται για τον χαρακτηρισμό των κατασταλτικών εδαφών. Η γενική καταστολή σχετίζεται με τον ανταγωνισμό για πόρους μεταξύ όλων των μελών της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας, ενώ η ειδική καταστολή ενός φυτοπαθογόνου εξηγείται από την δραστηριότητα μόνο μέρους της κοινότητας, εκπροσωπούμενη από συγκεκριμένες μικροβιακές ομάδες και οδηγεί στη προστασία ενάντια σε συγκεκριμένα παθογόνα (Gómez Expósito *et al.*, 2017). Επιπλέον, ενώ η γενική καταστολή δεν μεταφέρεται μεταξύ των εδαφών, η ειδική καταστολή (specific) μπορεί να μεταφερθεί με ανάμιξη 1-10% κατασταλτικού εδάφους σε συμβατικό αγωγίμο έδαφος (*conducive*) (Schlatter *et al.*, 2017).

Ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά στη περιοχή της ριζόσφαιρας εκδηλώνεται μέσω μικροβιακής παραγωγής πτητικών, εξωκυτταρικών λυτικών ενζύμων και δευτερογενών μεταβολιτών όπως σιδηρο-χηλικοποιητικά σιδερόφορα και αντιβιοτικά. Επίσης αναφέρονται και ο υπερπαρασιτισμός και η πρόκληση της επαγόμενης διασυστηματικής ανοχής (*ISR*) από ριζοβακτήρια (Weller *et al.*, 2002; Raaijmakers *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2014; Schlatter *et al.*, 2017). Η αντιβίωση είναι ο πιο μελετημένος μηχανισμός των κατασταλτικών εδαφών κατά των ασθενειών, όπου η ανάπτυξη και / ή η δραστηριότητα ενός οργανισμού παρεμποδίζεται από έναν άλλο οργανισμό μέσω της παραγωγής ειδικών ή μη ειδικών μεταβολιτών (Gómez-Expósito *et al.*, 2017). Βακτήρια παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών, ιδιαίτερα τα *Pseudomonas* spp. που είναι ικανά να παράγουν 2,4-διακετυλοφθορογλυκινόλη (*DAPG*), έχουν λάβει σημαντική προσοχή εξαιτίας των ρόλων τους στην καταστολή της μαύρης σήψης ριζών καπνού (Stutz *et al.*, 1986; Ramette *et al.*, 2006) και του πλαγιάσματος των σιτηρών (Raaijmakers & Weller, 1998; Cook, 2006). Οι Latz *et al.* (2012) έδειξαν μια συσχέτιση μεταξύ της καταστολής της νόσου του *R. solani* AG2-2IIIIB σε φυτάρια ζαχαροτεύτλων και της αφθονίας δύο αντιβιοτικών γονιδίων *phlD* και

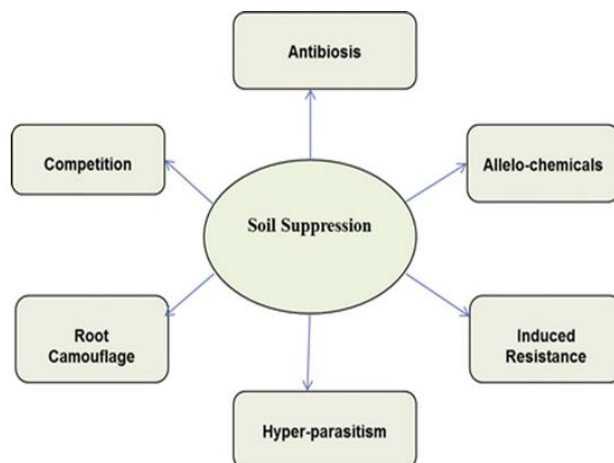
prnD τα οποία παράγουν ανιμυκητιακές ενώσεις DAPG και πυρρολιντρίνη αντίστοιχα.

Επίσης εξετάζεται ο ρόλος των ανιμικροβιακών ενώσεων σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις κατά την τροποποίηση της δραστηριότητας της μικροβιακής κοινότητας μέσω της αλληλοκυτταρικής σηματοδότησης, κινητικότητας, ανταπόκρισης στο στρες και σχηματισμού βιοφίλμ (Romero *et al.*, 2011; Philippot *et al.*, 2013). Επίσης προτάθηκε ότι οι πηκτικές ενώσεις μπορεί να παίζουν ρόλο στην καταστολή των ασθενειών, όπως στην δυνατότητα να επιτρέπουν την επικοινωνία και τον ανταγωνισμό μεταξύ των φυσικά διαχωρισμένων μικροοργανισμών του εδάφους, καταλήγοντας σε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις και αλλαγές στην παραγωγή αντιβιοτικών και δευτερογενών μεταβολιτών (Garbeva *et al.*, 2014; Tyc *et al.*, 2017). Για τα περισσότερα κατασταλτικά εδάφη δεν έχουν καθοριστεί πλήρως οι μηχανισμοί καταστολής (Schlatter *et al.*, 2017).

Έχει αποδειχθεί δύσκολο να εντοπιστούν οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί καταστέλλουν την ασθένεια για πολλά φυτοπαθογόνα, πιθανώς λόγω του πλήθους των διαδραστικών παραγόντων που σχετίζονται με τον τύπο καλλιέργειας και την ποικιλία, τον τύπο εδάφους, το περιβάλλον και τη διαχείριση γεωπονικών πρακτικών, όσο και της πιθανότητας για συμμετοχή πολλαπλών οργανισμών. Ο μικροβιακός μηχανισμός ή οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη καταστολή του *R. solani* AG8 είναι επί του παρόντος άγνωστοι.

1.5.2. Καταστολή του *Rhizoctonia solani* στο έδαφος

Η καταστολή του εδάφους του *R. solani* AG8 στο σπάρη και AG2-2 στα ζαχαρότευτλα, έχει χαρακτηριστεί ευρέως (Schlatter *et al.*, 2017). Διαφορετικοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες εμπλέκονται στην καταστολή του *R. solani* από τα εδάφη (Εικόνα 56). Η υφή του εδάφους, η σχέση pH-δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) (Εικόνα 57), ηλεκτρική αγωγιμότητα και η οργανική ύλη ήταν οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους που επηρεάζουν την καταστολή της ασθένειας του *Rhizoctonia* (Ghini & Morandi, 2006; Val-Moraes, 2015).



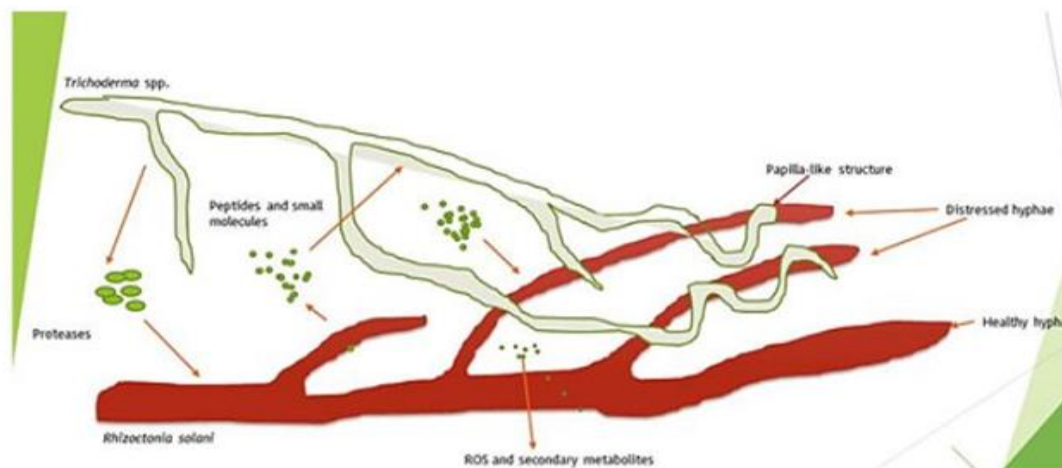
Εικόνα 56: διάφοροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην καταστολή του εδαφογενούς παθογόνου *R. solani* από τα εδάφη: αντιβίωση, αλληλο-χημικά συστατικά, επαγόμενη αντίσταση, υπερπαρασιτισμός, καμουφλαζ ρίζας, ανταγωνισμός. Πηγή: Yadav *et al.*, (2015).



Εικόνα 57: Κατασταλτική ιδιότητα εδαφών βάσει της σχέσης pH-δυναμικού οξειδοαναγωγής. Σε έδαφος χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) παρουσιάζεται καταστολή της ασθένειας, ενώ σε υψηλού Eh επάγεται η ασθένεια. Πηγή: <https://www.slideshare.net/AdvancingEcoAgricult/using-cover-crops-to-develop-disease-suppressive-soil>.

Προσφάτως, διεξήχθησαν μελέτες μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην καταστολή του *R. solani* για να ανακαλύψουν τα σημαντικά βιολογικά συστατικά. Οι (Penton *et al.* 2014) βρήκαν μια σχέση μεταξύ της κυριαρχίας μιας μυκητιακής κοινότητας που ανήκει στη τάξη *Hypocreales* και είναι κατασταλτική της ασθένειας του *R. solani* AG8. Οι *Trichoderma* spp., που ανήκουν στους *Hypocreales* έχουν μελετηθεί ευρέως καθώς είναι αποτελεσματικά μυκοπαράσιτα του *R. solani* (Εικόνα 58). Υψηλότεροι πληθυσμοί των *Trichoderma* spp. σχετίζονταν με την υψηλή καταστολή του εδάφους στο *R. solani* AG2-2 στα ζαχαρότευτλα (Anees *et al.*, 2009).

Επιπλέον, διαφορετικές μικροβιακές τάξεις των ριζοσφαιρικών βακτηρίων σχετίζονται με την καταστολή του εδάφους του *R. solani* (Gómez Expósito *et al.*, 2017). Μεταξύ των βακτηριακών γενών που εμπλέκονται, οι *Pseudomonas* και *Bacillus* είναι οι πιο διακεκριμένοι (Mendes *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2013; Donn *et al.*, 2014).



Εικόνα 58: Σχηματική απεικόνιση του μυκοπαρσιτισμού κατά του οποίου τα *Trichoderma* spp. αναγωνίζονται το *Rhizoctonia solani* εντός της εδαφικής κοινότητας. **Πηγή:** Abbas *et al.*, (2017).

Στην **Εικόνα 59** απεικονίζονται παραδείγματα εδαφών συμβατικού τύπου αλλά και κατασταλτικού στη δράση του *R. solani* ως αποτέλεσμα δράσης ωφέλιμων βακτηρίων.



Εικόνα 59: Παράδειγμα εδάφους φυσικής καταστολής στην ασθένεια πλαγιάσματος που προκαλείται από παθογόνο εδάφους *R. solani* σε σύγκριση με ένα συμβατικό αγώγιμο έδαφος. Σε αυτά εδάφη με παρόμοιες φυσικο-χημικές ιδιότητες εισήχθη το παθογόνο σε καλλιέργεια ευαίσθητων ποικιλιών ζαχαροτεύτλων. Στο κατασταλτικό έδαφος (αριστερά) η επίπτωση της ασθένειας είναι πολύ χαμηλή, ενώ τα περισσότερα σπορόφυτα είναι προσβεβλημένα στο αγώγιμο έδαφος (δεξιά). Εικόνα από το εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Πανεπιστημίου Wageningen, Ολλανδία.

Υπάρχουν αναφορές βελτίωσης της καταστολής της ασθένειας του *R. solani* στο έδαφος με την εφαρμογή διαφορετικών τροποποιήσεων οργανικής ύλης (Postma & Schilder, 2015) και τον συνδυασμό τους με το *Trichoderma* (Huang *et al.*, 2016). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι το περιεχόμενο οργανικής ουσίας και ότι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί εμπλέκονται στην ενίσχυση της καταστολής του *R. solani*.

Έπειτα μεταξύ των *Oxalobacteraceae*, κάποια μέλη των γενών *Collimonas* και *Janthinobacterium* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων και να προστατεύουν ρίζες φυτών από μυκητιακή μόλυνση (Leveau *et al.*, 2010; Johnsen *et al.*, 2010). Ομοίως, μέλη της *Burkholderiaceae* μελετήθηκαν καλά για την παραγωγή διαφόρων μεταβολικών με δραστικότητα έναντι μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των *R. solani* (El-Banna & Winkelmann, 1998). Επίσης, *Sphingobacteria* όπως το *Chitinophaga* και το *Pedobacter* είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν μυκητοκτόνο δράση ή επάγουν ανταγωνιστικά χαρακτηριστικά σε άλλες βακτηριακές τάξεις (Garbeva *et al.*, 2011).

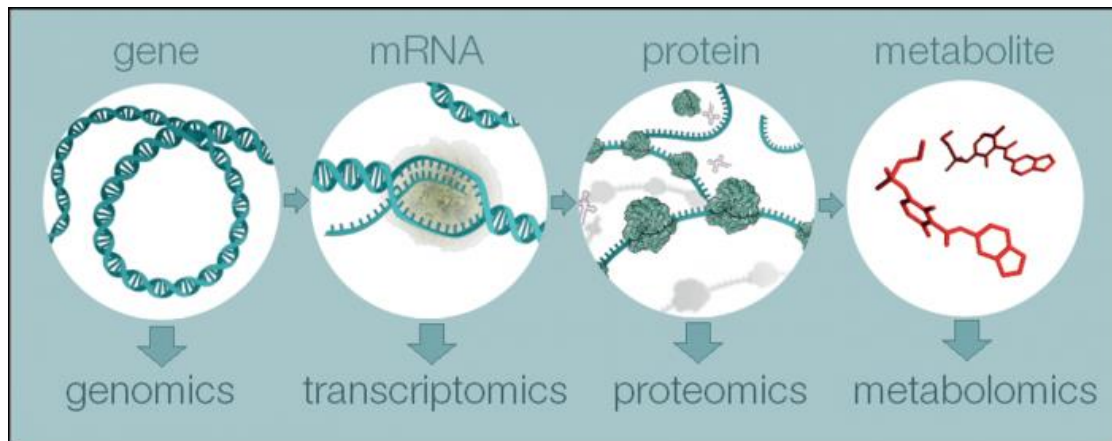
1.6 Η έννοια της Μεταβολομικής ανάλυσης

Οι σύγχρονες τεχνικές «ομικής» υψηλής ρυθμο-απόδοσης (*high-throughput*) αποτελούν ισχυρά εργαλεία της βιοτεχνολογίας για τη κατανόηση πολύπλοκων ζητημάτων σε διάφορους κλάδους επιστημών όπως ιατρική, βιολογία, περιβάλλον, γεωργία, τοξικολογία, φαρμακευτική κ.α., ιδίως όταν συνδυάζονται με βιολογικά συστήματα και απαντούν στα ερωτήματα που προσδοκούν έμμεσα στη βελτίωση της ανθρώπινης ευρωστίας (Εικόνα 60). Μια από τις διαρκώς εξελισσόμενες «ομικές» είναι η μεταβολομική (*metabolomics*) αποτελώντας τον συνδετικό κρίκο μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου (Εικόνα 61) (Hamany Djande *et al.*, 2020), καθώς προσφέρει μια ευρεία εικόνα της βιοχημικής και φυσιολογικής κατάστασης ενός οργανισμού. Επίσης το αλλαγμένο μεταβόλομα αποτελεί μια αντανάκλαση των αλλαγών στα επίπεδα του γονιδιώματος, μεταγραφώματος και πρωτεώματος. Συνεπώς το μεταβόλωμα θεωρείται το βιοχημικό στρώμα που αντικατοπτρίζει όλες τις πληροφορίες που εκφράζονται και διαμορφώνονται σε άλλα στρώματα ομικής, καθιστώντας το τον στενότερο κύκλο προς τον φαινότυπο. Το μεταβολικό αποτύπωμα ή προφίλ ενός οργανισμού αποτελεί το αποτέλεσμα της μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδιώματος, της ρύθμισής τους μέσω μετα-μεταγραφικών (*post-transcriptional*) και μετα-μεταφραστικών (*post-translational*) παραγόντων καθώς και της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην ανάπτυξη του οργανισμού (Xu *et al.*, 2014).

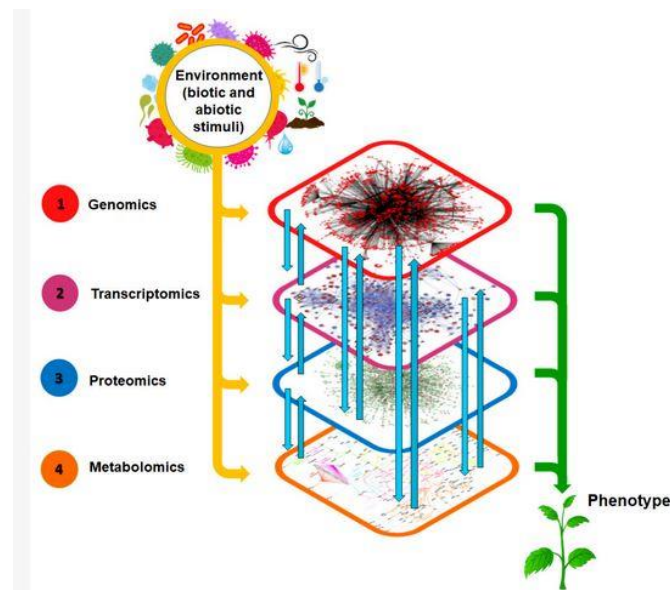
Πειραματικά οι μεταβολομικές μελέτες μπορούν να οριστούν ως α) το μεταβολομικό προφίλ που καθορίζεται από την ανάλυση (*ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση*) ενός μεγάλου αριθμού μικρομορίων γνωστών ως

μεταβολιτών οι οποίοι αλληλεπιδρούν εντός κάποιου βιολογικού συστήματος (Segers *et al.*, 2019), β) το μεταβολομικό αποτύπωμα δηλαδή τη μέθοδο ραγδαίας ρυθμο-απόδοσης που παρέχει χαρακτηρισμό φαινοτύπου και ξεχωρίζει τις διάφορες μεταβολικές καταστάσεις (Korcka *et al.*, 2004; Ellis *et al.*, 2007; Llanes *et al.*, 2018) και γ) το μεταβολικό αποτύπωμα δηλαδή την ανάλυση των μεταβολιτών που εκκρίνονται από έναν οργανισμό (Ellis *et al.*, 2007; Tugizimana *et al.*, 2013). Αυτές οι στρατηγικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναξαρτήτως ή συνδυαστικά για την κατανόηση του μεταβολόματος, καθώς παρέχουν σε ένα συγκεκριμένο χρονικό σημείο το χημικό χάρτη ενός βιολογικού συστήματος (Tugizimana *et al.*, 2013). Το μεταβόλομα μπορεί να οριστεί ως το ολοκληρωμένο σύνολο ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους ($<\pm 2000$ Da) το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στα μεταβολικά μονοπάτια και στις κυτταρικές διεργασίες σε ένα βιολογικό σύστημα (Dwivedi *et al.*, 2010) και ουσιαστικά είναι το χημικό προφίλ ή αποτύπωμα των μεταβολιτών που αντανακλά το ιστορικό ζωής. Πλέον η μεταβολομική καθίσταται ένα πανίσχυρο εργαλείο και στην έρευνα φυτικών ασθενειών σε συστήματα αλληλεπίδρασης φυτών-μυκητών (Chen *et al.*, 2018) και είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη στην ανακάλυψη μορίων μεταβολιτών-βιοσημαντών.

Οι βιοσημαντές είναι μετρήσιμοι δείκτες κάποιας βιολογικής κατάστασης και μπορούν να περιγράψουν τις παρατηρούμενες αλλαγές, έχοντας ευρεία χρήση στη παρακολούθηση ή πρόβλεψη φαινοτυπικών χαρακτηριστικών πριν παρατηρηθούν (Wolfender *et al.*, 2013). Επομένως στον τομέα της φυτοπαθολογίας η μεταβολομική μέσω της ικανότητάς της για ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό πολλαπλών μεταβολιτών προσφέρει μια ολιστική προσέγγιση ενώπιον της ανακάλυψης νέων διαγνωστικών και προγνωστικών βιοσημαντών για ασθένειες φυτών και ενώπιον της κατανόησης των παθολογικών μηχανισμών των πολύπλοκων αυτών ασθενειών (Maia *et al.*, 2020). Συνεπώς η ανάλυση των βιοσημαντών καθιστά την μεταβολομική κατάλληλη και εφαρμόσιμη σε διαφορετικά πεδία έρευνας όπως στην ιατρική με πρώιμη ανίχνευση ασθενειών [πχ. καρκίνου (Williams *et al.*, 2015), διαβήτη (Tao *et al.*, 2017)] και νευρολογικών ασθενειών (Gonzalez-Dominguez *et al.*, 2017; Murgia *et al.*, 2017), τοξικολογία (Cuykx *et al.*, 2018), τρόφιμα και διατροφή (La Barbera *et al.*, 2017), περιβαλλοντική ανάλυση (Cuykx *et al.*, 2018) και ασφαλώς ποιοτικό έλεγχο των βοτανικών εκχυλισμάτων (Wang *et al.*, 2017) όπως της κάνναβης.



Εικόνα 60: Σφαιρική εικόνα των κύριων πεδίων «ομικής», από τη γενωμική έως τη μεταβολομική. Πηγή: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/what-is/bolomics>



Εικόνα 61: Ένα σύστημα ροής βιολογικών πληροφοριών από το γονότυπο έως το φαινότυπο. Η μεταβολομική προσφέρει μια ευρεία εικόνα της βιοχημικής και φυσιολογικής κατάστασης ενός οργανισμού. Το αλλαγμένο μεταβόλομα αποτελεί μια αντανάκλαση των αλλαγών στα επίπεδα του γονιδιώματος, μεταγραφώματος και πρωτεώματος. Πηγή: Djante *et al.* (2020).

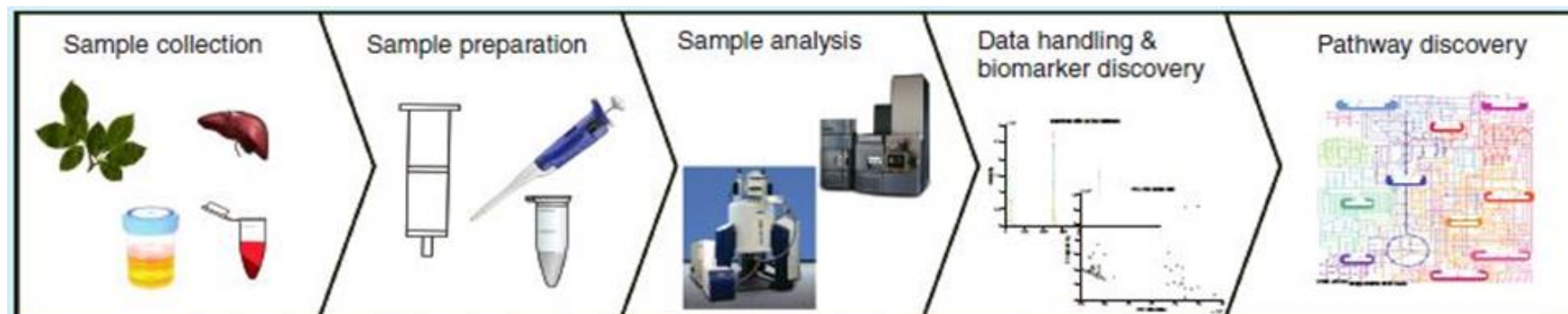
1.6.1 Αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού των δειγμάτων

Τα αναλυτικά βήματα που εφαρμόζονται σε μια μεταβολομική μελέτη απεικονίζονται στην **Εικόνα 62**. Η μεταβολομική έρευνα πραγματοποιείται κυρίως σε πολύπλοκες «μήτρες», όπως αίμα, περιπτώματα, κύτταρα ή φυτικά εκχυλίσματα (Gonzalez-Domingues *et al.*, 2017). Ως εκ τούτου απαιτούνται επαρκής προετοιμασία δείγματος και κατάλληλες αναλυτικές τεχνικές για τον ραγδαίο και ταυτόχρονο προσδιορισμό των διαφόρων συστατικών (Dwivedi *et al.*, 2010). Η απόκτηση μιας ευρείας κάλυψης του μεταβολώματος πράγματι αποτελεί μια πρόκληση εξαιτίας του ευρέως φάσματος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μικρών μορίων. Για να εξασφαλιστεί η επιτυχία της μεταβολομικής ανάλυσης ώστε να απομονωθούν/ταυτοποιηθούν οι μέγιστοι δυνατοί μεταβολίτες και συνεπώς να επεκταθεί η κάλυψη ολόκληρου του μεταβολώματος, μερικές φορές απαιτούνται διάφορες αναλυτικές τεχνικές με διαφορετικές δυνατότητες που να μπορούν να ανταπεξέλθουν ενώπιον συγκεκριμένων ομάδων μεταβολιτών και της μεγάλης φυσικοχημικής ποικιλίας του μεταβολώματος σε μια βιολογική μήτρα (Segers *et al.*, 2019). Για να παραχθεί ένα μεταβολομικό προφίλ, εφαρμόζονται φασματοσκοπικές και φασματομετρικές τεχνικές όπως NMR και MS υψηλού πεδίου, αλλά και τεχνικές διαχωρισμού σε συνδυασμό με φασματομετρική ανίχνευση μάζας όπως HPLC, υπέρτατη-HPLC (UHPLC), GC, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), χρωματογραφία δύο διαστάσεων (2D) και χρωματογραφία υπερκρίσιμης ροής (SFC), των οποίων η σύγκριση ως προς τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους αναφέρεται στον **Πίνακα 19**. Επιπλέον οι τεχνικές διαχωρισμού μπορούν να συνδυαστούν και με αναλυτή σπινθηρισμού «χρόνου πτήσης» (TOF). Για παράδειγμα ο συνδυασμός αυτών των αναλυτών μαζών με GC έχουν μειώσει σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης των πολύπλοκων μιγμάτων και έχουν βελτιώσει την ευκρίνεια μάζας (Villas-Boas *et al.*, 2005; Dunn, 2008).

Επίσης οι Allwood *et al.*, (2009) εστίασαν στην ανάπτυξη πρότυπων πρωτοκόλλων μεταβολομικής φυτών τύπου GC-TOF/MS βασισμένα σε πειράματα μεταξύ εργαστηρίων. Επιπλέον η εισαγωγή των πανίσχυρων αναλυτών Orbitrap MS και κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR) σε μεταβολομικές εφαρμογές άνοιξαν νέους ορίζοντες στην ανάλυση των παγκόσμιων μεταβολομικών δικτύων με εφαρμογή μεταβολομικής. Επιπλέον οι FT-ICR/MS και Orbitrap MS εφαρμόστηκαν επιτυχώς σε μεταβολομικές μελέτες υψηλής ρυθμο-απόδοσης (Oikawa *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2008; Aliferis & Jabaji, 2009; Taylor *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2008; Chong *et al.*, 2009; Koulman *et al.*, 2009; Okada *et al.*, 2009; Lv *et al.*, 2010). Παρόλο που με τις δύο αυτές πλατφόρμες παρέχεται μεγάλη δύναμη ευκρίνειας και ακρίβεια μάζας, η ανάθεση των ανιχνευόμενων ιόντων προς τις ανταποκρινόμενες ενώσεις είναι απαιτητική, αλλά η καθιέρωση οδηγιών για την ελαχιστοποίηση υποψήφιων μοριακών τύπων (Kind & Fiehn, 2007) σε συνδυασμό με βιβλιοθήκες στοχευμένων

μεταβολιτών και αναλύσεων MSⁿ συνεισφέρουν στο να ξεπεράσουν προσωρινά αυτό το εμπόδιο.

Συμπερασματικά η επιλογή για μια δεδομένη τεχνική επηρεάζεται από τη μήτρα του δείγματος, την συγκέντρωση και τις ιδιότητες των μεταβολιτών, καθώς και από την ποσότητα του δείγματος (Williams *et al.*, 2015; Kohler *et al.*, 2016; (Wu *et al.*, 2017; Puig-Castellvi *et al.*, 2017; (Marx *et al.*, 2018).



Εικόνα 62: Διάγραμμα ροής μεταβολομικών μελετών. Πηγή: Segers *et al.*, (2019).

Πίνακας 19: Σύγκριση των αναλυτικών τεχνικών NMR, HPLC-MS, UHPLC-MS, SFC-MS, CE-MS και GC-MS στο μεταβολομικό προφίλ. Segers *et al.*, (2019).

Property	Technique					
	NMR	HPLC-MS	UHPLC-MS	SFC-MS	CE-MS	GC-MS
Sensitivity	-	++	+++	+++	+	+++
Reproducibility	High	Lower than NMR				
Resolution	Low	Higher than NMR				
Quantification	Yes	Yes; internal standard needed				
Amount of sample preparation	Low	Medium	Medium	Medium	Medium	Extensive
Sample volume for injection	100–200 μ l	\pm 10 μ l	\pm 2–10 μ l	\pm 1–10 μ l	1–20 nl	\pm 1–2 μ l
Range of metabolites	Polar and nonpolar	RPLC: nonpolar HILIC: polar		Polar and nonpolar	Polar	Volatile polar and nonpolar
Identification of metabolites	Easy	Difficult (databases need to be improved)				Easy (spectral libraries)

HILIC: Hydrophilic-interaction liquid chromatography; RPLC: Reversed-phase liquid chromatography; SFC-MS: Supercritical fluid chromatography mass spectrometry; UHPLC-MS: Ultrahigh-performance liquid chromatography mass spectrometry.

1.6.1.1 Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (GC-MS) στην μεταβολομική ανάλυση

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης θα αναλυθεί η GC-MS ως τεχνική διαχωρισμού των μεταβολιτών, καθώς αποτέλεσε τη τεχνική που εφαρμόστηκε για μεταβολομική ανάλυση του πειράματος.

Η GC ήταν μία από τις πρώτες τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την αποσαφήνιση του μεταβολομικού προφίλ σε διαφορετικά πεδία έρευνας (Pauling *et al.*, 1971; Fiehn, 2016; Nassar *et al.*, 2017). Η GC-MS αποτελεί μια καλή πλατφόρμα για μη στοχευμένες αναλύσεις για να διαχωρίσει πολικές ενώσεις (Πίνακας 19) (Pauling *et al.*, 1971), (Gonzalez-Dominguez *et al.*, 2017). Η πιο σύνηθης τεχνική ιονισμού που εφαρμόζεται για ανάλυση GC σε μεταβολομικές αναλύσεις είναι ο ιονισμός ηλεκτρονίων. Αυτή η τεχνική είναι μια ισχυρή τεχνική ιονισμού σε σύγκριση με τον ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI). Ωστόσο αυτός ο ισχυρός ιονισμός είναι ισχυρά αναπαραγωγίμος μεταξύ διαφόρων πλατφόρμων, χαρακτηριστικό που αποτελεί πλεονέκτημα σε σύγκριση με άλλες πηγές ESI με LC που χρησιμοποιούνται συχνά. Ως εκ τούτου τα δεδομένα της GC-MS μπορούν εύκολα να συγκριθούν με καταγεγραμμένες φασματικές βάσεις δεδομένων ιονισμού ηλεκτρονίων, όπως για παράδειγμα την βάση δεδομένων NIST (Vinaixa *et al.*, 2016; Beale *et al.*, 2018). Επιπλέον η επιβεβαίωση των ισοβαρών ενώσεων με μια πανομοιότυπη μάζα είναι εφικτή βάσει των αναπαραγωγίμων δεικτών κατακράτησης από την GC (Beale *et al.*, 2018).

Μια σημαντική απαίτηση είναι η πτητικότητα των ενώσεων του δείγματος, αν και η παραγωγοποίηση συνήθως εκτελείται για να τις καταστήσει πτητικές σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Ο σχηματισμός ενός νέου συστατικού από την παραγωγοποίηση μπορεί επίσης να λύσει το ζήτημα της θερμικής αστάθειας των μεταβολιτών (Takeo *et al.*, 2017). Τα χρωματογραφήματα που αποκτώνται από την GC-MS είναι πολύπλοκα και μπορεί να περιέχουν πολύπλοκα προϊόντα παραγωγοποίησης. Οι χρόνοι ανάλυσης είναι συνήθως στα 60 min, αλλά και πιο σύντομες χρονικά αναλύσεις με λιγότερη ευκρίνεια μπορεί να είναι εφικτές όταν χρησιμοποιείται λογισμικό deconvolution. Αυτές οι προσεγγίσεις deconvolution θα ταιριάξουν σε όλες τις απαιτήσεις για την μεταβολομική, αλλά η ακρίβεια ακόμα θα είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με στοχευμένη ανάλυση (Koek *et al.*, 2011).

Δεδομένου ότι η παραγωγοποίηση είναι σημαντική, χρειάζεται να βελτιστοποιηθεί προσεκτικά inline ή offline. Οι Takeo *et al.*, 2017 βελτιστοποίησαν μια στερεάς φάσης αναλυτική παραγωγοποίηση (SPAD) των μεταβολιτών, με τη χρήση των δύο πιο κοινών παραγωγοποιήσεων για την ανάλυση GC της μεθοξύωσης και τριμεθυλοπυριπίωσης (Fiehn, 2016). Η διαδικασία αφορά έναν συνδυασμό από προετοιμασία δείγματος μέσω SPE και μιας παραγωγοποίησης, η οποία είναι λιγότερο χρονοβόρα από ότι η διαδοχική προσέγγιση. Η τεχνική SPAD διαθέτει επιπρόσθετα πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή επιλεξιμότητα, πιθανότητα αυτοματοποίησης με οποιαδήποτε

χρωματογραφική τεχνική και συμβατότητα με ευρέως φάσματος μήτρες δειγμάτων. Για να παραγωγοποιηθεί ένα εύρος από ενεργούς μεταβολίτες, εμπλέκονται δύο στάδια (Tian *et al.*, 2016). Αρχικά σχηματίζεται ένα **oxime** στάδιο, ακολουθούμενο από τριμεθυλοπυριπίωση. Η διαδικασία παραγωγοποίησης μπορεί να παρεμποδιστεί ταυτόχρονα από την παρατεταμένη ξήρανση του δείγματος (Takeo *et al.*, 2017) και της παρουσίας ύδατος (Beale *et al.*, 2018). Η απομάκρυνση του ύδατος είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προεπεξεργασία του δείγματος για GC, αλλά παρατείνει την προετοιμασία του δείγματος με ένα επιπρόσθετο βήμα. Έπειτα η παραγωγοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε απροσδιόριστα σημαντικά σχετικά με τις ενώσεις-ισομερή, αυξάνοντας συνεπώς την πολυπλοκότητα των μη στοχευμένων μελετών ομικής. Οι Lai *et al.*, (2017) εξέτασαν μεταξύ άλλων διαφορετικές αντιδράσεις παραγωγοποίησης και κατέγραψαν την παρουσία σχετικών με τις ενώσεις-ισομερών βάσει παραγωγοποίησης. Σύμφωνα με αυτή τη πληροφορία ανέπτυξαν ένα διάγραμμα ροής για βιβλιογραφία άγνωστων μεταβολιτών πυριπικής δομής, με βάση τις ακριβείς μάζες που μετρήθηκαν με GC-MS. Περισσότερες λεπτομέρειες για την παραγωγοποίηση φυτικών ή φαρμακευτικών εκχυλισμάτων και για ενδεικτικό πρωτόκολλο εφαρμογής αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

Για την βελτιστοποίηση ολόκληρου του δείγματος πρέπει να γίνει σχετική προετοιμασία. Ωστόσο δεν υπάρχει μια βέλπστη διεργασία προετοιμασίας δείγματος και θα αποτελεί πάντοτε έναν συμβιβασμό (Fiehn, 2016). Παράδειγμα παρατεταμένης προετοιμασίας δείγματος αποτελεί η μελέτη παραδοσιακού Κινεζικού φαρμάκου για τον διαβήτη τύπου II (Tao *et al.*, 2017) στην οποία περιλαμβάνεται η παραγωγοποίηση σε δείγματα ορού όπου προστέθηκε εσωτερική πρότυπη ένωση (standard) για να διορθώσει τις πειραματικές παραλλαγές εξαιτίας της προετοιμασίας δείγματος, παραγωγοποίησης και όγκου έγχυσης.

Η GC-MS χρησιμοποιείται επίσης και σε στοχευμένες προσεγγίσεις για να ποσοτικοποιήσει τους δεδομένους μεταβολίτες. Οι Tian *et al.*, (2016) μελέτησαν την επίδραση ενός βοτανικού φαρμάκου (*Xiaoyaosan*) σε καταθληπτικούς ασθενείς, κατά την οποία οι ρυθμίσεις της παραγωγοποίησης είναι πανομοιότυπες με αυτές των μη στοχευμένων προσεγγίσεων που περιγράφουν οι Zhao *et al.*, (2017) διερευνώντας το δυναμικό ενός άλλου αντιδιαβητικού φαρμάκου με την μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος ορού υπερουχαιμικών ποντικών και οι Tao *et al.*, (2017). Στη σημερινή ημέρα το στάδιο της παραγωγοποίησης θα είναι λιγότερο χρονοβόρο λόγω των πρόσφατων βελτιώσεων (Beale *et al.*, 2018), όπως για παράδειγμα της τεχνολογίας SPAD. Ωστόσο η βελτιστοποίηση των βημάτων της παραγωγοποίησης αλλά και η ενσωμάτωσή τους εντός γραμμής (inline) αποτελεί ακόμα ένα πεδίο έρευνας.

1.6.1.1.1 Παραγωγοποίηση με Meox και MSTFA

Οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης προορίζονται για να μεταμορφώσουν τον αναλύτη για ανιχνευσιμότητα στην αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (GC-MS) ή άλλων ενόργανων αναλυτικών μεθόδων. Η παραγωγοποίηση στην ανάλυση με GC-MS μπορεί να οριστεί ως μια διαδικαστική τεχνική η οποία πρωτίστως τροποποιεί την λειτουργικότητα ενός αναλύτη με σκοπό να επιτρέψει τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς. Ένας τροποποιημένος αναλύτης σε αυτή την περίπτωση είναι το προϊόν, το οποίο είναι γνωστό ως παράγωγο. Το παράγωγο μπορεί να έχει παρόμοια ή στενά συγγενική δομή, αλλά όχι την ίδια όπως του πρωτότυπου μη-τροποποιημένου χημικού συστατικού.

Η πτητικότητα του δείγματος είναι μια απαίτηση για την ανάλυση με GC-MS. Η παραγωγοποίηση θα καταστήσει τα υψηλώς πολικά υλικά υλικά να γίνουν επαρκώς πτητικά, έτσι ώστε να μπορούν να εκλουστούν σε λογικές θερμοκρασίες χωρίς θερμική αποσύνθεση (Knapp, 1979) ή μοριακή αναδιάταξη (Kuhnel *et al.*, 2007). Κατανοώντας τη χημεία των αναλυτών, τα αντιδραστήρια της παραγωγοποίησης που χρησιμοποιούνται στην προετοιμασία του δείγματος και η λεπτομερής λειτουργικότητα του GC-MS είναι σημαντικά για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Από τότε που η GC-MS χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει πτητικά οργανικά συστατικά, η τροποποίηση της ενεργής ομάδας ενός μορίου μέσω της παραγωγοποίησης επιτρέπει την ανάλυση των συστατικών τα οποία σε διαφορετικές περιπτώσεις δεν μπορούν να παρακολουθηθούν εύκολα από GC-MS. Η διαδικασία παρακολούθησης είτε αυξάνει, είτε μειώνει την πτητικότητα του υπό ενδιαφέροντος συστατικού. Επιπλέον μειώνει την προσρόφηση του αναλύτη στο σύστημα GC και βελτιώνει την ανταπόκριση του ανιχνευτή, τους διαχωρισμούς και τη συμμετρία των κορυφών. Είναι απαραίτητο να αναπυχθούν ή/και να βελτιώσουν τις χημικές αναλυτικές μεθόδους και συνεπώς την ανάγκη να εξοικειωθούν με τις μεθόδους παραγωγοποίησης, που είναι εφαρμόσιμες στην ανάλυση GC. Σε γενικές γραμμές η παραγωγοποίηση στοχεύει στην βελτίωση της καταλληλότητας, αποτελεσματικότητας και ανιχνευσιμότητας στην αέρια χρωματογραφία.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά όλα τα βήματα παραγωγοποίησης με methoxylamine hydrochloride (Meox) και N-methyl-N(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) και παρουσιάζονται το σχετικό πλάνο (Πίνακας 20) και μια εικόνα του γενικού μηχανισμού της αντίδρασης (Εικόνα 63) για την οπτική επίδειξη της χημικής παραγωγοποίησης των δειγμάτων πριν την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας (GC-MS), για την καλύτερη έκλουση και ευαισθησία της ανίχνευσης.

Για την προετοιμασία τους τα δείγματα υπό εξέταση διαλύονται με την χρήση των κατάλληλων διαλυτών (βάσει της φύσης της μελέτης) και αποξηραίνονται υπό υγρό άζωτο. Επιπλέον η ποσότητα του δείγματος πρέπει

να μετράται με σκοπό να καθορίσει την απόδοση του επιθυμητού εκχυλίσματος.

Πρωτόκολλο χημικής παραγωγοποίησης των φυτικών/φαρμακευτικών δειγμάτων (Bajrai *et al.*, 2016)

1. Τα φυτικά/φαρμακευτικά δείγματα πρέπει να διαλυθούν σε ένα κατάλληλο σύστημα διαλυτών (πχ. για παραγωγοποίηση της αλκοολικής ζάχαρης, το φαρμακευτικό δείγμα πρέπει να διαλυθεί σε αναλογία 1:1 νερού και μεθανόλης) για εύκολη και ευαίσθητη έκλουση του δείγματος μέσα στη στήλη GC
2. Τα δείγματα πρέπει να φιλτραριστούν μέσω σύριγγας φίλτρων μεγέθους 0,2 μm βαθμίδας HPLC.
3. Τα δείγματα πρέπει να υποστούν επεξεργασία μόνο σε γυάλινες φιάλες καλυμένες με σφινγκτά καπάκια για κατάλληλη παραγωγοποίηση.
4. Τα φυτικά δείγματα πρέπει να είναι τελείως αποξηραμένα υπό υγρό άζωτο έτσι ώστε να απομακρύνουν τα ίχνη του διαλύτη
5. Τα δείγματα πρέπει να εκτεθούν για θέρμανση σε συνεχή θερμοκρασία (40°C) κατά το στάδιο της ξήρανσης
6. Μόλις τα δείγματα ξηρανθούν τελείως, πρέπει να αναμιχθεί ένα διάλυμα από το χημικό παράγοντα παραγωγοποίησης methoxylamine hydrochloride σε pyridine (100 μL) και να αφεθούν τα δείγματα στη θερμοκρασία των 40°C για 90 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η αντίδραση χημικής παραγωγοποίησης.
7. Μετά τον συγκεκριμένο χρόνο (90 min), πρέπει να αναμιχθεί με τα δείγματα ο συγκεκριμένος διαλύτης MSTFA (100 μL) τύπου GC.
8. Ο όγκος του χημικού παράγοντα παραγωγοποίησης και διαλύτη GC πρέπει να ρυθμιστεί βάσει της ποσότητας των δειγμάτων.
9. Εν συνεχεία τα δείγματα πρέπει να αφεθούν σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα στους 40°C.
10. Επιπλέον, όλα τα δείγματα πρέπει να επαναφιλτραριστούν με τη χρήση σύριγγας φίλτρων μεγέθους 0,2 μm βαθμίδας HPLC.
11. Τέλος τα δείγματα πρέπει να αποθηκεύονται μόνο σε μικρά γυάλινα φιαλίδια κατάλληλα για νάλυση GC.
12. Εάν τα δείγματα δεν αναλυθούν άμεσα, πρέπει να αποθηκεύονται σε ψύχος (4°C) για 24-28 ώρες

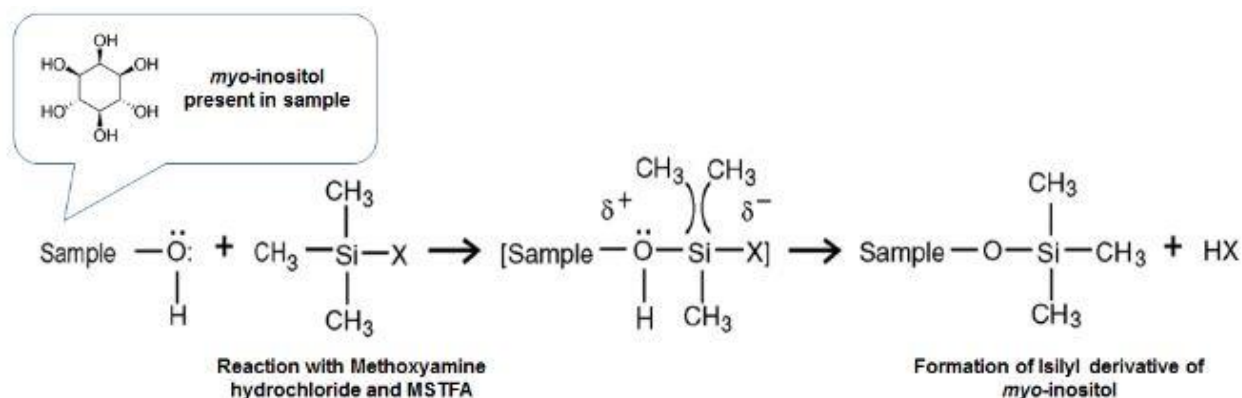
13. Βάσει της φύσης των συστατικών, στο GC-MS μπορεί να ανιχνευτεί συγκεκριμένο συστατικό αναλόγως του χρόνου κατακράτησής του και ταύπισης με την βιβλιοθήκη συστατικών GC-MS και/ή να μπορεί να αναλυθεί ποσοτικώς χρησιμοποιώντας πρότυπο συστατικό.

Ένα φαρμακευτικό/φυτικό δείγμα στην ακατέργαστη μορφή του περιέχει έναν μεγάλο αριθμό συστατικών. Κάποια από τα συστατικά βιοδραστικής σημασίας δεν μπορούν να ανιχνευτούν κατά την ανάλυση GC χωρίς αντίδραση χημικής παραγωγοποίησης, η οποία επιτρέπει την ευαίσθητη ανίχνευση των επιθυμητών συστατικών στη στήλη GC εξαιτίας των αλλαγών των χημικών συστατικών στην διαφορετική ισομερή μορφή τους, επομένως τα συστατικά μπορούν να ανιχνευτούν εύκολα από το GC-MS με υψηλότερη ευαισθησία. Η γενική αντίδραση της παραγωγοποίησης περιγράφεται στην **Εικόνα 63**. Ένας σημαντικός αριθμός ερευνητικών άρθρων έχει δημοσιευτεί πάνω στον χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των μεταβολικών συστατικών σε διάφορα φυτικά και φαρμακευτικά δείγματα, όπου η χημική παραγωγοποίηση των δειγμάτων πριν την ανάλυση με GC έχει καταγραφεί ως μια επιτακτική διαδικασία για καλύτερη ανίχνευση του προφίλ των συστατικών (Farag *et al.*, 2015; Japelt *et al.*, 2015). Για τον επιτυχή διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση των φυτικών και φαρμακευτικών συστατικών από διάφορες πηγές έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές.

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία από τις πολλές και η πιο δημοφιλή και ευρέως εφαρμόσιμη τεχνική διαχωρισμού και ανίχνευσης για να χαρακτηρίσει ταυτόχρονα οργανικά και ανόργανα υλικά, συνιστώντας την ενδεχόμενη χρησιμότητά της στην χημική ανάλυση του πολύπλοκου εκχυλίσματος του ακατέργαστου υλικού (Farag *et al.*, 2015). Η συγκεκριμένη μέθοδος με τα Meox και MSTFA αποτελεί μια επιτυχημένη εφαρμογή της χημικής παραγωγοποίησης και χρωματογραφικών τεχνικών για την ανίχνευση και χαρακτηρισμό των φαρμακευτικών και βιολογικά δραστικών ή/και δευτερογενών μεταβολιτών από διάφορα φυτικά και φαρμακευτικά δείγματα. Ωστόσο η επιλογή της τεχνικής παραγωγοποίησης για την ανάλυση των συστατικών θα βασιστεί στα διαθέσιμα αντιδραστήρια και στους τύπους αντίδρασης που μπορούν να παραγάγουν παράγωγα που να δίνουν επιθυμητά αποτελέσματα στην GC. Τα παράγωγα πρέπει να είναι κατάλληλα, ανιχνεύσιμα και αποτελεσματικά για την ανάλυση με GC. Η αξιολόγηση των ενεργών ομάδων του αναλύτη, του ανιχνευτή GC, ακόμα και των παραπροϊόντων της αντίδρασης μεταξύ άλλων, θα καθοδηγήσει την επιλογή της τεχνικής παραγωγοποίησης.

Πίνακας 20: Πλάνο σχεδίασης αναλογίας αντίδρασης του υπό εξέταση δείγματος, αντιδραστηρίων παραγωγοποίησης και standards. Πηγή Bajpai *et al.*, 2016

Δείγμα/ Παράγοντας παραγωγοποίησης	Blank	Standard (1000, 1000, 500, 250 και 125 ppm)	Φυτικό συστατικό/Φάρμακο A (γνωστής διαλυμένης ποσότητας)
Φυτικό συστατικό/Φάρμακο A	-	-	1 mL από αποξηραμένο δείγματα
Standard	-	1 mL από αποξηραμένο δείγμα	-
Methoxylamine hydrochloride (παράγοντας παραγωγοποίησης)	100μL	100 μL	100 μL
N-methyl-N(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (διαλύτης)	100μL	100 μL	100 μL



Εικόνα 63.: Γενικός μηχανισμός αντίδρασης για το σχηματισμό πυριτικών παραγώγων της *myo*-inositol. Πηγή: Bajpai *et al.*, (2016).

1.6.2 Επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής

Εφόσον όλα τα δεδομένα της μεταβολομικής ανάλυσης που προέκυψαν από τις τεχνικές διαχωρισμού των μεταβολιτών, καταλήγουν σε στατιστικές αναλύσεις με πολυπαραγοντικά σύνολα δεδομένων, απαιτούνται και τα κατάλληλα χημομετρικά εργαλεία για την αποκόμιση περεταίρω σχετικών πληροφοριών.

1.6.2.1 Πολυπαραγοντικές αναλύσεις δεδομένων (MVDA)

Οι Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides (2010) αναφέρουν στην ανασκόπησή τους ότι η πολυπαραγοντική ανάλυση (*multivariate analysis*) είναι η κεντρική στατιστική προσέγγιση στην ανάλυση της απέραντης ποσότητας των δεδομένων που προέρχονται από τα πειράματα μεταβολομικής. Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (*Principal component analysis, PCA*) είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την αρχική ανασκόπηση συνόλων δεδομένων και την ανίχνευση των τάσεων και των ακραίων τιμών (*outliers*) που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τον κινητήριο μοχλό στις αναλύσεις. Πραγματοποιώντας PCA, ανιχνεύονται οι κατευθύνσεις στον πολυπαραγοντικό χώρο που ανηπρωσώπευουν τις μεγαλύτερες πηγές της παραλλαγής (κύριες συνιστώσες, PCs). Ωστόσο σύμφωνα με τους Eriksson *et al.*, (2001), δεν είναι απαραίτητο τα PCs που ανακαλύπτονται με εφαρμογή PCA να ανηπρωσώπευουν την μέγιστη παραλλαγή μεταξύ ομάδων. Στον αντίποδα η εφαρμογή διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (*Partial Least Square Discriminant Analysis PLS-DA*) επιτυγχάνει μια περιστροφή της προβολής (*projection*) για να ξεδιπλώσει κρυμμένες μεταβλητές που συνεισφέρουν στον διαχωρισμό ομάδας. Ως εκ τούτου η ανίχνευση των μεταβλητών με την μεγαλύτερη επιρροή (*βιοσημαντές*) των παρατηρούμενων διαχωρισμών πρέπει να βασίζεται στην PLS-DA. Η ορθογώνια PLS-DA (*OPLS-DA*) αποτελεί μια εναλλακτική οδό στην PLS-DA και έχει σχεδιαστεί για να διαχειρίζεται την μεταβλητή X που είναι ορθογώνια στην Y. Μπορεί εξίσου να εφαρμοστεί για το διαχωρισμό μεταξύ επεμβάσεων και για την ανίχνευση των βιοσημαντών σε πειράματα μεταβολομικής. Η διαμέριση των δεδομένων X με εφαρμογή OPLS-DA παρέχει βελτιωμένη διαφάνεια του μοντέλου και ερμηνευτικότητα χωρίς καμία επίδραση στην ισχύ της πρόβλεψης (Trygg & Wold, 2002).

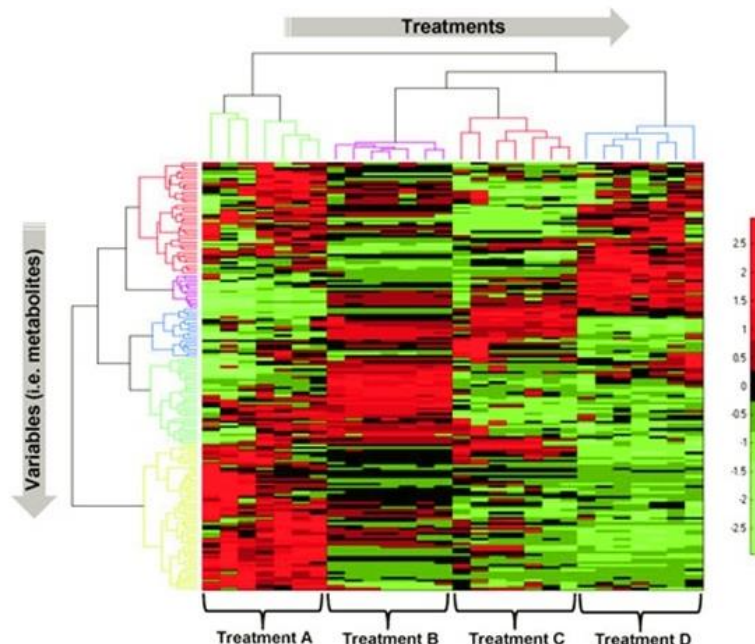
Επιπλέον η εφαρμογή των multi-block πολυπαραγοντικών αναλύσεων πάνω σε συνδυαστικά δεδομένα από διαφορετικές αναλυτικές πλατφόρμες φαίνεται να είναι μια πανίσχυρη στατιστική μέθοδος που παρέχει πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες για υψηλής ρυθμο-απόδοσης ταυτοποίησης των ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα. Τα προεπεξεργασμένα δεδομένα των μητρώων που αποκτώνται με διαφορετικές αναλυτικές πλατφόρμες, συνδυάζονται μέσα σε μία μεμονωμένη μήτρα και μετέπειτα υποβάλλονται σε multiblock πολυπαραγοντικές αναλύσεις όπως multi-block PCA ή multi-block

PLS-DA. Η συγκεκριμένη προσέγγιση παρουσιάστηκε αρχικά από τους Biais et al., 2009 που πραγματοποίησε multiblock PCA σε συνδυαστικά δεδομένα NMR και GC-TOF/MS.

1.6.2.2 Ιεραρχική ομαδοποίηση (HC) και θερμικοί χάρτες (heat maps)

Οι Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides (2010) αναφέρουν ότι παρόλο που οι PCA και PLS-DA αποτελούν τους κύριους στατιστικούς ελέγχους που εφαρμόζονται στην μεταβολομική για την ανίχνευση των τάσεων και βιοσημαντών, η ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (*Hierarchical Cluster Analysis, HCA*) είναι μια στατιστική μεθοδολογία που παρέχει πολύτιμες πληροφορίες που αφορούν την ομαδοποίηση των επεμβάσεων σε μεγάλα σύνολα δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά με τις PCA και PLS-DA. Η έννοια της HCA είναι να ομαδοποιήσει τις επεμβάσεις που είναι πιο κοντά σε συστάδες (*clusters*). Η HCA βασικά ξεκινά με έναν αριθμό συστάδων ίσο με αυτό των παρατηρήσεων και προοδευτικά οι δύο πιο συναφείς παρατηρήσεις ή συστάδες συγχωνεύτηκαν μέχρις ότου να παραμείνει μόνο μία συστάδα. Ο υπολογισμός των αποστάσεων ομαδοποίησης βασίζεται σε αλγορίθμους όπως μεμονωμένους, ολοκληρωμένους, μέσω των όρων και συνδέσεις του Ward's. Τα αποτελέσματα της HCA παρουσιάζονται σε δένδρογράμματα, όπου οι παρατηρήσεις σχεδιάζονται έναντι αποστάσεων των συστάδων.

Ένα ακόμα πανίσχυρο εργαλείο για τις αναλύσεις και την απεικόνιση των μεταβολομικών συνόλων δεδομένων είναι οι αποκαλούμενοι θερμικοί χάρτες, οι οποίοι συνήθως συνδυάζονται με δυσδιάστατες (2D)-HCA. Στα πειράματα μεταβολομικής οι θερμικοί χάρτες απεικονίζουν διακυμάνσεις (*φορές αλλαγής*) στην συγκέντρωση των μεταβολιτών μεταξύ των επεμβάσεων που κωδικοποιούνται με την χρήση κωδικών-χρώματος (**Εικόνα 64**). Ο συνδυασμός της 2D-HCA με θερμικούς χάρτες αποκαλύπτει τις τάσεις μέσα στις επεμβάσεις και επιπροσθέτως, μεταβλητές (*μεταβολίτες*) των οποίων οι συγκεντρώσεις αλλάζουν με ένα πανομοιότυπο μοτίβο μεταξύ των επεμβάσεων.



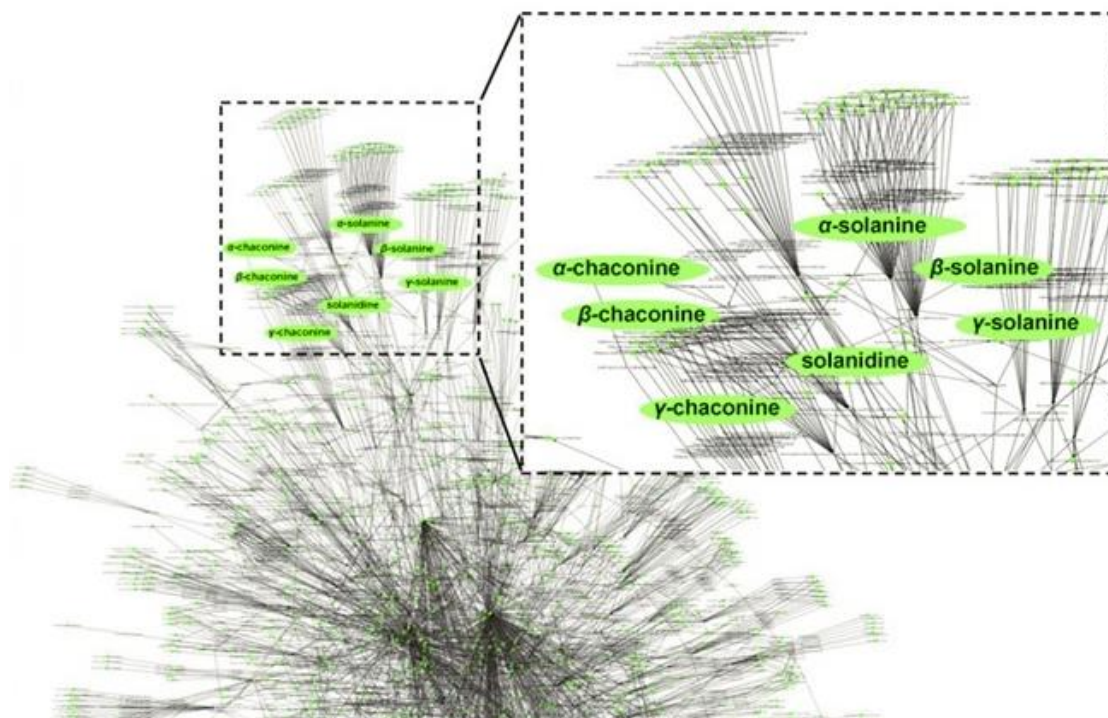
Εικόνα 64: Θερμικός χάρτης που απεικονίζει τις διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των μεταβολιτών μεταξύ κωδικοποιημένων επεμβάσεων με τη χρήση κλίμακας χρώματος. Η 2D-HCA σε συνδυασμό με θερμικούς χάρτες αποκαλύπτει τάσεις εντός των επεμβάσεων και μεταβλητών (μεταβολιτών). Πηγή: Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides (2010).

1.6.3.3 Διαδικτυακές πηγές πληροφοριών μεταβολομικής και βιολογικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων

Η ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού ελεύθερων διαθέσιμων διαδικτυακών βάσεων δεδομένων και λογισμικών για δεδομένα μεταβολομικής προεπεξεργασίας, αναλύσεων, απεικόνισης και βιολογικής ερμηνείας κατά τα σύγχρονα χρόνια, έχουν ανοίξει νέους ορίζοντες στην μεταβολομική.

Οι μεταβολομικές αναλύσεις καταλήγουν σε μια απέραντη ποσότητα δεδομένων των οποίων η βιολογική ερμηνεία είναι απαιτητική, χρονοβόρα και απαιτεί εργαλεία υψηλής ρυθμο-απόδοσης για την συσχέτιση με φυσιολογικές διαδικασίες και μεταβολικά μονοπάτια των βιολογικών συστημάτων υπό μελέτη. Σε αντίθεση με την ανάπτυξη λογισμικού για προεπεξεργασία δεδομένων και αναλύσεων, μόνο λίγα λογισμικά πακέτα που διευκολύνουν την ισχυρή ερμηνεία των μεταβολομικών δεδομένων σε μεταβολικά δίκτυα, είναι διαθέσιμες. Μεταξύ αυτών το λογισμικό Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003) επιτρέπει τις διάφορες μεταβολομικές εφαρμογές υψηλής ρυθμο-απόδοσης μέσω πρόσθετων (*plug-ins*) μικρών λογισμικών όπως το MetaNetter (Breitling *et al.*, 2006) και Metascape (Gao *et al.*, 2010). Στην **Εικόνα 65** παρουσιάζεται ένα αποτέλεσμα μεταβολομικών μονοπατιών με την χρήση του Cytoscape v.2.6.3. Τέλος η ανάπτυξη προηγμένων, εκλεπτυσμένων λογισμικών που ενσωματώνουν διάφορες εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων, αναμένεται να ενισχύσει την μεταβολομική έρευνα και να

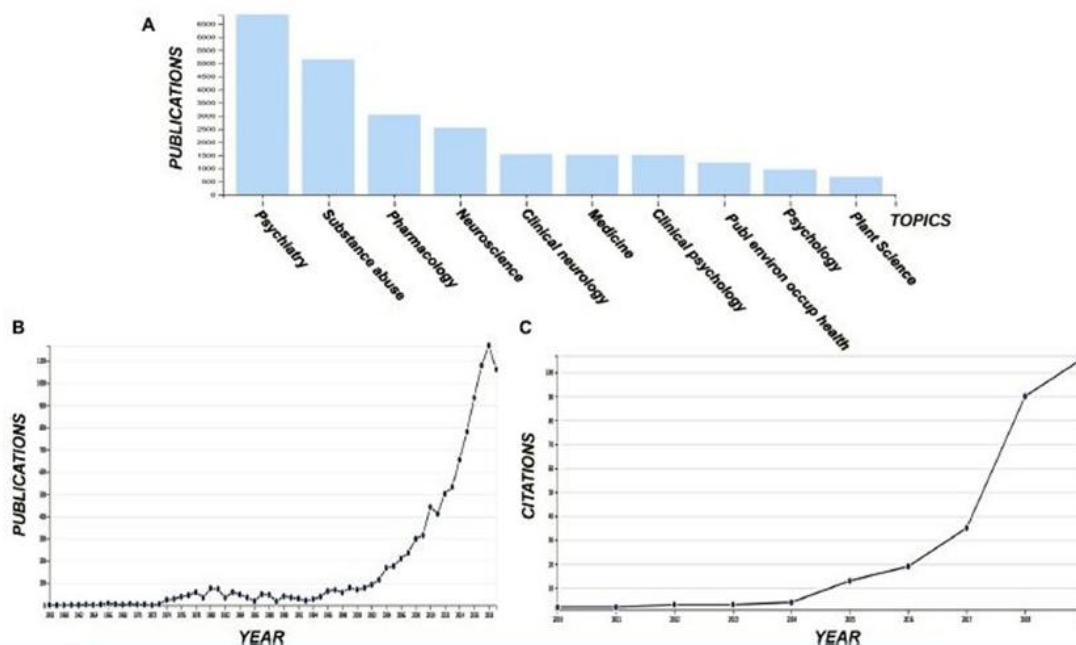
συνεισφέρει στην ανάπτυξή τους ως ένα ισχυρά παγκόσμιο βιοαναλυτικό εργαλείο για την μελέτη βιολογικών συστημάτων.



Εικόνα 65: Μερική όψη του μεταβολικού δικτύου της πατάτας με τη χρήση του λογισμικού Cytoscape v2.6.3 και της βάσης δεδομένων BioCyc. Το διευρημένο τμήμα απεικονίζει το μοναπάτι του γλυκοαλκαλοειδούς, το οποίο οδηγεί στην παραγωγή α-σολανίνης και α-χακονίνης, δύο από τα πιο άφθονα βιοενεργά γλυκοαλκαλοειδή της πατάτας που εμπλέκονται στις αποκρίσεις της πατάτας σε βιοτικά και αβιοτικά ερεθίσματα. Οι κόμβοι αναπαριστούν μεταβολίτες/ένζυμα/χημικές αντιδράσεις. (<http://www.gramene.org/pathway/potatocyc.html>). Πηγή: Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides (2010).

1.6.3 Μεταβολομική στο *Cannabis sativa* L.

Η πρόσφατη νομιμοποίηση της κάνναβης σε πολλές χώρες για φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς μέσα στο αντίστοιχο νομοθετικό πλαίσιο (Pacula & Smart, 2017; Cox, 2018), σε συνδυασμό με τις αξιοσημείωτες βιοδραστικότητες του φυτού, θέτουν μια παρόρμηση για επιτάχυνση και εντατικοποίηση της κάνναβης στην έρευνα και ανάπτυξη (R&D). Παρόλο που είναι ακόμα σε βρεφικό στάδιο, υπάρχει επί του παρόντος ένα εκθετικά αυξανόμενο ενδιαφέρον στην R&D της κάνναβης (**Εικόνα 66**).



Εικόνα 66: (A) Δημοσιεύσεις που ομαδοποιούνται σε διάφορες περιγραφές με τον όρο «κάνναβη», (B) ο αντίστοιχος αριθμός δημοσιεύσεων και (C) ο αριθμός παραπομπών για την απόκτηση των όρων «κάνναβη» και «μεταβολομική». Άντληση δεδομένων από την βάση δεδομένων του ISI Web of Science (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, United States) (Πηγή: Aliferis & Bernard-Perron, (2020).

Παρόλα αυτά η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών προϊόντων, η εκτίμηση του κινδύνου για τα προϊόντα κάνναβης και του ποιοτικού τους ελέγχου, καθώς και η έρευνα πάνω στο φυτό και τα βιοδραστικά συστατικά του, καθιστούν απαραίτητη την υλοποίηση προηγμένων βιοαναλυτικών εργαλείων. Τέτοια εργαλεία θα μπορούσαν να διευκολύνουν την αναζήτηση της απαραίτητης ελλειπούσας γνώσης, η οποία θα τεθεί υπό εκμετάλλευση ενώπιον της της ανάπτυξης καινοτόμων, ασφαλών προϊόντων και την βελτίωση της παραγωγικότητας του φυτού σε μια επίκερη μόδα. Επομένως με βάση τις πολύπλευρες και μοναδικές ικανότητες στην αποσαφήνιση της μεταβολικής σύστασης των πολύπλοκων μητρών, η μεταβολομική ανιππροσωπεύει ένα ιδανικό βιοαναλυτικό εργαλείο που θα μπορούσε να επιταχύνει σημαντικά την R&D της κάνναβης. Συνεπώς η επιτυχής εφαρμογή της απαιτεί σταθερή τεχνογνωσία στον πειραματικό σχεδιασμό, αναλυτική και βιοαναλυτική χημεία, προηγμένη στατιστική και βιοπληροφορική.

Για την εφαρμογή της μεταβολομικής στην R&D της κάνναβης οι Aliferis & Bernard-Perron, (2020) εισήγαγαν τον όρο «κανναβινομική» και στον Πίνακα 21 καταγράφονται διάφορες μελέτες μεταβολομικής στην R&D της κάνναβης. Η εφαρμογή της μπορεί να βοηθήσει στον τομέα δια της χαρτογράφησης του μεταβολομάτων των υπάρχοντων γονοτύπων και της ταξινόμησής τους ως προς τις αντίστοιχες χημειοποικιλίες (Hazekamp *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2018). Επιπροσθέτως έχει προβλεφθεί ότι η συνεισφορά της κανναβινομικής

ενώπιον της βελτιστοποίησης και κανονικοποίησης των γεωπονικών πρακτικών [π.χ. εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών (PGR), βιοδιεγέρτες, λιπάσματα, συνθήκες φωτός, αρδευτικά συμβάντα] για την παραγωγή ανώτερης ποιότητας προϊόντων θα είναι ουσιώδης (Magagnini *et al.*, 2018). Παρομοίως, η Κανναβινομική αναμένεται να έχει ένα σημαντικό αντίκτυπο στην ανακάλυψη φαρμακευτικών προϊόντων, ιατρική, επιστήμη τροφίμων, ενεργή έρευνα στην κοσμητολογία και μεταβολική μηχανική των μικροοργανισμών για την βιοσύνθεση των κανναβινοειδών (Aliferis & Bernard-Perron 2020).

Πίνακας 21: Εφαρμογή της μεταβολομικής στην έρευνα και ανάπτυξη. Πηγή: Aliferis & Bernard-Perron (2020)

Analytical method ^a	Extraction solvents ^b	Purpose of the study	References
¹ H NMR	MeOH:H ₂ O (1:1, v/v) or CHCl ₃ -d, evaporation, dissolution in CHCl ₃ -d or MeOH-d ₄ :H ₂ O-d ₂	Effect of jasmonic acid (JA) and pectin on Cannabis cell lines	Pec̃ <i>et al.</i> , 2010
¹ H NMR (¹ D DOSY), ¹ H NMR	H ₂ O and H ₂ O:EtOH extracts, evaporation, dissolution in CHCl ₃ -d, MeOH-d ₄ , or H ₂ O-d ₂	Discovery of the differences among cultivars and study of the effects of temperature and solvent polarity on the cannabinoid content of extracts	Politi <i>et al.</i> , 2008
¹ H NMR, ¹ H- ¹ H, COSY, ¹ H- ¹³ C HMBC	CHCl ₃ -MeOH:H ₂ O, evaporation of the extracts and finally dissolution in CHCl ₃ -d or MeOH-d ₄ :KH ₂ PO ₄	Classification and analyses of <i>C. sativa</i> L. plants and cell suspension cultures	Flores-Sanchez <i>et al.</i> , 2012
¹ H NMR	H ₂ O-d ₂ , CHCl ₃ -d	Cannabinoids biosynthesis and metabolite profiles of trichomes during flowering	Happyana and Kayser, 2013
¹ H NMR LC/DAD	DMSO-d ₆ MeOH, MeOH:H ₂ O	Discrimination among chemovars based on the cannabinoid and phenolic contents	Peschel and Politi, 2015
GC/FID	CHCl ₃ , followed by Ace	Discrimination between <i>C. sativa</i> var <i>sativa</i> and <i>C. sativa</i> var <i>indica</i> based on the terpenoid profiles of essential oils	Hillig, 2004
GC/FID	EtOH	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their terpenoid and cannabinoid profiles	Fischedick <i>et al.</i> , 2010
GC/FID	EtOH	Chemotaxonomy of Cannabis flowers samples and extracts	Elzinga <i>et al.</i> , 2015
GC/FID	EtOH	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their terpenoid and cannabinoid profiles	Hazekamp and Fischedick, 2012

^a¹H-NMR; proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹D DOSY; diffusion-edited ¹H NMR, ¹H-¹H COSY; proton/proton correlation spectroscopy, ¹H-¹³C HMBC; ¹H-¹³C heteronuclear multiple quantum coherence, GC/FID; gas chromatography-flame ionization detector, GC/MS; GC/mass spectrometry, LC-DAD; liquid chromatography-diode array detector, LC/ESI/MS; liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, LC/TOF/MS; liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, LC/QTOF/MS; quadrupole time-of-flight mass spectrometry, HRMS; high resolution mass spectrometry, LC/QQQ/MS; triple quadrupole LC/MS. ^bAce, acetone; CHCl₃, chloroform; DMSO, dimethyl sulfoxide; EtAc, ethyl acetate; EtOH, ethanol; MeOH, methanol.

Πίνακας 21 (συνέχεια): Εφαρμογή της μεταβολομικής στην έρευνα και ανάπτυξη. Πηγή: Aliferis & Bernard-Perron (2020).

Analytical method ^a	Extraction solvents ^b	Purpose of the study	References
GC/FID	EtOH	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their terpenoid and cannabinoid profiles	Hazekamp <i>et al.</i> , 2016
GC/FID	MeOH	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their terpenoid profile	Fischedick, 2017
GC/FID, LC-DAD	EtOH	Method validation for the detection of cannabinoids and terpenoids	Giese <i>et al.</i> , 2015
GC/FID, LC-DAD	MTBE	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their terpenoid and cannabinoid profiles	Zager <i>et al.</i> , 2019
GC/MS	CHCl ₃ , followed by evaporation of the extracts, and addition of Ace	Chemotaxonomy of Cannabis strains based on their Δ ⁹ -THC to CBD ratio	Hillig and Mahlberg, 2004
GC/MS	MeOH (80%, v/v)	Chemotaxonomy of Cannabis strains	Mudge <i>et al.</i> , 2019
LC/ESI/MS	deionized H ₂ O, followed by addition of ACN:MeOH 70:30 (v/v) (<i>formic acid</i> 0.1%, v/v), mM):ACN (70:30, v/v), removal of phospholipids, drying, and dissolution in ammonium acetate (2.0 Mm):ACN (70:30, v/v) solution	Study of pharmacokinetics of major cannabinoids in rat brains	Citti <i>et al.</i> , 2018
LC/TOF/MS-LC/QTOF/MS	EtAc (<i>formic acid</i> 0.05% v/v)	Study and optimization of the biosynthesis of natural cannabinoids or synthetic analogs by metabolic engineered yeast strains	Luo <i>et al.</i> , 2019
HRMS (Orbitrap MS)	MeOH	Chemotaxonomy of Cannabis strains and assessment of the quality of Cannabis products	Wang <i>et al.</i> , 2018
LC/QQQ/MS NMR	MeOH, followed by dilution in H ₂ O/MeOH (2/1, v/v) (0.1% <i>formic acid</i>) CHCl ₃ -d	Analyses of plant's trichomes	Happyana <i>et al.</i> , 2013

^a¹H-NMR; proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹D DOSY; diffusion-edited ¹H NMR, ¹H-¹H COSY; proton/proton correlation spectroscopy, ¹H-¹³C HMBIC; ¹H-¹³C heteronuclear multiple quantum coherence, GC/FID; gas chromatography-flame ionization detector, GC/MS; GC/mass spectrometry, LC-DAD; liquid chromatography-diode array detector, LC/ESI/MS; liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, LC/TOF/MS; liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, LC/QTOF/MS; quadrupole time-of-flight mass spectrometry, HRMS; high resolution mass spectrometry, LC/QQQ/MS; triple quadrupole LC/MS. ^bAce, acetone; CHCl₃, chloroform; DMSO, dimethyl sulfoxide; EtAc, ethyl acetate; EtOH, ethanol; MeOH, methanol.

2. Σκοπός της μελέτης

Η φυτοπροστασία στην κάνναβη αντιμετωπίζει πολλά ζητήματα αποτελεσματικότητας. Ο εδαφογενής φυτοπαθογόνος μύκητας *Rhizoctonia solani* εμφανίζει καταστρεπτική δράση σε φυτάρια κάνναβης, προκαλώντας σημαντική υποβάθμιση στην απόδοση και παραγωγή της καλλιέργειας. Τα μέτρα φυτοπροστασίας έναντι αυτού του μύκητα είναι κυρίως προληπτικά, ενώ τα κατασταλτικά κρίνονται ανεπαρκή στην αποτελεσματικότητα της αντιμετώπισης. Ως εκ τούτου είναι επιτακτική η ανάγκη να εντοπιστούν νέοι και καινοτόμοι βιοδραστικοί παράγοντες φυτοπροστασίας. Το αντικείμενο της εργασίας αφορά την αξιολόγηση παραγόντων φυτοπροστασίας έναντι του εδαφογενούς μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC σε καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης με την εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης, κατά την οποία προσδιορίζονται οι μεταβολίτες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοδραστικότητα, φυσιολογία και άμυνα ενός φυτού που αποτελεί αναδυόμενη καλλιέργεια στην Ελλάδα με πολλές εμπορικές και οικονομικές προοπτικές, αλλά και με υποσχόμενες εξελίξεις στην Έρευνα, Ανάπτυξη και Ιατρική. Συγκεκριμένα αξιολογούνται δύο σκευάσματα βιοδιεγερτών, με εκχύλισμα καφέ φυκιών θαλάσσης *Ascophyllum nodosum* και με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών αντίστοιχα, καθώς και το οργανικό προσθετικό εδάφους Biochar από σφένδαμο. Επίσης εξακριβώνονται και οι μεταβολές που επιφέρουν οι βιοδραστικοί αυτοί παράγοντες στους μεταβολίτες της κάνναβης και ιδίως των κανναβινοειδών εγνωσμένης αξίας για την εμπορικότητα του φυτού στη παγκόσμια αγορά. Επιπλέον εκτιμάται η αποτελεσματικότητα των επιλεγμένων παραγόντων στο πλαίσιο εναλλακτικών μεθόδων φυτοπροστασίας, χωρίς την εφαρμογή επιβλαβών για την ανθρώπινη υγεία και περιβαλλοντικά ρυπογόνων χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων τα οποία αφενός δεν διαθέτουν άδεια έγκρισης για εφαρμογή στην καλλιέργεια κάνναβης, αφετέρου ανακαλούνται και για ευρύτερη χρήση από τις αρμόδιες αρχές. Τέλος εξετάζεται σε επίπεδο βιοδοκιμών η κατασταλτική δράση επιλεγμένων βακτηρίων προώθησης της φυτικής ανάπτυξης αλλά και ενδοφύτων κάνναβης έναντι του *Rhizoctonia solani* AG-1-IC, ως υποψήφιοι και μελλοντικοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Βιολογικό υλικό

3.1.1 Φυτικό υλικό

Στη παρούσα διπλωματική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν σπόροι βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L) κυρίως της ποικιλίας «*Futura 75*» και δευτερευόντως των ποικιλιών «*Zenit*» και «*KC Dora*» ευγενικής προσφοράς του Καθηγητή κ. Δημητρίου Μπιλάλη σε συνεργασία με το εργαστήριο Γεωργίας του Γ.Π.Α.

Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η εξής διαδικασία: Το εδαφικό υπόστρωμα της σποράς τύρφης:περλίτη αναλογίας 3:2 που αποκτήθηκε από το εργαστήριο Ανθοκομίας του Γ.Π.Α., αποστειρώθηκε συνολικά 3 φορές σε κλίβανο θερμοκρασίας 120°C για περίπου 1h, με 1 μέρα κενού χρονικού διαστήματος μεταξύ κάθε αποστείρωσης. Οι δίσκοι σποράς απολυμάνθηκαν σε χλωρίνη περιεκτικότητας 2% σε νερό για 15 min. Κάθε γλαστράκι καλύφθηκε με 33,94 g του υποστρώματος τύρφης:περλίτη σε ξηρή κατάσταση και εν συνεχεία φυτεύτηκε ο σπόρος κάνναβης στο κέντρο (Εικόνα 67). Μετά εφαρμόστηκε πότισμα με 20 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, με ρυθμισμένο pH 5,5-6,5. Έπειτα τα γλαστράκια μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με συνθήκες θερμοκρασίας 24°C, σχετικής υγρασίας 60% και φωτοπεριόδου 18h όπου παρέμειναν εκεί για 3 βδομάδες μέχρι τη συγκομιδή των φύλλων και ανθέων τους. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι ο όγκος ποτίσματος αυξήθηκε στα 35 mL από τη δεύτερη βδομάδα μετά τη σπορά, ώστε να καλυφθούν οι αυξημένες ανάγκες των φυτών σε σχέση με την πρώτη.



Εικόνα 67: Φυτικά δείγματα *Cannabis sativa* L. σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη που αναπτύχθηκαν σε ειδικό θάλαμο για τις ανάγκες του πειράματος της παρούσας διπλωματικής. (Α) θάλαμος ανάπτυξης φυτών υπό ελεγχόμενες συνθήκες, (Β) φύτευση σπόρων βιομηχανικής κάνναβης σε γλαστράκια των 7x7x6 cm με υπόστρωμα τύρφης περλίτη 3:2, (Γ) σπορόφυτα βιομηχανικής κάνναβης ηλικίας 5 ημερών, (Δ) σπορόφυτα βιομηχανικής κάνναβης 5 ημερών εντός του θαλάμου ανάπτυξης και (Ε) κονινή λήψη των φυτών εντός του θαλάμου ανάπτυξης.

3.1.2 Σκευάσματα βιοδιεγερτών για πειράματα *in planta* και τρόπος εφαρμογής τους

Για τις ανάγκες του πειράματος αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα των εμπορικών σκευασμάτων βιοδιεγερτών **EKOprop 4G** της παρασκευάστριας εταιρείας «*Green Ravenna*» εξ Ιταλίας μη καταγεγραμμένου προεραϊκά αριθμού άδειας σύμφωνα με τα κεφάλαια 6 του Υπουργικού διατάγματος 75/2010 και Ι του Υπουργικού Διατάγματος 18534/2009 της ιταλικής νομοθεσίας περί άδειας διάθεσης βιοδιεγερτών στην αγορά και **Acadian** της εταιρείας «*Acadian Seaplants Limited*» εκ Καναδά, αριθμού άδειας διάθεσης **5715987** 04/02/2019, ευγενικής χορηγίας των ελληνικών αντιπροσώπων εταιρειών διάθεσης «*Anthesis E.Π.Ε.*» και «*Humofert S.A.*» αριθμού κυκλοφορίας **24** αντίστοιχα.

Το σκεύασμα EKOprop 4G είναι βιοδιεγέρτης ριζικού συστήματος, διατίθεται σε μορφή βρέξιμων κόκκων και περιέχει ζωντανά σπόρια συμβιωτικών βακτηρίων ριζόσφαιρας (*Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Pseudomonas* spp.), Μυκόριζας (*Glomus* spp.) και ωφέλιμων σαπροφυτικών μυκήτων εδάφους (*Trichoderma* spp.) σε αναλογίες που αναγράφονται στον **Πίνακα 22**. Λόγω της δράσης τους απελευθερώνουν τα συστατικά που

δεσμεύει το έδαφος και αποδίδουν στα φυτά πολύτιμα στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Επίσης δημιουργείται συμβιωτική σχέση επωφελεία του φυτού. Επομένως οι ωφέλιμοι αυτοί οργανισμοί με τη θετική τους συνεργεία προσδίδουν στα φυτά:

- καλύτερη απορρόφηση νερού και θρεπτικών
- αντοχή σε αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος-αβιοτικούς παράγοντες
- καλύτερη ανταπόκριση του αμυντικού συστήματος του φυτού
- Υψηλότερα επίπεδα φωτοσύνθεσης
- Ανταγωνισμός των ωφέλιμων μικροοργανισμών με παθογόνα εδάφους σε ζωτικό χώρο και θρεπτικά συστατικά, καθιστώντας το έδαφος λιγότερο φιλικό για την ανάπτυξη των παθογόνων

Το σκεύασμα *Acadian* είναι ένας φυσικός βιοδιεγέρτης σε υγρή μορφή που εφαρμόζεται δια διαφυλλικής λίπανσης, υδρολίπανσης, εμβάπτισης σπόρων ή ριζών. Προέρχεται από θαλάσσια φύκια *Ascophyllum nosodum* συλλογής από παράκτια νερά του βόρειου Ατλαντικού ωκεανού στον Καναδά. Είναι μια φυσική αποθήκη κύριων και δευτερευόντων στοιχείων και ιχνοστοιχείων σε χημική μορφή (σίδηρο, θείο, μαγνήσιο, ασβέστιο, χαλκό, ψευδάργυρο, μαγγάνιο, κοβάλτιο κ.α). Περιέχει επίσης υδατάνθρακες (μαννιτόλη, αλγινικό οξύ, λαμιναρίνη), φυσικούς παράγοντες προώθησης ανάπτυξης φυτών (κυτοκινίνες, αυξίνες, γιββερελλίνες) και αμινοξέα (γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, αργινίνη, γλυκίνη, λευκίνη, λυσίνη, βαλίνη, σερίνη, φαινυλαλανίνη, ισολευκίνη, ιστιδίνη, προλίνη, θρεονίνη, τυροσίνη, μεθειονίνη, κυστίνη). Όλο το παραπάνω ενεργειακό δυναμικό θα δώσει στα καλλιεργούμενα φυτά τη δυνατότητα να μεγιστοποιήσουν την παραγωγική τους ικανότητα ως εξής:

- βοηθώντας στη καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων από τα φυτά
- ενισχύοντας την ανάπτυξη δυνατού ριζικού συστήματος και κατ' επέκταση ολόκληρου του φυτού
- ευνοώντας την ανθοφορία και αυξάνοντας τη καρποφορία
- αυξάνοντας την πρωτεϊνική περιεκτικότητα των καρπών καθώς και την περιεκτικότητα σε ιχνοστοιχεία
- βελτιώνοντας την ποιότητα και τη γεύση των καρπών και λαχανικών
- διεγείροντας και προωθώντας το φύτρωμα των σπόρων
- βελτιώνοντας τις φυσικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους, αυξάνοντας τη συνολική ιχνοστοιχειακή διαθεσιμότητα
- αυξάνοντας την αντοχή των φυτών δυσμενείς συνθήκες αβιοτικών παραγόντων και καταπόνησης

Η σύστασή του στα κύρια μακροθρεπτικά συστατικά αναγράφεται στον **Πίνακα 22** και η συσκευασία του στην **Εικόνα 68**.

Πίνακας 22: Τα εμπορικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν, η σύστασή τους και οι αντιπρόσωποι εταιρείες διάθεσης στην Ελλάδα

Εμπορική ονομασία	Σύσταση	Εταιρεία
EKOprop 4G	Μυκόριζα (<i>Glomus</i> spp.) 1% <i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp. $1,6 \times 10^3$ CFU/g <i>Trichoderma</i> spp. 5×10^3 CFU/g	Anthesis E.Π.Ε.
Acadian	Εκχύλισμα θαλάσσιων φυκιών του είδους <i>Ascophyllum nosodum</i> (0,1 % υδατοδιαλυτό άζωτο, 0,1% φώσφορος P ₂ O ₅ , 5% κάλιο K ₂ O)	Humofert S.A.



Εικόνα 68: Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν, «Acadian» και «EKOprop 4G»

Η δοσολογία εφαρμογής για τους βιοδιεγέρτες εκτιμήθηκε με βάση την ένδειξη στην επικέτα τους (Πίνακας 23) και έγινε η αντίστοιχη αναγωγή για υδρολίπανση. Συγκεκριμένα η δοσολογία υπολογίστηκε για να καλύψει 16 γλαστράκια (ανά βιοδιεγέρτη) συνολικού όγκου εδαφικού υποστρώματος 3.008 mL (188 mL ανά γλαστράκι) ώστε να πραγματοποιηθεί υδρολίπανση στους απαιτούμενους όγκους των 20-35 mL. Μετά από υπολογισμούς προκύπτει ότι για το σκέυασμα EKOprop αντιστοιχούν **115,20 mg** προϊόντος σε 560 ml συνολικό όγκο υδατικού διαλύματος και για το Acadian αντιστοιχούν **594,3 µL** προϊόντος σε 560 ml συνολικό όγκο υδατικού διαλύματος. Για την παρασκευή του υδατικού διαλύματος του EKOprop ακολουθήθηκαν οι οδηγίες επικέτας στις οποίες αναγράφονταν για 1-2 kg/ha

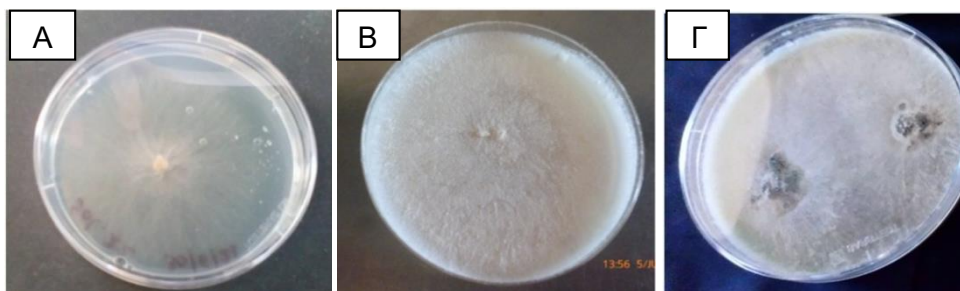
εδάφους (ή 0,1-0,2 g/m² εδάφους) με 2-3 εφαρμογές σε όλο το διάστημα της καλλιέργειας 4 εβδομάδων. Για την παρασκευή του Acadian οι οδηγίες ανέφεραν για 0,5 έως 1 L/ στρέμμα εδάφους με εφαρμογή κάθε 10-15 μέρες μέχρι τη συγκομιδή.

Πίνακας 23: Οι βιοδιεγέρτες του πειράματος, οι δραστικές τους ουσίες, οι συνιστώμενες δόσεις τις ετικέτας τους, η αναγώμενη δόση στο πείραμα, και ο όγκος ποτίσματος που εφαρμόστηκε σύμφωνα με τις ανάγκες των φυτών

Βιοδιεγέρτης	Δραστική ουσία	Δοσολογία Ετικέτας/πειράματος	Όγκος ποτίσματος
EKOprop 4G	Μυκόριζα (<i>Glomus spp.</i>) 1% <i>Bacillus spp.</i> , <i>Streptomyces spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> 1,6 x 10 ³ CFU/g <i>Trichoderma spp.</i> 5 x 10 ³ CFU/g	1-2 kg/ha (0,1-0,2 g/m ²) εδάφους 115,20 mg στα 3.008 mL συνολικού εδάφους	20 - 35 mL
Acadian	Εκχύλισμα θαλάσσιων φυκιών του είδους <i>Ascophyllum nosodum</i> (0,1 % υδατοδιαλυτό άζωτο, 0,1% φώσφορος P ₂ O ₅ , 5% κάλιο K ₂ O)	0,5-1 L/στρέμμα εδάφους 594,3 μL στα 3.008 mL συνολικού εδάφους	20 - 35 mL

3.1.3 Στέλεχος *Rhizoctonia solani*

Στα πειράματα *in planta* της παρούσας διπλωματικής που περιγράφονται στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BV-7(ATCC 76123)b, με τον εργαστηριακό κωδικό «AG1 22» (Εικόνα 69) που ανήκει στην ομάδα αναστόμωσης AG1-IC, ιαπωνικής προέλευσης αναπτυσσόμενο σε ζαχαρότευτλα. Το συγκεκριμένο στέλεχος προήλθε από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. και είχε παραχωρηθεί από το πανεπιστήμιο McGill του Καναδά, από την Καθηγήτρια Suha Jahabi.



Εικόνα 69: Καλλιέργεια του στελέχους AG1 22 του παθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα PDA σε διάστημα (Α) 2, (Β) 5 και (Γ) 7 ημερών αντίστοιχα.

3.1.4 Στελέχη βακτηρίων και ενδοφύτων κάνναβης

Στα πειράματα *in vitro* της **Ενότητας 4.5** χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ωφέλιμων ριζοσφαιρικών βακτηρίων τύπου συνθετικής κοινότητας (*Symposium*) προερχόμενα από compost και απομονώθηκαν από τη ρίζα τοματιάς, με σκοπό να αποφέρουν οφέλη στη καλλιέργεια εφαρμογής για αειφορική αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και συνεπώς να βελτιώσουν την ανάπτυξη των φυτών. Τα στελέχη ήταν μια ευγενική προσφορά του τμήματος Γεωργικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων, του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου της Λεμεσού στη Κύπρο εκ μέρους του Επίκουρου Καθηγητή Ιακώβου Παντελίδη και αναγράφονται στον **Πίνακα 24**.

Επιπλέον για τον ίδιο σκοπό πειράματος βιοδοκιμών χρησιμοποιήθηκαν και τα απομονωμένα και χαρακτηρισμένα στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης S₂ (PLS 176), L₅ (PLS 182) και fL₁ (PLS 168), που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μοριακά στο γένος *Bacillus* από την ομάδα «*Pesticide Metabolomics Group*» (PMG) του εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α. προερχόμενα από προηγούμενες μελέτες.

Πίνακας 24: Αναλυτική ταξινόμηση των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα βιοδοκιμών κατά φύλλο, κλάση, τάξη, οικογένεια, γένος, είδος και κατηγορία συνθετικής μικροβιακής κοινότητας (Syncom) που προσφέρει τα οφέλη στην καλλιέργεια εφαρμογής μέσω εμβολιασμού της στο έδαφος

PHYLLUM	CLASS	ORDER	FAMILY	GENUS	SPECIES	SynCom
<i>Proteobacteria</i>	<i>GammaProteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. putida</i> 3Ba4	Rhizosphere
<i>Proteobacteria</i>	<i>GammaProteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. anguilliseptica</i> 1Ba3	Rhizosphere
<i>Proteobacteria</i>	<i>GammaProteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i> 2Ba30	Rhizosphere
<i>Actinobacteria</i>	N/A	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>M. foliorum</i> 2Ba37	Rhizosphere
<i>Proteobacteria</i>	<i>GammaProteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i> 2Ba27	Rhizosphere
<i>Proteobacteria</i>	<i>AlphaProteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. sp.</i> 2Ba42	Rhizosphere
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. chandigarhensis</i> 3Ba3	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. endophyticus</i> 1Ba2	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. endophyticus</i> 3Ba21	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. humi</i> 1Ba28	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. humi</i> 1Ba43	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. humi</i> 3Ba30	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 1Ba18	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba16	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba17	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba20	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba28	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba44	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba45	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba46	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. licheniformis</i> 3Ba9	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> 1Ba20	Bacilli

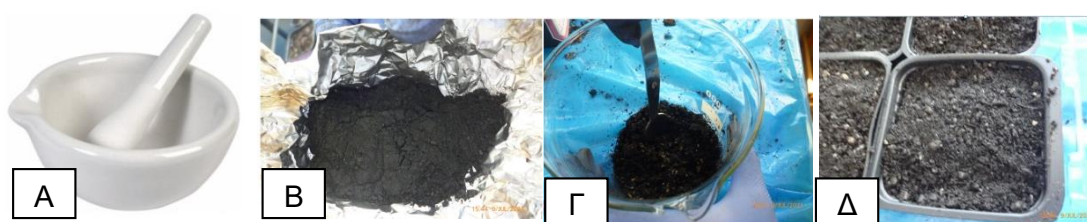
Πίνακας 24: (συνέχεια): Αναλυτική ταξινόμηση των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα βιοδοκιμών κατά φύλλο, κλάση, τάξη, οικογένεια, γένος, είδος και κατηγορία συνθετικής μικροβιακής κοινότητας (Syncom) που προσφέρει τα οφέλη στην καλλιέργεια εφαρμογής μέσω εμβολιασμού της στο έδαφος

PHYLLUM	CLASS	ORDER	FAMILY	GENUS	SPECIES	SynCom
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> 1Ba19	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> 2B19s	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i> CCS	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. circulans</i> 1Ba46	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. firmus</i> 2Ba55	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. foraminis</i> 1Ba49	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. niacini</i> 1Ba10	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. sp.</i> 2Ba43	Bacilli
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. sp.</i> 3Ba35	Bacilli

3.2 Εκτίμηση βιοδραστικότητας του biochar σε πειράματα in planta

Το biochar της παρούσας διατριβής προήλθε από το πανεπιστήμιο McGill του Καναδά και αποτέλεσε προϊόν πυρόλυσης από φλοιό σφενδάμου σε θερμοκρασία 700°C για 4 ώρες μέχρι σχηματισμού του τελικού προϊόντος. Το biochar αλέστηκε και θρυμματίστηκε σε σωματίδια μικρότερα του 1mm.

Για τις ανάγκες του πειράματος εφαρμόστηκε biochar 5% w/v σε σχέση με τον όγκο εδαφικού υποστρώματος στο γλαστράκι. Επομένως για 16 γλαστράκια με συνολικό όγκο 3.008 mL ζυγίστηκαν 150,40 g biochar σε ζυγαριά ακριβείας και θρυμματίστηκαν σε γουδί με γουδοχέρι εντός απαγωγού μέχρι να μετατραπεί σε σκόνη. Έπειτα ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο για 30 min σε θερμοκρασία 121°C. Το biochar ενσωματώθηκε στο εδαφικό υπόστρωμα με ανάμιξη, έτσι ώστε κάθε γλαστράκι να περιέχει 24,54 gr εδαφικού υποστρώματος και 9,40 gr biochar (Εικόνα 70). Τέλος όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα, φυτεύτηκε ο σπόρος κάνναβης και όπως θα αναφερθεί παρακάτω τα μισά φυτά θα μολυνθούν με το *Rhizoctonia solani* AG1 22.



Εικόνα 70: Biochar από το πανεπιστήμιο McGill. (Α) Θρυμματισμός σε γουδί, (Β) συλλογή και (Δ) ενσωμάτωση με το εδαφικό υπόστρωμα στα γλαστράκια, (Γ) με τη βοήθεια ποτηριού ζέσεως.

3.3 Καλλιέργεια του στελέχους *Rhizoctonia solani* για μακροχρόνια διατήρηση και παραγωγή μολυσματικών υφών

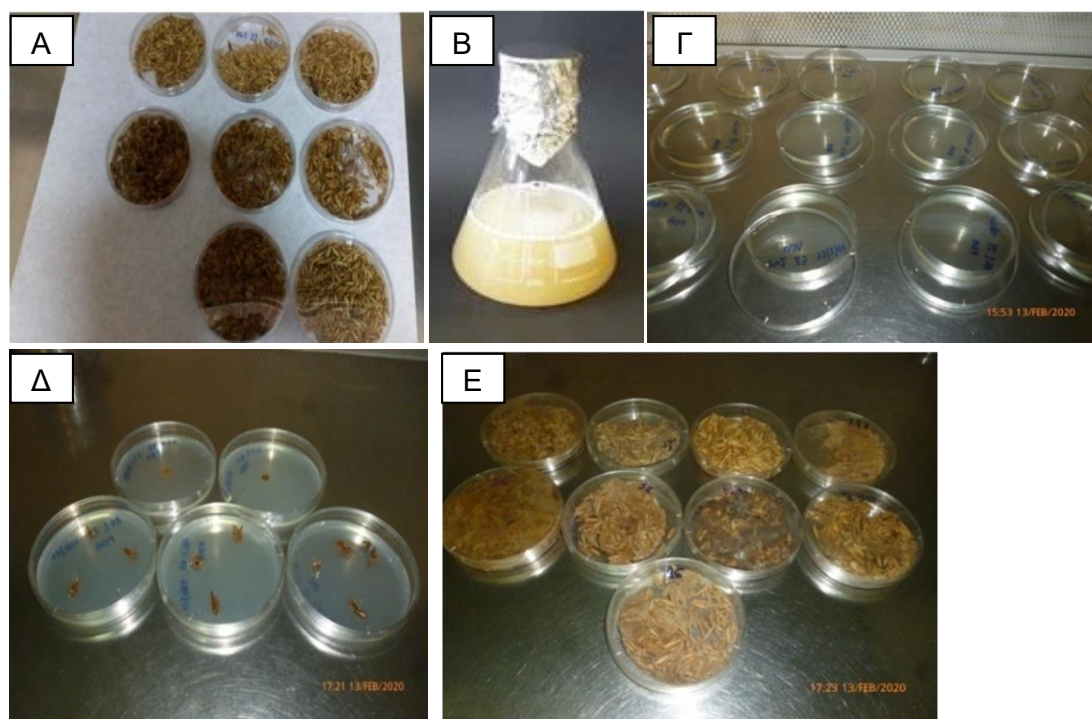
Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια του *R. solani* στα τρυβλία ήταν από Potato Dextrose Agar (PDA), αποτελούμενο από 39 gr σκόνης PDA (*Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France*), στα οποία προστέθηκαν και 5 gr σκόνης άγαρ (*Acumedia/Neogen, Leshar Place, Lansing, Michigan*) σε συνολικό διάλυμα 1 L απιονισμένου νερού. Το μίγμα αυτό αποστειρώθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 121°C για 20 min (Εικόνα 71B).

Για τη μακροχρόνια διατήρηση του μύκητα χρησιμοποιήθηκαν σπόροι βρώμης για υπόστρωμα ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως σπόροι βρώμης διαβρεχόμενοι από απεσταγμένο νερό, ώστε οι υδατώδεις συνθήκες να ενισχύσουν τη μόλυνση και ο μύκητας

να εισχωρήσει ταχύτερα στους σπόρους. Ακολούθησε αποστείρωση εις διπλούν για 30 min σε θερμοκρασία 121°C. Η στρώση των σπόρων στα τρυβλία έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία Petri των 9 cm (Εικόνα 71Γ). Έπειτα έγινε η μόλυνση των αποστειρωμένων σπόρων με μυκηλιακούς δίσκους (*plags*) των 5 mm. Η επώαση των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε σε ειδικό θάλαμο σε θερμοκρασία 24°C υπό συνθήκες σκότους για δύο εβδομάδες και εν τέλει τοποθετήθηκαν στο ψυγείο στους 4°C για μακροχρόνια συντήρηση.

Από τα τρυβλία που περιείχαν τους επιμολυσμένους σπόρους βρώμης (Εικόνα 71Δ), με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας αποκτήθηκαν 3-4 σπόροι και εμβολιάστηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα 20 mL PDA. Όπως και πριν ακολούθησε αντίστοιχα η επώαση των καλλιιεργειών στο θάλαμο στους 24°C υπό συνθήκες σκότους για 3 ημέρες προς ανάπτυξη του μύκητα. Μετά το τριήμερο τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο στους 4°C για βραχυχρόνια συντήρησή τους (Εικόνα 71Γ, Ε)

Τέλος η παραγωγή φρέσκου μολύσματος μύκητα πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με 20 mL θρεπτικό υλικό PDA μέσω μυκηλιακών δίσκων 5 mm προγενέστερης καλλιιεργείας, πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι καλλιιεργείες επωάστηκαν πάλι στους 24°C για 3 μέρες και πλέον ήταν διαθέσιμοι είτε για παρασκευή νέων καλλιιεργειών, μολύνσεων φυτών ή βιοδοκιμών.



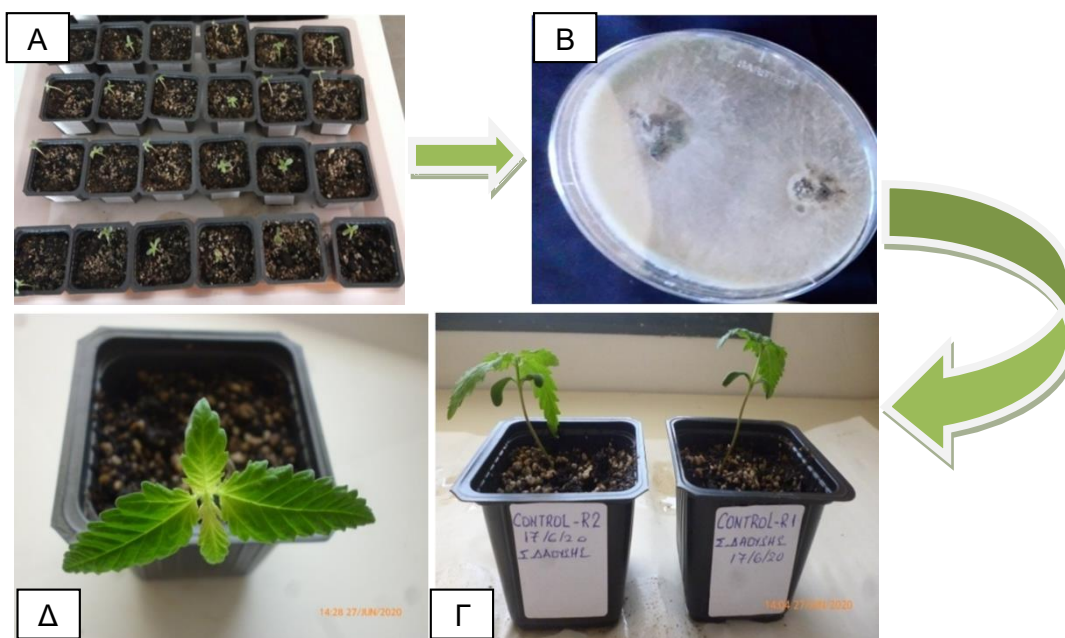
Εικόνα 71: (Α) Στρώσιμο σπόρων βρώμης σε τρυβλίο Petri των 9 cm υπό ασηπτικές συνθήκες *Laminar*, (Β) παρασκευή θρεπτικού υλικού PDA σε κωνική φυάλη, (Γ) προσθήκη αποστειρωμένου PDA στα τρυβλία εντός *Laminar*, (Δ) τρυβλία με προγενέστερες καλλιιεργείες μύκητα *Rhizoctonia solani* αναπτυσσόμενες σε μολυσμένα σπόρια βρώμης, (Ε) τρυβλία με PDA και σπόρους βρώμης μολυσμένους με το στέλεχος *R. solani* AG1 22 για ανανέωση καλλιιεργειών.

3.4 Μόλυνση φυτών κάνναβης στο εδαφικό υπόστρωμα τύρφη:περλίτη

Για να εξεταστεί η επίδραση του στελέχους AG1-22 *Rhizoctonia solani* στη κάνναβη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε φυτά που αναπτύσσονταν σε εδαφικό υπόστρωμα τύρφη:περλίτη αναλογίας 3:2. Συγκεκριμένα κάθε γλαστράκι καλύφθηκε από 33,94 g ξηρής μάζας του εδαφικού υποστρώματος και στη μέση φυτεύτηκε ένας σπόρος κάνναβης.

Μετά από τέσσερις ημέρες δημιουργήθηκαν φρέσκιες και καθαρές καλλιέργειες του μύκητα σε θρεπτικό υλικό PDA σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.4, έτσι ώστε ο εμβολιασμός του εδάφους με τον μύκητα να εφαρμοστεί την δεύτερη βδομάδα από την σπορά των σπόρων και συγκεκριμένα στο στάδιο των δύο φύλλων.

Η μόλυνση με το στέλεχος AG1-22 (Εικόνα 72) έγινε με τη προσθήκη δύο μυκηλιακών δίσκων από φρέσκιες καθαρές καλλιέργειες σε βάθος 2 cm, ανηδιαμετρικά και σε απόσταση 1 cm από το στέλεχος του φυτού. Για κάθε εφαρμογή μολύνθηκαν 7 φυτά και σύνολο 35 φυτά. Εν συνεχεία εφαρμόστηκε πότισμα σε κάθε γλαστράκι με 35 mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό pH 5,5-6,5 σύμφωνα με τον εκτιμώμενο όγκο νερού της δεύτερης βδομάδας ανάπτυξης των φυτών. Τέλος τα φυτά επέστρεψαν στο θάλαμο ανάπτυξης με συνθήκες 24°C και 60% σχετικής υγρασίας, μέχρι να παρατηρηθούν τα συμπτώματα προσβολής από τον μύκητα.



Εικόνα 72: (Α) Μόλυνση των φυτών κάνναβης που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη με (Β) μυκηλιακούς δίσκους από το στέλεχος *Rhizoctonia solani* AG1-22 φρέσκιας καλλιέργειας 4 ημερών στο (Γ), (Δ) στάδιο ανάπτυξης των 2 πραγματικών φύλλων

3.5 Βιοδοκιμές για την αξιολόγηση βιοδραστικότητας ωφέλιμων βακτηρίων έναντι του *Rhizoctonia solani* AG1-22

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν φρέσκιες καλλιέργειες των ωφέλιμων ριζοσφαιρικών βακτηρίων (Εικόνα 73Γ) μετά τη παραλαβή από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο της Λεμεσού σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Soy Agar (TSA) σύμφωνα με τη εξής διαδικασία:

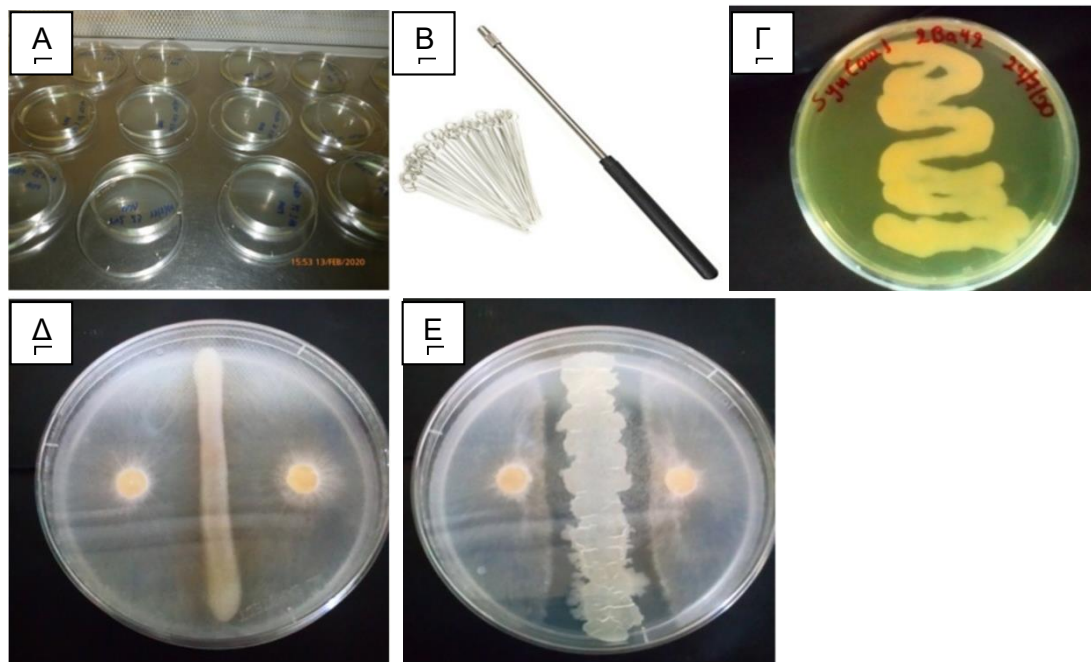
Ζυγίστηκαν 30 gr από Tryptic Soy Broth (MP Corporation, U.S.A.) μαζί 15 gr σκόνης άγαρ (Acumedia/Neogen, Leshar Place, Lansing, Michigan) σε συνολικό διάλυμα 1 L απιονισμένου νερού. Το μίγμα αυτό αποστειρώθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας 121°C για 20 min.

Στη συνέχεια έγινε η προσθήκη του TSA στα τρυβλία Petri των 9 cm και με τη βοήθεια βακτηριακού κρίκου προστέθηκαν τα βακτήρια με τη μέθοδο streaking πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες (Εικόνα 73Α, Β) και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 30°C υπό συνθήκες σκότους. Επειδή ο χρόνος επώασης μεταξύ των βακτηρίων διέφερε, διενεργούταν καθημερινός έλεγχος των τρυβλίων.

Το πείραμα των βιοδοκιμών διενεργήθηκε στα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PDA, όπου με τη χρήση βακτηριακού κρίκου τοποθετήθηκε το κάθε βακτηριακό στέλεχος σε μια κάθετη ευθεία γραμμή διερχόμενη από το κέντρο του τρυβλίου. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν συνολικά 2 μυκηλιακοί δίσκοι του στελέχους *R. solani* AG1-22 υπό μια κάθετη προς τη γραμμή στρώσης των βακτηρίων νοητή γραμμή, διερχόμενη από το κέντρο του τρυβλίου σε απόσταση του ήμισυ του κέντρου και αντιδιαμετρικά (Εικόνα 73Δ). Με τον ίδιο τρόπο έγινε η και η τοποθέτηση των ενδοφύτων βακτηρίων κάνναβης, καθώς και η αντίστοιχη προσθήκη των μυκηλιακών δίσκων.

Έπειτα τα τρυβλία τοποθετήθηκαν πάλι σε επωαστικό θάλαμο στους 24°C υπό συνθήκες σκότους και καθημερινώς παρατηρούταν η ανάπτυξη του μύκητα προς διαπίστωση αν το μυκήλιό του υπερκάλυψε όλο το τρυβλίο μαζί με τη γραμμή ανάπτυξης των βακτηρίων (Εικόνα 73Δ) ή αν το μυκήλιο περιορίστηκε σε ανάπτυξη μακριά της γραμμής των βακτηρίων, αφήνοντάς την άθικτη (Εικόνα 73Ε).

Τέλος η εκτίμηση της ζώνης παρεμπόδισης πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό «Image J» (Schneider *et al.*, 2012).



Εικόνα 73: (Α) Προσθήκη αποστειρωμένου TSA στα τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες, (Β) Βακτηριακός κρίκος για τη μεταφορά βακτηρίων σε τρυβλία με τη μέθοδο *streaking*, (Γ) καθαρή καλλιέργεια ριζοσφαιρικού βακτηρίου σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα TSA, (Δ) συγκαλλιέργεια ωφέλιμου ριζοσφαιρικού βακτηρίου (ευθεία γραμμή) με το στέλεχος *R. solani* AG1-22 (μυκηλιακοί δίσκοι) εντός τρυβλίου κατά την οποία δεν παρατηρείται παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα, καθώς όλο το τρυβλίο μαζί με τη βακτηριακή καλλιέργεια επικαλύφθηκαν με το μυκήλιο του AG1-22, (Ε) συγκαλλιέργεια ενδόφυτου βακτηρίου κάνναβης (ευθεία γραμμή) με το στέλεχος *R. solani* AG1-22 (μυκηλιακοί δίσκοι) εντός τρυβλίου, κατά την οποία παρατηρείται παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μύκητα λόγω του βακτηρίου, καθώς η ανάπτυξη του μυκηλίου AG1-22 περιορίζεται και δεν επικαλύπτει και τη βακτηριακή καλλιέργεια.

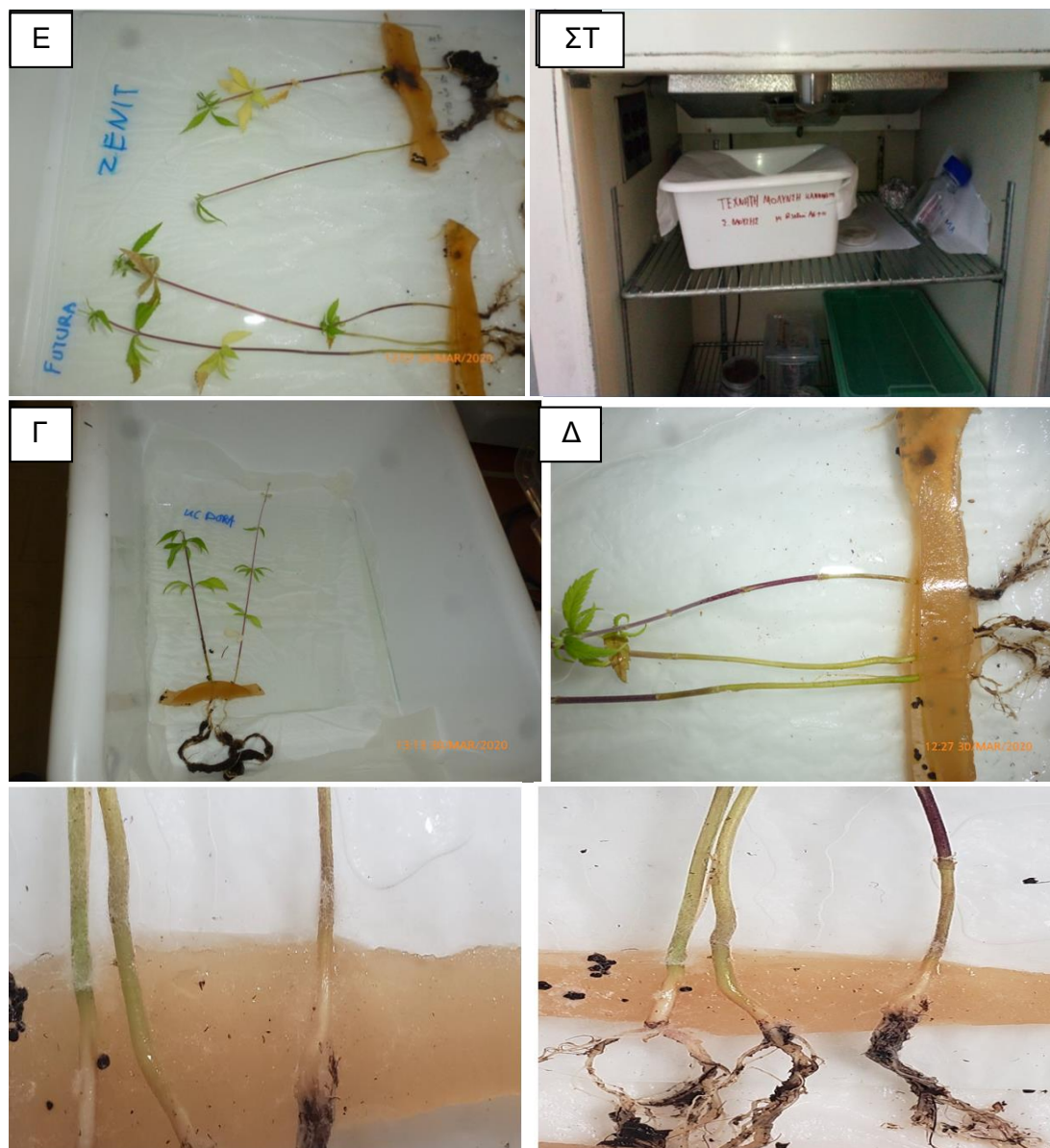
3.6 Τεχνητή μόλυνση φυτών κάνναβης με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC

Πριν την εφαρμογή του βασικού πειράματος *in planta* με φυσικό εμβολιασμό του *R. solani* AG-1-IC στο εδαφικό υπόστρωμα, εφαρμόστηκε μια μέθοδος τεχνητής μόλυνσης των φυτών κάνναβης υπό εργαστηριακές συνθήκες, ώστε πέραν της επιστημονικής βιβλιογραφίας να επιβεβαιωθεί ότι η ομάδα AG-1-IC πράγματι μολύνει φυτάρια κάνναβης, επιφέροντας κάποια από τα καταγεγραμμένα συμπτώματα προσβολής.

Αρχικώς καλλιεργήθηκαν φυτά βιομηχανικής κάνναβης από σπόρους ποικιλιών «FUTURA 75», «ZENIT», «KC DORA» σε εδαφικό υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 3:2 εντός θαλάμου ανάπτυξης ακριβώς με τις ίδιες συνθήκες που περιγράφονται στην ενότητα 3.1.1. Τα φυτά συγκομίστηκαν μετά από 4 εβδομάδες και καθαρίστηκε με αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό το ριζικό τους σύστημα από το προσκολλημένο εδαφικό υπόστρωμα.

Εν συνεχεία τα φυτά τοποθετήθηκαν εντός πλαστικής λεκάνης πάνω σε γυάλινες πλάκες και επικαλύφθηκαν στο λαιμό τους από λωρίδες φρέσκιας καλλιέργειας μύκητα *R. solani* AG-1-IC τριών ημερών που αναπτύχθηκε σε τρυβλίο Petri των 9 cm εντός θρεπτικού υλικού PDA. Η επικάλυψη των λαιμών πραγματοποιήθηκε κατά τύπο «σάντουιτς» με λωρίδα καλλιέργειας κάτωθι και άνωθεν του λαιμού (Εικόνα 74). Μεταξύ των γυάλινων πλακών και φυτού τοποθετήθηκε χαρτί κουζίνας με σκοπό να απορροφήσει το αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό που προστέθηκε εσωτερικά της λεκάνης μετά την τοποθέτηση των λωρίδων *R. solani* AG-1-IC, ώστε να διαβραχεί το χαρτί και να διατηρείται μια σχετική υγρασία που θα ευνοήσει την τεχνητή μόλυνση. Το ριζικό σύστημα των φυτών δεν ήταν τοποθετημένο πάνω στις γυάλινες πλάκες αλλά προεξείχε πάνω στην επιφάνεια του χαρτιού κουζίνας. Έπειτα οι λεκάνες σκεπάστηκαν κατά τα 2/3 με χαρτί κουζίνας και μεταφέρθηκαν σε ειδικό θάλαμο για επώαση σε θερμοκρασία 24°C υπό συνθήκες σκότους για τρεις ημέρες όπως ακριβώς στην επώαση των καλλιεργειών μύκητα (ενότητα 3.4).

Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, μετακινήθηκε η άνω λωρίδα καλλιέργειας *R. solani* AG-1-IC ώστε να εξεταστούν μακροσκοπικά τυχόν συμπτώματα προσβολής πάνω στο λαιμό των φυτών και πάρθηκαν αποδεικτικές φωτογραφίες.



Εικόνα 74: Διαδικασία πειράματος τεχνητής μόλυνσης φυτών κάναβης ποικιλιών «FUTURA 75», «ZENIT» και «KC DORA» εντός πλαστικής λεκάνης. (Α), (Β), (Γ), επικάλυψη των φυτών τύπου σάντουιτς στο ύψος του λαιμού με λωρίδες καλλιέργειας *Rhizoctonia solani* AG-1-IC που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PDA. (Δ) Τοποθέτηση των φυτών σε επωαστικό θάλαμο για 3 ημέρες. (Ε), (ΣΤ) παρατήρηση τυχόν συμπτωμάτων μόλυνσης από τον *Rhizoctonia solani* AG-1-IC μετά από την απομάκρυνση της άνω λωρίδας μετά το πέρας 3 ημερών.

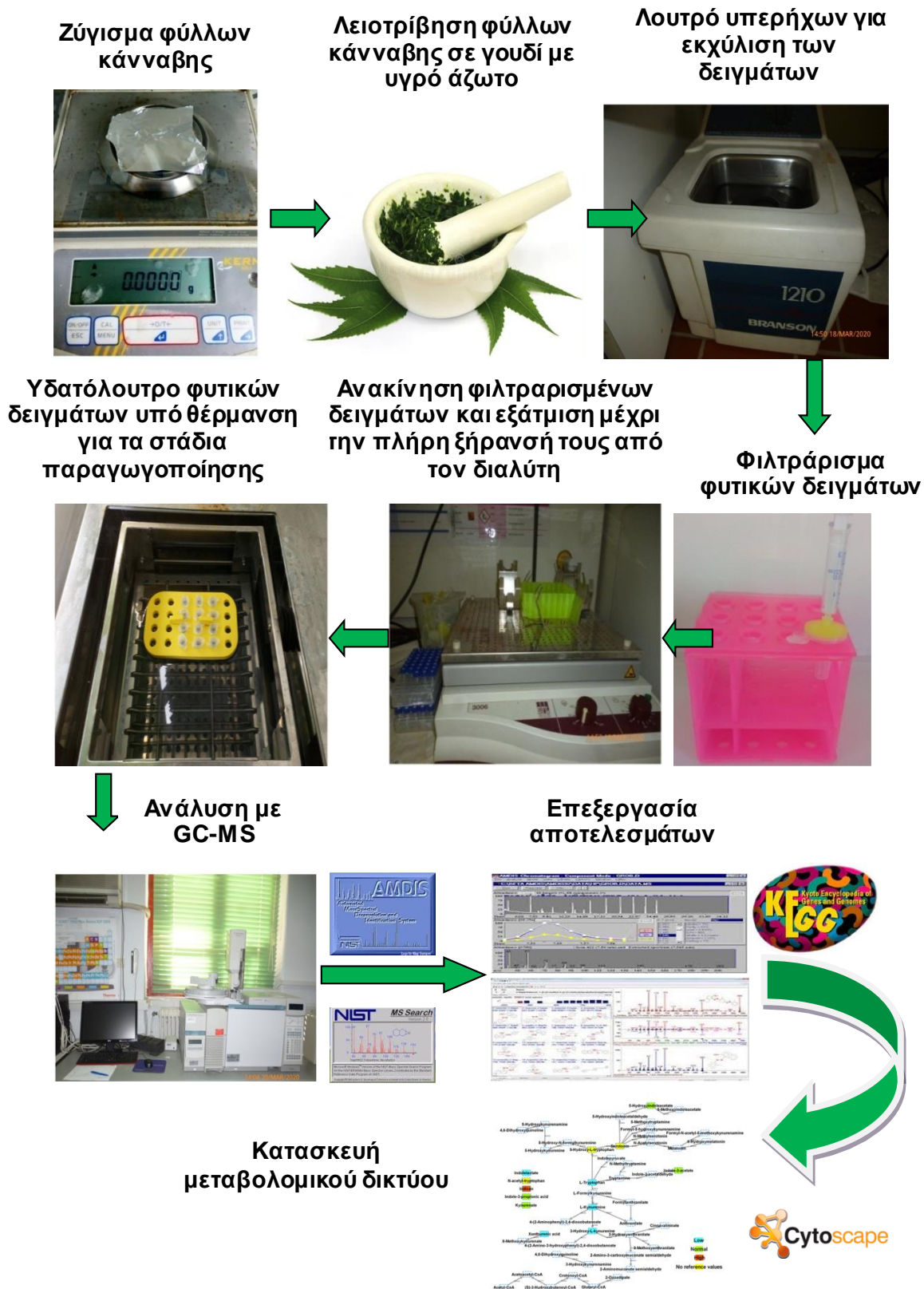
3.7 Μεταβολομική ανάλυση μέσω GC/EI/MS και εφαρμογής πρωτοκόλλων

Οι διαδικασίες για τη μεταβολομική ανάλυση, ξεκίνησαν μετά τη συγκομιδή 3 πραγματικών φύλλων των φυτών περίπου ηλικίας 3 εβδομάδων ανάπτυξης μετά τη σπορά, διαθέτοντας 6 πραγματικά φύλλα και συγκεκριμένα μόλις παρατηρήθηκαν τα συμπτώματα μόλυνσης των φυτών από το *R. solani* AG1-22 στα δείγματα του μάρτυρα (*control*). Για την προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση κάθε χρειάστηκαν 40 mg φυτικού ιστού για κάθε δείγμα, όπου αντιστοιχεί σε περίπου 3 φύλλα, αναλόγως και του μεγέθους ανάπτυξης του φυτού που επηρρεάστηκε και από κάποια υλικά εφαρμογής (*βιοδιεγέρτες, biochar*). Κατά τη προετοιμασία των δειγμάτων έγιναν τα εξής:

Το φυτικό δείγμα λειοτριβήθηκε σε γουδί με προσθήκη υγρού αζώτου μέχρι τη μετατροπή του σε ομοιόμορφη σκόνη και να διακοπεί η τρεχούμενη διαδικασία μεταβολισμού του προς αποφυγή της αποδόμησης των δευτερογενών μεταβολιτών του. Στη συνέχεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο εκχύλισης προστέθηκαν 600 μL διαλύματος μεθανόλης:οξικού μεθυλεστέρα 1:1 και το μίγμα μεταφέρθηκε με ενδεδειγμένη πιπέτα σε φουαλίδιο Eppendorf των 1,5 mL. Στη συνέχεια ακολούθησε η εκχύλιση του δείγματος σε λουτρό υπερήχων (*Branson 1210, Danbury, U.S.A.*) για 20 min. Μετά τα δείγματα αναδεύτηκαν για 1 h στις 200 rpm σε οριζόντιο αναδευτήρα (*GLF 3006 Gessellschaft fur Labortechnik, Burtwedel, Germany*) για 20 min. Έπειτα, το μίγμα φιλτραρίστηκε μέσω φίλτρων PVDF (*Chromafill O-20/25, Macherry-Nagel GmbH & Co. KG, Durren, Germany*) μεγέθους πόρων 0,20 μm και διαμέτρου 25 mm. Μετά το πέρας του φιλτραρίσματος τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε νέο φουαλίδιο Eppendorf των 1,5 mL και προστέθηκαν άμεσα 20 μL διαλύματος ριβιτόλης (0,2 mg/mL σε μεθανόλη). Το πρώτο μέρος του πρωτοκόλλου μεταβολομικής ολοκληρώθηκε με την εξάτμιση των δειγμάτων μέχρι πλήρους ξηρότητας από διαλύτη.

Κατά το δεύτερο μέρος της μεταβολομικής ανάλυσης ακολούθησε η διαδικασία της παραγωγοποίησης σε δύο στάδια με σκοπό τη τροποποίηση της πτητικότητά τους, καθιστώντας έτσι τους μεταβολίτες των δειγμάτων πιο σταθερούς και ανιχνεύσιμους από το αναλυτικό μηχάνημα GC/MS. Κατά το πρώτο στάδιο προστέθηκαν στα δείγματα 80 μL MeOX (*methoxylamine hydrochloride σε πυριδίνη*) και μετά τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 30°C για 2 h (Mojak *et al.*, 2020). Στο δεύτερο στάδιο προστέθηκαν και 80 μL MSTFA N-methyl-N(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide και ακολούθησε εκ νέου υδατόλουτρο στους 37°C για 90 min. Τέλος τα δείγματα μεταγγίστηκαν μέσω πιπέτας σε μικροϋποδοχείς (*inserters*) εντός φουαλιδίων αυτόματου δειγματολείπτη και τοποθετήθηκαν στις θέσεις υποδοχών του αέριου χρωματογράφου (GC) ενσωματωμένου με ανιχνευτή μάζας με τυχαία σειρά δειγμάτων προς αποτελεσματικότερη εμφάνιση κορυφών και συνεπώς ανίχνευση των μεταβολιτών, σύμφωνα με τις οδηγίες καλής πρακτικής για

επιτυχημένη ανάλυση από το μηχάνημα. Η συνολική πειραματική διαδικασία μεταβολομικής ανάλυσης παρατίθεται στην παρακάτω **Εικόνα 75**.



Εικόνα 75: Στάδια μεταβολομικής ανάλυσης για την επίδραση των παραγόντων φυτοπροστασίας στο μεταβολισμό του *Cannabis sativa* L.

3.7.1 Ανάλυση των παραμέτρων

Για την ανάλυση των μεταβολικών προφίλ φυτικών ιστών της *Cannabis sativa* L. στις διάφορες εφαρμογές παραγόντων φυτοπροστασίας, χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) με αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683, σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας 5973 inert mass selective detector (MSD) (Εικόνα 76). Η στήλη του οργάνου ήταν HP-MSD (μήκους 30 m, διαμέτρου 0,25 mm, πάχος υμενίου 0,25 μ m, Agilent Technologies Inc.) Η αναλογία έγχυσης ήταν 5:1, θερμοκρασίας 230°C με ήλιον ως φέρον αέριο, ρυθμού ροής 1 ml min⁻¹. Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν σταθερή στους 70°C για 5 min, ακολουθούμενη από αύξηση με ρυθμό 5°C min⁻¹ έως τους 295°C, όπου διατηρούνταν σταθερή για 2 min. Ο τρόπος λειτουργίας του θετικού ιονισμού ηλεκτρονίων ήταν στα 70 eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή των μαζών 50-750 Da με ρυθμό 2 σαρώσεων/sec με αρχική καθυστέρηση καταγραφής σημάτων 10 min. Η θερμοκρασία για τη πηγή MS ήταν 230°C και για το τετράπολο 150°C.



Εικόνα 76: Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS (αριστερά) με αυτόματο δειγματολήπτη 7683 (δεξιά), σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας 5973 inert (GC/EI/MS).

Για τον προαπαιτούμενο ποιοτικό έλεγχο της ανάλυσης (*quality control*), εισήχθησαν τυφλά δείγματα (*blanks*) για την παρασκευή των οποίων εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο παραγωγοποίησης και ανάλυσης με τα φυτικά δείγματα, έτσι ώστε να ανιχνευθεί πιθανή ρύπανση από την διαχείριση, τη προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο.

3.7.2 Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών από την επίδραση των παραγόντων φυτοπροστασίας στην *Cannabis sativa* L.

Τα αποκτηθέντα χρωματογραφήματα υφίσταντο επεξεργασία μεταβολομικής ανάλυσης με τη χρήση του λογισμικού «MS DIAL» (Tsugawa et al., 2015). Το συγκεκριμένο λογισμικό εξυπηρετεί στην αυτοματοποίηση της προεπεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως ευθυγραμμίσεις, διόρθωση γραμμών βάσης και συμπλήρωμα των κενών δεδομένων. Για την μεταβολομική ανάλυση της παρούσας εργασίας εφαρμόστηκαν οι συνιστώμενες ρυθμίσεις για την ανάλυση δεδομένων GC/EI/MS.

Σύμφωνα με την ανάλυση του MS DIAL η μήτρα που προέκυψε, επισυνάφθηκε στο MS Excel® για περαιτέρω επεξεργασία. Πιο αναλυτικά, βάσει της ανάλυσης των χρωματογραφημάτων με το λογισμικό AMDIS, οι κορυφές που αντιστοιχούσαν σε χημικές ενώσεις μη σχετικές με τα αναλυόμενα φυτικά δείγματα και οι κορυφές με δεδομένα μικρότερου του 50% των επαναλήψεων κάθε επέμβασης με τους παράγοντες φυτοπροστασίας, αφαιρέθηκαν από τη περαιτέρω ανάλυση έτσι ώστε αυτή να θεωρηθεί πιο αξιόπιστη και ακριβής για τις «έγκυρες» κορυφές που πληρούσαν τα κριτήρια σε βάθος ανάλυσής τους. Στην συνέχεια, η μήτρα εξαγόταν στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umea, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων μεταξύ των δεδομένων και την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών μέσω εφαρμογής πολυπαραγοντικής ανάλυσης (Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides, 2011; Jaeger & Lisec, 2018). Επίσης η ανίχνευση τυχόν ακραίων τιμών πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των βιοσημαντών της επίδρασης των παραγόντων φυτοπροστασίας (*Ascophyllum nosodum*, *ωφέλιμοι μικροοργανισμοί και biochar*) στον μεταβολισμό της *C. sativa* L. με τη χρήση της μεθόδου Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA, $P < 0,05$) (Aliferis & Jabaji, 2012). Επιπλέον εφαρμόστηκε στα δεδομένα ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (*Hierarchical Cluster Analysis, HCA*) (Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides, 2011; Caesar et al., 2018).

Όσον αφορά την ανακάλυψη των βιοσημαντών, πραγματοποιήθηκε με την χρήση Coefficient plots για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα για τα ζεύγη των επιλεγμένων συγκρίσεων, με διαστήματα εμπιστοσύνης προερχόμενα από jack-knifing (95%) και S-plots (Wiklund et al., 2008). Στο τελικό στάδιο σχεδιάστηκαν και οι μεταβολικοί χάρτες (metabolic maps) χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμές Coefficient $>2,5$ και $<-2,5$. Τέλος για κάποιους επιλεγμένους μεταβολίτες κατασκευάστηκαν τα trend plot της διακύμανσής τους εν παρουσία και απουσία των παραγόντων φυτοπροστασίας.

3.8 Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών του *Cannabis sativa* L.

Για υψηλής ρυθμο-απόδοσης μη στοχευμένη μεταβολομική, η χρήση των βάσεων δεδομένων μεταβολιτών εξειδικευμένων ειδών (*species-specific metabolites library*) κρίνεται απαραίτητη για την μεγαλύτερη δυνατή αποσαφήνιση της ευρείας ποσότητας των ληφθεισών πληροφοριών και της μείωσης του εσφαλμένου ρυθμού ανακάλυψης. Παρόλο που υπάρχουν μερικές κατανοητές βάσεις δεδομένων μεταβολιτών (π.χ. *collection of PlantCyc*), για την κάνναβη δεν υφίστανται. Ως εκ τούτου υποβληθήκαμε στη διαδικασία εγκαθίδρυσης μιας βάσης δεδομένων μεταβολιτών εξειδικευμένων ειδών ανοιχτής πρόσβασης για την κάνναβη (*Cannabis MetaboLid v.1.0.*, <https://aua.gr/pesticide-metabolomicsgroup/Resources/default.html>) στην οποία θα δημοσιευτούν οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη με σκοπό την ενίσχυση μελετών μεταβολομικής στο φυτό της κάνναβης (Παράρτημα 2). Εφαρμόστηκε μεθοδολογία παρόμοια με αυτήν των Aliferis *et al.*, (2015) η οποία κατασκευάστηκε από την ομάδα μας PMG.

Η βάση δεδομένων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τα δεδομένα αναλύσεων με GC/EI/MS η οποία περολαμβάνει τα φάσματα μαζών και πληροφορίες για τους μεταβολίτες όπως, τα φάσματα μαζών, το χρόνο κατακράτησης (*Retention time*), τη μάζα αναφοράς (*quantitative mass*) και από στοιχεία υπαρχόντων βάσεων δεδομένων μεταβολιτών και άλλων ισότοπων όπως *Metabolites Common name*, *Metabolites Derivatives*, *Synonym(s)*, *KEGG ID*, *Golm Metabolome Database ID*, *PubChem ID*, *Cas Registry Number*, *Biosynthetic pathways*, *Abbreviated Biosynthetic pathway(s)*, *Monoisotopic mass (Da)*, *Average Molecular Mass (Da)*, *Molecular Formula* και *Chemical group* (Ενότητα 4.8).

Συγκεκριμένα οι πληροφορίες για τη συμπλήρωση των δεδομένων λαμβάνονταν από τις βάσεις δεδομένων *kegg* (*KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-GenomeNet*. <http://www.genome.jp/kegg>), *Golm Metabolome Database* (<http://qmd.mpimp-golm.mpg.de/>) και *Pubchem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Επιπλέον στη βάση δεδομένων θα συμπεριληφθούν και οι πλήρεις συνθήκες ανάλυσης (*αναλύτης, συνθήκες ανάλυσης*)

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Η ποικιλία κάνναβης «FUTURA 75» απέδωσε φυτάρια με καλύτερη και πιο παραγωγική ανάπτυξη

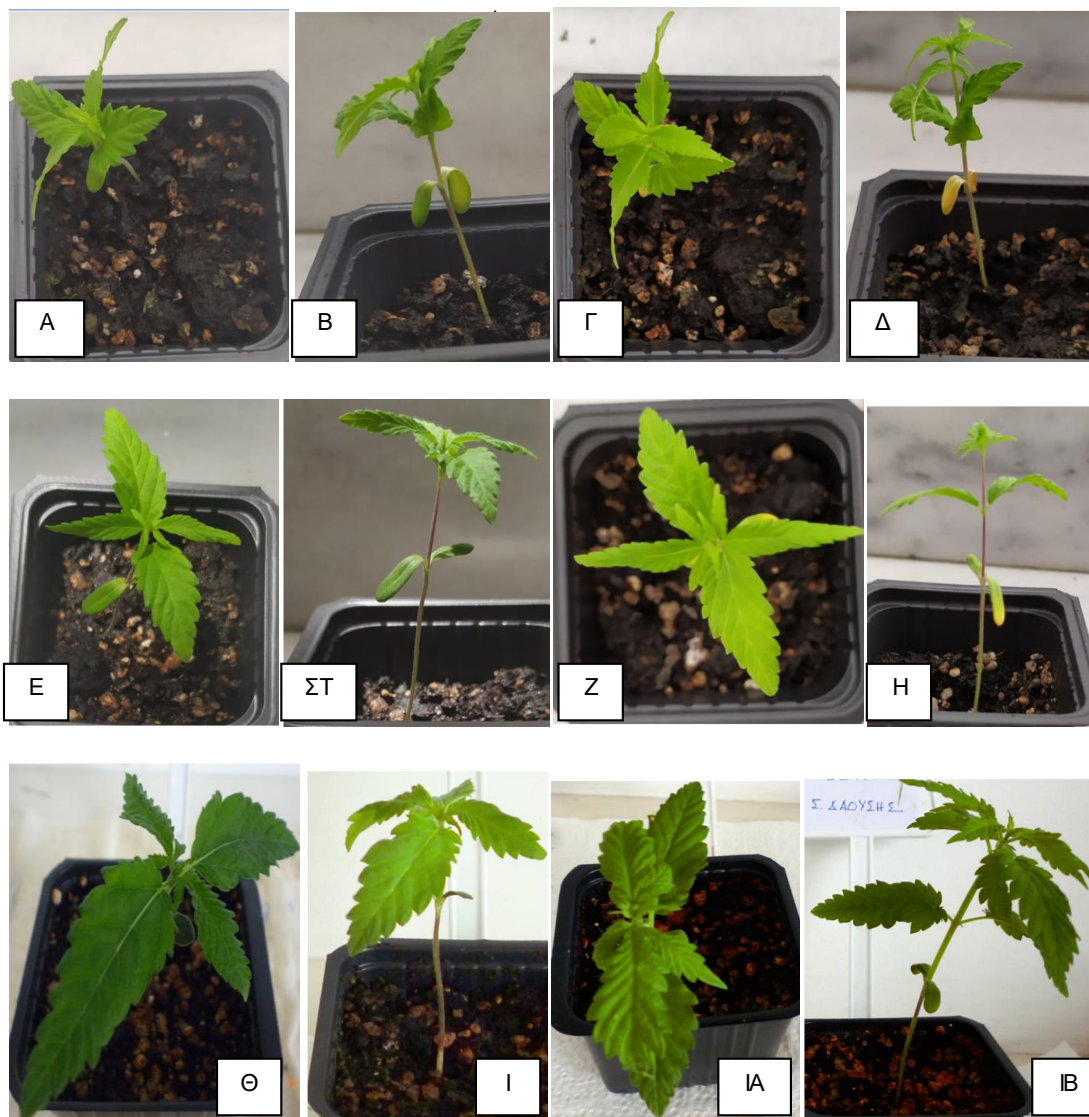
Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, εφαρμόστηκε ένα πιλοτικό πείραμα με καλλιέργεια των μόνοικων ποικιλιών *Cannabis sativa* L., «Futura 75», «Zenit» και «KC Dora» σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη υπό ελεγχόμενες συνθήκες στον θάλαμο ανάπτυξης φυτών. Ο σκοπός ήταν να αξιολογηθεί η καταλληλότερη ποικιλία βιομηχανικής κάνναβης για την επιτυχή διεκπεραίωση του πειράματος με υψηλής ποιότητας δεδομένα μεταβολομικής ανάλυσης και ευκρινείς μορφολογικές διαφορές στην επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων φυτοπροστασίας, καθώς και στην επίδραση του μύκητα *R. solani* και γενικότερα για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η καλλιέργεια διήρκησε 24 ημέρες και παρόλο που δεν εφαρμόστηκαν κάποιες ποσοτικές μετρήσεις, υπήρξαν κάποιες εμφανείς μορφολογικές διαφορές με πιο εύρωστα και παραγωγικά φυτάρια, με περισσότερο αναπτυγμένα φύλλα από την ποικιλία Futura 75. Στην **Εικόνα 77** συγκρίνονται φαινοτυπικά τα φυτάρια των τριών ποικιλιών.

Επιπλέον συνεκτιμήθηκε και η εύρεση δεδομένων για την απόδοση και τις προοπτικές των ποικιλιών σε βιομάζα και απόδοση συστατικών του αιθερίου ελαίου τους, αλλά και της περιεκτικότητάς τους στα δύο κυριότερα κανναβινοειδή με την μεγαλύτερη δυνατή αφθονία, μέσω της επιστημονικής βιβλιογραφίας αλλά και αρχείων βάσεων δεδομένων από εταιρείες παραγωγής και προμήθειας σπόρων βιομηχανικής κάνναβης. Συγκεκριμένα η ποικιλία Ρουμανικής προέλευσης Zenit απορρίφθηκε για καλλιέργεια από την παρούσα εργασία, λόγω χαμηλότερης απόδοσης βιομάζας (8-10 t/ha) έναντι 10-12 t/ha των KC Dora και Futura 75, αλλά κυρίως λόγω πολύ χαμηλότερης περιεκτικότητάς της στα κανναβινοειδή CBD (<0,5%) και THC (<0,02%) σε σχέση με τα αντίστοιχα 2-3% και <0,12% των Futura 75 και KC Dora (ihempfarm, 2017). Σχετικά με την σύγκριση των Futura 75 Γαλλικής προέλευσης και KC Dora Ουγγρικής προέλευσης, οι Baldini *et al.*, (2018) σε πείραμα μελέτης διετούς καλλιέργειας κατέγραψαν απόδοση βιομάζας στελέχους 8,3 t/ha για Futura 75 και 7,7 t/ha για KC Dora, ενώ σε περιεκτικότητες % σε θρεπτικά λιπαρά οξέα υπήρξαν παρεμφερείς ποσότητες με την Futura 75 να υπερέχει ελαφρώς στα ολεϊκό οξύ ($15,0 \pm 0,19$), γ-λινολενικό οξύ ($1,4 \pm 0,01$) έναντι ($13,7 \pm 0,11$) και ($1,2 \pm 0,05$) της KC Dora, η KC Dora να υπερέχει ελαφρώς σε στεαρικό οξύ ($3,1 \pm 0,07$) έναντι $2,9 \pm 0,01$ και α-λινολενικό οξύ ($17,7 \pm 0,24$) έναντι $16,0 \pm 0,69$, ενώ οι περιεκτικότητες ήταν παρόμοιες για τις Futura 75 και DC Dora σε παλμιτικό οξύ ($7,5 \pm 0,31$) και ($7,6 \pm 0,49$) αντίστοιχα και σε λινολεϊκό οξύ ($56,2 \pm 0,20$) και ($56,0 \pm 0,90$) αντίστοιχα. Όσον αφορά τις περιεκτικότητες απόδοσης σε αιθέριο έλαιο η Futura 75 υπερτερεί σημαντικά με συγκεντρώσεις 6,00 L/ha τον πρώτο χρόνο και 12,00 L/ha τον δεύτερο χρόνο καλλιέργειας σε σχέση με τις αντίστοιχες για την KC Dora με περίπου 3 L/ha κάθε έτος. Ασφαλώς και οι χημειοποικιλίες και οι εδαφοκλιματικές συνθήκες μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή

θηλικών ανθέων, συνεπώς και την παραγωγή του αιθερίου ελαίου, ωστόσο ερευνητές που διεξήγαν παλαιότερα πειράματα αγρού με αυτές τις ποικιλίες σε διαφορετικές συνθήκες, βρήκαν παρόμοιες αποδόσεις από 4-11 L/ha (Meier & Mediavilla 1998; Bertoli *et al.*, 2010 Verma *et al.*, 2014),

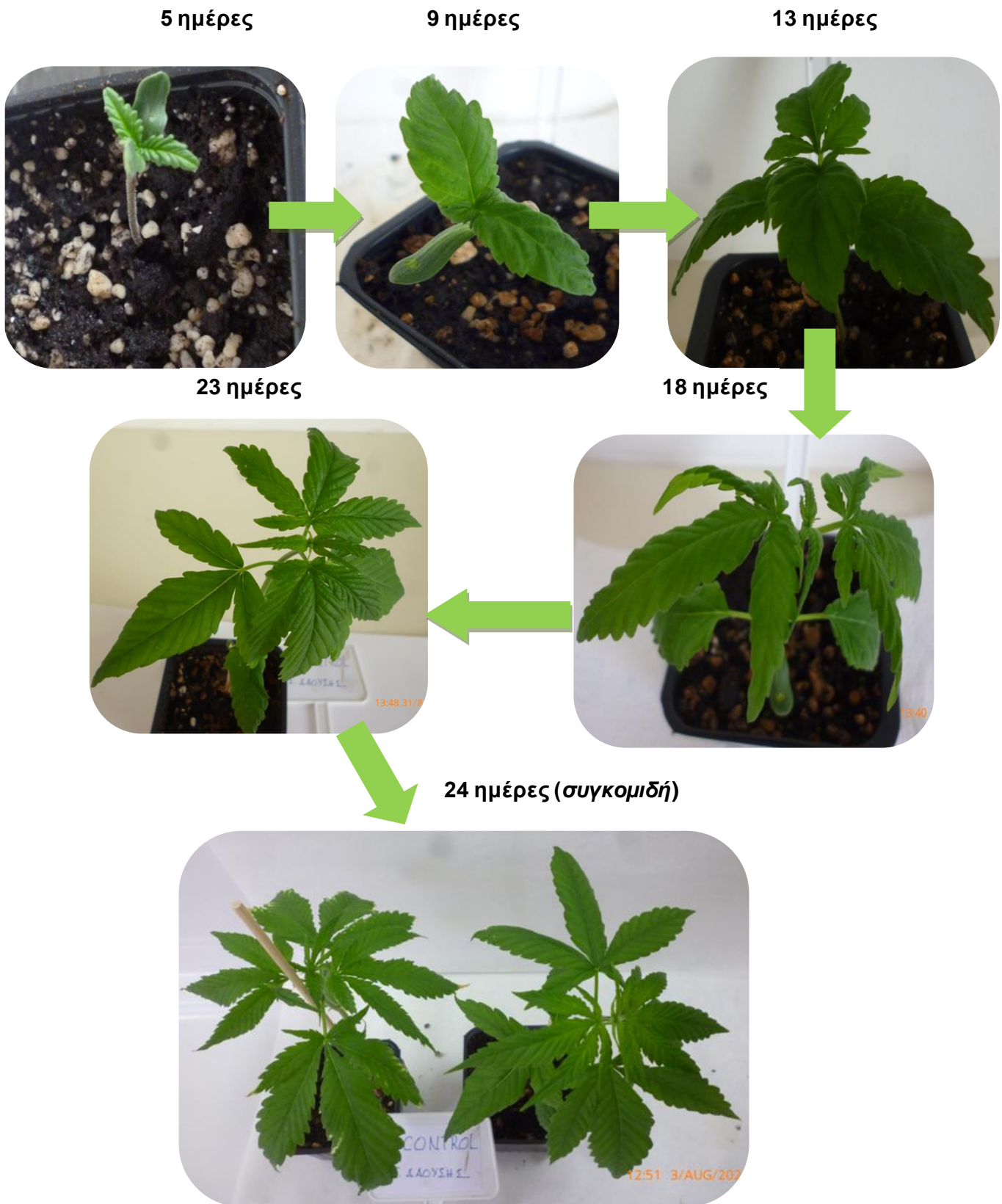
Επομένως βάσει των μορφολογικών παρατηρήσεων αλλά και καταγεγραμμένων ιδιοτήτων και αποδόσεων, επιλέχθηκε τελικώς η ποικιλία **Futura 75** για τη συνέχεια των πειραμάτων. Με αυτή τη ποικιλία ακολούθησε η σπορά, οι επεμβάσεις και τέλος η συλλογή των πιο εύρωστων φυτών.



Εικόνα 77: Καλλιέργεια των τριών ποικιλιών κάναβης με εμφανείς μορφολογικές διαφορές μεταξύ τους, όπου η *Futura 75* παρουσιάζει την καλύτερη και ταχύτερη ανάπτυξη. (Α), (Β) Ποικιλία *Zenit* σε 14 ημέρες ανάπτυξης, και σε (Γ), (Δ) 19 ημέρες. (Ε), (ΣΤ), Ποικιλία *KC Dora* σε 14 ημέρες ανάπτυξης και (Ζ), (Η) σε 19 ημέρες. (Θ), (Ι) Ποικιλία *Futura 75* σε 14 ημέρες ανάπτυξης και (ΙΑ), (ΙΒ) σε 19 ημέρες.

4.2 Οι επεμβάσεις με βιοδιεγέρτες και οργανικό προσθετικό εδάφους οδήγησαν σε φυτάρια αισθητά καλύτερης ανάπτυξης σε σχέση με του μάρτυρα

Οι επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν στη παρούσα εργασία για την αξιολόγηση της δυνατότητας φυτοπροστασίας στην κάνναβη, περιελάμβαναν τους βιοδραστικούς παράγοντες εκχυλίσματος *Ascophyllum nodosum* (**Acadian**), μίγμα σπορίων από τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς μυκόρριζα (*Glomus spp*), *Trichoderma spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, *Pseudomonas spp.* (**Ekorprop 4G**) και το **biochar**. Στις **Εικόνες 78, 79, 80** και **81** παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης φυταρίων κάνναβης ανά τακτά χρονικά διαστήματα για τις αντίστοιχες επεμβάσεις με μάρτυρα (*καμία προσθήκη βιοδραστικού παράγοντα*), Acadian, Ekorprop 4G και biochar. Η καλλιέργεια διήρκεσε 24 ημέρες και στις **ενότητες 4.2.1 - 4.2.6** παρουσιάζονται οι φαινοτυπικές διαφορές των φυταρίων για κάθε επέμβαση. Όπως διακρίνονται στις αντίστοιχες **Εικόνες (82, 84, 88, 90, 91, 92)** για κάθε επέμβαση βάσει καταγραφής μετρήσεων στον αριθμό και μήκος φύλλων όπως και ύψους των φυτών, συνολικά υπήρξαν εμφανείς μορφολογικές διαφορές με πιο εύρωστα και παραγωγικά φυτάρια, ταχύτερης ανάπτυξης και μεγαλύτερου αριθμού και μεγέθους φύλλων σε όλες τις επεμβάσεις με βιοδραστικούς παράγοντες σε σύγκριση με του μάρτυρα (**Εικόνες 82, 84, 88**). Όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων με βιοδραστικούς παράγοντες δεν διακρίνονται ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ τους σε ύψος, αριθμό και μέγεθος φύλλων (**Εικόνες 90, 91, 92**) με τις όποιες διαφορές πιθανότατα να οφείλονται στην γενετική δυναμική της ανάπτυξης κάθε φυτού ξεχωριστά. Ωστόσο σε ορισμένα φυτά με την προσθήκη biochar στο εδαφικό υπόστρωμα παρατηρήθηκαν κάποια συμπτώματα χλώρωσης στο τέλος της πρώτης εβδομάδας ανάπτυξης, αλλά βελτιώθηκαν προς τις τελευταίες ημέρες μέχρι την συγκομιδή (**Εικόνα 89**). Επιπλέον σε κανένα στάδιο ανάπτυξης δεν παρουσιάστηκε κάποια τοξικότητα στα φυτά λόγω εφαρμογής των βιοδραστικών παραγόντων. Στην ενότητα 4.2.7 συγκρίνονται φαινοτυπικά τα φυτά όλων των επεμβάσεων κατά τα οποία διακρίνονται εμφανώς οι διαφορές σε σχέση με του μάρτυρα (**Εικόνα 93**).



Εικόνα 78: Ανάπτυξη φυτών κάνναβης χωρίς κάποια επέμβαση (μάρτυρας)

5 ημέρες



9 ημέρες



13 ημέρες



23 ημέρες



18 ημέρες



24 ημέρες (συγκομιδή)



Εικόνα 79: Ανάπτυξη φυτών κάνναβης με *Ascophyllum nodosum* (Acadian)

5 ημέρες



9 ημέρες



13 ημέρες



23 ημέρες



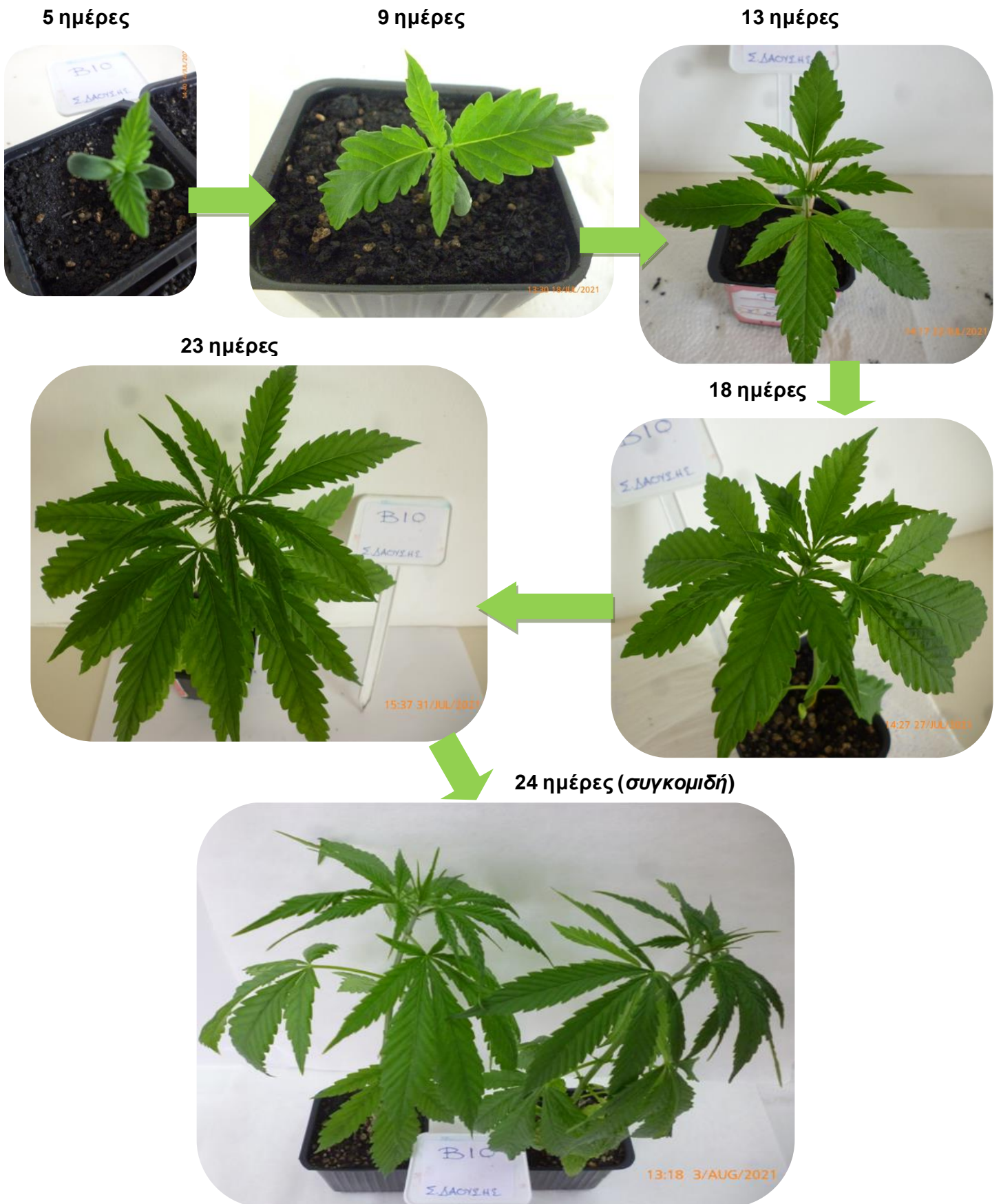
18 ημέρες



24 ημέρες (συγκομιδή)



Εικόνα 80: Ανάπτυξη φυτών κάνναβης με ωφέλιμους μικροοργανισμούς (*Ekoprop 4G*)



Εικόνα 81: Ανάπτυξη φυτών κάνναβης με οργανικό υπόστρωμα biochar

4.2.1 Η Επέμβαση με *Ascophyllum nodosum* του βιοδιεγέρτη «Acadian» ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα

Σύμφωνα με την **Εικόνα 82** η επέμβαση με εκχύλισμα *A. nodosum* (**EAN**) βελτίωσε την αύξηση των φυτών, συνεπώς και την ανάπτυξή τους.



Εικόνα 82: Φαινοτυπικές διαφορές φυτών κάναβης μάρτυρα σε σχέση με αυτών που εφαρμόστηκε το εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum* από το σκεύασμα βιοδιεγέρτη «Acadian». (Α), (Β), (Γ), (Δ) αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά τα φυτά με το Acadian σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Ε), (ΣΤ), (Ζ), (Η) αριστερά τα φυτά με το Acadian και δεξιά τα φυτά μάρτυρα σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (Θ) στερεοσκοπική φωτογραφία φύλλου κάναβης. (Ι), (ΙΑ), (ΙΒ) αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά τα φυτά με το Acadian σε **23 ημέρες ανάπτυξης**.

Υπάρχουν πολλές επιστημονικές μελέτες που επιβεβαιώνουν την θετική επίδραση του EAN στην ανάπτυξη και παραγωγικότητα διάφορων φυτών και λαχανικών παραθέτοντας και τον σχετικό «τρόπο δράσης» (*Mode of Action, MoA*). Στην παρούσα μελέτη με τα αποτελέσματα που προκύπτουν σύμφωνα με τις εφαρμόσιμες πειραματικές διαδικασίες, δεν κατέστη δυνατό να αποσαφηνιστεί ο ακριβής τρόπος δράσης του EAN στα φυτά της κάνναβης. Ως εκ τούτου θα αναφερθούν οι αντίστοιχες μελέτες στην επιστημονική βιβλιογραφία, όπου διευκρινίζεται ο τρόπος δράσης, ως πιθανοί μηχανισμοί και για την παρούσα εργασία.

Με βάση την ανασκόπηση που δημοσίευσαν οι Van Oosten *et al.*, (2017) περίπου 47 εταιρείες παγκοσμίως σχετίζονται επί του παρόντος με την κατασκευή εκχυλισμάτων από *A. nodosum* για γεωργικές και φυτοκομικές εφαρμογές. Το *A. nodosum* είναι πλούσια πηγή σε ποικίλα βιοενεργά φαινολικά συστατικά όπως φλωροτανίνες και μοναδικούς πολυσακχαρίτες π.χ. αλγινικό οξύ (28%), fucoidans (11,6%), μαννιτόλη (7,5%) και λαμιναρίνη (4,5%) (Ragan & Jensen, 1977; Holdt & Kraan, 2011; Yuan & Macquarrie, 2015a; Moreira *et al.*, 2017). Αυτά τα παρόντα βιοενεργά συστατικά εκχυλίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για να προωθήσουν την ανάπτυξη των φυτών σύμφωνα με τους Van Oosten *et al.*, (2017).

Αρχικά το *A. nodosum* έχει αναφερθεί να επηρεάζει την ικανότητα των φυτών για **αποκόμιση, συσσώρευση και βιοσύνθεση θρεπτικών συστατικών**. Οι Crouch & van Staden (1993), Khan *et al.*, (2009), Craigie, (2011), Sharma *et al.*, (2014), Van Oosten *et al.*, (2017) ανέφεραν ταυτόχρονη βελτίωση της ανάπτυξης και παραγωγικότητας αγροτικών καλλιεργειών, αυξάνοντας την διαθεσιμότητα και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών. Διάφορες δημοσιεύσεις υπέδειξαν ότι η διαφυλλική εφαρμογή EAN στα φύλλα του αμπελιού (*vitis vinifera*) μετά από πλήρη άνθηση, αύξησε το περιεχόμενο θρεπτικών συστατικών στα αμπέλια, ιδίως την συσσώρευση ανθοκυανινών και φαινολικών συστατικών (Norrie *et al.*, 2002; Sabir *et al.*, 2014; Frioni *et al.*, 2018). Δύο εμπορικά εκχυλίσματα με *A. nodosum*, «Rygex®» και «Super Fifty®» ενίσχυσαν τα περιεχόμενα μακροθρεπτικών (N, P, K, Ca, S) και μικροθρεπτικών (Mg, Zn, Mn, Fe) συστατικών στους καρπούς τομάτας (Di Stasio *et al.*, 2018). Παρομοίως φυτά ελιάς (*Olea europaea*) που μεταχειρίστηκαν με EAN έδειξαν μια υψηλότερη απορρόφηση K, Fe και Cu (Chouliaras *et al.*, 2009). Επιπλέον η εφαρμογή του εμπορικού σκευάσματος «AZAL5®» σε συγκεκριμένες αναλογίες (v/v) βελτίωσε την ανάπτυξη της ρίζας και των βλαστών της ελαιοκράμβης (*Brasica napus*) διεγείροντας την συσσώρευση αζώτου και θείου (Jannin *et al.*, 2013), με την ανάλυση μικροσυστοιχιών (microarrays) να αποκαλύπτει διαφορεική έκφραση 724 και 298 γονιδίων στους βλαστούς και στη ρίζα αντίστοιχα μετά από 3 ημέρες εφαρμογής, ενώ μετά από 30 ημέρες τα αντίστοιχα γονίδια που εκφράστηκαν διαφορεικά ήταν 724 και 298. Μεταξύ των εκφρασθέντων γονιδίων αναγνωρίστηκαν αυτά που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την αφομοίωση των νιτρικών και με τον μεταβολισμό των αμινοξέων, εξηγώντας την

απορρόφηση των νιτρικών στην ελαιοκράμβη, αλλά και επαγωγή γονιδίων που επιφέρουν υψηλότερη συσσώρευση θειϊκών. Τα εμπορικά σκευάσματα «Maxicrop®», «Proton®» και «Algipower®» αναφέρθηκαν να βελτιώνουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών στα αμπέλια (Turan & Kose, 2004).

Τα EAN ενισχύουν την ανάπτυξη φυλλωδών λαχανικών όπως του σπανακιού (*Spinacia oleracea*) και μαρουλιού (*Lactuca sativa*) (Cassan *et al.*, 1992; Moller & Smith, 1998; Fan *et al.*, 2013; Chrysargyris *et al.*, 2018). Συγκεκριμένα η εφαρμογή EAN μέσω εμβάπτισης ρίζας επήγαγε την έκφραση συνθετάσης της γλουταμίνης στο σπανάκι (Fan *et al.*, 2013), η οποία ήταν υπεύθυνη για την μετατροπή του ανόργανου αμμωνίου σε οργανική γλουταμίνη και επιπλέον παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και αφομοίωση του αζώτου (Oliveira *et al.*, 2002). Επιπροσθέτως η εφαρμογή EAN στη ρίζα επήγαγε την έκφραση νιτρικής αναγωγάσης, ενός σημαντικού ενζύμου που σχετίζεται με την αφομοίωση του αζώτου και καταλύει την μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη (Fan *et al.*, 2013). Συνεπώς αυτά τα αποτελέσματα ερευνών συνιστούν ότι πράγματι το EAN παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών ενισχύοντας την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών μέσω την ρύθμισης γονιδίων που σχετίζονται με την αποκόμιση θρεπτικών συστατικών. Σε διαφυλλική εφαρμογή του εμπορικού σκευάσματος «Biopost AG200®» εβδομαδιαίως μέχρι 5 εβδομάδες, ενίσχυσε την σχετική ανάπτυξη και ποιότητα (μετα-συγκομιδής) του μαρουλιού, αναπτυσσόμενου υπό συνθήκες έλλειψης Κ αυξάνοντας την αντιοξειδωτική δράση (Chrysargyris *et al.*, 2018). Σε μελέτη όπου εφαρμόστηκε το ίδιο σκεύασμα με την παρούσα εργασία «Acadian®» και με τον ίδιο τρόπο (προ-συγκομιδής), αναφέρθηκε να έχει μια βαθιά επίδραση στην μείωση απωλειών προ-συγκομιδής, μειώνοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Fan *et al.*, 2014), ενώ προγενέστερα αποτελέσματα (Fan *et al.*, 2011) είχαν δείξει ότι η εφαρμογή με EAN αύξησε τα αντιοξειδωτικά και διέγειρε την βιοσύνθεση φαινολικών συστατικών στο σπανάκι.

Επιπλέον η επαγόμενη από EAN βιοσύνθεση φαινολικών συστατικών σε σπανάκι που χρησιμοποιήθηκε ως πρόσληψη τροφής προστάτεψε τον νηματώδη οργανισμό μοντέλο *Caenorhabditis elegans* ενάντια σε οξειδωτική και θερμική καταπόνηση (Fan *et al.*, 2011). Παρομοίως η παροχή ενός συμπληρώματος θρέψης με αεροξηραμένο και αλεσμένο EAN, «Tasco®-Forage» βελτίωσε επίσης τα μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά συστατικά όπως α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ και β-καροτένιο στη τύρφη και σε ζωοτροφές (Allen *et al.*, 2001). Το «Tasco®-Forage» επήγαγε επίσης και την δράση των ενζύμων δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), αναγωγάση της glutathion και υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος (APX) σε ζωοτροφές (Allen *et al.*, 2001). Το εμπορικό σκεύασμα «AlgaeGreen®» αύξησε την απόδοση και το περιεχόμενο των δευτερογενών μεταβολιτών στο λάχανο (*Brassica oleraceae*) (Lola-Luz *et al.*, 2013). Έπειτα η επέμβαση με EAN ενίσχυσε σημαντικά τόσο την ανάπτυξη του βλαστού όσο και τη βιοσύνθεση βιοενεργών μορίων όπως φαινολικών και φλαβονοειδών ενός υβριδίου

φαρμακευτικού φυτού *Calibrachoa* (Elansary *et al.*, 2016a), ενισχύοντας περαιτέρω και την αντικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση του φυτού.

Η ριζική εφαρμογή με EAN αναφέρθηκε να επάγει συσσώρευση μεταγραφών aldehyde dehydrogenase της βεταΐνης (BADH) και μονοοxygenase της χολίνης (CMO) σε σπανάκι αναπτυσσόμενο *in vitro* (Fan *et al.*, 2013). Τα συγκεκριμένα ένζυμα να είναι γνωστό ότι καταλύουν ένα μονοπάτι δύο διαδρομών που σχετίζεται με την βιοσύνθεση της βεταΐνης της γλυκίνης, ενός αμφοτερικού συστατικού τεταρτοταγούς αμμωνίου το οποίο είναι ένα επαρκές, συμβατό ωσμοπροστατευτικό που προστατεύει τα φυτά ενάντια σε περιβαλλοντικά στρες (Sakamoto & Murata, 2002). Πράγματι το EAN έδειξε να περιέχει συστατικά τεταρτοταγούς αμμωνίου όπως βεταΐνη ης γλυκίνης, δ-αμινοβαλερικό οξύ της βεταΐνης, γ-αμινοβουτυρικό οξύ της βεταΐνης και laminine (Whapham *et al.*, 1993; Blunden *et al.*, 1996; MacKinnon *et al.*, 2010).

Πέραν των γεωργικών καλλιεργειών οι Hurtado & Critchley (2018), ανασκόπησαν την επίδραση του βιοδιεγέρτη *A. nodosum* στο σκέυασμα της παρούσας μελέτης «**Acadian®**» ως σκόνη εκχυλίσματος υδρόβιου φυτού (AMPEP) στην αύξηση της καλλιέργειας και μικροπολλαπλασιασμού άλλου σημαντικώς εμπορικού φυκιού, *Kappaphycus alvarezii*. Η εφαρμογή αυτού του προϊόντος βελτίωσε την καλλιέργεια βιομάζας του *K. alvarezii* (Marroig *et al.*, 2016), ενώ τα αποτελέσματα των Tibubos *et al.*, 2017 έδειξαν ότι το AMPEP επήγαγε τον άμεσο σχηματισμό αξόνων σε νέα φυτάρια του *K. alvarezii*. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ένα εκχύλισμα παραγόμενο από *A. nodosum* μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και από εμπορικά σημαντικές καλλιέργειες φυκιών.

Στον Πίνακα 25 παρατίθενται όλες οι μελέτες που διενεργήθηκαν πάνω στην εφαρμογή διαφορετικών σκευασμάτων βιομάζας *A. nodosum* για την επίδρασή τους στην βελτίωση της ανάπτυξης των φυτών.

Πίνακας 25: Λίστα από εκχυλίσματα κατασκευασμένα από βιομάζα *A. nodosum* τα οποία αναφέρθηκαν να βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών. Πηγή: Shukla et al., (2019).

S. No.	Extract	Crop	Function	References
1	GA14 [®] (Goemar, France)	<i>Spinacia oleracea</i>	Foliar spray improved total fresh biomass	Cassan et al., 1992
2	Maxicrop [®] Original	Tomato	Higher chlorophyll content in sprayed plants	Whapham et al., 1993
3	Maxicrop [®]	<i>Capsicum annuum</i>	Improved yield and quality	Eris et al., 1995
4	Goemar [®]	<i>Citrus unshiu</i>	Early maturation of fruit	Fornes et al., 1995
5	<i>A. nodosum</i> extract	Kwi fruit	Improved fruit growth, weight, and maturation	Chouliaras et al., 1997
	<i>A. nodosum</i> extract	Tomato, dwarf French bean, wheat, barley, maize	Enhanced leaf chlorophyll level	
6	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Vitis vinifera</i>	Improved yield and fruit quality	Norie et al., 2002
7	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Poa pratensis</i>	Improved shelf life and transplant rooting	Zhang et al., 2003
8	Maxicrop [®] , Proton [®] , Algipower [®]	<i>Vitis vinifera</i>	Improved copper uptake of grapevine	Turan and Köse, 2004
9	Goemar [®]	Clementine Mandarin and Navelina Orange	Increased productivity and yield	Fornes et al., 2002
10	<i>A. nodosum</i> extract	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Improved plant growth by modulation of concentration and localization of auxin	Rayorath et al., 2008
11	<i>A. nodosum</i> extract	<i>Hordeum vulgare</i>	Induced gibberellic-acid-independent amylase activity in barley and promoted seed germination	Rayorath et al., 2008
12	Goëmar BM 86 [®]	Apple	Improved the fruit quality of apple and have high nitrogen content	Basak, 2008
13	Acadian [®] Marine Plant Extract Powder (AMPEP)	<i>Kappaphycus striatum</i>	AMPEP improves micro-propagation	Hurtado et al., 2009
14	<i>A. nodosum</i> extract	<i>Olea europaea</i>	Showed increased tree productivity and improved their nutrition status and oil quality parameters	Chouliaras et al., 2009
15	Alge [®]	<i>Citrullus lanatus</i>	Application of extract showed increased growth parameters and yield responses	Abdel-Mawgoud et al., 2010
16	Activave [®]	Strawberry	Increases fruit yield and quality and acts as iron chelator	Spinelli et al., 2010
17	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Spinacia oleracea</i>	Enhances phenolic antioxidant content of Spinach	Fan et al., 2011
18	AMPEP	<i>Ulva lactuca</i>	Reduces ionic liquid induced oxidative stress in <i>Ulva lactuca</i>	Kumar et al., 2013
19	<i>A. nodosum</i> extract	<i>Medicago sativa</i>	Improves root colonization of rhizobial symbionts	Khan et al., 2012
20	<i>A. nodosum</i> extract	Strawberry	Improved plant growth, fruit quality and microbial growth	Alam et al., 2013
21	Super Fifty [®] , Ecoelictor [®]	Lettuce; Oilseed rape	Enhanced plant growth and tolerance to biotic and abiotic stresses	Guinan et al., 2012
22	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Spinacia oleracea</i>	Improved yield and nutritional quality	Fan et al., 2013
23	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Spinacia oleracea</i>	Improves phenolics and antioxidant content of spinach	Fan et al., 2013
24	Alga Special (AS)	<i>Vitis vinifera</i>	Improved vegetative growth	Popescu and Popescu, 2014
25	AZAL5	<i>Brassica napus</i>	Promotes plant growth and nutrient uptake	Jannin et al., 2013
26	AlgaeGreen [®]	<i>Brassica oleracea</i>	Enhanced biosynthesis of secondary metabolites	Lola-Luz et al., 2013
27	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Spinacia oleracea</i>	Preharvest ANE application enhanced post-harvest storage quality of spinach	Fan et al., 2014
28	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	Carrot	Promote plant growth and root yield in carrot associated with increased root-zone soil microbial activity	Alam et al., 2014
29	Stella Maris [™]	<i>Calibrachoa hybrida</i>	Increased biosynthesis of secondary metabolites and enhanced antibacterial and antifungal properties of <i>C. hybrida</i> extract	Elansary et al., 2016a
	<i>A. nodosum</i> extract	<i>Vitis vinifera</i>	Improved growth, yield, berry quality attributes, and leaf nutrient content of grapevines	Sabir et al., 2014
30	Premium liquid seaweed	<i>Allium cepa</i>	Improved vegetative growth and yield of onion	Hidangmayum and Sharma, 2017
31	Seaweed extract	<i>Zea mays</i>	Promotes root morphology and plant nutrition	Ertani et al., 2018
32	Acadian [®] (Acadian Seaplants)	<i>Vitis vinifera</i>	Foliar spray has a positive effect on ripening dynamics and fruit quality	Froni et al., 2018
33	Rygex [®] , Super fifty [®]	<i>Solanum lycopersicum</i>	Increased plant growth and fruit quality and mitigates salinity stress in tomato plants	Di Stasio et al., 2018
34	Seaweed extract	<i>Spinacia oleracea</i>	Improved growth, quality, and nutritional value of spinach grown under drought conditions	Xu and Leskovar, 2015
35	Seasol [®]	<i>Fragaria ananassa</i>	Increased growth response of strawberry root	Mattner et al., 2018

Ένας άλλος σημαντικός MoA από τα EAN είναι η ικανότητά τους να βελιώνουν την ανάπτυξη των φυτών **ρυθμίζοντας τη βιοσύνθεση φυτοορμονών στα φυτά**. Οι φυτοορμόνες είναι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις και παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες οι οποίες ρυθμίζουν μερικές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες στα φυτά (Wally *et al.*, 2013; Wani *et al.*, 2016). Οι πιο κοινές φυτοορμόνες περιλαμβάνουν τις αυξίνες (IAA), κυτοκινίνες (CK), αμπσιικό οξύ (ABA), γιββερελλικό οξύ (GA), αιθυλένιο, ιασμονικό οξύ (JA) και σαλικυλικό οξύ (SA) (Wani *et al.*, 2016). Ενώ μια αναφερθείσα επίδραση EAN για αύξηση ανάπτυξης αποδόθηκε στην παρουσία μιας ποικιλίας «ουσιών σαν φυτοορμόνες» (Strick & Van Staden, 1996; Khan *et al.*, 2009; Craigie, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Battacharrya *et al.*, 2015).

Υπάρχει μια ευρεία ποικιλία παραλλαγής στο περιεχόμενο αυξινών σε EAN που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Αυτή η ποικιλία πιθανότατα αποτελεί μια συνάρτηση της μεθόδου εκχύλισης και επεξεργασίας, καθώς και της γεωγραφικής τοποθεσίας του ακατέργαστου συγκομισθέντος υλικού, συμπεριλαμβανομένης και οποιαδήποτε πιθανής εποχιακής παραλλαγής (Strick & Van Staden, 1996; Wally *et al.*, 2013). Τα ακρωνύμια που προέρχονται από μικρά RNAs που ρυθμίζονται από αυξίνες (SAURs) σύμφωνα με πληροφορίες παίζουν σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές, φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες (Ren & Gray, 2015). Οι Goni *et al.*, (2016) ανέφεραν διαφορική έκφραση σχετικών γονιδίων, άλλων με υπερ-έκφραση και άλλων με υπο-έκφραση σε εμπορικά σκευάσματα EAN ουδέτερου και αλκαλικού χαρακτήρα. Για παράδειγμα οι Rayorath *et al.*, (2008) βασισμένοι σε EAN από αλκαλικά υδρολύματα στο οποίο οι Buggeln & Craigie (1971) είχαν αναφέρει βιολογικώς ενεργά ομόλογα ενώσεων «σαν αυξίνες», ανακάλυψαν ότι οι παρούσες βιοενεργές ενώσεις σε μεθανολικό κλάσμα αυτού του εμπορικού EAN προκάλεσαν την φυτική ανάπτυξη ενισχύοντας την ανάπτυξη του ακροριζίου και έδειξαν υψηλότερη έκφραση του συστήματος γονιδίου αναφοράς β-γλυκορονιδάσης (GUS) στη διαγονιδιακή γραμμή του *Arabidopsis thaliana*. Τα αποτελέσματα πρότειναν αναπιφύλακτα ότι το οργανικό κλάσμα ANE ρύθμιζε την δράση αυξίνης σε φυτά μεταχειρισθέντα με ENA μέσω της ρύθμισης από στοιχεία προαγωγής ανάπτυξης που ανταποκρίνονται σε αυξίνες (AuxRE) (Rayorath *et al.*, 2008).

Στις υπόλοιπες φυτοορμόνες υπάρχουν αντίστοιχα και αναφορές για κυτοκινίνες και ενώσεις «σαν κυτοκινίνες» οι οποίες ήταν οι πιο άφθονοι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών, όντας παρούσες σε εμπορικά εκχυλίσματα *A. nodosum* (Khan *et al.*, 2011; Wally *et al.*, 2013). Οι Strick & Van Staden (1996) ερεύνησαν τη δράση των κυτοκινίνων στα εμπορικά εκχυλίσματα φυκιών «Seamac®» αξιολογώντας την επίδρασή του σε τύλους (*callus*) στα φύλλα σόγιας, επιδεικνύοντας και μέγιστο σχηματισμό τύλων. Οι Khan *et al.*, (2011) και Wally *et al.*, (2013) έδειξαν ότι η ριζική εφαρμογή ενός αλκαλικού εκχυλίσματος *A. nodosum* κατέληξε στην ενεργοποίηση του υποκινητή ARR5 που ανταποκρίνεται σε κυτοκίνη. Η εφαρμογή αυτού του εμπορικού

εκχυλίσματος φυκιού στο *A. thaliana* επέδειξε υψηλότερη συγκέντρωση κυτοκινίνων, αμπισισικού οξέος (ABA), σε συνδυασμό με μείωση των επιπέδων των αυξινών ινδολαιθανικού οξέος (IAA). Η συγκεκριμένη παρατήρηση βοηθά στην εξήγηση των ποικίλων μηχανισμών δράσης πίσω από την υψηλότερη βλαστική ανάπτυξη των φυτών και τη μείωση του μήκους των πρωτογενών ριζών (Wally *et al.*, 2013). Στην ίδια μελέτη οι συγγραφείς έδειξαν ότι η εφαρμογή ενός EAN αύξησε τις συγκεντρώσεις των κυτοκινίνων στους ιστούς του *A. thaliana*, ιδίως τις αυτές τύπου trans-zeatin και τύπου cis-zeatin. Δεδομένου ότι το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης των κυτοκινίνων περιλαμβάνει τη μεταφορά ενός ισοπρενοειδούς μορίου στην αδενίνη μέσω των ενζύμων τρανσφερασών του ισοπεντυλίου (ITPs), οι εφαρμογές με EAN επήγαγαν την έκφραση ITP3, ITP4 και ITP5 στο *A. thaliana* (Wally *et al.*, 2013). Επιπλέον στην ίδια μελέτη τα EAN ρύθμισαν επίσης και τα μεταγραφικά επίπεδα κυτοσολικού και μιτοχονδριακού ITPs (ITP3, ITP4 και ITP5) και επήγαγαν τη παραγωγή κυτοκινίνων τύπου ισοπεντυλίου δια του μονοπατιού του mevalonate (MVA) (Frebort *et al.*, 2011), (Wally *et al.*, 2013).

Επίσης σε πανομοιότυπη πατέντα των ITP3, ITP4 και ITP5 η έκφραση κάποιων υδροξυλασών κυτοκινίνης που καταλύουν τη βιοσύνθεση της trans-zeatin, ήταν υψηλότερη σε μεταχειρισθέντα με EAN φυτά *A. thaliana* (Takei *et al.*, 2004; Wally *et al.*, 2013). Επιπροσθέτως τα EAN κατέστειλαν την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονταν στην αποδόμηση της κυτοκινίνης (Wally *et al.*, 2013). Πράγματι η συσσώρευση της οξειδάσης της κυτοκινίνης 4 (CKX4) που σχετίζονταν με τον καταβολισμό της κυτοκινίνης, μειώθηκε σε φυτά *A. thaliana* που τους χορηγήθηκαν EAN. Αυτό συνιστά ότι οι εφαρμογές με EAN επήγαγαν μια υψηλότερη μεταβολική παραγωγή κυτοκινίνων εντός των χορηγηθέντων φυτικών ιστών, ρυθμίζοντας διαφορικά τον μεταβολισμό των κυτοκινίνων. Επίσης έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το υψηλό επίπεδο κυτοκινίνων στα φυτά καθυστερεί τη γήρανση (Gan & Amasino, 1995; Lim *et al.*, 2003). Βάσει αυτών οι Wally *et al.*, (2013) έδειξαν ότι η εφαρμογή EAN καθυστέρησε τη γήρανση σε φυτά Αραβίδοψης, αυξάνοντας το περιεχόμενο ενδογενών κυτοκινίνων. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποστηρίχτηκε περαιτέρω από την ισχυρή αναστολή της έκφρασης του συσχετιζόμενου με την γήρανση γονιδίου 13 (SAG13) σε μεταχειρισθέντα με EAN φυτά (Wally *et al.*, 2013).

Όσον αφορά τη ριζική εφαρμογή EAN οι Wally *et al.*, (2013) ανέφεραν ότι διαμόρφωσε την έκφραση γονιδίων που αναμείχθηκαν στη βιοσύνθεση GA και συνεπώς κατέληξαν σε υψηλότερη συσσώρευση του GA24. Σε παρόμοια αποτελέσματα η φυλλική εφαρμογή σε φύλλα Αραβίδοψης ρύθμισε επίσης την έκφραση των GA-ανταποκρινόμενων γονιδίων GASA1 και GASA4 έπειτα από 1 βδομάδα επέμβασης (Goni *et al.*, 2016).

Όλα αυτά τα δημοσιευμένα στοιχεία τεκμηρίωσαν ότι η εφαρμογή με EAN ρύθμισε επίπεδα ενδογενών φυτοορμονών και πιθανώς τις αναλογίες μεταξύ τους εντός των χορηγηθέντων φυτικών ιστών, διαμορφώνοντας την έκφραση

γονιδίων που σχετίζονται στη βιοσύνθεση. Ακολούθως η διαμόρφωση της έκφρασης γονιδίων βελτιώνει την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών.

Ένα ακόμα όφελος που προσφέρει η επέμβαση με EAN για την παρούσα εργασία θα μπορούσε να είναι η βελτίωση της ποιότητας του εδάφους, δηλαδή της «*συνεχούς ικανότητας του εδάφους να λειτουργεί ως ένα ζωτικό οικοσύστημα που διατηρεί τα φυτά, ζώα και ανθρώπους*» (U.P. EPA, 2012), ώστε με την βελτίωση να ενισχύεται η ικανότητά του να διατηρεί τις περιβαλλοντικές και βιολογικές του διεργασίες. Τα επιλεγμένα υπό μελέτη εκχυλίσματα φυκών που προορίζονται για γεωπονική χρήση συνιστούν δύο MoA. Αφενώς όπως αναφέρθηκε, αποτελούν βιοδιεγέρτες που ενισχύουν την αύξηση και την παραγωγικότητα των φυτικών καλλιεργειών και δεύτερον είναι **χηλιωτές** συνεισφέροντας άμεσα στην υγεία του εδάφους (Khan *et al.*, 2009). Πράγματι τα EAN παρέχουν φυσική χηλικοποίηση στο έδαφος λόγω της παρουσίας αλγινικών υπολειμμάτων στο υδρολυμένο εκχύλισμα, τα οποία επιτρέπουν αύξηση των φυτικά διαθέσιμων ιχνοστοιχείων και αυξημένο εξαερισμό του εδάφους, καθώς και ικανότητα συγκράτησης ύδατος (Spinelli *et al.*, 2010; Craigie, 2011; du Jardin, 2015; Illera-Vives *et al.*, 2015). Για του λόγου το αληθές, το σκέυασμα «Actiware®» ένα ενισχυτικό μεταβολισμού παρασκευασμένο από *A. nodosum* χρησιμοποιήθηκε ως φυσικός χηλιωτής σιδήρου και βελτίωσε την παραγωγικότητα φράουλας (Spinelli *et al.*, 2010).

Τα αλγινικά οξέα που αποτελούνται από μονάδες mannuronic και gulucoric acid και παράγονται από καφέ άλγες (Yabur *et al.*, 2007; Craigie, 2011; Battacharyya *et al.*, 2015), αποτελούν κύριο συστατικό του αλγικού κυτταρικού τοιχώματος, αποτελώντας από 15-30% του ξηρού βάρους (Yabur *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009; Craigie, 2011; Battacharyya *et al.*, 2015). Όταν εκχυλιστούν εμπορικά τα αλγινικά οξέα δύνανται να σχηματίζουν φυσικά κόμμεα ή πηκτώματα βασιζόμενα στη συστασή τους (π.χ. αναλογία *mannuronic acid: gulucoric acid*) και μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν νερό (Glicksman, 1987; Yabur *et al.*, 2007). Επομένως τα αλγινικά οξέα έχουν βρεθεί να βελτιώνουν τις φυσικές συνθήκες του εδάφους (Khan *et al.*, 2009; Illera-Vives *et al.*, 2015). Μέσω της φυσικής χηλικοποίησης τα αλγινικά οξέα δεσμεύονται στα μεταλλικά ιόντα στο έδαφος, σχηματίζοντας σύμπλοκα πολυμερή (λ.χ *υψηλού μοριακού βάρους*) και αυτά τα μόρια απορροφούν την υγρασία και διογκώνονται σαν αποτέλεσμα (Khan *et al.*, 2009; Battacharyya *et al.*, 2015). Όντως αυτά τα διογκωμένα μόρια είναι που αυξάνουν τον εξαερισμό και την ικανότητα συγκράτησης ύδατος (Khan *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2010). Τέλος πέραν των προαναφερθέντων διαδικασιών η παρουσία αλγινικών οξέων στη ριζόσφαιρα τροποποιεί τη δομή του εδάφους για να γίνει ένα πιο συμβατό περιβάλλον για την ανάπτυξη φυτών αλλά και της μικροβιακής δράσης (Battacharyya *et al.*, 2015).

Τέλος αξίζει να αναφερθούν οι επιδράσεις των EAN στην μετρίαση της καταπόνησης εξαιτίας αβιοτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα υπάρχουν μελέτες που κάνουν λόγο για βελτίωση φυτών στην ανοχή λόγω αλατότητας όπως αραβίδοψη, τοματιά (*Solanum lycopersicum*), φρούτα του πάθους

(*Passiflora edulis*) και αβοκάντο (*Persea americana*) (Jithesh *et al.*, 2012; Bonomelli *et al.*, 2018; Di Stasio *et al.*, 2018; Jolinda *et al.*, 2018; Shukla *et al.*, 2018a), λόγω ξηρασίας όπως σόγια (Martyntenko *et al.*, 2016; Shukla *et al.*, 2018b), αραβίδωση, σπανάκι (*Spinacia oleracea*), *Spiraea niponica* και lemonwood (*Pittosporum eugenioides*) (Xu & Leskovar, 2015; Elansary *et al.*, 2016b; Santaniello *et al.*, 2017) και λόγω παγετού σε χειμερινό κριθάρι και αραβίδωση (Burchett *et al.*, 1998; Rayirath *et al.*, 2009) μετά από εφαρμογή διάφορων εμπορικών σκευασμάτων EAN συμπεριλαμβανομένων και του «Acadian®». Ωστόσο στην παρούσα εργασία οι συνθήκες καλλιέργειας των φυταρίων κάνναβης ήταν ελεγχόμενες εντός του θαλάμου ανάπτυξης με ρυθμισμένη θερμοκρασία, σχετική υγρασία και με δυνατότητα εξαερισμού, επομένως δεν υφίστανται ζητήματα ξηρασίας και παγετού. Ως εκ τούτου δεν θα αναφερθούν σχετικές μελέτες με προτεινόμενο MoA καθώς αυτοί οι παράγοντες δεν υπήρξαν στη παρούσα καλλιέργεια κλειστού χώρου. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και με τον παράγοντα της αλατότητας, καθώς το απιονισμένο νερό του ποτίσματος και το εδαφικό υπόστρωμα καλλιέργειας δεν αυξάνουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα του εδάφους, επιφέροντας τυχόν αλατότητα.

Στην **Εικόνα 84** αναφέρονται παραδείγματα με βελτίωση της ανάπτυξης διαφόρων καλλιεργειών με διαφορετικούς MoA μετά από εφαρμογές με EAN.



Εικόνα 84: Τα εκχυλίσματα *Ascophyllum nodosum* (EAN) βελτιώνουν την ανάπτυξη διαφόρων καλλιεργειών με διαφορετικούς τρόπους δράσης (*Mode of Actions*). Πηγή: Shukla *et al.*, (2019).

4.2.2 Η Επέμβαση με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών του βιοδιεγέρτη «Ekorpor 4G» ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα

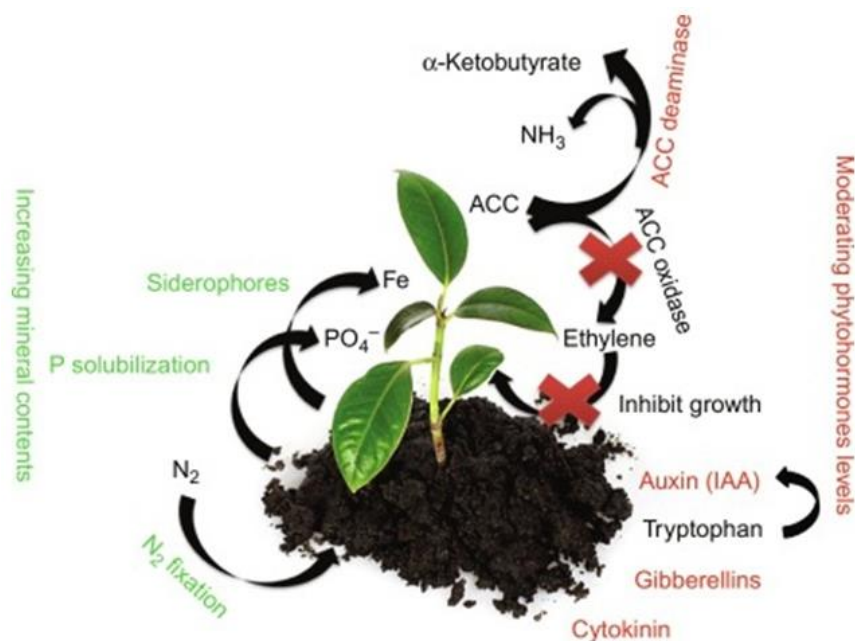
Σύμφωνα με την **Εικόνα 85** η επέμβαση με ωφέλιμους μικροοργανισμούς βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών, συνεπώς και την παραγωγικότητά τους.



Εικόνα 85: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ των φυτών κάναβης μάρτυρα και αυτών που εφαρμόστηκαν σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών από το σκεύασμα βιοδιεγέρτη «Ekorpor 4G». (Α), (Β), (Γ), (Δ) αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά με Ekorpor 4G σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Ε), (ΣΤ), (Ζ), (Η) αριστερά τα φυτά με το Ekorpor 4G και δεξιά του μάρτυρα σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (Θ) στερεοσκοπική φωτογραφία φύλλου κάναβης. (Ι), (ΙΑ), (ΙΒ) αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά με το Ekorpor 4G σε **23 ημέρες ανάπτυξης**.

Υπάρχουν πολλές αναφορές στην επιστημονική βιβλιογραφία που επιδεικνύουν την χρησιμότητα των ωφέλιμων μικροοργανισμών στην ανάπτυξη των φυτών. Όπως και στην προηγούμενη ενότητα θα αναφερθούν οι πιθανοί τρόποι δράσεων (*Mode of Actions*) με βάση τα γένη των ωφέλιμων μικροοργανισμών και πως επιδρούν στην ανάπτυξη των φυτών. Πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι σε μελέτες επίδρασης μικροβιακών βιοδιεγερτών οι μικροοργανισμοί εφαρμόζονται είτε μεμονωμένα σαν είδη και γένη, είτε ως κοινότητα (*symposium*). Αυτό μπορεί έχει διαφορετικό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της προώθησης της ανάπτυξης στα φυτά, καθώς η συνύπαρξη (ή μη) κάποιων μικροοργανισμών δεν εμφανίζει την ίδια συμβατότητα, κάτι που μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα της επίδρασης στις καλλιέργειες. Παρά το γεγονός της αποδεδειγμένης θετικής επίδρασης κάποιων γενών ή ειδών μικροοργανισμών μεμονωμένα, η ταυτόχρονη εφαρμογή τους ενδέχεται να μην επιφέρει την ίδια επιτυχία, ή αντιστρόφως η συνέργειά τους να είναι πιο ευεργετική στα φυτά από ότι η μεμονωμένη προσθήκη.

Ξεκινώντας από τα ριζοβακτήρια προώθησης ανάπτυξης των φυτών (PGPR) τα οποία είναι καλώς αναγνωρισμένα ως υποσχόμενες εισροές για αειφορική γεωργική παραγωγή (Bhattacharyya & Jha, 2012; Gupta *et al.*, 2015, 2021; Backer *et al.*, 2018), υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που καταλήγουν στην προώθηση της ανάπτυξης. Οι έμμεσοι που αφορούν βακτηριακά ερεθίσματα τα οποία αναστέλλουν τη δράση άλλων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, αναλύονται στην ενότητα 4.4.2. Άμεσοι καθορίζονται ως οι μηχανισμοί που εφαρμόζουν αυτά τα βακτηριακά ερεθίσματα τα οποία καταλήγουν στην άμεση προώθηση της φυτικής ανάπτυξης. Μηχανισμοί όπως 1) **παροχή ενισχυμένης θρέψης από ιχνοστοιχεία**, 2) **παραγωγή φυτικών ορμονών** ή 3) **άλλων μορίων που διεγείρουν τη φυτική ανάπτυξη** και 4) τις πρωταρχικές άμυνες ενάντια σε αβιοτικές ή βιοτικές καταπονήσεις (Podile & Kishore, 2006; Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Bhattacharyya & Jha, 2012; Nandal & Hooda, 2013; Vacheron *et al.*, 2013; Ahemad & Kibret, 2014; Yan *et al.*, 2016; Rosier *et al.*, 2018). Εκ των τεσσάρων αυτών μηχανισμών θα αναλυθούν οι τρεις πρώτοι καθώς όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα οι συνθήκες καλλιέργειας της παρούσας εργασίας δεν συνάδουν με stress από καταπόνηση αβιοτικών παραγόντων, ενώ η καταπόνηση από βιοτικούς περιγράφεται στην ενότητα 4.4 (*παράγοντας Rhizoctonia solani*). Στην **Εικόνα 86** αναφέρονται συγκεντρωτικά οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούν τα PGPR για να προωθήσουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών.



Εικόνα 86: Οι μηχανισμοί των ριζοβακτηρίων προώθησης ανάπτυξης των φυτών (*PGPR*) που χρησιμοποιούνται για να προωθήσουν άμεσα την φυτική αύξηση. Πηγή: Kong & Glick, (2017).

Στην ενισχυμένη θρέψη από ιχνοστοιχεία μπορεί να υπάγεται η **διαλυτοποίηση του φωσφόρου** για την περίπτωση καλλιέργειας κάνναβης και όχι η σταθεροποίηση του αζώτου (*nitrogen fixation*) από συμβιωτικά ριζοβακτήρια καθώς αυτά δρουν κυρίως σε ψυχανθή φυτά ή σε καλλιέργειες δημητριακών. Τα βακτήρια διαλυτοποίησης φωσφόρου προμηθεύουν φωσφορικά άλατα με πιο αποδεκτό τρόπο προς τα φυτά, χωρίς να είναι επιβλαβή για το περιβάλλον (Alogi *et al.*, 2017). Ουσιαστικά μετατρέπουν τα αδιάλυτα οργανικά και ανόργανα φωσφορικά άλατα σε μια μορφή που είναι εύκολα προσβάσιμη από τα φυτά (Alogi *et al.*, 2017), ενώ οι περιβαλλοντικές συνθήκες, οι συνθήκες του εδάφους και των φυτών καθώς και τα βακτηριακά ερεθίσματα επηρεάζουν τις δράσεις των διαλυτοποιητών βακτηρίων φωσφόρου (Gupta *et al.*, 2015). Σύμφωνα με τους Banerjee *et al.*, (2006) οι πιο ισχυροί διαλυτοποιητές φωσφόρου προέρχονται από τα γένη *Rhizobium*, *Bacillus* και *Pseudomonas* εκ των οποίων τα τελευταία περιλαμβάνονται στο εμπορικό σκεύασμα βιοδιεγέρτη Ekorpor 4G της παρούσας εργασίας. Σαν **MoA** η βασική αρχή της διαλυτοποίησης ανόργανου φωσφόρου είναι η **χρήση ενώσεων που διαλύουν ιχνοστοιχεία μορφής ορυκτών**, όπως ιόντα υδροξυλίου, οργανικά οξέα, πρωτόνια, σιδηροφόρους και διοξειδίου του άνθρακα (Rodriguez & Fraga, 1999). Τα οργανικά οξέα που παράγονται μαζί με τα καρβοξυλικά και υδροξυλικά ιόντα χηλιώνουν τα κατιόντα ή μειώνουν το pH καταλήγοντας στην απελευθέρωση των φωσφορικών αλάτων (Khosro 2012). Τα οργανικά οξέα που είναι είτε γλουκονικά είτε κετο γλουκονικά οξέα παράγονται και εκκρίνονται από διαλυτοποιητικά βακτήρια φωσφόρου οδηγώντας στην οξινοποίηση των μικροβιακών κυττάρων και των

περιβάλλοντων χώρων τους. Ως εκ τούτου τα φωσφορικά ιόντα απελευθερώνονται. Το μειωμένο pH προκύπτει από την παραγωγή απελευθέρωσης πρωτονίων/διπτανθρακικών και ανταλλαγών αερίων «O₂/CO₂» (Sharma *et al.*, 2017). Συνεπώς το pH της ριζόσφαιρας και της διαθεσιμότητας του φωσφόρου συνδέονται αντιστρόφως. Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι οι Zaidi *et al.*, (2009) δημοσίευσαν ότι το χαρακτηριστικό είδος PGPR *Bacillus subtilis* του γένους **Bacillus**, σχετίζεται άμεσα με την διαλυτοποίηση του φωσφόρου και εκθέτει συνεργιστική δράση με δένδροειδείς μυκορριζικούς μύκητες στη ριζόσφαιρα μαρουλιού (Kohler *et al.*, 2007).

Από τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς που συμβάλλουν στην ενισχυμένη θρέψη των φυτών, δεν θα μπορούσαν να αποτελέσουν εξαίρεση και οι μυκορριζικοί μύκητες οι οποίοι θεωρούνται κρίσιμα μέλη του φυτικού μικροβιώματος, ενισχύοντας την πρόσβαση των φυτών σε θρεπτικά συστατικά και νερό (van der Heijden *et al.*, 2015). Αυτοί οι μύκητες σχηματίζουν συμβίωση με τις ρίζες των περισσότερων φυτών παγκοσμίως (Tedersoo, 2017). Οπότε οι μυκορριζικοί μύκητες όπως οι δένδροειδείς του γένους **Glomus** εμπλέκονται και σε στρατηγικές αποκόμισης φωσφόρου (Read & Perez-Moreno, 2003; Jansa *et al.*, 2011; Bunn *et al.*, 2019). Πράγματι η ικανότητα των δένδροειδών μυκορριζικών μυκήτων να προωθούν την ανάπτυξη και την απόδοση των φυτών, αλλά και να ενισχύουν την απορρόφηση φωσφόρου, έχει τεκμηριωθεί σε βέλτιστο βαθμό (Nadeem *et al.*, 2014; ;Brundrett & Tedersoo, 2018; Etesami, 2020).

Ένας άλλος πιθανός παράγοντας αυξημένης ανάπτυξης των φυτών κάνναβης στη παρούσα εργασία από την προσθήκη ωφέλιμων οργανισμών όπως ριζοβακτηρίων είναι η **δέσμευση του σιδήρου από βακτηριακούς σιδηροφόρους μέσω παραγωγής τους ως MoA**. Οι σιδηροφόροι είναι μικρά πεπτιδικά μόρια που έχουν πλευρικές αλυσίδες και λειτουργικές ομάδες στις οποίες τα ιόντα σιδήρου μπορούν να δεσμευτούν (Goswami *et al.*, 2016). Αποτελούν χηλιωτές σιδήρου που εξυπηρετούν ως μεταφορείς σιδήρου και έχουν μια υψηλή τάση πρόσδεσης σε κάποια σύμπλοκα. Μάλιστα ένας μεγάλος αριθμός εξ αυτών έχουν προβληθεί και χρησιμοποιηθεί από μικρόβια και μπορεί να είναι εξειδικευμένα βάσει είδους (Sandy & Butler, 2009). Επομένως οι **σιδηροφόροι συνειφέρουν στη θρέψη του φυτού με σίδηρο** (Scavino & Pedrasa, 2013). Παραδείγματα ριζοβακτηρίων παραγωγής σιδηροφόρων αποτελούν τα γένη που εμπεριέχονταν στο σκεύασμα Ekorpor 4G της παρούσας εργασίας, **Pseudomonas** (Sharma & Johri, 2003; Cornelis & Dingemans, 2013; Bonneau *et al.*, 2020; Ghazy & El-Nahrawy, 2021) **Bacillus** (Yu *et al.*, 2011; Rizzi *et al.*, 2019; Ghazy & El-Nahrawy, 2021), **Streptomyces** (Schutze *et al.*, 2015), (Armin *et al.*, 2021) όπου στελέχη της επέδειξαν σημαντική αύξηση στη βλάστηση και φυτική ανάπτυξη. Επιπλέον για την περίπτωση μυκήτων στο Ekorpor 4G υπήρξε μελέτη για αναφορά της ουσίας glomuferrin ως πιθανό σιδηροφόρο μόριο που παράγει ο μυκορριζικός μύκητας του γένους **Glomus** (Winkelmann, 2017), ενώ οι Vinale *et al.*, (2013)

ανέφεραν το hardianic acid ως καινοτόμο σιδηροφόρο μόριο προερχόμενο από το *Trichoderma harzianum* και οι Zhao *et al.*, (2020) ανέφεραν την επίδραση σιδηροφόρων από το *T. asperellum* στην ενδογενή αυξίνη του *A. thaliana* υπό συνθήκες καταπόνησης ανεπάρκειας σιδήρου, είδη μυκήτων από το γένος ***Trichoderma***.

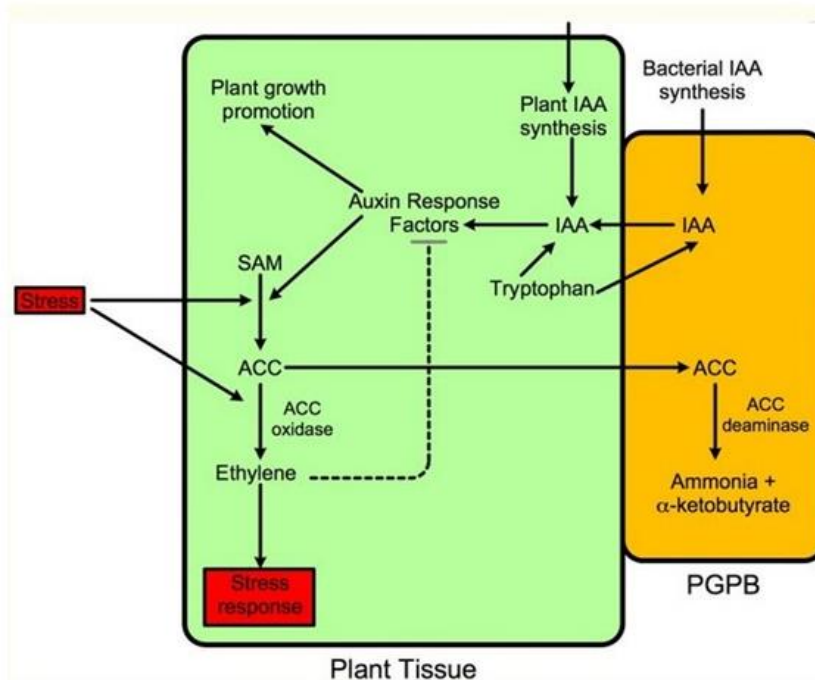
Επιπλέον βασικότατος παράγοντας ενίσχυσης ανάπτυξης φυτών από PGPR είναι η παραγωγή φυτοορμονών όπως **αυξίνες, κυτοκινίνες, γιββερελλίνες, ένζυμα ACC deaminase** και άλλες μεταβολικά ενεργές ενώσεις (Olanrewaju *et al.*, 2017). Η ικανότητα παραγωγής αυξινών αποτελεί τον πιο σύνθητη μηχανισμό που χρησιμοποιείται κυρίως για να εξηγήσει τις θετικές επιδράσεις των PGPR στην ανάπτυξη των φυτών. Οι Patten & Glick, (1996) ανέφεραν ότι περίπου το 80% των ριζοσφαιρικών μικροβίων θα μπορούσε να συνθέσει και να απελευθερώσει αυξίνη ως δευτερογενή μεταβολίτη. Είναι αρκετές οι γνωστές αυξίνες που υφίστανται στη φύση με την πιο σχετική να είναι το ινδολ-3-αιθανικό οξύ (IAA) (Spraegen *et al.*, 2007b) και συχνά στη βιβλιογραφία η αυξίνη «ανταλλάσσεται» με το IAA. Ο **MoA** των αυξινών είναι ο **γεωτροπισμός και φωτοτροπισμός, η διαφοροποίηση αγγειακών ιστών, κυριαρχία του ακραίου οφθαλμού, έναρξη της ρίζας (πλευρική και τυχαία), κυτταρική διαίρεση και επιμήκυνση ρίζας και βλαστού** (Grobelač *et al.*, 2015). Πράγματι οι ριζοβακτηριακές αλλαγές σε IAA αλλάζουν τις δεξαμενές των φυτών σε αυξίνες, αυξάνοντας τελικά τα επίπεδα εκκριμάτων που είναι διαθέσιμα για απορρόφηση από τα φυτά σύμφωνα με τους Ali *et al.*, (2010). Παραδείγματα παραγωγής αυξινών αποτέλεσε η εφαρμογή με *P. fluorescens* σε αραβόσιτο (Benizri *et al.*, 1997) και με *P. syringae* σε αραβίδοψη (Zhang *et al.*, 2007) από το γένος ***Pseudomonas***. Επίσης και μικροοργανισμοί από το γένος ***Bacillus*** διεγείρουν την σύνθεση αυξινών όπως IAA (Shao *et al.*, 2015).

Οι κυτοκινίνες κατανέμονται τακτικά σε άλγες, βακτήρια και ανώτερα φυτά, ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες διαθέσιμες για τον ρόλο των βακτηρίων που παράγουν κυτοκινίνες. Οι πιο γνωστές που σχηματίζονται στα φυτά είναι οι zeatins οι οποίες απομονώθηκαν πρωτίστως από τον αραβόσιτο (*Zea mays*) (Schafer *et al.*, 2015). Σαν **MoA** οι κυτοκινίνες **ρυθμίζουν την κυριαρχία του ακραίου οφθαλμού, κυτταρική διαίρεση, επιμήκυνση ρίζας, βλάστηση σπόρου, διαφοροποίηση του ξυλώματος και των χλωροπλαστών, ανάπτυξη άνθους και καρπού, σηματοδότηση θρεπτικών συστατικών, γήρανση φύλλων** και αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων (Sakakibara 2006). Η έκφραση γονιδίων κυτοκινίνων είναι σχετικά παρούσα σε διάφορα PGPR και η προσθήκη τους σε αναπτυσσόμενα φυτά μπορεί να αλλάξει ευρέως τη σύσταση φυτοορμονών του φυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ότι ο εμβολιασμός μαρουλιού (*Lactuca sativa*) με *Bacillus subtilis* (γένος ***Bacillus***) αύξησε το περιεχόμενο κυτοκινίνων και την ανάπτυξη των φυτών (Arkhipova *et al.*, 2005) και βάσει αυτών των πειραμάτων, φάνηκε ότι οι κυτοκινίνες εκτελούν την καθυστέρηση της γήρανσης μέσω της συσσώρευσης χλωροφύλλης, τον σχηματισμό

κυτταρικών ιστών, ανάπτυξη της ρίζας, επιμήκυνση και σχηματισμό τριχών, έναρξη μίσχων και διεύρυνση των φύλλων (Sakakibara 2006). Άλλες μελέτες περιλάμβαναν πάλι παραγωγή κυτοκινίνων από στέλεχος *Bacillus subtilis* σε σπύρι (Kudoyarova *et al.*, 2014), αλλά και από το γένος ***Pseudomonas*** με εμβολιασμό *P. fluorescens* σε φυτά αραβίδοψης (Großkinsky *et al.*, 2016) και *Pseudomonas* sp. στα γένη μηλοειδών *Pyrus* και *Malus* (Kapoor & Kaur, 2016). Επιπλέον υπήρξαν και αναφορές για παραγωγή κυτοκινίνων και από το γένος *Streptomyces* (Joshi *et al.*, 2007; Amaresan *et al.*, 2018). Όσο για τη παραγωγή κυτοκινίνων από ωφέλιμους μύκητες υπάρχουν αναφορές για μυκόρριζες του γένους ***Glomus*** σε *Catharanthus roseus* (Ratti *et al.*, 2010) και για ***Trichoderma*** σε εμβολιασμένα σπορόφυτα αραβίδοψης (Bean *et al.*, 2021).

Όσον αφορά τη παραγωγή ενζύμων 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό παράγοντα επίδρασης στην ανάπτυξη των φυτών κάνναβης στη παρούσα εργασία. Σαν **MoA** η ύπαρξη αυτού του ενζύμου σε PGPR είναι υπεύθυνη για την **εκκαθάριση της πρόδρομης ένωσης σύνθεσης του αιθυλενίου, ACC σε αμμωνία και α-ketobutyrate (Εικόνα 87)** (Honma & Shimomura, 1978). Έπειτα με την μείωση των επιπέδων ACC στα φυτά (Glick *et al.*, 1998, 2007) δεν παρατηρούνται σε αυτά δυσμενείς επιδράσεις όπως αναστολή της ανάπτυξής τους ή θάνατο όταν τα επίπεδα ACC βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης ένα άλλο δεδομένο αποτελεί ότι η αύξηση των επιπέδων ACC (και κατ' επέκταση αιθυλενίου) στα φυτά, τυγχάνει όταν το φυτό επέλθει σε καταστάσεις καταπόνησης λόγω δυσμενών συνθηκών όπως παρουσίας μετάλλων, ακραίων θερμοκρασιών, χημικών, έλλειψης ή περίσσειας ύδατος, υπεριώδες φως, ζημιάς από έντομα και νηματώδεις, προσβολών από μυκητιακά ή βακτηριακά παθογόνα, όσο και μηχανικής πληγής (Barnawal *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2014). Επομένως το ένζυμο ACC deaminase βοηθά σημαντικά στη μείωση των παραγόντων που επάγουν stress και υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν την επίδραση τέτοιων PGPR στη μετρίαση των δυσμενών επιπτώσεων του αυξημένου αιθυλενίου λόγω καταπόνησης ξηρασίας (Dansih *et al.*, 2019, 2020a,b), τοξικότητας βαρέων μετάλλων (Danish *et al.*, 2019; Zafar *et al.*, 2020), περίσσειας ύδατος (Mayak & Glick, 2004). Παρόλο που στην παρούσα μελέτη δεν υπάρχουν οι δυσμενείς συνθήκες καταπόνησης για τα φυτά λόγω ελεγχόμενων κλιματολογικών και εδαφολογικών συνθηκών, η δημοσιευμένη έρευνα του El-Tarabily, (2008) ανέφερε προώθηση ανάπτυξης σε τοματά μέσω εμβολιασμού με PGPR του γένους ***Streptomyces*** όπως *S. filipinensis* και *S. atrovirens* ως ριζοβακτήρια επαρκούς ικανότητας παραγωγής ACC deaminase, καταγράφοντας μείωση των ενδογενών επιπέδων ACC (και ταυτόχρονα αύξηση των επιπέδων IAA από το πρώτο) και μάλιστα υπό ευνοϊκές γνοτοβιοτικές συνθήκες ανάπτυξης σε θερμοκήπιο που δεν άρμοζαν σε πρόκληση καταπόνησης εκ των φυτών. Συνεπώς βάσει αυτής της αναφοράς, η βελτιωμένη ανάπτυξη των φυταρίων κάνναβης στη παρούσα μελέτη μπορεί

υποθετικά να οφείλεται (και) στην ικανότητα του γένους *Streptomyces* (παρόν στο *Εκορπορ 4G*) για παραγωγή του ενζύμου.



Εικόνα 87: Σχηματική αναπαράσταση της διέγερσης της φυτικής ανάπτυξης από PGPR που περιέχουν ACC deaminase. Η καταπόνηση αυξάνει ταυτόχρονα τη σύνθεση αυξίνης IAA και αιθυλενίου εντός του φυτού και μειώνοντας εν τέλει την φυτική ανάπτυξη. Με τα στελέχη PGPR που περιέχουν την ACC deaminase, τα επίπεδα αιθυλενίου μειώνονται και συνεπώς ανακουφίζοντας κάποια από την αναστολή της ανάπτυξης που προκλήθηκε από τα αυξημένα επίπεδα αιθυλενίου. Αυτό επιτρέπει στο βακτηριακό IAA να συνεχίσει να προωθεί τη φυτική ανάπτυξη. Συνεπώς τα PGPR που παράγουν ταυτόχρονα IAA και ACC deaminase χαμηλώνουν την έκταση του μεγάλου εύρους των περιβαλλοντικών καταπονήσεων που αναστέλουν τη φυτική ανάπτυξη. SAM S-adenosyl-methionine. Αυτά τα PGPR προστατεύουν τα φυτά ενάντια σε κατασταλτικές επιδράσεις των επαγόμενων από αιθυλένιο καταπονήσεων που περιλαμβάνουν ξηρασία, κατάκλιση με νερό, ακραίες θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα, μεταλλικούς και οργανικούς επιμολυντές, θήρευση από έντομα και νηματώδεις και βακτηριακά φυτοπαθογόνα. Πηγή: Olanrewaju *et al.*, (2017).

Οι γιββερελλίνες (GA) είναι γνωστές για τη διέγερση αύξησης και ενεργοποίηση σημαντικών διεργασιών ανάπτυξης συμπεριλαμβανομένων και της επιμήκυνσης βλαστών, βλάστησης σπόρου, άνθησης, καθορισμού του καρπού (Zaidi *et al.*, 2015), βελτίωσης ρυθμού φωτοσύνθεσης (Khan *et al.*, 2015) και περιεχομένου χλωροφύλλης (You *et al.*, 2012). Επιπλέον μαζί με άλλες φυτοορμόνες αποτελούν μετατροπείς σημάτων διεγέρτη. Ωστόσο παρά την τεράστια αφθονία των διαφορετικών GA, δεν είναι γνωστή η βιολογική δράση και ο ρόλος αυτών των μορίων. Η παραγωγή GA που έχει παρατηρηθεί σε PGPR ανήκει σε κάποια γένη, μεταξύ και των οποίων τα *Bacillus* (Deka *et al.*, 2015), *Pseudomonas* (Kang *et al.*, 2014; Pandya & Desai, 2014) και στο στέλεχος *Streptomyces* sp. IA1, το οποίο απομονώθηκε από γεωργικό έδαφος και αύξησε την ανάπτυξη σε τομάτα (Goudjal *et al.*,

2016) και σε αγγούρι (*Cucumis sativus*) (Toumatia *et al.*, 2016), δεδομένα που κατατάσσουν το υπάρχον Ekorpor 4G υποψήφιο για αύξηση GA στα φυτάρια κάνναβης της παρούσας εργασίας. Όπως και στη περίπτωση των κυτοκινίνων οι περισσότεροι ρόλοι λειτουργίας που αποδίδονται σε βακτηριακώς παραγόμενες GA για την ανάπτυξη των φυτών οφείλονται στην ανταπόκριση του φυτού σε εξωγενή προσθήκη καθαρών GA σε αναπτυσσόμενα φυτά. Επιπροσθέτως ενώ τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των GA στα φυτά και μύκητες είναι γνωστά, δεν μπορεί να ειπωθεί το ίδιο και για τα βακτήρια. Σαν **MoA** μπορεί να αποδοθεί η **επαγωγή αύξησης και ανάπτυξης βλαστών** και επίσης η **αναστολή της ριζικής ανάπτυξης μέσω των δράσεων του σηματοδοτικού συστήματος GA, τον καταστολέα DELLA ο οποίος ενεργοποιεί γονίδια επαγωγής GA** (Minguet *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2016; Nelson & Steber, 2016).

Όλες οι παραπάνω μελέτες με την επίδραση ωφέλιμων μικροοργανισμών στις αυξημένες αποδόσεις των φυτών σχετίστηκαν με αυξημένο ποσοστό βλάστησης (Gholami *et al.*, 2009), ζωηρότητας σποροφύτων (Bharathi *et al.*, 2004), αύξησης ρίζας και βλαστού και συνολικής παραγωγής βιομάζας (van Loon *et al.*, 1998), ωστόσο αφορούν διαφορετικά φυτά αντί κάνναβης όπως στην παρούσα εργασία. Σε αυτήν τη περίπτωση υπάρχει γενικά μια έλλειψη δεδομένων σχετικά με την χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών και μάλιστα για PGPR λόγω των προηγούμενων νομοθετικών περιορισμών στην παραγωγή αυτής της καλλιέργειας. Παρόλα αυτά υπάρχουν δύο δημοσιεύσεις που αναφέρουν δεδομένα τα οποία αφορούν τα οφέλη από εμβολιασμό με PGPR στην ανάπτυξη και απόδοση βιομηχανικής και φαρμακευτικής κάνναβης και δεν περιελάμβαναν μικροοργανισμούς από γένη που εμπεριέχονται στο σκεύασμα Ekorpor 4G της παρούσας εργασίας, ως εκ τούτου η παρούσα διπλωματική είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει αυξημένη ανάπτυξη φυταρίων κάνναβης, στα οποία εφαρμόστηκε σκεύασμα βιοδιεγέρτη με τα γένη PGPR *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* και τα γένη μυκήτων *Glomus* και *Trichoderma* συνδυαστικά.

Οι Pagnani *et al.*, (2018) έδειξαν ότι μια κοινότητα PGPR (*Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia ambifaria* και *Herbaspirillum seropedicae*) βελτίωσε την ανάπτυξη και τη φυσιολογική κατάσταση φυτών βιομηχανικής κάνναβης με αυξημένη συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών και αντιοξειδωτική δράση. Οι Conant *et al.*, (2017) επέδειξαν ότι το προϊόν μικροβιακού βιοδιεγέρτη «Mammoth P™» αποτελούμενο από τη συνεργιστική κοινότητα (*consortium*) των *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Conamonas testosteroni* και *Pseudomonas putida*, προήγαγε την ανάπτυξη κάνναβης στο στάδιο της άνθησης αλλά δεν ανέφερε επιδράσεις στην συγκέντρωση των κανναβινοειδών. Πάντως προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με PGPR τροποποιεί την συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών σε άλλα φυτικά είδη (Kim *et al.*, 2011; Vacheron *et al.*, 2013; Braga *et al.*, 2016; Mishra *et al.*, 2018), κάτι που υποθέτει ότι ο εμβολιασμός με PGPR θα αλλάξει τα επίπεδα

κανναβινοειδών/σύσταση στη κάνναβη. Ωστόσο αυτό θα είναι συνάρτηση παραγόντων όπως τα χρονικά σημεία ανάλυσης βάσει σταδίου ανάπτυξης του φυτού, ηλικίας, κλιματολογικών συνθηκών, καταστάσεων (ή μη) καταπόνησης λόγω αβιοτικών και βιοτικών παραγόντων. Και επιπλέον πρέπει να καθοριστεί και η επίδραση των PGPR στην απόδοση της κάνναβης και στη βιοσύνθεση και συσσώρευση των κανναβινοειδών σε συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς ή όργανα και ασφαλώς στα διάφορα στάδια ανάπτυξης.

4.2.3 Η επέμβαση με biochar σφενδάμου ευνόησε την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα

Σύμφωνα με την **Εικόνα 88** η επέμβαση με biochar κορμού σφενδάμου βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών, συνεπώς και την παραγωγικότητά τους.



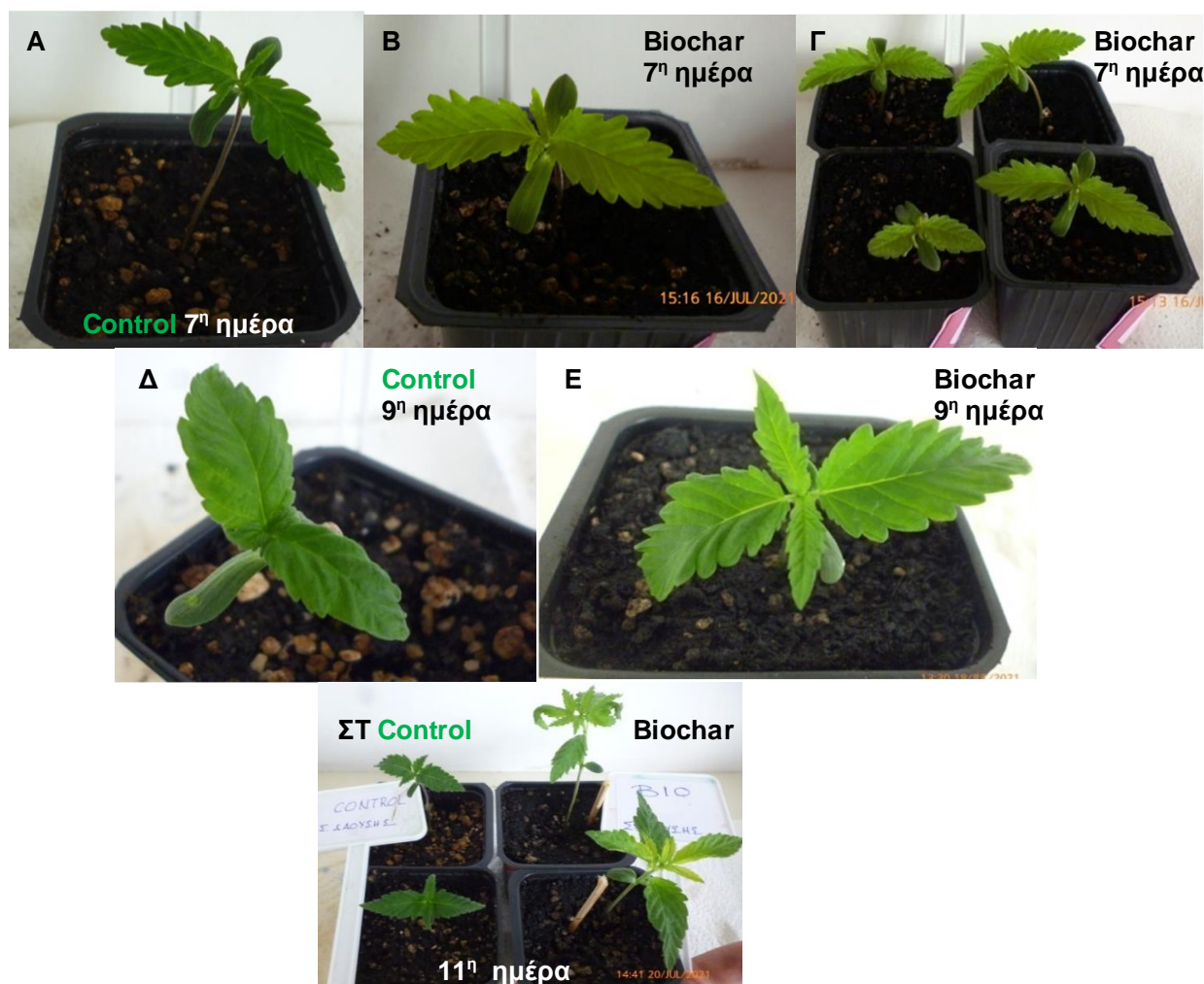
Εικόνα 88: Φαινοτυπικές διαφορές φυτών κάνναβης μάρτυρα σε σχέση με αυτών που εφαρμόστηκε το biochar σφενδάμου. (Α), (Β), (Γ), αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά με το biochar σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Δ), (Ε), (ΣΤ), (Ζ), αριστερά τα φυτά με το biochar και δεξιά του μάρτυρα σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (Η), (Θ), (Ι), (ΙΑ) αριστερά τα φυτά μάρτυρα και δεξιά με το biochar σε **23 ημέρες ανάπτυξης**. (ΙΒ) στερεοσκοπική φωτογραφία φύλλου κάνναβης.

Τα οφέλη που προσφέρει γενικά η χρήση biochar στα φυτά όπως παροχή πλούσιας πηγής άνθρακα και αζώτου (Morreno Bariga, 2016), αύξηση της φωτοσύνθεσης (Nguyen *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2020), αύξηση γονιμότητας εδάφους λόγω μείωσης οξύτητας (Lin *et al.*, 2018), αύξησης ικανότητας ανταλλαγής κατιόντων (I.A.K.) (Riawan *et al.*, 2016), αύξησης διαθεσιμότητας θρεπτικών στοιχείων (Gao *et al.*, 2016), αύξησης απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων (Ge *et al.*, 2019) και μεγαλύτερης ικανότητας συγκράτησης ύδατος ακόμα και σε εδάφη που η κλάση τους επιτρέπει χαμηλή ικανότητα συγκράτησης (Yu *et al.*, 2013), δικαιολογούν την καλύτερη ανάπτυξη των φυταρίων κάνναβης στη παρούσα εργασία.

Ωστόσο σε σύγκριση με μια μελέτη αξιολόγησης μεμονωμένης/ταυτόχρονης εφαρμογής biochar (προερχόμενο από λιγνινο-κυτταρινική βιομάζα) και «πράσινων αποβλήτων» (προερχόμενων από φυτικά υπολείμματα της ποικιλίας βιομηχανικής κάνναβης «Finola») τύπου compost σε εδάφη της Bologna Ιταλίας ως προς την απόδοση ανάπτυξης φυτών βιομηχανικής κάνναβης ανοιχτής καλλιέργειας (Santunionea *et al.*, 2020) τα αποτελέσματα είναι κάπως ανιπατικά. Σε αυτή την μελέτη αναφέρθηκε ότι τα φυτά του μάρτυρα χωρίς προσθήκη biochar ή συνδυασμού του με τα πράσινα απόβλητα, είχαν καλύτερη απόδοση από άποψη παραγωγής φυτικής και ανθικής βιομάζας, αν και η ανάλυση περιεκτικότητας κανναβινοειδών CBD και THC έδειξε αύξηση από 18,2-25% στα φυτά με biochar και συνεφαρμογής biochar με πράσινα απόβλητα σε σχέση με του μάρτυρα. Όσον αφορά την μειωμένη απόδοση βιομάζας των φυτών οι συγγραφείς το απέδωσαν στην συνεχή υγρή κατάσταση κατά την οποία περιήλθαν τα εδάφη καλλιέργειας λόγω του τακτικού και καθημερινού ποτίσματος όλων των φυτών στις ίδιες ποσότητες, με τα εδάφη προσθήκης biochar, biochar και πράσινων αποβλήτων να διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης ύδατος σε σχέση με τα αμεταχειρίστα εδάφη (μάρτυρα). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα εδάφη προσθήκης biochar ή/και πράσινων αποβλήτων να είναι μονίμως υγρά δημιουργώντας ζητήματα περίσσειας ύδατος με αποτέλεσμα η διατήρηση της ισορροπίας στην υγεία μεταξύ οξυγόνου, ύδατος και ριζικής ανταλλαγής αερίων στο έδαφος να μην είναι ίδια σε σχέση με του μάρτυρα και να απαιτούνταν λιγότερο νερό για αυτή την ισορροπία.

Συγκρίνοντας αυτά τα δεδομένα με τα φυτάρια της παρούσας εργασίας, πράγματι όταν τα φυτά βρίσκονταν σε αρχικά στάδια ανάπτυξης από το τέλος της πρώτης εβδομάδας έως την 11η περίπου ημέρα, εμφάνισαν σημάδια χλώρωσης σε σχέση με του μάρτυρα (Εικόνες 88 A, B, 89), τα οποία βελτιώθηκαν σταδιακά και εξαλείφθηκαν κατά τη δεύτερη εβδομάδα ανάπτυξης. Το γεγονός ότι τα φυτάρια ήταν ακόμα νεαρά στο στάδιο ανάπτυξης, δεν είχαν αναπτύξει το ριζικό τους σύστημα για να μπορούν να απορροφούν όλη τη ποσότητα ύδατος που τους χορηγούνταν κάθε δεύτερη ημέρα και έτσι το νερό συγκρατούνταν στο εδαφικό υπόστρωμα λόγω παρουσίας του biochar, με αποτέλεσμα τα υποστρώματα να παραμένουν μονίμως υγρά. Πράγματι οι συνθήκες έλλειψης οξυγόνου επηρεάζουν την

υγεία του φυτού καθώς μειώνεται η μεταβολική δραστηριότητα των φυτών από άποψη κατάστασης κυτταρικής ενέργειας, διότι με πτωτικές συγκεντρώσεις οξυγόνου εντός των κυττάρων η παραγωγή του ATP μέσω της αναπνοής μειώνεται και ως εκ τούτου υποχωρεί ραγδαία και η κατάσταση ενέργειας (Faix, 2017). Έπειτα η χλώρωση στα φύλλα είναι το πιο κοινό σύμπτωμα υπερ-άρδευσης φυτών (Drew & Sisworo, 1977; Schuster, 2022). Από τα τέλη της δεύτερης εβδομάδας που τα φυτά είχαν αναπτύξει μεγαλύτερων διαστάσεων ριζικό σύστημα, η υγρασία που παρέμενε στο υπόστρωμα μειώνονταν σταδιακά με την απορρόφηση του ύδατος από το ριζικό σύστημα και έτσι το υπόστρωμα ερχόταν σε μια πιο ξηρή κατάσταση μέχρι την επόμενη προσθήκη ύδατος. Ως αποτέλεσμα τα συμπτώματα χλώρωσης βελτιώθηκαν και με την πάροδο των ημερών καλλιέργειας εξαλείφθηκαν (Εικόνες 88 Δ-ΙΑ, 89 ΣΤ).



Εικόνα 89: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φυτών κάνναβης μάρτυρα και αυτών που προστέθηκ ε biochar κατά το χρονικό διάστημα ανάπτυξης τέλους 1ης εβδομάδας έως μέσου της 2ης. (Α) φυτά μάρτυρα 7 ημερών ανάπτυξης δίχως χλώρωση φύλλων. (Β), (Γ), φυτά με biochar 7 ημερών ανάπτυξης με συμπτώματα χλώρωσης φύλλων. (Δ) φυτά μάρτυρα 9 ημερών ανάπτυξης δίχως χλώρωση φύλλων. (Ε) φυτά με biochar 7 ημερών ανάπτυξης με συμπτώματα χλώρωσης φύλλων. (ΣΤ) αριστερά φυτά μάρτυρα χωρίς χλώρωση φύλλων και δεξιά με biochar με χλώρωση φύλλων σε 11 ημέρες ανάπτυξης.

4.2.4 Οι επεμβάσεις με εκχυλίσμα *Ascophyllum nodosum* και σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών δίνουν παρόμοιους φαινοτύπους

Σύμφωνα με την **Εικόνα 90** οι επεμβάσεις με τα σκευάσματα βιοδιεγερτών Acadian και Ekorpor 4G παρουσιάζουν παρόμοια ανάπτυξη φυταρίων.



Εικόνα 90: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φυτών κάναβης επέμβασης του σκευάσματος «Ekorpor 4G» και αυτών που εφαρμόστηκε το σκεύασμα «Acadian». (Α), (Β), (Γ), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Ekorpor 4G και δεξιά με Acadian σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Δ), (Ε), (ΣΤ), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Ekorpor 4G και δεξιά με Acadian σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (Ζ), (Η), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Ekorpor 4G και δεξιά με Acadian σε **23 ημέρες ανάπτυξης**.

4.2.5 Οι επεμβάσεις με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών και biochar δίνουν παρεμφερείς φαινότυπους τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας

Σύμφωνα με την **Εικόνα 91** οι επεμβάσεις με Ekorpor 4G και biochar δίνουν φυτάρια παρόμοιας ανάπτυξης στο τέλος της καλλιέργειας. Μικρή εξαίρεση τα συμπτώματα χλώρωσης στα φύλλα των φυτών προσθήκης biochar σε ένα εύρος χρονικού διαστήματος τα οποία βελτιώθηκαν και εξαλείφθηκαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.3.



Εικόνα 91: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φυτών κάνναβης επέμβασης του σκευάσματος «Ekorpor 4G» και αυτών που εφαρμόστηκε το biochar. (Α), (Β), (Γ), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Ekorpor 4G και δεξιά με biochar σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Δ), (Ε), αριστερά τα φυτά επέμβασης με το Ekorpor 4G και δεξιά με biochar σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (ΣΤ), (Ζ), (Η), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Ekorpor 4G και δεξιά με biochar σε **23 ημέρες ανάπτυξης**.

4.2.6 Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα *Ascorphyllum nodosum* και biochar δίνουν παρεμφερείς φαινότυπους τις τελευταίες ημέρες καλλιέργειας

Σύμφωνα με την **Εικόνα 92** οι επεμβάσεις με Acadian και biochar δίνουν φυτάρια παρόμοιας ανάπτυξης στο τέλος της καλλιέργειας. Μικρή εξαίρεση τα συμπτώματα χλώρωσης στα φύλλα των φυτών προσθήκης biochar σε ένα εύρος χρονικού διαστήματος τα οποία βελτιώθηκαν (ενότητα 4.2.3).



Εικόνα 92: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φυτών κάνναβης επέμβασης του σκευάσματος «Acadian» και αυτών που εφαρμόστηκε το biochar. (Α), (Β), (Γ), αριστερά τα φυτά επέμβασης με biochar και δεξιά με Εκορπορ 4G σε **11 ημέρες ανάπτυξης**. (Δ), (Ε), (ΣΤ) αριστερά τα φυτά επέμβασης με biochar και δεξιά με το Εκορπορ 4G σε **18 ημέρες ανάπτυξης**. (Ζ), (Η), αριστερά τα φυτά επέμβασης με Acadian και δεξιά με biochar σε **23 ημέρες ανάπτυξης**

4.2.7 Επισκόπηση όλων των επεμβάσεων στα φυτά κάνναβης

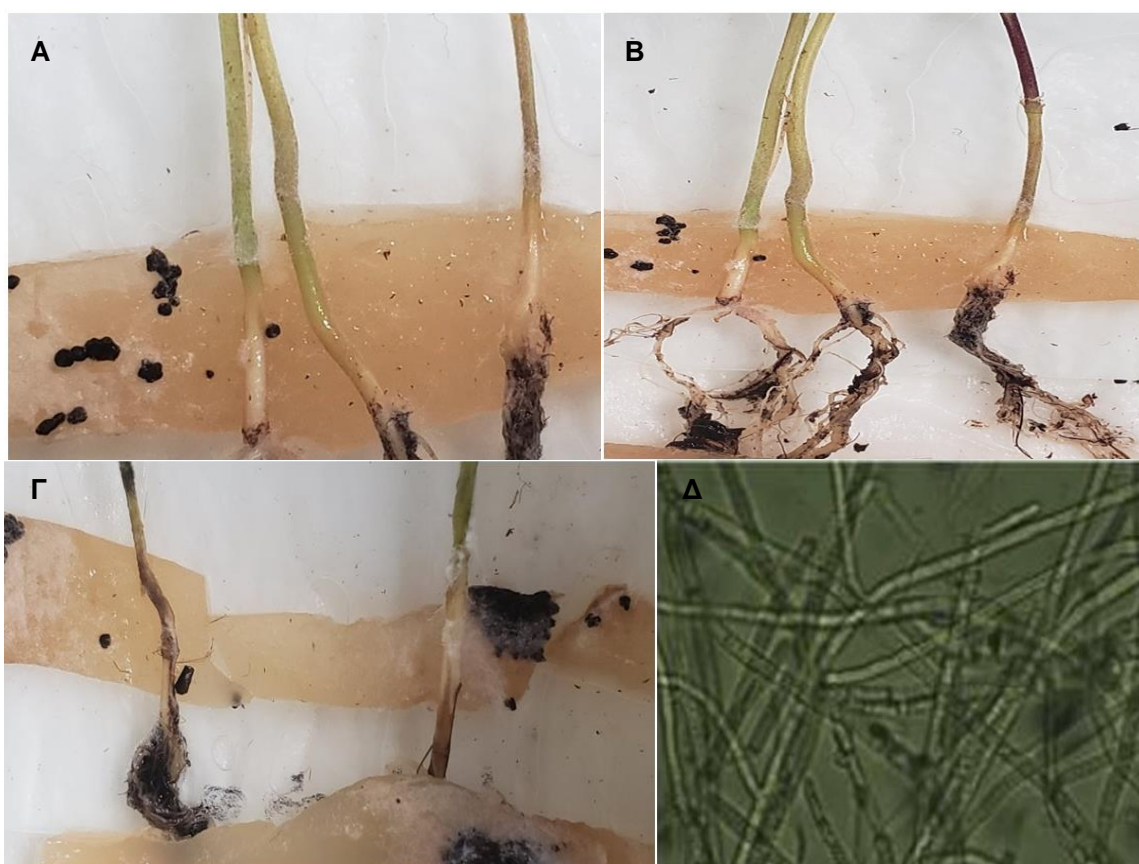
Στην **Εικόνα 93** παρουσιάζονται τα φυτά κάνναβης με όλες τις επεμβάσεις (*Acadian*, *Ekorpor 4G*, *biochar*) σε σχέση με του μάρτυρα (απιονισμένο νερό).



Εικόνα 93: Φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ φυτών κάνναβης για κάθε επέμβαση (ACA με εκχύλισμα *Ascorphyllum nodosum*, EKO με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών, BIO με *biochar* σφενδάμου και Control με απιονισμένο νερό). (Α), (Β) τα φυτά όλων των επεμβάσεων σε 13 ημέρες ανάπτυξης, (Γ), (Δ) σε 18 ημέρες ανάπτυξης, (Ε), (ΣΤ) σε 23 ημέρες ανάπτυξης, (Ζ) σε 24 ημέρες ανάπτυξης όπου αποτελεί και την ημέρα συγκομιδής των φύλλων. Στις εικόνες Α, Β, Γ και Δ υπάρχει η ένδειξη «VAL» ως μελλοντική επέμβαση με τη μυκητοκτόνο δραστική ουσία *validamycin* η οποία δεν εφαρμόστηκε εν τέλει και συνεπώς δεν συμπεριλήφθηκε στη παρούσα εργασία με αποτέλεσμα τα συγκεκριμένα φυτά να παρουσιάζουν τον ίδιο φαινότυπο με του μάρτυρα (*control*).

4.3 Ο εδαφογενής μύκητας *Rhizoctonia solani* AG1-IC μόλυνε τα φυτάρια κάνναβης υπό εργαστηριακές συνθήκες

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* μόλυνε επιτυχώς και τις 3 ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης υπό εργαστηριακές συνθήκες και στην **Εικόνα 94** διακρίνονται τα συμπτώματα προσβολής πάνω στο στέλεχος των φυτών και συγκεκριμένα στο λαιμό. Τα συμπτώματα περιελάμβαναν κυρίως καφέ σήψεις και αποχρωματισμό του λαιμού. Επιπλέον παρατηρήθηκαν και όργανα ανάπτυξης του μύκητα όπως λευκό μυκήλιο στο στέλεχος αλλά και καφέ σκληρώτια δίπλα στη λωρίδα με θρεπτικό υλικό στο οποίο περιτυλίχτηκαν σκόπιμα τα στελέχη. Για επιβεβαίωση της μόλυνσης των φυτών από το μύκητα διενεργήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση στους φυτικούς ιστούς των στελεχών, με τις υφές χαρακτηριστικής στένωσης και διακλάδωσης να διακρίνονται ευκρινώς (**Εικόνα 94 Δ**).



Εικόνα 94: Μόλυνση των φυτών βιομηχανικής κάνναβης ποικιλιών «Futura 75», «Zenit» και «KC Dora» από τον *Rhizoctonia solani* AG-1-IC υπό εργαστηριακές συνθήκες. (Α), (Β), (Γ) πάνω στον λαιμό του στελέχους των φυτών παρατηρούνται καφετί σήψεις και αποχρωματισμοί, ενώ διακρίνεται ευκρινώς και η ανάπτυξη λευκού μυκηλίου του μύκητα πάνω στο στέλεχος καθώς και τα καφέ σκληρώτια πάνω στη λωρίδα με το θρεπτικό υλικό όπου αναπτυσσόταν ο μύκητας. (Δ) μικροσκοπική παρατήρηση του *R. solani* AG-1-IC στους ιστούς των στελεχών των φυτών κάνναβης όπου διακρίνονται οι υφές του μύκητα με χαρακτηριστική διακλάδωση και στένωση.

4.4 Ο εδαφογενής μύκητας *Rhizoctonia solani* AG-1-IC μόλυνε τα φυτάρια κάνναβης με φυσικό τρόπο *in planta*

Ο μύκητας *Rhizoctonia solani* AG-1-IC αξιολογήθηκε για την ικανότητά του να μολύνει φυτάρια βιομηχανικής κάνναβης και υπό φυσικές συνθήκες δια του εμβολιασμού του στο εδαφικό υπόστρωμα των φυτών, σε πείραμα *in planta* (Εικόνα 95H). Τα εμβολιασμένα με τον μύκητα φυτά ως αποτέλεσμα της προσβολής παρουσίασαν κάποια συμπτώματα σε σχέση με του μάρτυρα που παρέμειναν υγιή (Εικόνα 95), τα οποία ξεκίνησαν κατά την τρίτη ημέρα του εμβολιασμού σε πιο ήπια κατάσταση και σταδιακά επιδεινώθηκαν μέχρι την τελευταία ημέρα της καλλιέργειας. Τα συμπτώματα περιελάμβαναν καχεκτική ανάπτυξη φυτών σε σχέση με τα υγιή, από ήπιους έως έντονους αποχρωματισμούς στα άκρα των φύλλων, χλωρώσεις και ξηρασία φύλλων και κλίση στελέχους μέχρι το πλήρες πλάγιασμα του με κλίση 90° σε σχέση με τους όρθιους βλαστούς των μη εμβολιασμένων και υγιών φυτών μάρτυρα. Συμπτώματα που οφείλονται στη προσβολή του ριζικού συστήματος από τον μύκητα. Επιπλέον σε φυτάρια που εκριζώθηκαν, παρατηρήθηκαν καστανέρυθρα έλκη στο λαιμό των φυτών (Εικόνα 96). Για την επιβεβαίωση της μόλυνσης παρασκευάστηκε δείγμα από τους ιστούς του λαιμού, το οποίο παρατηρήθηκε μικροσκοπικά με τις υφές χαρακτηριστικής στένωσης και διακλάδωσης του *Rhizoctonia solani* να διακρίνονται ευκρινώς (Εικόνα 96)



Εικόνα 95: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάναβης σε σχέση με τα υγιή μη εμβολιασμένα φυτά μάρτυρα κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β), (Γ) αριστερά τα υγιή μη εμβολιασμένα φυτά και δεξιά τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά που παρουσιάζουν αποχρωματισμούς στα φύλλα, χλώρωση, αρχές ξήρανσης και καχεκτική ανάπτυξη εν συγκρίσει με τα υγιή, σε 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Δ), αριστερά τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά που παρουσιάζουν εντονότερους αποχρωματισμούς στα φύλλα, χλώρωση, σημάδια ξήρανσης και καχεκτική ανάπτυξη εν συγκρίσει με τα υγιή, σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και δεξιά τα υγιή μη εμβολιασμένα φυτά. (Ε) αριστερά τα υγιή φυτά και δεξιά τα εμβολιασμένα με ίδια συμπτώματα με τη (Δ) σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (ΣΤ), (Ζ) αριστερά τα υγιή μη εμβολιασμένα φυτά και δεξιά τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά που παρουσιάζουν εντονότερα συμπτώματα από τις (Δ), (Ε) αλλά και αρχές έως πλήρες πλάγιασμα στελέχους εν συγκρίσει με τα υγιή, σε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Η) Ανάπτυξη λευκού μυκηλίου του *R. solani* έως την επιφάνεια του εδαφικού υποστρώματος από το σημείο εμβολιασμού.



Εικόνα 96: Μόλυνση φυτών βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) από τον εδαφογενή μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC. Αριστερά, εκριζωμένο φυτάριο κάνναβης στο οποίο παρατηρούνται καστανέρυθρα έλκη στον λαιμό του φυτού. Δεξιά, μικροσκοπική παρατήρηση των υφών του *R. solani* χαρακτηριστικής στένωσης και διακλάδωσης κατά την μόλυνση επί των φυτικών ιστών της κάνναβης.

4.4.1 Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum* σε φυτά εμβολιασμένα με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν παρεμφερείς φαινοτύπους με μικρές διαφορές σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά χωρίς επέμβαση

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 97** οι επεμβάσεις με εκχύλισμα *A. nodosum* (EAN) από το σκεύασμα βιοδιεγέρτη Acadian, περιόρισαν τη σοβαρότητα της ασθένειας με αποτέλεσμα τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά να παρουσιάζουν λιγότερα (ήπια χλώρωση κατώτερων φύλλων) έως καθόλου συμπτώματα προσβολής, αναδεικνύοντας την βιοδραστικότητα του *A. nodosum* ως υποψήφιο, καινοτόμο και αποτελεσματικό παράγοντα φυτοπροστασίας για τη βιομηχανική κάνναβη.

Η βελτίωση των φυτικών αμυνών από τα EAN έναντι διαφόρων παθογόνων έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες και οι αντίστοιχοι προτεινόμενοι Modes of Actions καταγράφονται στον **Πίνακα 26**. Σχετικά με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των φυτών έναντι παθογόνων έχουν αναφερθεί η επίκτητη διασυστηματική αντοχή (SAR) και η επαγόμενη διασυστηματική αντοχή (ISR). Στην πρώτη το σαλικυλικό οξύ (SA) παίζει κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την μετρίαση της παθογένεσης, ενώ στην δεύτερη τα μονοπάτια του ιασμονικού οξέος (JA) και αιθυλενίου (ET) είναι σημαντικά για την επαγωγή ευρέως φάσματος ανθεκτικότητας σε ασθένειες (Gaffney *et al.*, 1993; Van Loon *et al.*, 1998).



Εικόνα 97: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάναβης μετά από την επέμβαση με το σκεύασμα «Acadian» σε σχέση με των ίδιας επέμβασης μη εμβολιασμένων φυτών μάρτυρα, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Acadian και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, κατά τα οποία παρατηρούνται μικρές διαφορές στο ύψος της ανάπτυξης. (Γ) Αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Δ), (Ε) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Acadian και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και συκομιδή των φύλλων. Με κόκκινο κύκλο επισημάνονται τα ήπια συμπτώματα χλώρωσης που παρατηρήθηκαν στα κατώτερα φύλλα των φυτών.

Πίνακας 26: Λίστα από διαφορετικά εκχυλίσματα *Ascoryllum nodosum* που επάγουν ανθεκτικότητες ασθενειών σε διαφορετικά φυτά έναντι διαφορετικών παθογόνων. Πηγή: Sukla *et al.*, (2019).

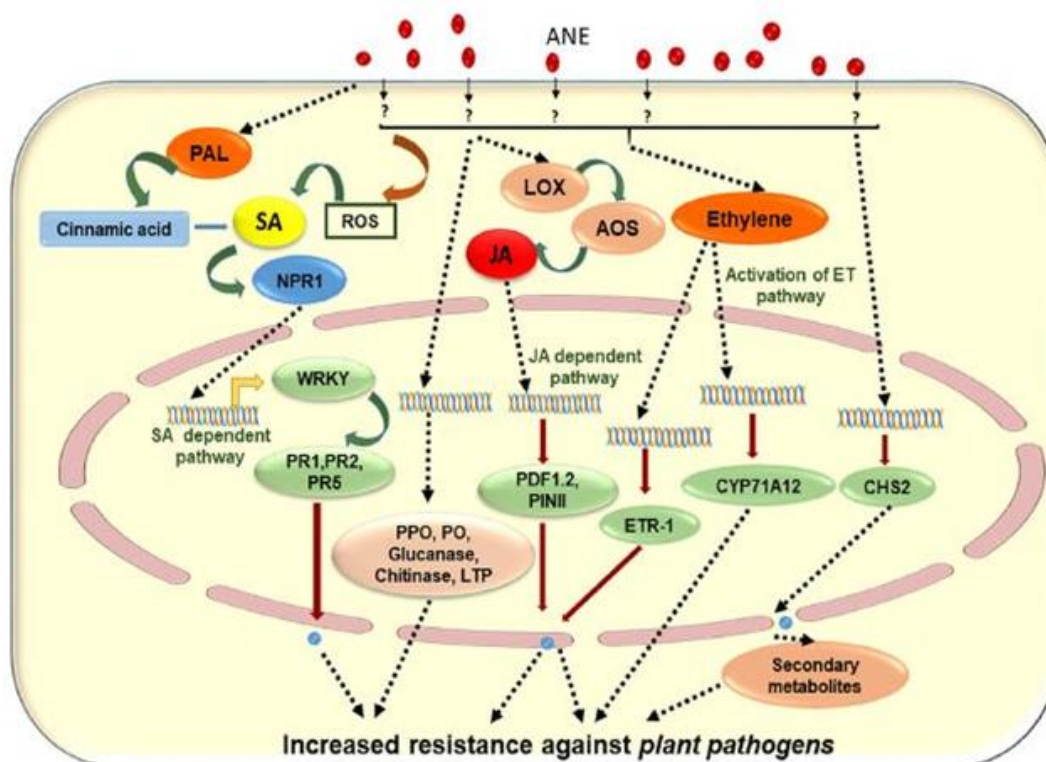
Εκχύλισμα <i>A. nodosum</i>	Καλλιέργεια	Υπαίτιο παθογόνο	Ασθένεια	Λειτουργία	Βιβλιογραφία
<i>A. nodosum</i> extract (Acadian Seaplants)	καρότο	<i>Alternaria radicina</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Μαύρη σήψη, βοτρυτής	Επαγωγή έκφρασης αμυνο-σχετιζόμενων γονιδίων και πρωτεϊνών	Jayaraj <i>et al.</i> , 2008
Stimplex® (Acadian Seaplants)	Αγγούρι	<i>Alternaria cucumerinum</i> , <i>Didymella applanat</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Τήξη από <i>Alternaria</i> , gummy stem blight, Σήψη ρίζας και στελέχους από Φουζάριο, Βοτρυτής	Μείωση της ασθένειας ενεργοποιώντας διαφορετικά αμυνο-σχετιζόμενα ένζυμα και συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών	Jayaraman <i>et al.</i> , 2011
<i>A. nodosum</i> extract (Acadian Seaplants)	<i>K. alvarezii</i>	<i>Polysiphonia subtilissima</i>	Ice-ice, goose bumps	Μειώνει την ανάπτυξη του επιφύτου	Loueiro <i>et al.</i> , 2010
<i>A. nodosum</i> extract (Acadian Seaplants)	Αραβίδοψη	<i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Sclerotinia sclerotium</i>	Βακτηριακό έλκος, Σήψη στελέχους	Μειώνει την ανάπτυξη των ασθενειών που συνδέονται με την έκφραση της μεταγραφής γονιδίου που σχετίζεται με το ιασμονικό οξύ	Subramian <i>et al.</i> , 2011
Marmarine	Αγγούρι	<i>Phytophthora melonis</i>	Πλάγιασμα στελέχους	Επαγωγή αμυνο-σχετιζόμενων ενζύμων	Abkhoo & Sabbagh, 2016
<i>A. nodosum</i> extract (Acadian Seaplants)	Τομάτα	<i>A. solani</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	Τήξη από <i>Alternaria</i> , Βακτηριακή κηλίδωση φύλλων	Μείωση συμβάντων των ασθενειών στα φυτά με την υπερ-έκφραση του μονοπρωτεϊνικού JA/αιθυλενίου	Ali <i>et al.</i> , 2016
AMPER	<i>K. alvarezii</i>	<i>Neosiphonia apiculata</i>	Ice-ice	Μείωση του βιοτικού στρες που προκαλείται από τα ενδόφυτα	Ali <i>et al.</i> , 2018
Dalgin®	Τομάτα	<i>Phytophthora capsici</i>	Πλάγιασμα στελέχους	Επαγωγή έκφρασης αμυνο-σχετιζόμενων γονιδίων και πρωτεϊνών	Panjehkeh & Abkhoo, 2016
Stella maris™	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, <i>Xanthomonas campestris</i> BP109		Αναστολή της ανάπτυξης πολλαπλών βακτηριακών παθογόνων επάγοντας την έκφραση των γονιδίων WRKY30, CYP71A12 και PR-1	Cook <i>et al.</i> , 2018

Έχει αναφερθεί ότι οι παρούσες βιοδραστικές ενώσεις των EAN προκάλεσαν αποκρίσεις άμυνας έναντι διαφόρων παθογόνων (Patier *et al.*, 1995), (Sharma *et al.*, 2014). Το εμπορικό σκεύασμα EAN «*Marmarine*» (IFTCTM, Αμμάν, Ιορδανίας) σε συνδυασμό εναλλαγής με την μυκητοκτόνο δραστική ουσία metalaxyl βελτίωσε την φυτική άμυνα έναντι του *Phytophthora melonis* σε αγγούρι (Abkhoo & Sabbagh 2016) μέσω ενισχυμένης ενεργοποίησης ενζύμων ανθεκτικότητας σε ασθένειες όπως polyphenol oxidase, lipoxygenase, phenylalanine ammonia lyase (PAL) και β-1,3-glucanase. Η συγκεκριμένη μελέτη επισήμανε τον ρόλο ορισμένων εκχυλισμάτων φυκιών σε διαφορετικά φυτικά ένζυμα και γονίδια που μπορούσαν να καταλήξουν στην επαγωγή μηχανισμών άμυνας (ή ανθεκτικότητας σε ασθένειες) στο αγγούρι.

Σε παρόμοια μελέτη (Panjehkeh & Abkhoo 2016) αποκαλύφθηκε ότι η ίδια αρχική εφαρμογή του EAN «*Dalgin*» (Sustainable Agro Solutions, Ισπανίας) με εναλλαγή metalaxyl προκάλεσε την επαγωγή ανθεκτικότητας (ISR) έναντι του *Phytophthora capsica* στην τομάτα. Παρομοίως ο συνδυασμός εναλλαγής του υγρού EAN «*Stimplex*®» με chlorothalonil μείωσε την εξάπλωση μυκητιακών ασθενειών στο αγγούρι μέσω της επαγωγής γονιδίων και ενζύμων άμυνας (Jayaraman *et al.*, 2011). Επιπλέον οι Subramanian *et al.*, (2011) εκπόνησαν μελέτη για τον μηχανισμό επαγόμενης ανθεκτικότητας EAN σε αραβίδοψη έναντι του *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Τα διαφορετικά EAN επήγαγαν ανθεκτικότητα σε φυτά ανεπάρκειας SA, αλλά δεν προκάλεσαν κάποια επίδραση στο μεταλλαγμένο στέλεχος JAR1 (ανθεκτικότητας JA). Επιπροσθέτως η εφαρμογή EAN επήγαγε την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με JA. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συνιστούν ότι τα EAN επήγαγαν ανθεκτικότητα από ANE σε «πλημμελή» φυτά αραβίδοψης ενεργοποιώντας το JA-εξαρτώμενο σηματοδοτικό μονοπάτι, ενώ διαφορετικά κλάσματα διαλυτών παρουσίασαν μειωμένη ανάπτυξη των συμπτωμάτων ασθένειας στα φύλλα, κάτι που σχετίστηκε με την αυξημένη έκφραση μεταγραφών γονιδίων σχετιζόμενων με JA (Subramanian *et al.*, 2011).

Σε άλλες μελέτες η εφαρμογή δια εμβλαππίσματος του EAN «*AMPER*» ως διαλυτό κονίαμα προκάλεσε έναν φυσικό μηχανισμό άμυνας σε καλλιεργήσιμες κόκκινες άλγες *Kappaphycus* έναντι των επιφύτων *Neosiphonia apiculata*, *Cladophora* και *Ulva* επάγοντας το φαινολικό περιεχόμενο, την απενεργοποίηση ελευθέρων ριζών και την χηλίωση σιδήρου (Loureiro *et al.*, 2010, 2012), (Hurtado *et al.*, 2012; Ali *et al.*, 2018). Επιπλέον ένα ακόμα προϊόν EAN («*Stella Maris*®») αναφέρθηκε να ωθεί την φυτική ανοσία, εξυψώνοντας την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο εν τέλει οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης (Cook *et al.*; 2018). Οι συγγραφείς έδειξαν ότι προκλήθηκε υπερέκφραση γονιδίων απόκρισης φυτικής άμυνας, ενώ οι Subramanian *et al.*, (2011) έδειξαν ότι η εξωγενής εφαρμογή φυσικού παράγοντα (priming) στις ρίζες φυτών αραβίδοψης ηλικίας τριών εβδομάδων με EAN δύο ημέρες πριν τον εμβολιασμό προστάτεψε τα φυτά έναντι του νεκρωτικού παθογόνου *Sclerotinia sclerotium*. Παρομοίως οι Jayaraj *et al.*,

(2008) έδειξαν ότι ο διαφυλλικός ψεκασμός EAN σε φυτά καρότου μείωσε σημαντικά την εξάπλωση της ασθένειας που προκλήθη από τα *Alternaria radacina* και *Botrytis cinerea*. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το priming των φυτών καρότου με EAN επήγαγε την δράση ενζύμων σχετιζόμενων με άμυνα συμπεριλαμβανομένων των peroxidase (PO), polyphenoloxidase (PPO), PAL, chitinase και β -1,3-glucanase καθώς και αύξησε την συσσώρευση μεταγραφών γονιδίων και ενζύμων άμυνας (PR-1, PR-5, NPR01, LTP, chalcone synthase και PAL). Τέλος βάση της βιβλιογραφίας η **Εικόνα 98** περιγράφει τους ρυθμιστές που είναι παρόντες στα EAN και είναι γνωστοί για την βελτίωση των αποκρίσεων φυτικής άμυνας έναντι διαφόρων παθογόνων.



Εικόνα 98: Σχηματική αναπαράσταση του προτεινόμενου Mode of Action των εκχυλισμάτων *Ascophyllum nodosum* στην εκμείωση φυτικής άμυνας έναντι διαφορετικών παθογόνων. Πηγή: Sukla *et al.*, (2019).

4.4.2 Οι επεμβάσεις με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών σε φυτά εμβολιασμένα με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν παρεμφερείς φαινοτύπους με μικρές διαφορές σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά χωρίς επέμβαση

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 99** οι επεμβάσεις με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών από το σκεύασμα βιοδιεγέρτη Ekorpor 4G, περιόρισαν τη σοβαρότητα της ασθένειας με αποτέλεσμα τα εμβολιασμένα με μύκητα φυτά να παρουσιάζουν λιγότερα (ήπια χλώρωση κατώτερων φύλλων) έως καθόλου συμπτώματα προσβολής, αναδεικνύοντας την βιοδραστικότητα της μικροβιακής κοινοπραξίας από *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Glomus* spp. ως υποψήφιους, καινοτόμους και αποτελεσματικούς μικροβιακούς παράγοντες φυτοπροστασίας για τη βιομηχανική κάνναβη.

Τα τελευταία 50 χρόνια έχουν διεξαχθεί παρατεταμένες μελέτες για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι *Streptomyces* μπορεί να αναστέλλουν τα παθογόνα στο έδαφος, συμπεριλαμβανομένων των αντιβίωση, ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά, παραγωγή αποικοδομητικών ενζύμων, παραγωγή οξειδίων του αζώτου και απενεργοποίηση των σημάτων διακυπταρικής επικοινωνίας μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών (quorum quenching) (Mahadevan & Crawford 1997; Cohen & Mazzola 2006; Mahmoudi et al., 2011). Μεταξύ αυτών η αναστολή παθογόνων μέσω αντιβιοτικών είναι πιο συχνά η προταρχική εστίαση της καταστολής φυτικών ασθενειών από τους *Streptomyces*. Η ποικιλία των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγεται από αυτό το γένος προσφέρει τεράστια δυνατότητα για καταστολή μυκητιακών και άλλων παθογόνων. Επιπλέον οι ευρείες ικανότητές τους να μεταβολίζουν ποικίλες πηγές άνθρακα και αζώτου, ενισχύει την δυνατότητά τους να συναγωνίζονται αποτελεσματικά για πόρους στη ριζόσφαιρα (Schlatter et al., 2009).

Πέραν των άμεσων τοξικών επιδράσεων σε άλλα μικρόβια, η παραγωγή νιτρικών οξέων από τους *Streptomyces* έχει δείξει την ενεργοποίηση φυτικών αμυνών, προσφέροντας επιπρόσθετα καινοτόμα μέσα για την προστασία φυτών έναντι παθογόνων (Cohen et al., 2005). Έχει αποδειχτεί επίσης ότι οι *Streptomyces* αποικοδομούν τις σηματοδοτικές ενώσεις που συντονίζουν την έκφραση των γονιδίων που απαιτούνται για την παθογένεια στο *Pectobacterium carotovorum*, συνιστώντας έναν περαιτέρω μηχανισμό για καταστολή ασθένειας (Mahmoudi et al., 2011). Τέλος η παραγωγή ενζύμων chitinase ή ενώσεων προώθησης φυτικής ανάπτυξης έχει αναφερθεί ότι συνεισφέρει στην καταστολή ασθενειών από κάποιες απομονώσεις *Streptomyces* (El-Tarabily et al., 2000; Berg et al., 2001; Quecine et al., 2008; Verma et al., 2011).



Εικόνα 99: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάνναβης μετά από την επέμβαση με το σκεύασμα «Ekorpor 4G» σε σχέση με των ίδιας επέμβασης μη εμβολιασμένων φυτών μάρτυρα, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Ekorpor 4G και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, κατά τα οποία παρατηρούνται μικρές διαφορές στο ύψος της ανάπτυξης ορισμένων φυτών. (Γ), (Δ) αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Ε) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Ekorpor 4G και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και συκομιδή των φύλλων. Με κόκκινο κύκλο επισημαίνονται τα ήπια συμπτώματα χλώρωσης που παρατηρήθηκαν στα κατώτερα φύλλα των φυτών.

Σε άλλες μελέτες καταστολής των συμπτωμάτων της ασθένειας που προκαλεί ο *R. solani* με την συμμετοχή των *Streptomyces* οι Sadeghi *et al.*, (2009) σε τριετές πείραμα αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα δύο απομονώσεων (S2 και C) που καταστέλλουν ασθένειες για τον έλεγχο του πλάγιασματος στα ζαχαρότευτλα από τον *R. solani* AG-4 υπό συνθήκες θερμοκηπιακής καλλιέργειας, με τις επεμβάσεις σπορίων *Streptomyces* να μειώνουν το πλάγιασμα των σποροφύτων σε φυσικά (2005) και σε τεχνητά προσβεβλημένα εδάφη (2006 και 2007), δείχνοντας πολύ μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με το μυκητοκτόνο σκεύασμα Vitavax. Συγκεκριμένα η αξιολόγηση της τελικής συγκομιδής σε βάθος τριετίας αποκάλυψε την αύξηση της απόδοσης της ρίζας των φυτών προσθήκης των παραγόντων βιοελέγχου σε σχέση με τα αμεταχειρίστα του μάρτυρα. Στην σύγχρονη μελέτη των Ebrahimi-Zarandi *et al.*, (2021) διερευνήθηκε η ικανότητα δύο ειδών *Streptomyces* που αποικίζουν την ρίζα τοματιάς να ενεργοποιούν την ανθεκτικότητα έναντι του *R. solani* AG-4 με σκοπό τον βιοέλεγχο, αξιολογώντας την πατέντα αλλαγών έκφρασης των γονιδίων LOXB και PAL1 υπό εμβολιασμό με παθογόνο στα φυτά προσθήκης των βιολογικών παραγόντων (primed). Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα στελέχη *Streptomyces globisporus* F8 και *S. praecox* R7 κατάφεραν να ενισχύσουν την έκφραση γονιδίων Iyroxigenase και PAL στα φυτά, κάτι που συνιστά ότι τα στελέχη μπορεί να ενεργοποιούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια του JA και φαινυλοπροπανοειδών, ως εκ τούτου καταλήγοντας σε κατάσταση επαγόμενης άμυνας των φυτών έναντι του *R. solani*. Επιπλέον ο βιοχημικός χαρακτηρισμός αυτών των στελεχών έδειξε ότι ήταν ισχυροί παραγωγοί σιδηροφόρων, πρωτεασών, με το R7 να παράγει και αμυλάση.

Τα είδη του γένους *Trichoderma* αποτελούν εν δυνάμει βιολογικούς παράγοντες ελέγχου που αναστέλλουν το *R. solani* με άμεση αναμέτρηση μέσω μυκοπαρσιτισμού, αντιβίωσης ή ανταγωνισμού, καθώς και επάγοντας αποκρίσεις φυτικής άμυνας (Abbas *et al.*, 2017). Για τον έλεγχο των φυτοπαθογόνων το *Trichoderma* spp. και/ή οι εξωκυτταρικοί του μεταβολίτες μπορούν να τεθούν υπό εκμετάλλευση για παράγοντες βιοελέγχου και παρασκευή βιολογικών μυκητοκτόνων (Vinale *et al.*, 2008). Αυτοί οι μεταβολίτες περιλαμβάνουν πηητικά και υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες (Eziashi *et al.*, 2007) και δευτερογενείς μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους (Schuster & Schmoll 2010; Kotasthane *et al.*, 2015) που έχουν συλλεχθεί από 20 απομονώσεις του *Trichoderma* εκ των οποίων το *T. viride* (T14) ταυτοποιήθηκε ως ο μεγαλύτερος παραγωγός ανόργανων φωσφορικών ενώσεων, ινδολαιθανικού οξέος (IAA) και σιδηροφόρων, επιδεικνύοντας υψηλή ανταγωνιστική δράση έναντι του *R. solani*. Εξάλλου η συσχέτιση πρωτεϊνών των *Trichoderma* spp. συνδέθηκε με την σύνθεση επιβλαβών δευτερογενών μεταβολιτών, ολοκλήρωση, αναγνώρισης, μετάδοση σήματος και γεντικού επαναπρογραμματισμού της έκφρασης γονιδίων, καθώς και με τον μυκοπαρσιτισμό του *R. solani*.

Συνολικά έχουν ελεγχθεί 25 στελέχη *T. viride* και *T. harzianum* για την ανταγωνιστική τους ικανότητα έναντι του ρύγχους θήκης ρυζιού (sheath blight) του παθογόνου *R. solani* (Krishnamurthy *et al.*, 1999). Επιπλέον το *T. asperellum* έχει επίσης ελέγξει την ίδια ασθένεια σε τροπικές πεδινές περιοχές καλλιέργειας ρυζιού (de Franca *et al.*, 2015). Ο βιοέλεγχος του *R. solani* σε τομάτες υπό συνθήκες θερμοκηπίου και αγρού έχουν αναλυθεί από το *T. harzianum* (Montealegre *et al.*, 2010). Το πλάγιασμα καλλιεργειών θερμοκηπίου που προκαλεί ο *R. solani* έχει ελεγχθεί με παρασκευή σκευάσματος διαφόρων *Trichoderma* spp. (Lewis & Lumsden 2001). Έπειτα το *T. virens* επέδειξε κάπως καλύτερο έλεγχο του έλκους στελέχους της πατάτας, συνιστώντας πιθανή παροχή βελτιωμένης αποτελεσματικότητας βιοελέγχου με αυτή την προσέγγιση (Brewer & Larkin 2005). Επίσης έχουν χαρακτηριστεί 16 στελέχη των *Trichoderma* spp. προερχόμενα από εδάφη ζαχαροτεύτλων, όπου παρατηρήθηκαν γυμνές λωρίδες έκτασης (patches) λόγω *R. solani*. Από αυτές τις μελέτες ήταν προφανείς διαφορετικοί ανταγωνιστικοί μηχανισμοί, με το πιο ανταγωνιστικό στέλεχος T30 να ταυτοποιείται ως *T. gamsii* (Annes *et al.*, 2011).

Επιπροσθέτως σε άλλες μελέτες οι ικανότητες βιοελέγχου των υδατοδιαλυτών και πηκτικών μεταβολιτών των *T. asperellum* και *T. harzianum* αξιολογήθηκαν έναντι του *R. solani* σε φυτά φασολιού υπό εργαστηριακές και συνθήκες θερμοκηπίου (Asad *et al.*, 2014). Οι παρασκευές από μικροσκληρώτια και βυθισμένα κονίδια που σχηματίστηκαν από ζύμωση υγρής καλλιέργειας *T. harzianum* στελέχους Rifai T-22 μείωσαν ή εξάλειψαν το πλάγιασμα σποροφύτων που προκάλεσε ο *R. solani* (Kabori *et al.*, 2015). Επιπλέον η σηψιρριζία του βαμβακιού έχει ελεγχθεί από διάφορα είδη *Trichoderma* (Gajera *et al.*, 2016). Σε άλλη αναφορά το *T. harzianum* επάγει την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την φυτική άμυνα και παράγουν υψηλή ποσότητα ergosterol υποδεικνύοντας την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε υψηλότερο ρυθμό στο έδαφος, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει τις θετικές του επιδράσεις στην αύξηση και άμυνα των φυτών φασολιού υπό παρουσία *R. solani* που προκαλεί σηψιρριζία (Mayo *et al.*, 2015). Επιπρόσθετα τα *Trichoderma* spp. είναι γνωστά για παραγωγή διαφορετικών αντιβιοτικών ουσιών όπως gliotoxin, gliovirin, vidirin και trichovirin (Vinale *et al.*, 2008). Ο ανταγωνισμός των *Trichoderma* spp. έναντι διαφόρων ασθενειών που προκαλούνται από τον *R. solani* παρουσιάζεται στον **Πίνακα 27**.

Επομένως τα *Trichoderma* spp. θεωρούνται τα πιο επιτυχημένα βιομυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη σημερινή γεωργία με παραπάνω από 60% των καταγεγραμμένων παγκοσμίως να βασίζονται σε αυτό το γένος, ενώ συνεχείς ανακαλύψεις νέων ειδών (Chen & Zhuang 2016) αναμένεται να ενισχύσουν μελλοντικά την ποικιλία βιοελέγχων για τον *R. solani*.

Πίνακας 27: Ανταγωνισμός του *Trichoderma* spp. έναντι ασθενειών που προκαλούνται από τον μύκητα *Rhizoctonia solani*. Πηγή: Abbas *et al.*, (2017)

<i>Trichoderma</i> spp.	Metabolites	Disease control
<i>T. lignorum</i> , <i>T. virens</i> , <i>T. hamatum</i> , <i>T. harzianum</i> and <i>T. pseudokoningii</i> (Rifai)	Unknown inhibitory substances; Extracellular metabolites or antibiotics, or lytic enzyme action	Damping-off of bean
<i>T. virens</i> isolates GL3 and GL21; <i>T.</i>	Antibiotics gliovirin and gliotoxin,	Damping-off of cucumber

Όσον αφορά την δυνατότητα καταστολής ασθενειών διαφόρων παθογόνων από τα *Pseudomonas* spp., οι κύριοι μηχανισμοί από τους οποίους το γένος ασκεί την επίδραση βιοελέγχου είναι ο ανταγωνισμός για θώκους (niches) και αποκόμιση θρεπτικών συστατικών, παραγωγή αντιβιοτικών και επαγόμενη διασυστηματική αντοχή. Στην ενότητα 1.3.2.7.3 αναφέρονται παραδείγματα καταστολής σε διάφορες ασθένειες. Σχετικά με τον βιοέλεγχο του *R. solani* σε συνθήκες αγρού οι Saikia *et al.*, (2006) ανέφεραν την επαγωγή διασυστηματικής αντοχής φυτών ρυζιού έναντι του AG5 σε διαχείριση σπόρων με 3 απομονώσεις *Pseudomonas aeruginosa*, αυξάνοντας και την απόδοση των σπόρων. Συγκεκριμένα η HPLC ποσοτικοποίησε το παραχθέν σαλικυλικό οξύ (SA) τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* στις ρίζες. Επιπλέον για τα προμεταχειρισθέντα φυτά με *P. aeruginosa* που δοκιμάστηκαν στον εμβολιασμό με το παθογόνο *R. solani*, παρατηρήθηκε συσώρευση 3 ενζύμων υπεροξειδάσης σχετιζόμενων με παθογένεια. Οι οξειδάσες που καθαρίστηκαν, έδειξαν αντιμυκητιακή δράση έναντι του *R. solani* και δύο άλλων παθογόνων ρυζιού. Σε σύγχρονες μελέτες οι Tagele *et al.*, (2019) εξέτασαν το στέλεχος KNU17p1 που ταυτοποιήθηκε ως *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* για την ικανότητα καταστολής των ασθενειών γκριζας ζώνης φύλλων και ρύγχους θήκης (banded leaf and sheath blight) σε κορεάτικες καλλιεργήσιμες ποικιλίες αραβοσίτου (*Miheugchal* και *Mibaek-2*) που προκαλεί ο *R. solani* AG1-IA, με τα αποτελέσματα να δείχνουν δυνατότητα αποτελεσματικότητας μείωσης της ασθένειας 64,1% και 69% αντίστοιχα σε σχέση του αρνητικού μάρτυρα (εμβολιασμός μόνο με *R. solani* όπου όλα τα φυτά προσβλήθηκαν σε υψηλό βαθμό). Οι συγγραφείς απέδωσαν αυτήν την ιδιότητα στα πτητικά συστατικά που παρήγαγε *in vitro* το στέλεχος *Pseudomonas*.

Στην μελέτη των Zhang *et al.*, (2020) ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση του *P. protogens* FD6 στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα σιταριού και εκτιμήθηκε η καταστολή του *R. solani* AG-8. Τα αποτελέσματα έδειξαν παραγωγή φάσματος αντιμικροβιακών μεταβολιτών γνωστής δράσης έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων. Επίσης ο αποικισμός της ριζόσφαιρας από το συγκεκριμένο στέλεχος μείωσε σημαντικά την αφθονία του μύκητα στην ριζόσφαιρα 13 φορές και η καταστολή παθογόνου αύξησε κατά 21-29% την

φυλλική βιομάζα των σποροφύτων σιταριού σε επίπεδα μη σημαντικώς διαφορετικά σε σχέση με τα υγιή φυτά μάρτυρα.

Σχετικά με το γένος *Bacillus* πολλά είδη του έχουν ερευνηθεί για επαγωγή φυτικής διασυστηματικής αντοχής στην ανθεκτικότητα παθογόνων μυκήτων. Υπάρχουν εμφανείς αναφορές στη διασυστηματική δράση των αμυνοσχετιζόμενων ενζύμων όπως peroxidase (POD), superoxidase dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO) και PAL και έκφρασης των αμυνοσχετιζόμενων γονιδίων που ενισχύονται από τα *Bacillus* sp. στην σόγια, τομάτα και αραβίδοψη (Niu *et al.*, 2011; Kurabachew & Wydra 2014; Chandrasekaran & Chun 2016; Jain *et al.*, 2017). Στην περίπτωση του *R. solani* σε οι Wu *et al.*, (2019) ανέφεραν τον βιοέλεγχο για την μάρανση φυταρίων πιπεριάς (*Capsicum annuum* L.) δια της επαγωγής μηχανισμών άμυνας και παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων από το στέλεχος *Bacillus subtilis* SL-44. Για την εκτίμηση αυτής της ικανότητας ανιχνεύτηκαν οι δράσεις των σχετικών ενζύμων με τα αποτελέσματα φθορίζουσας μικροσκοπίας σε συνδυασμό με χρωστικές να δείχνουν την επαγωγή μεγάλης ποσότητας ενεργού οξυγόνου και συσσώρευσης callose στα φύλλα πιπεριάς. Οι δράσεις των αμυνο-σχετιζόμενων ενζύμων βελτιώθηκαν σημαντικά σε φυτά επέμβασης με το βακτηριακό στέλεχος, όπως των POD, catalase, SOD, PPO και PAL. Επιπλέον στα φυτά με SL-44 ενισχύθηκαν η δράση της chitinase και β-1,3-glucanase. Επιπρόσθετα το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων ανθεκτικότητας της πιπεριάς CaPIN II αυξήθηκε σημαντικά στην επέμβαση με το βακτήριο, ενώ το διήθημά του οδήγησε στον θάνατο του φυτοπαθογόνου μύκητα μέσω της θραύσης των μυκηλίων και διαρροής των κυτταρικών περιεχομένων. Έπειτα στα ακατέργαστα εκχυλίσματα του SL-44 ανιχνεύτηκαν τα surfactin, iturin και fengycin τα οποία θα μπορούσαν να είναι αποτελεσματικές αντιμυκητιακές ενώσεις έναντι του *R. solani*. Τέλος τα αποτελέσματα συνέστησαν ότι όχι μόνο το *B. subtilis* SL-44 επήγαγε διασυστηματική αντοχή στα σπορόφυτα πιπεριάς έναντι της μάρανσης από *R. solani* μέσω του εξαρτώμενου από ιασημονικό οξύ σηματοδοτικού μοναπατιού, αλλά και παρήγαγε αντιμυκητιακές ενώσεις που ανέστειλαν ή ζημίωσαν την ανάπτυξη μυκηλίου του μύκητα. Στην μελέτη των Zhang *et al.*, (2020) ποσοτικοποιήθηκε η συγκέντρωση του *Bacillus subtilis* NCD-2 στο έδαφος και στη ριζόσφαιρα σιταριού και εκτιμήθηκε η καταστολή του *R. solani* AG-8. Τα αποτελέσματα έδειξαν παραγωγή φάσματος αντιμικροβιακών μεταβολιτών γνωστής δράσης έναντι εδαφογενών φυτοπαθογόνων. Επίσης ο αποικισμός της ριζόσφαιρας από το συγκεκριμένο στέλεχος μείωσε σημαντικά την αφθονία του μύκητα στην ριζόσφαιρα 3 φορές και η καταστολή παθογόνου αύξησε κατά 21-29% την φυλλική βιομάζα των σποροφύτων σιταριού σε επίπεδα μη σημαντικώς διαφορετικά σε σχέση με τα υγιή φυτά μάρτυρα.

Στην περίπτωση των δενδρόμορφων μυκορριζών (AMF) του γένους *Glomus* υπάρχουν πολλές μελέτες που να δείχνουν ότι εμφανίζουν καλές επιδράσεις βιοελέγχου για πολλές ασθένειες καλλιεργειών (Gao *et al.*, 2018; Aseel *et al.*, 2019; Deja-Sikora *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Miozzi *et al.*, 2019).

Από άποψη μυκητιακών ασθενειών οι AMF μπορούν να διεγείρουν τον μηχανισμό ανθεκτικότητας των φυτών με πολλαπλούς τρόπους (Gao *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Παρόλα αυτά οι AMF δεν διεγείρουν άμεσα στην τυπική απόκριση άμυνας των φυτών ξενιστών, αλλά βελτιώνουν την άμυνα του ξενιστή μέσω της βελτίωσης της απόκρισης των ριζών του ξενιστή στην επίθεση παθογόνου (Rashad *et al.*, 2020). Επιπλέον η αποίκηση με AMF βελτιώνει την άμυνα των αντιοξειδωτικών οι οποία λειτουργεί κυρίως με την ελαχιστοποίηση του οξειδωτικού stress που προκαλούν τα παθογόνα στα φυτά (Li *et al.*, 2019). Στην περίπτωση των ριζικών ασθενειών οι AMF καταστέλλουν τις φυτικές ασθένειες κυρίως μέσω της μείωσης της μόλυνσης των παθογόνων στις ρίζες, ως εκ τούτου μειώνοντας την επίπτωση και τον δείκτη της ασθένειας (Bagy *et al.*, 2019). Επιπλέον δεδομένου ότι η μυκορριζική αποίκηση προωθεί την παραγωγή αυξητικών ορμονών στα φυτά ξενιστές οι οποίες βελτιώνουν τις μετατοπίσεις των θρεπτικών συστατικών, φωτοσυνθετική απόδοση και πρωτογενή όσο και δευτερογενή μεταβολισμό (Jentschel *et al.*, 2006; Aseel *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019b) στη μελέτη των Ahammed *et al.*, (2020a) βρέθηκε θετική συσχέτιση της μελατονίνης και των AMF έναντι της μάρανσης από *Fusarium* σε αγγούρι.

Όσον αφορά την αντιμετώπιση ασθενειών από τον *R. solani* έχουν διεξαχθεί κάποιες μελέτες με μεμονωμένης εφαρμογής μυκόρριζας *Glomus* ή σε συνδυασμό με άλλα PGPRs. Οι Berta *et al.*, (2005) ανέφεραν καταστολή της σηψιρριζίας από *R. solani* 1556 με την εφαρμογή του *Glomus mossae* BEG12 και *Pseudomonas fluorescens* A6RI σε φυτά τομάτας παρεμβαίνοντας στην ανάπτυξη του παθογόνου και της μορφογένεσης της ρίζας. Τα φυτά ξεπέρασαν την μείωση της αύξησης που προκάλεσε ο *R. solani*, με την καταστολή της ασθένειας να συσχετίζεται με σημαντική μείωση της επιφυτικής και παρασιτικής ανάπτυξης του παθογόνου μαζί με μια αύξηση του μήκους της ρίζας και του αριθμού των ακρορριζίων των εμβολιασμένων φυτών τομάτας. Οι Saldajeno & Hyakumachi (2011) ανέφεραν ότι ο εμβολιασμός σποροφύτων αγγουριού με *Glomus mosseae*. (ή/και με το PGPR *Fusarium equiseti* απομονώσεων GF18-3 και GF19-1) 6 και 12 ημέρες πριν τον εμβολιασμό με *R. solani* αύξησε το ποσοστό προστασίας έναντι της ασθένειας του πλαγιάσματος. Σε πρόσφατες έρευνες η Atwa (2018) συνδύασε βιολογικούς παράγοντες με μυκόρριζα (αποτελούμενη κυρίως από ενδοσπόρια *Glomus* sp.), *Paenibacillus polymyxa* και *Pseudomonas fluorescens* για έλεγχο του πλαγιάσματος αγγουριού από το *R. solani*, με τα αποτελέσματα των επεμβάσεων να δείχνουν μείωση των ποσοστών προ και μεταφυτρωτικού πλαγιάσματος και παράλληλα αύξηση των επιβιωσάντων φυτών (έως 92% με τον συνδυασμό όλων των βιολογικών παραγόντων) σε σύγκριση με τα αμεταχείριστα του μάρτυρα σε προσβεβλημένο έδαφος από το *R. solani*, αλλά και με αυτών παρουσίας του μυκητοκτόνου Rizotex-T με αντίστοιχο ποσοστό 48%. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων στα φυτά σόγιας των διαφορετικών επεμβάσεων (μεμονωμένα ή συνδυαστικά) καθορίστηκε η δράση οξειδωτικών ενζύμων και τα περιεχόμενα των

φαινολικών ενώσεων. Όλες οι επεμβάσεις αύξησαν τις PO, PPO, και φαινολικά περιεχόμενα σε σχέση με τα αμεταχειρίιστα φυτά που φυτεύτηκαν σε προσβεβλημένα με *R. solani* εδάφη, με τις επεμβάσεις των AMF να παρουσιάζουν το τρίτο κατά σειρά μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης σε σχέση με τις αυτές του συνδυασμού και των τριών παραγόντων ταυτόχρονα.

Τέλος οι Wu *et al.*, (2020) εφάρμοσαν κοινοπραξίες AMF αποτελούμενες κυρίως από *Glomus* sp. αναφέροντας ενίσχυση της ανθεκτικότητας του πλαγιάσματος σποροφύτων καρπουζιού από *R. solani* μέσω ανακούφισης από το οξειδωτικό stress. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποίκιση με AMF για χρήση λαχανικών κατέληξε σε ποσοστό επίπτωσης της ασθένειας 18,4% με 59,7% επίδραση βιολογικού ελέγχου σε σχέση με 45,7% επίπτωσης ασθένειας για τα προσβεβλημένα φυτά δίχως εφαρμογής AMF. Αυτό αποδόθηκε στις αυξήσεις ρυθμού φωτοσύνθεσης (68,6%), χλωροφύλλης α, β, καροτενοειδών, ξηρού βάρους (63,4%), συσσώρευσης βιομάζας, ενώ σε πυκνότητα εμβολιασμού με μυκόρριζες 30 σπορίων/φυτό προκλήθηκε η υψηλότερη συσσώρευση αμπισικού οξέος, ινδολοαιθανικού οξέος και γιββερελικού οξέος. Επιπλέον οι AMF μείωσαν σημαντικά την σχετική διαρροή ηλεκτρολυτών, συσσώρευση H₂O₂ και υπεροξειδωση των λιπιδίων και αύξησαν την δράση της ρίζας και των ενζύμων αλλά και τις μεταγραφές τους στις ρίζες, συνιστώντας μετρίαση του προακλούμενου από *R. solani* οξειδωτικού stress.

Εν κατακλείδι με βάση και τις ομοιότητες στους φαινοτύπους των εμβολιασμένων με *R. solani* AG1-IC και μη εμβολιασμένων φυτών κάνναβης που εφαρμόστηκε το σκέυασμα Ekorpro 4G συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω γένη ωφέλιμων μικροοργανισμών της παρούσας εργασίας, μπορούμε να πούμε ότι είναι αποτελεσματικό στην μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας, ωστόσο για την εφαρμογή του ως μυκητοκτόνο πρέπει να τεθούν υπόψη οι κύριες παράμετροι όπως τον περιορισμό της αποτελεσματικότητας αλλά και της ασυνέπειας υπό συνθήκες αγρού, όπως όλα τα μυκητοκτόνα που βασίζονται σε μικροβιακούς παράγοντες. Η πηγή αυτών των δυσκολιών είναι ότι τα μικρόβια δρουν με αργό ρυθμό σε σύγκριση με τα χημικά και επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Verma *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2014; Lorito & Woo 2015). Σε κάθε περίπτωση τα «θωρακισμένα» φυτά με βιοδιεγέρτη κοινοπραξίας ωφέλιμων μικροοργανισμών καθίστανται πιο ικανά να αντιμετωπίσουν τα εισβάλλοντα παθογόνα σε σχέση με τα φυτά που παραμένουν σχετικά ευάλωτα. Ως εκ τούτου πρέπει να διεξαχθούν περισσότερα πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας για περαιτέρω αξιολόγηση του σκευάσματος σε διάφορες συνθήκες αγρού, όπου υφίστανται και αρκετοί αβιοτικοί ή/και βιοτικοί παράγοντες.

4.4.3 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε εμβολιασμένα φυτά με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα ανεμβολίαστα φυτά της ίδιας επέμβασης

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 100** οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών παρουσιάζουν διαφορές στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών συγκριτικά με τα αντίστοιχα ανεμβολίαστα της ίδιας επέμβασης. Συγκεκριμένα τα εμβολιασμένα φυτά εμφάνισαν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους. Τα περισσότερα να εμφανίζουν παρόμοια ανάπτυξη σε σχέση με τα υγιή ανεμβολίαστα, ωστόσο σε κάποια από τα κατώτερα φύλλα εμφανίστηκαν χλωρωτικές περιοχές και μεταχρωματισμό (**Εικόνα 100 Ε, ΣΤ**). Ορισμένα φυτά παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη σε σχέση με τα ανεμβολίαστα με περιοχές φύλλων που παρουσίασαν ξηράνσεις και αποχρωματισμούς (**Εικόνα 100 Ζ**). Όσον αφορά τους πιο υγιείς φαινοτύπους στην ενότητα 1.4 αναλύονται οι προτεινόμενοι μηχανισμοί καταστολής ασθενειών από την προσθήκη του biochar στο έδαφος, εκ των οποίων η συσχέτιση του biochar με μονοπάτια ISR, η ακινητοποίηση των παθογενετικών ενζύμων και τοξικών μεταβολιτών των φυτοπαθογόνων, η τροποποίηση εδάφους από άποψη διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και η άμεση μυκοτοξική δράση από οργανικές ενώσεις αλειφατικών, αρωματικών και φαινολικών συστατικών, μπορούν στη παρούσα μελέτη να αποτελέσουν πιθανές αιτίες μείωσης της σοβαρότητας της ασθένειας σε σχέση με τα εμβολιασμένα με *R. solani* AG-1-IC φυτά δίχως επέμβασης με biochar. Αντιθέτως στα καχεκτικά φυτά της **Εικόνας 100 Ζ** φαίνεται πως η σοβαρότητα της ασθένειας επιδεινώθηκε.

Προς επιβεβαίωση αυτού του συμπεράσματος στην μελέτη των Copley *et al.*, (2015) εκτιμήθηκε μέσω μεταβολομικής ανάλυσης η επίδραση του ίδιου biochar σφενδάμου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, στην ασθένεια πλαγιάσματος από τον *R. solani* AG-4 σε 11 φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα γλάστρας δίχως έδαφος, προσθήκης biochar διαφορετικών συγκεντρώσεων και εμβολιάστηκαν με τον μύκητα, ενώ έγινε και αξιολόγηση *in vitro*. Τα αποτελέσματα έδειξαν θετική συσχέτιση μεταξύ της τροποποίησης εδάφους με biochar και σοβαρότητας ασθένειας και επίπτωσης, καθώς και φυσικοχημικών παραμέτρων. Σύμφωνα με μελέτες η ανάπτυξη των παθογόνων και η μολυσματικότητα μπορούν να επηρεαστούν από ένα ευρύ φάσμα φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών όπως pH, ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC) και διεγερτικούς παράγοντες όπως glycerol, oxalic acid και benzoic acid (Sunesson *et al.*, 1995; Douds *et al.*, 1996; Fries *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 2008).

Στην περίπτωση της μελέτης των Copley *et al.*, (2015) οι θετικές συσχετίσεις μεταξύ του biochar σφενδάμου και pH και EC κατέστησαν ανεπαρκείς για πρόκληση καταστολής της ασθένειας και ανάπτυξης του *R. solani*. Επιπλέον οι υψηλές συγκεντρώσεις σε ασβέστιο, μαγνήσιο, υδρογόνο

και φώσφωρο μειώνουν την κατασταλτικότητα των εδαφών στο πλάγιασμα (Ghini & Moraiti 2006) επομένως οι υψηλές τους συγκεντρώσεις στο biochar σφενδάμου ίσως έπαιξαν και έναν ρόλο για την προώθηση της ασθένειας στην παρούσα μελέτη. Έπειτα στην μελέτη των Copley *et al.*, (2015) η προσθήκη biochar αύξησε σημαντικά την ανάπτυξη του *R. solani* και την επέκταση των υφών *in vitro*, αλλάζοντας και τον πρωτογενή μεταβολισμό του μύκητα, κυρίως την mannitol, τους κύκλους τρικαρβοξυλικών οξέων και το μονοπάτι της γλυκόλυσης. Ο λόγος οφείλεται στο ότι ένα ή περισσότερα οργανικά συστατικά όντας παρόντα στο biochar μπορεί να μεταβολίζονται από τον *R. solani*.

Πιο συγκεκριμένα όταν μεταβολίτες που διατίθενται στο biochar σφενδάμου όπως το oxalic acid, glycerol, benzoic acid και ricinoleic acid χορηγούνται σε επίπεδα χαμηλής συγκέντρωσης, έχουν αναφερθεί να παρουσιάζουν διεγερτική επίδραση στην ανάπτυξη μυκήτων (Douds *et al.*, 1996; Fries *et al.*, 1997) ή μεταβολίζονται από μύκητες (Sunesson *et al.*, 1997; Matsuzaki *et al.*, 2008). Είναι αξιοσημείωτο ότι η glycerol έχει συνδεθεί σε αυξημένη παθογένεια σε *Fusarium verticilloides* και *F. oxysporum* (Canero & Roncero 2008; Jurado *et al.*, 2008; Rangel *et al.*, 2008). Επομένως η φαινομενική επιδείνωση της ασθένειας από τον *R. solani* AG-1-IC στη παρούσα μελέτη μετά την έκθεσή του στο biochar σφενδάμου για 5 ημέρες μπορεί να αποδοθεί στην glycerol και ενδεχομένως άλλων συστατικών εντός του biochar που προωθούν την ανάπτυξη ή/και την μολυσματικότητα.

Επιπλέον οι αλλαγές των μεταβολιτών του *R. solani* που σχετίζονται με τον κύκλο TCA με την προσθήκη biochar επιδεικνύουν ότι ο μύκητας δύναται να αποδομήσει τα ανθρακικά πολυμερή εντός του biochar (Copley *et al.*, 2015). Μια μείωση στα προϊόντα σχετίζεται συχνά με μια αυξημένη απαίτηση για ενέργεια, η οποία παρατηρείται συχνά όταν οι μύκητες υποβάλλονται σε στρεσογόνες συνθήκες (Harding *et al.*, 2003). Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται σε μεταβολίτες του καλλιεργούμενου υπό biochar *R. solani*, υποδεικνύουν ότι το παθογόνο χρησιμοποιεί την κυτταρίνη, λιγνίνη ή πιθανόν άλλες ενώσεις του biochar για να διεγείρει την ανάπτυξη του παθογόνου στο μίγμα της γλάστρας. Παρόλο που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα, αποτελεί κοινή γνώση ότι ο *R. solani* είναι ισχυρός παραγωγός κυτταρασών και μπορούν να τις χρησιμοποιήσουν σε φλοιό σκληρού ξύλου αποτελεσματικά (Chung *et al.*, 1988).

Επιπλέον είναι πολύ πιθανόν οι αυξημένες συγκεντρώσεις xylitol στις υφές του *R. solani* να αποτελούν μια ένδειξη υψηλής μεταβολικής δράσης για προκάτοχες ενώσεις αμινοξέων, παραγωγή νουκλεϊκών οξέων, μεταβολισμό των αρωματικών συστατικών εντός του biochar προς παραγωγή αναγωγικής ισχύος ή παραγωγής προκατόχων ενώσεων για τον κύκλο TCA, τα οποία επηρεάστηκαν επίσης από την έκθεση του *R. solani* στο biochar (Kruger & von Schaewen 2003; Toivari *et al.*, 2007; Alper & Stephanopoulos 2009).

Παράλληλα η mannitol διαθέτει πληθώρα από βιολογικούς ρόλους σε σαπροφυτικούς και παθογενετικούς μύκητες, όπως αποθήκευση

υδατανθράκων, δεξαμενή αναγωγικής ισχύος ή ενίσχυσης σε αντοχής στο stress (Solomon *et al.*, 2007). Επομένως η αύξηση της mannitol στα κύτταρα των υφών του μύκητα που αναπτύχθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις biochar, μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας μολυσματικότητας ή δείκτης παθογένειας στο *R. solani*, μιας σχετίστηκε θετικά με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της στο biochar σε τρυβλία άγαρ-ύδατος. Αν και δεν είναι σαφής ο ακριβής μηχανισμός της διαμόρφωσης της μολυσματικότητας από την mannitol, οι παραπάνω ρόλοι μπορεί να συνεισφέρουν στους πιθανούς ρόλους της μολυσματικότητάς της στον *R. solani* AG-1-IC της παρούσας μελέτης.

Εν κατακλείδι πρέπει να εξεταστεί η επίδραση του biochar κορμού σφενδάμου σε άλλα εδάφη ή σε υποστρώματα γλάστρας, καθώς και σε άλλα συστήματα παθογένειας. Οι μελλοντικές κατευθύνσεις πρέπει να εστιάζουν περισσότερο στις αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή και στην διαχείριση ασθενειών ως ανταπόκριση στην τροποποίηση με biochar, καθώς και στην προσπάθεια της κατανόησης της επίδρασης των τροποποιητικών στην φυσιολογία και ανάπτυξη των παθογόνων. Τέλος καθίσταται απαραίτητη μια πιο εμπειριστατωμένη κατανόηση των παραγόντων που επιδρούν σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις, πριν την εφαρμογή του biochar σε εδάφη ή εδαφικά υποστρώματα γλάστρας ώστε να περιοριστούν οι απώλειες των καλλιεργειών.



Εικόνα 100: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάνναβης μετά από την επέμβαση με το Biochar σφενδάμου σε σχέση με των ίδιας επέμβασης μη εμβολιασμένων φυτών μάρτυρα, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Biochar και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, κατά τα οποία δεν παρατηρούνται διαφορές στο ύψος της ανάπτυξης των φυτών. (Γ) τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Δ) αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά υπό την επέμβαση του Biochar και δεξιά τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με *R. solani* υπό την ίδια επέμβαση 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και συγκομιδή των φύλλων. (Ε), (ΣΤ) εμβολιασμένο φυτό μετά από 4 ημέρες στο οποίο επισημάνονται με κόκκινο κύκλο τα κατώτερα φύλλα του που εμφανίζουν χλωρωτικές περιοχές και μεταχρωματισμό. (Ζ) Αριστερά τα μη εμβολιασμένα φυτά και δεξιά τα κάποια από τα εμβολιασμένα φυτά που παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και περιοχές φύλλων με ξηράνεσις και αποχρωματισμούς σε σχέση με τα ανεμβολίαστα.

4.4.4 Οι επεμβάσεις με εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum* σε φυτά εμβολιασμένα με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν παρόμοιους φαινοτύπους σε σχέση με της αντίστοιχης επέμβασης σπορίων ωφέλιμων μικροοργανισμών

Σύμφωνα με την **Εικόνα 101** τα εμβολιασμένα φυτά με *R. solani* AG-1-IC των επεμβάσεων με το σκεύασμα Acadia παρουσιάζουν παρόμοια εμφάνιση σε ανάπτυξη, αριθμό φύλλων και ευρωστία σε σύγκριση με τα αντίστοιχα εμβολιασμένα με μύκητα της επέμβασης σκευάσματος Ekorpor 4G. Για τους λόγους που αναλύθηκαν στις ενότητες 4.4.1 και 4.4.2 αλλά και με βάση την σημαντική αύξηση συγκεκριμένων μεταβολιτών που προκάλεσαν τα συγκεκριμένα σκευάσματα σύμφωνα με την μεταβολομική ανάλυση (ενότητες 4.7.1-4.7.1.7), μπορεί να δικαιολογηθεί η υγιής εμφάνιση των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών και στις δύο επεμβάσεις, χωρίς ωστόσο απαιτείται και περαιτέρω εκτίμηση για τον παράγοντα που ήταν πιο αποτελεσματικός σε αυτή την σύγκριση.



Εικόνα 101: Σύγκριση φαινοτύπων των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάνναβης μετά από την επέμβαση με το Ekorpor 4G σε σχέση με των αντίστοιχων της επέμβασης με Acadia, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα εμβολιασμένα με *R. solani* φυτά υπό την επέμβαση του Ekorpor 4G και δεξιά τα αντίστοιχα με Acadia 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, κατά τα οποία δεν παρατηρούνται διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών. (Γ), (Δ) τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

4.4.5 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε φυτά εμβολιασμένα με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα εμβολιασμένα φυτά της επέμβασης εκχύλισματος *Ascophyllum nodosum*

Σύμφωνα με την **Εικόνα 102** οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών παρουσιάζουν διαφορές στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών συγκριτικά με τα αντίστοιχα της επέμβασης με το Acadian. Συγκεκριμένα τα εμβολιασμένα φυτά προσθήκης biochar εμφάνισαν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους, με τα περισσότερα να εμφανίζουν παρόμοια ανάπτυξη σε σχέση με τα εμβολιασμένα της προσθήκης Acadian, ωστόσο κάποια από τα κατώτερα φύλλα εμφάνισαν χλωρωπικές περιοχές και μεταχρωματισμό (**Εικόνα 101 Δ, ΣΤ**). Επιπλέον ορισμένα φυτά προσθήκης biochar παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και με περιοχές φύλλων που παρουσίασαν ξηράνσεις και αποχρωματισμούς (**Εικόνα 101 Ε**) σε σχέση με αυτά της προσθήκης Acadian που φαινοτυπικά έδειχναν πιο υγιή και περισσότερο αναπτυγμένα. Για τους λόγους που αναλύθηκαν στην ενότητα 4.4.1 αλλά και με βάση την σημαντική αύξηση συγκεκριμένων μεταβολιτών που προκάλεσε το συγκεκριμένο σκευάσμα σύμφωνα με την μεταβολομική ανάλυση (ενότητες 4.7.1 - 4.7.1.7), μπορεί να δικαιολογηθεί η υγιής εμφάνιση των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών επέμβασης Acadian. Ωστόσο σε σύγκριση με τα εμβολιασμένα της επέμβασης biochar (ενότητα 4.4.3) που παρουσίασαν κάποια συμπτώματα προσβολής εμφανίζοντας διαφορετικούς φαινοτύπους, μπορεί να ειπωθεί ότι το Acadian ήταν πιο αποτελεσματικός βιοδραστικός παράγοντας στην μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας προκαλούμενης από τον μύκητα.



Εικόνα 101: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάρναβης μετά από την επέμβαση με το Acadian σε σχέση με των αντίστοιχων επέμβασης με Biochar, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα μη φυτά υπό την επέμβαση του Acadian και δεξιά τα αντίστοιχα της επέμβασης με Biochar σφενδάμου 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *R. solani*., κατά τα οποία δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών. (Γ) τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Δ) αριστερά φυτά επέμβασης με Acadian χωρίς συμπτώματα προσβολής και δεξιά τα αντίστοιχα με biochar 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *R. solani* όπου παρατηρούνται και επισημαίνονται με κόκκινο κύκλο τα κατώτερα φύλλα φυτών που εμφανίζουν χλωρωτικές περιοχές και μεταχρωματισμό. (Ε) Εμβολιασμένα με *R. solani* φυτά επέμβασης με Biochar που παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και περιοχές φύλλων με ξηράνσεις και αποχρωματισμούς σε σχέση με τα αυτά της επέμβασης με Acadian. (ΣΤ) κοντινή λήψη φυτών επέμβασης Biochar μετά από 4 ημέρες εμβολιασμού με *R. solani* όπου τονίζονται με κόκκινο κύκλο τα συμπτώματα του (Δ).

4.4.6 Οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου σε φυτά εμβολιασμένα με *Rhizoctonia solani* AG-1-IC εμφάνισαν φαινοτυπικές διαφορές στην υγεία των φύλλων και στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών σε σχέση με τα εμβολιασμένα φυτά της επέμβασης σπορίων ωφέλιμων μικροοργανισμών

Σύμφωνα με την **Εικόνα 103** οι επεμβάσεις με biochar σφενδάμου των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών παρουσιάζουν διαφορές στην ανάπτυξη ορισμένων φυτών συγκριτικά με τα αντίστοιχα της επέμβασης με το Ekorpor 4G. Συγκεκριμένα τα εμβολιασμένα φυτά προσθήκης biochar εμφάνισαν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους, με τα περισσότερα να εμφανίζουν παρόμοια ανάπτυξη σε σχέση με τα εμβολιασμένα της προσθήκης Ekorpor 4G, ωστόσο κάποια από τα κατώτερα φύλλα εμφάνισαν χλωρωτικές περιοχές και μεταχρωματισμό (**Εικόνα 103 Ε**). Επιπλέον ορισμένα φυτά προσθήκης biochar παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και με περιοχές φύλλων που παρουσίασαν ξηράνσεις και αποχρωματισμούς (**Εικόνα 103 ΣΤ**) σε σχέση με αυτά της προσθήκης Ekorpor 4G που φαινοτυπικά έδειχναν πιο υγιή και περισσότερο αναπτυγμένα. Για τους λόγους που αναλύθηκαν στην ενότητα 4.4.2 αλλά και με βάση την σημαντική αύξηση συγκεκριμένων μεταβολιτών που προκάλεσε το συγκεκριμένο σκευάσμα σύμφωνα με την μεταβολομική ανάλυση (ενότητες 4.7.1 - 4.7.1.7), μπορεί να δικαιολογηθεί η υγιής εμφάνιση των εμβολιασμένων με *R. solani* φυτών επέμβασης Ekorpor 4G. Ωστόσο σε σύγκριση με τα εμβολιασμένα της επέμβασης biochar (ενότητα 4.4.3) που παρουσίασαν κάποια συμπτώματα προσβολής εμφανίζοντας διαφορετικούς φαινοτύπους, μπορεί να ειπωθεί ότι το Ekorpor 4G ήταν πιο αποτελεσματικός βιοδραστικός παράγοντας στην μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας προκαλούμενης από τον μύκητα.



Εικόνα 103: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάναβης μετά από την επέμβαση με το Ekorpor 4G σε σχέση με των αντίστοιχων επέμβασης με Biochar, κατά την πορεία ανάπτυξης των φυτών. (Α), (Β) αριστερά τα μη φυτά υπό την επέμβαση του Ekorpor 4G και δεξιά τα αντίστοιχα της επέμβασης με Biochar σφενδάμου 3 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *R. solani.*, κατά τα οποία δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών. (Γ), (Δ) τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. (Ε) κοντινή λήψη φυτών επέμβασης Biochar μετά από 4 ημέρες εμβολιασμού με *R. solani* όπου παρατηρούνται και επισημαίνονται με κόκκινο κύκλο οι χλωρωπικές περιοχές και ο μεταχρωματισμός που εμφανίζουν τα κατώτερα φύλλα τους. (ΣΤ) εμβολιασμένα με *R. solani* φυτά επέμβασης με Biochar που παρουσίασαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και περιοχές φύλλων με ξηράνσεις και αποχρωματισμούς σε σχέση με τα αυτά της επέμβασης με Ekorpor 4G.

4.4.7 Επισκόπηση όλων των επεμβάσεων στα εμβολιασμένα με *R. solani* φυτά κάνναβης

Στην **Εικόνα 104** παρουσιάζονται και συγκρίνονται οι φαινότυποι όλων των επεμβάσεων στα εμβολιασμένα με *R. solani* AG-1-IC φυτά. Σύμφωνα με τις εικόνες τα φυτά των μαρτύρων (χωρίς επέμβαση) υστερούν κατά πολύ σε ανάπτυξη και ευρωστία συγκριτικά με τα φυτά που υπέστησαν επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες. Τα φυτά των επεμβάσεων με *Ascorhylum nodosum* (*Acadian*), ωφέλιμους μικροοργανισμούς (*Ekorpor 4G*) και τα περισσότερα φυτά της επέμβασης με biochar σφενδάμου παρουσίασαν παρεμφερείς φαινοτύπους σε ανάπτυξη και εμφάνιση (**Εικόνα 104 Α, Β, Γ**). Ωστόσο ορισμένα φυτά της επέμβασης με biochar παρέμειναν πιο καχεκτικά εμφανίζοντας χλωρώσεις, αποχρωματισμούς και ξηράνσεις στα φύλλα τους (**Εικόνα 104 Δ, Ε**) σε σχέση με τους άλλους βιοδραστικούς παράγοντες, αλλά πιο παραγωγικά σε ανάπτυξη από τα φυτά των μαρτύρων. Οι λόγοι της διαφορετικής εμφάνισης των φυτών επέμβασης με biochar αναλύθηκαν στην ενότητα 4.2.3. Επομένως τα σκευάσματα βιοδιεγερτών *Acadian* και *Ekorpor 4G* εμφανίζουν πολλές προοπτικές ως παράγοντες φυτοπροστασίας προς εφαρμογή σε φυτά κάνναβης και επιβάλλεται να διεξαχθούν περαιτέρω πειράματα μεγαλύτερης κλίμακας υπό συνθήκες αγρού για περισσότερα συμπεράσματα. Στην περίπτωση εφαρμογής του biochar σφενδάμου πρέπει οπωσδήποτε να ληφθεί υπόψη η θετική επίδραση που έχει το biochar στον μεταβολισμό του *R. solani* σύμφωνα και με δεδομένα επιδείνωσης των συμπτωμάτων ασθένειας που προκαλεί ο μύκητας (έστω και σε πειράματα *in vitro*), προτού προστεθεί σε καλλιεργήσιμο έδαφος.

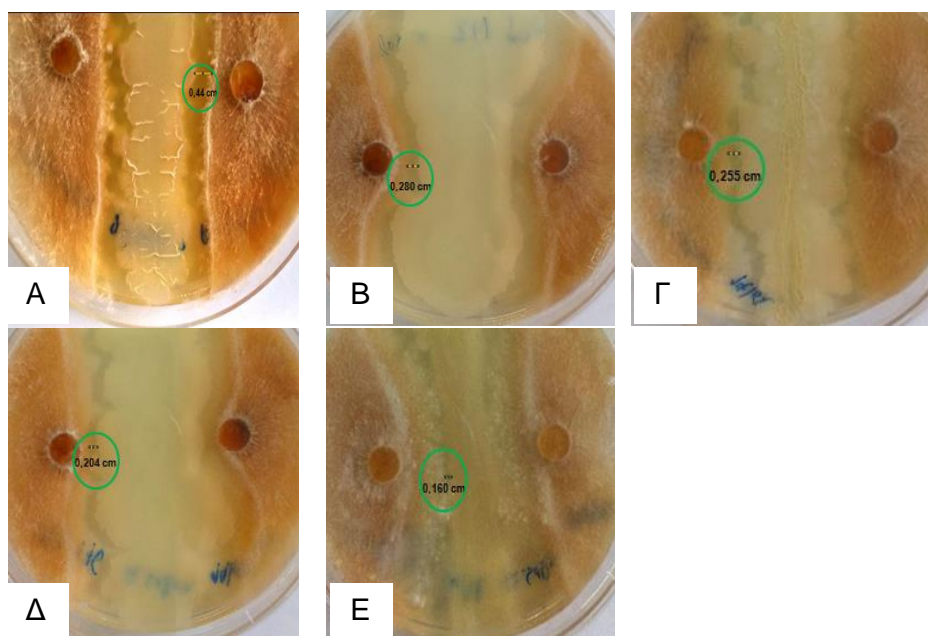


Εικόνα 104: Φαινοτυπικές διαφορές των εμβολιασμένων με τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC φυτών κάνναβης μετά από τις επεμβάσεις ACA με εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum*, EKO με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών, BIO με biochar σφενδάμου και Control με απιονισμένο νερό. (Α), (Β), φυτά υπό όλες τις επεμβάσεις 4 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με *R. solani*., κατά τα οποία παρατηρούνται εμφανείς διαφορές στην ανάπτυξη των φυτών μόνο των μαρτύρων με καχεκτικά φυτά που παρουσιάζουν φύλλα με ξηράνσεις, αποχρωματισμούς και τάση πλαγιάσματος του στελέχους. (Γ) τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό όπου και έγινε η συγκομιδή των φύλλων. (Δ), (Ε) ορισμένα φυτά επέμβασης με Biochar 5 ημέρες μετά τον εμβολιασμό εμφάνισαν εμφανώς πιο καχεκτική ανάπτυξη και περιοχές φύλλων με ξηράνσεις και αποχρωματισμούς σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά της ίδιας επέμβασης.

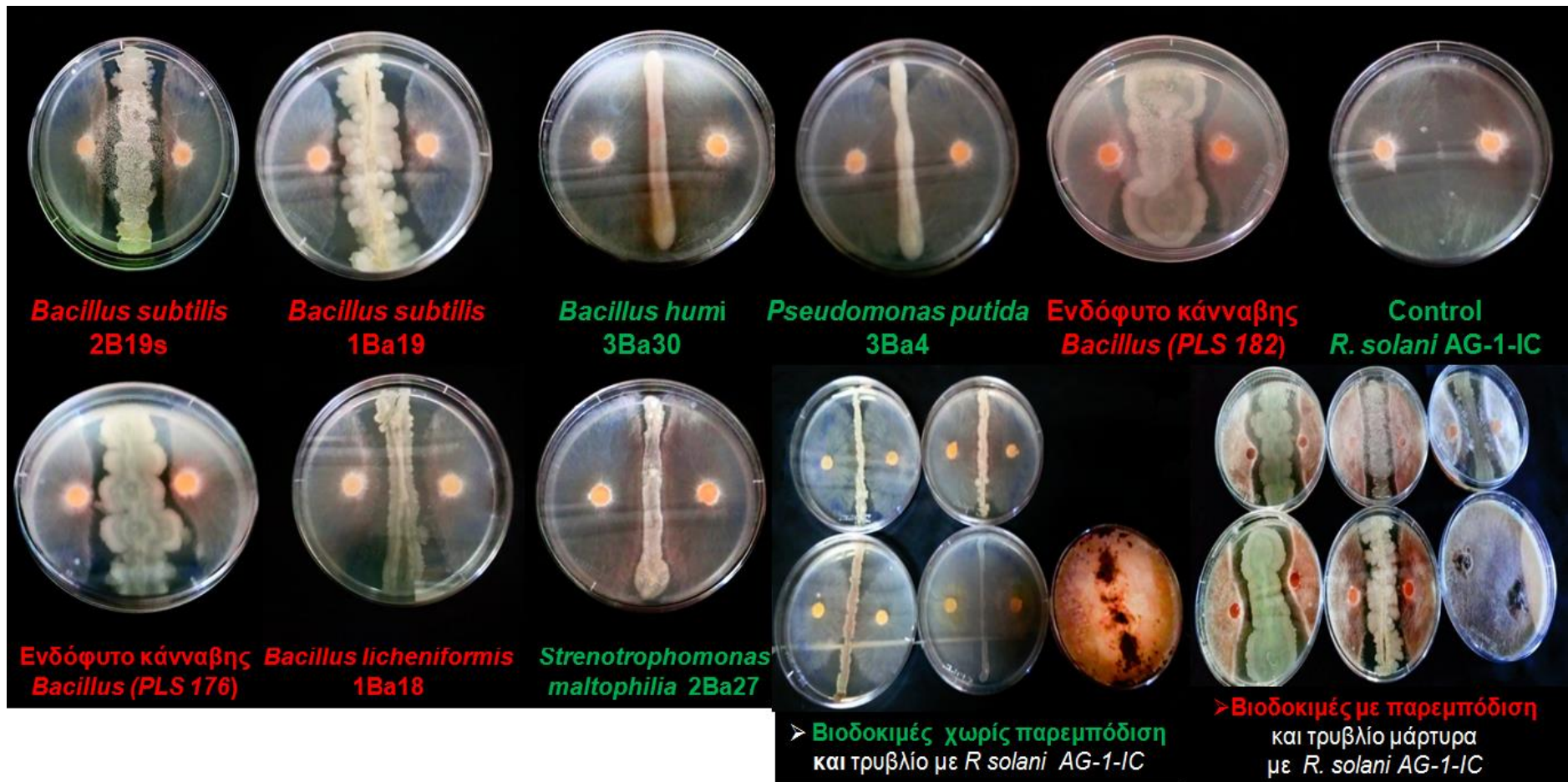
4.5 Τα στελέχη ριζοσφαιρικών βακτηρίων *Bacillus subtilis* 1Ba19, 2B19S, *B. licheniformis* 1Ba18 και των ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης *Bacillus* S₂ (PLS 176), *B. L*₅ (PLS 182) εμφάνισαν *in vitro* παρεμπόδιση έναντι του *Rhizoctonia solani* AG1-IC

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης ωφέλιμων βακτηρίων PGPRs και ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης σαν υποψήφιοι και μελλοντικοί παράγοντες φυτοπροστασίας έναντι του εδαφογενούς παθογόνου *R. solani* AG1-IC εφαρμόστηκαν πειράματα βιοδοκιμών για την εκτίμηση της *in vitro* παρεμπόδισης του *R. solani* AG1-IC από την δράση των βακτηρίων. Τα συγκεκριμένα βακτήρια των ριζοσφαιρικών κοινοτήτων «SynComs» παρουσιάζουν αποδεδειγμένη κατασταλτική δράση των συμπτωμάτων μάρανσης από την φυλή 1 απομόνωσης FoI004 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fox) (Rep *et al.*, 2005) και φυλή 1 απομόνωσης 70V *Verticillium dahliae* (Pantelides *et al.*, 2010) σε πειράματα *in vitro* φυτών αραβίδωσης (Tsolakidou *et al.*, 2019). Επομένως αποτέλεσε μεγάλο ενδιαφέρον και η διερεύνηση αυτών των κοινοτήτων για πιθανή *in vitro* παρεμπόδιση και στον *R. solani*. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 28**

Από όλα τα βακτήρια τα *Bacillus subtilis* 1Ba19, 2B19S, *B. licheniformis* 1Ba18, *B. S*₂ (PLS 176) και *B. L*₅ (PLS 182) εμφάνισαν *in vitro* παρεμποδιστική δράση στον *R. solani* AG1-IC (**Εικόνα 105**) και η αντίστοιχη ζώνη παρεμπόδισής τους καταγράφεται στον **Πίνακα 28** και **Εικόνα 104**.



Εικόνα 104: Τρυβλία των βακτηρίων με παρεμποδιστική δράση *in vitro* έναντι του *R. solani* AG1-IC και η αντίστοιχη ζώνη παρεμπόδισής όπως μετρήθηκε με το λογισμικό «Image J». (Α) *Bacillus subtilis* 2Ba19S, (Β) *Bacillus L*₅ (PLS 182), (Γ) *Bacillus subtilis* 1Ba19, (Δ) *Bacillus S*₂ (PLS 176), (Ε) *Bacillus licheniformis* 1Ba18.



Εικόνα 105: Αποτελέσματα βιοδοκιμών της *in vitro* παρεμπόδισης των ωφέλιμων ριζοφαιρικών βακτηρίων και ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης επί του μύκητα *Rhizoctonia solani* AG1-IC. Με κόκκινα γράμματα τα στελέχη βακτηρίων που παρουσίασαν παρεμπόδιση στον *R. solani* AG1-IC και με πράσινο ενδεικτικά στελέχη βακτηρίων (και μάρτυρας) τα οποία δεν παρουσίασαν παρεμπόδιση.

Πίνακας 28: Αποτελέσματα βιοδοκιμών εκτίμησης παρεμποδιστικής δράσης των βακτηρίων στον *R. solani* AG1-IC. Με κόκκινο φόντο και «+» τα βακτήρια που εμφάνισαν παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του *R. solani* και με πράσινο και «-» αυτά που δεν εμφάνισαν. Επίσης καταγράφεται η ζώνη παρεμπόδισης (cm)

SynCom2 (Bacilli)	Χρόνος επώασης σε TSA	Παρεμπόδιση <i>R. solani</i> AG-1-IC	SynCom1 (Rhizosphere)	Χρόνος επώασης σε TSA	Παρεμπόδιση <i>R. solani</i> AG-1-IC
<i>B. chandigarhensis</i> 3Ba3	δεν αναπτύχθηκε		<i>Pseudomonas putida</i> 3Ba4	24 ώρες	-
<i>B. endophyticus</i> 1Ba2	24 ώρες		<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> 1Ba3	24 ώρες	
<i>B. endophyticus</i> 3Ba21	δεν αναπτύχθηκε		<i>E. cloacae</i> 2Ba30	24 ώρες	-
<i>B. humi</i> 1Ba28	δεν αναπτύχθηκε		<i>Microbacterium foliorum</i> 2Ba37	24 ώρες	
<i>B. humi</i> 1Ba43	δεν αναπτύχθηκε		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 2Ba27	24 ώρες	-
<i>B. humi</i> 3Ba30	24 ώρες	-	<i>Ochrobactrum</i> sp. 2Ba42	24 ώρες	-
<i>B. licheniformis</i> 1Ba18	24 ώρες	+	<i>B. circulans</i> 1Ba46	24 ώρες	
<i>B. licheniformis</i> 3Ba16	24 ώρες	-	<i>Bacillus</i> sp. 2Ba43	24 ώρες	-
<i>B. licheniformis</i> 3Ba17	24 ώρες	-	<i>Bacillus</i> sp. 3Ba35	δεν αναπτύχθηκε	
<i>B. licheniformis</i> 3Ba20	24 ώρες	-			
<i>B. licheniformis</i> 3Ba28	24 ώρες		Ενδόφυτα κάνναβης		
<i>B. licheniformis</i> 3Ba44	δεν αναπτύχθηκε		<i>Bacillus</i> S2 (PLS 176)	24 ώρες	+
<i>B. licheniformis</i> 3Ba45	24 ώρες	-	<i>B. L5</i> (PLS 182)	24 ώρες	+
<i>B. licheniformis</i> 3Ba46	24 ώρες	-	<i>B. fL1</i> (168)	24 ώρες	-
<i>B. licheniformis</i> 3Ba9	24 ώρες	-			
<i>B. megaterium</i> 1Ba20	24 ώρες	-	Βακτήρια με παρεμπόδιση	Ζώνη παρεμπόδισης (cm)	
<i>B. subtilis</i> 1Ba19	24 ώρες	+	<i>Bacillus licheniformis</i> 1Ba18	0,160	
<i>B. subtilis</i> 2Ba19s	24 ώρες	+	<i>B. subtilis</i> 1Ba19	0,255	
<i>B. subtilis</i> CCS	24 ώρες		<i>B. subtilis</i> 2Ba19s	0,439	
<i>B. firmus</i> 2Ba55	δεν αναπτύχθηκε		<i>B. S2</i> (PLS 176)	0,204	
<i>B. foraminis</i> 1Ba49	24 ώρες	-	<i>B. L5</i> (PLS 182)	0,280	

Η συμβολή των ωφέλιμων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων και των PGPRs στην καταστολή ασθενειών σε επίπεδο αγρού περιγράφεται αναλυτικά στις ενότητες 1.5 και 4.4.2. Σε επίπεδο βιοδοκιμών ωστόσο η παρεμποδιστική ικανότητα έναντι παθογόνων εστιάζεται ουσιαστικά στην παραγωγή ενώσεων από τα PGPRs και ενδοφυτικά βακτήρια με διάφορες δυσμενείς επιπτώσεις για τα παθογόνα. Ιδίως τα είδη από το γένος *Bacillus* παράγουν μια ποικίλη συστοιχία από ανιμικροβιακούς μεταβολίτες, ανασταλτικούς στην ανάπτυξη και επιβίωση των φυτοπαθογόνων, όπως ανιμυκητιακές πρωτεΐνες (Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), πεπτιδία (Anthony *et al.*, 2009) και κυκλικά λιποπεπτιδία (Cawoy *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017) με τα τελευταία να συνδέονται και με την αποίκιση στην ρίζα (Ongena & Jacques 2008) και να έχουν δείξει επιμονή παρουσίας στο ριζοσφαιρικό έδαφος (Kinsella *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013).

Χαρακτηριστικό είδος του γένους αποτελεί το *B. subtilis* με συμμετοχές σε σχετικά πειράματα βιοπαρεμπόδισης. Συγκεκριμένα το στέλεχος NCD-2 παράγει τα ανιβιοτικά λιποπεπτιδία surfactin, fengycin, bacilaene και subtilosin, με το δεύτερο να αποδείχτηκε ως ο κύριος ανιμικροβιακός μεταβολίτης, υπεύθυνος για την καταστολή μάρανσης από τα *Verticillium* (Li *et al.*, 2005), **πλαγιάσματος από *R. solani* AG-4** στο βαμβάκι (Guo *et al.*, 2019) και «clubroot» από *Plasmodiophora brassicae* στο κινέζικο λάχανο (Guo *et al.*, 2019), όντας εγκεκριμένο ως βιο-Φ.Π. στην Κίνα έναντι του *Verticillium dahliae* στο βαμβάκι (Guo *et al.*, 2014). Επιπλέον στην σύγχρονη μελέτη των Zhang *et al.*, (2021) το ίδιο στέλεχος μείωσε σημαντικά την *in vitro* ανάπτυξη του ***R. solani* AG-8** σε ρίζες σιταριού μέσω μυκητιακής αντιβίωσης. Επίσης άλλο στέλεχος (Bs-1) του ίδιου είδους που απομονώθηκε από θαλάσσια ύδατα και ιζήματα, αποδείχτηκε ότι παρεμποδίζει *in vitro* την ασθένεια ρύγχους θήκης (sheath blight) στο ρύζι από τον *R. solani* (Raj *et al.*, 2019). Αυτό αποδόθηκε κατά μεγάλη πιθανότητα σε μια συλλογή ανιμυκητιακών ανιβιοτικών όπως 2,4-diacetylphloglucinol, oligomycin, phenazine, pyoluteorin, pyrolnitrin και pyrocyanin που παράγουν οι απομονώσεις του *B. subtilis* (Gupta *et al.*, 2001). Επιπλέον οι Höfte & Bakker (2007) και Reddy *et al.*, (2008) είχαν ισχυριστεί ότι ανιμυκητιακές ενώσεις όπως υδροκυάνιο (HCN), σαλικυλικό οξύ και 2-hydroxy phenazine που παράγουν οι βακτηριακοί παράγοντες βιοελέγχου καταστέλλουν τον φυτοπαθογόνο μύκητα.

Για το είδος *Bacillus licheniformis* έχει καταγραφεί ότι αυτό και τα προϊόντα του αναστέλλουν την ανάπτυξη πολυάριθμων μικροοργανισμών στο περιβάλλον. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες όπως λυτικά ένζυμα και βιολογικές επιφανειοδραστικές ουσίες (biosurfactants) που παράγονται από τα *B. licheniformis* αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών σε χαμηλή συγκέντρωση (Gutierrez-Manero *et al.*, 2001; Woo & Kim 2007). Επιπλέον τα ανιβιοτικά που παράγει όπως lichenysin (Madslien *et al.*, 2013), surfactin και iturin (Tendulkar *et al.*, 2007) έχουν φανεί να αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων μυκήτων και ως εκ τούτου εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης τους ως

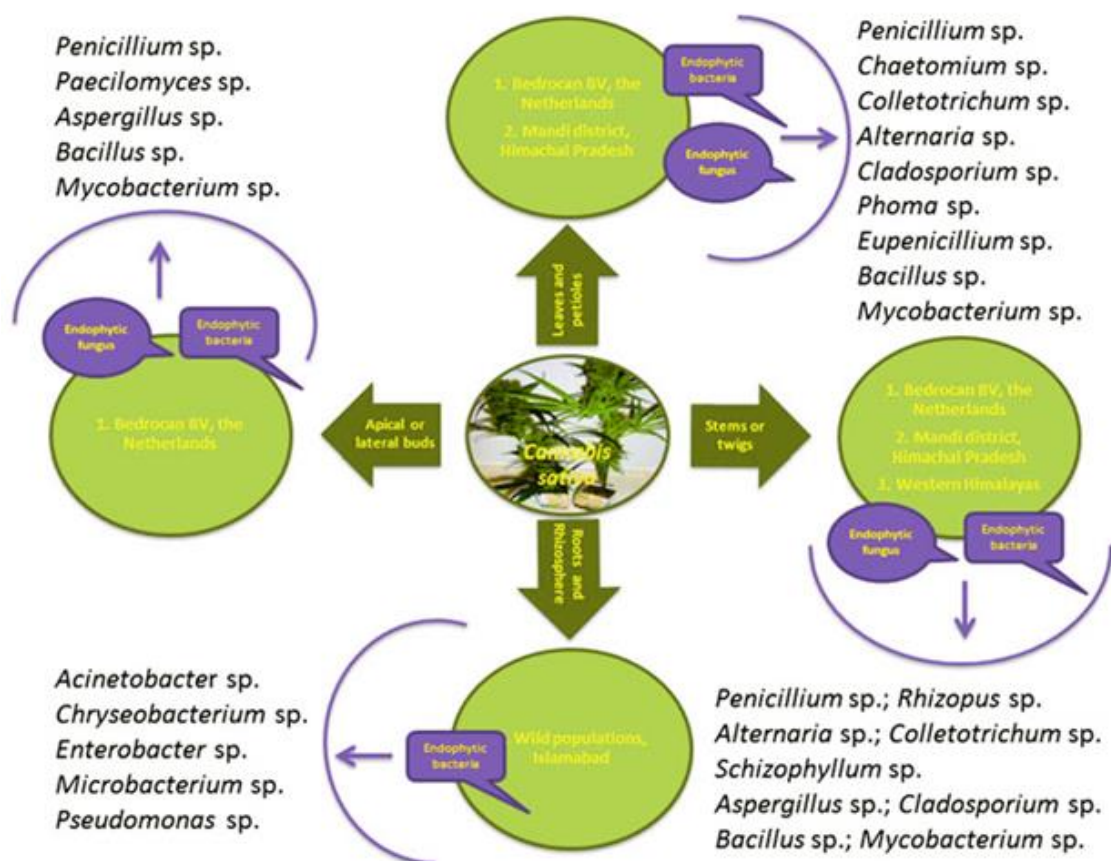
παράγοντες βιολογικού ελέγχου έναντι διαφόρων μυκητιακών φυτοπαθογόνων. Οι Jeong *et al.*, (2017) χρησιμοποιώντας το στέλεχος MH48 παρουσίασαν αντιμυκητιακή δράση ενάντια σε διάφορα παθογόνα συμπεριλαμβανομένου και του *R. solani*, αποδίδοντας αυτήν την ιδιότητα στο βενζοϊκό οξύ που παρήγαγε το στέλεχος, το οποίο απομονώθηκε, καθαρίστηκε από χρωματογραφικές τεχνικές και ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπικών αναλύσεων NMR και GC/MS. Επιπροσθέτως οι Akladiou *et al.*, (2018) είχαν εξετάσει την αντιμυκητιακή δράση μιας βιολογικής επιφανειοδραστικής ένωσης που παρήχθη από το *B. licheniformis* και μείωσε κατά πολύ τα συμπτώματα της σηψιρριζίας από ***R. solani* AG-4** σε δύο καλλιεργήσιμες ποικιλίες κουκιών (*Vicia faba*) Nubarria 1 και Sakha.

Στην μελέτη των Tsolakidou *et al.*, (2019) όπου αξιολογήθηκαν τα SynComs της παρούσας μελέτης για PGPRs και παράγοντες βιολογικού ελέγχου έναντι της φυλής 1 απομόνωσης 70V *Verticillium dahliae* και φυλής 1 απομόνωσης Fol004 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fox) σε φυτά αραβίδωσης, η παρεμποδιστική ικανότητα όλων των στελεχών *B. licheniformis* και *B. subtilis* αποδόθηκε στην δράση ενζύμων πηκτινάσης, κυτταράσης (8 στελέχη), στη πρωτεολυτική δράση (όλα τα στελέχη *B. subtilis*) και στην δράση της χιπινάσης (όλα τα στελέχη *B. licheniformis*) διότι σύμφωνα με τους Chernin & Chet (2002) και Compant *et al.*, (2005) η μικροβιακή πολύπλευρη δράση στην ριζόσφαιρα και η μικροβιακή δυνατότητα βιολογικού ελέγχου συνδέεται συνήθως με την παραγωγή υδρολυτικών ενζύμων (χητινάσες, γλυκανάσες, πρωτεάσες, κυτταράσες), ενώ τα κυκλικά λιποπεπτίδια που παράγονται από τα μικρόβια αναστέλλουν την ανάπτυξη φυτοπαθογόνων, διευκολύνουν την αποίκιση της ρίζας και διεγείρουν μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Raaijmakers *et al.*, 2010). Επομένως τα απομονωμένα στελέχη *Bacilli* συνιστούν μια δεξαμενή από ενζυματικές δράσεις που πιθανότητα επέδρασαν με παρόμοιο τρόπο και στην παρεμπόδιση του *R. solani* AG1-IC στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά τους ενδοφυτικούς οργανισμούς κάνναβης, διαδραματίζουν κι αυτοί ρόλο στα αποτελέσματα των βιοδοκιμών της παρούσας μελέτης. Τα τελευταία χρόνια οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί (EM) έχουν γίνει το κέντρο εστίασης της έρευνας στην ανακάλυψη των φυσικών προϊόντων. Κάτι που αποδίδεται στις μοναδικές χημικές δομές και φυσικοχημικές τους ιδιότητες που επιδεικνύουν διάφορες βιοδραστικότητες (Nisa *et al.*, 2015; Ozma *et al.*, 2018). Μέσα στο πλαίσιο αυτό οι EM αντιπροσωπεύουν μια εξαιρετική και εναλλακτική πηγή βιοδραστικότητας με σπουδαία δυνατότητα για εφαρμογές στην φυτοπροστασία (Fadiji & Babalola 2020; Aliferis 2020). Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί από μη προσβεβλημένους φυτικούς ιστούς κάνναβης διάφορα ενδοφυτικά βακτηριακά και μυκητιακά είδη (Kusari *et al.*, 2013, 2014a), (Gautam *et al.*, 2013; Quadri *et al.*, 2013; Afzal *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2018) (Εικόνα 106).

Εστιάζοντας στα είδη του γένους *Bacillus* θεωρούνται τα πιο μελετημένα γένη ενδοφύτων λόγω της ανώτερης ικανότητά τους για σύνθεση ευρείας

συστοιχίας από βιοδραστικά μόρια (Caulier *et al.*, 2019) όπως αναφέρθηκαν ήδη παραπάνω. Η δραστηριότητα αυτών των μορίων αποδίδεται κυρίως στην αμφιφιλική δομή τους (πολικός πεπτιδικός δακτύλιος συνδεδεμένος με μια υδροφοβική αλυσίδα λιπαρού οξέος) και έχουν μελετηθεί οι αντιμυκητιακές, αντιβιοτικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες (Falardeau *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2018; Olishavska *et al.*, 2019; Penha *et al.*, 2020). Και επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν μηχανισμούς φυτικής άμυνας (Choudhary & Johri 2009; Wu *et al.*, 2018). Οι Scott *et al.*, (2018) απομόνωσαν ενφοφυτικά βακτήρια και μύκητες από κάνναβης, τα οποία παράγαν HCN, μεταξύ των οποίων και το γένος *Bacillus*. Η ικανότητα αυτή των ενδοφύτων του *Bacillus* τα καθιστά ως μικροοργανισμούς επιτυχημένους ανταγωνιστές παθογόνων σε διάφορα περιβάλλοντα, διότι το HCN θεωρείται ένας πανίσχυρος παράγοντας βιοελέγχου και μπορεί να προστατεύσει τα φυτά από βιοτικές σκαταπονήσεις. Πράγματι βακτήρια με αυτήν την ιδιότητα είναι γνωστά για αναστολή διαφόρων φυτοπαθογόνων και συνεπώς έμμεσης ενίσχυσης της φυτικής ανάπτυξης (Santoyo *et al.*, 2012).



Εικόνα 106: Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα που δείχνει την ποικιλότητα ενδοφύτων που κατοικούν σε διαφορετικούς ιστούς των φυτών *Cannabis sativa* που ευδοκιμούν σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες. Πηγή: Kusari *et al.*, (2017).

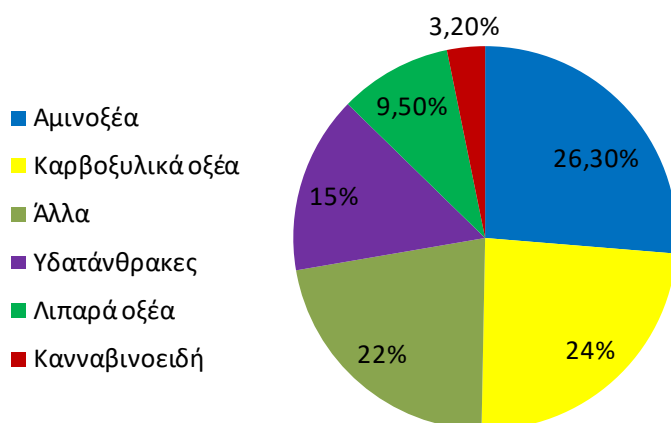
Εν κατακλείδι τα *Bacillus subtilis* 1Ba19, 2B19S, *B. licheniformis* 1Ba18, *B. S₂* (PLS 176) και *B. L₅* (PLS 182) μπορούν να αποτελέσουν πιθανοί παράγοντες βιολογικού ελέγχου σε σχεδιασμένα πειράματα αγρού. Η προσθήκη των PGPRs *Bacillus subtilis* 1Ba19, 2B19S και *B. licheniformis* 1Ba18 ως προϊόντα θρέψης των φυτών συνεισφέρει στην αποίκισή τους στη ρίζα ανταγωνίζοντας άλλα φυτοπαθογόνα (όπως *R. solani*), ενώ η ίδια διαδικασία με τους ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς κάνναβης *Bacillus. S₂* (PLS 176) και *B. L₅* (PLS 182) αυξάνει τον πληθυσμό της μικροβιακής κοινότητας και ενισχύει την δράση τους είτε ως παράγοντες ανάπτυξης φυτών είτε ως παράγοντες βιολογικού ελέγχου. Μια ακόμα δυνατότητα αξιοποίησης των ενδοφυτικών βακτηρίων κάνναβης αποτελεί η απομόνωση με εργαστηριακές τεχνικές των τοξικών για τα φυτοπαθογόνα δευτερογενών μεταβολιτών τους σε καθαρή μορφή και να παρασκευαστούν μελλοντικά ανάλογα Φ.Π. σταθερής και κατάλληλης συνταγής (formulation), κάτι που καθίσταται ιδιαίτερος απαιτητικό έργο (Sticher 2008; Bucar *et al.*, 2013).

4.6 Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης συνέβαλε στην καταγραφή και εκτίμηση σημαντικού μέρους του μεταβολώματος των φύλλων κάνναβης

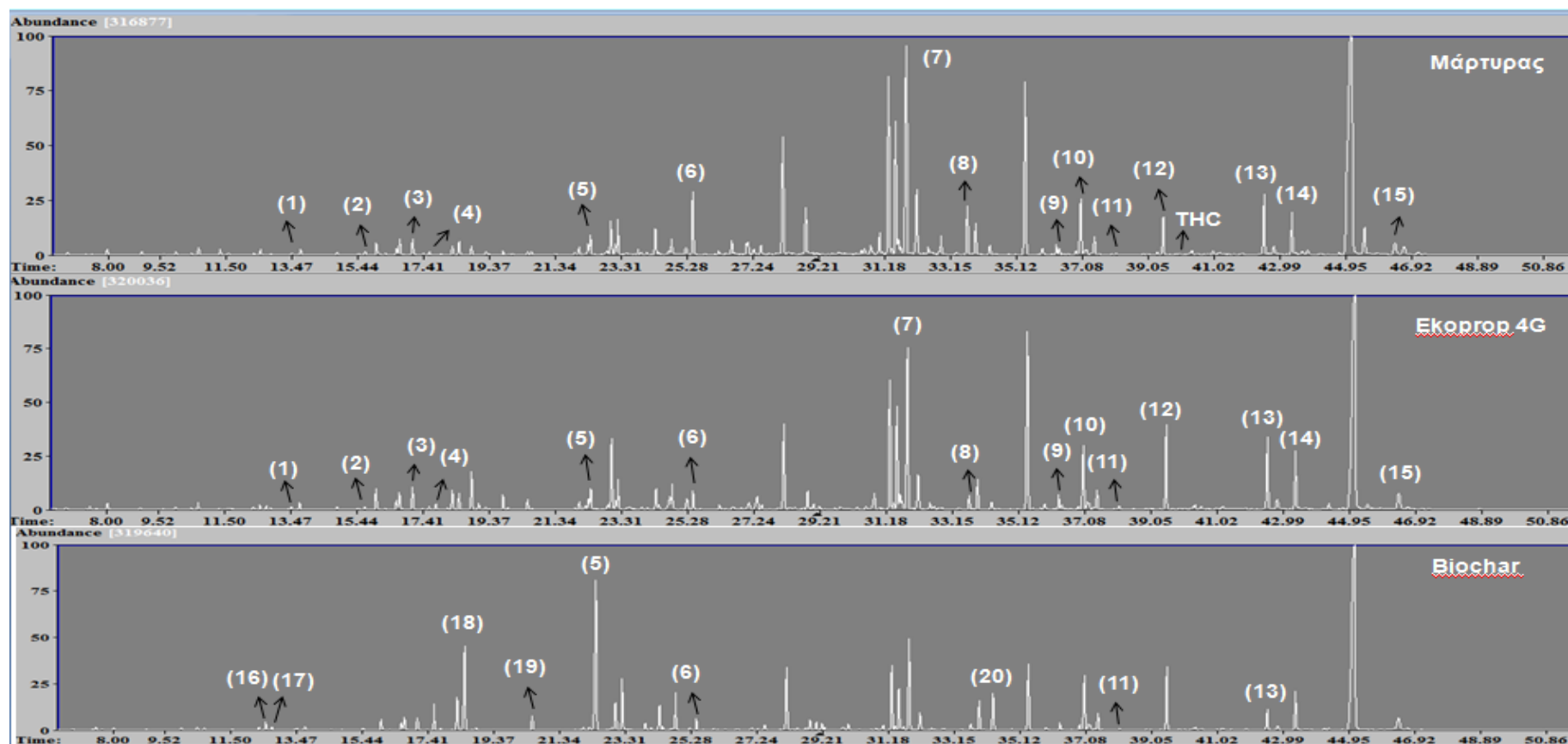
Το βασικό πλάνο της μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS που εφαρμόστηκε, στόχευε στην καταγραφή ενδεχόμενων αλλαγών στο μεταβολισμό των φυταρίων κάνναβης. Οι συνθήκες υπό τις οποίες έγινε η ανάλυση (Ενότητα 3.7) σύμφωνα με το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο εφαρμογής, οι ρυθμίσεις και οι παράμετροι της ενόργανης ανάλυσης με το GC/EI/MS (Ενότητα 3.7.1) αλλά και η βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων, συνέβαλαν σε επιτυχή κωδικοποίηση (*deconvolution*) των μεταβολιτών που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από το ενδο-μεταβόλωμα των φύλλων κάνναβης προς ανάλυση. Το αποτέλεσμα ήταν η λήψη μεταβολομικών προφίλ με υψηλής ποιότητας χρωματογραφήματα ευδιάκριτων οξείων κορυφών παρουσιάζοντας τον βέλτιστο δυνατό διαχωρισμό, με τον οποίο ξεχωρίζουν αρκετοί μεταβολίτες (Εικόνα 108)

Στο σύνολό τους ανακαλύφθηκαν 178 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 97 με τη βοήθεια του προγράμματος AMDIS και της βάσης δεδομένων NIST (Παράρτημα 2). Λαμβάνοντας υπόψη το μεταβολικό προφίλ που καταγράφηκε, τα ποσοστά των μεταβολιτών στα φύλλα κάνναβης περιλαμβάνουν 26,3% αμινοξέα, 24% καρβοξυλικά οξέα, 15% υδατάνθρακες, 9,5% λιπαρά οξέα, 3,2% κανναβινοειδή και 22% τα υπόλοιπα συστατικά (Εικόνα 107).

Χημικές ομάδες ταυτοποιημένων μεταβολιτών κάνναβης



Εικόνα 107: Ποσοστά των χημικών ομάδων που ανήκουν τα ταυτοποιημένα συστατικά του μεταβολώματος φύλλων κάνναβης.



Εικόνα 108: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα GC/EI/MS εκχυλισμάτων φύλλων φυτών κάναβης (*Cannabis sativa* L.) μάρτυρα (χωρίς επέμβαση), επέμβασης με **Εκορροπ 4G** και **Biochar** στα οποία σημειώθηκαν ενδεικτικά οι εξής μεταβολίτες: (1) L-Proline, (2) L-Serine, (3) L-Threonine, (4) Succinic acid, (5) Malic acid, (6) L-Glutamine, (7) D-Fructose (8) Myo-inositol, (9) α-Linolenic acid, (10) 2-O-Glycerol-α-d-galactopyranoside, (11) Cannabidiol, (12) 2-O-Glycerol-α-d-galactopyranoside, (13) Cannabinol, (14) Monopalmitin, (15) α-α-Trehalose (16) Oxalic acid, (17) L-Leucine, (18) Maleic acid, (19) L-Aspartic acid, (20) L-Pyroglutamic acid. Στο χρωματογράφημα του μάρτυρα και μόνο ανιχνεύτηκε σε πάρα πολύ μικρή συγκέντρωση το κανναβινοειδές Δ9-Tetrahydrocannabinol (THC) στον χρόνο κατακράτησης 39.72, και ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκε στο matrix της μεταβολομικής.

4.6.1 Οι επεμβάσεις με τα σκευάσματα βιοδιεγερτών Acadian, Ekoprop 4G και με το οργανικό προσθετικό εδάφους biochar είχαν σημαντική επίδραση στην περιεκτικότητα των φυταρίων κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) σε μεγάλο αριθμό μεταβολιτών

Η μεταβολομική ανάλυση GC/EI/MS πραγματοποιήθηκε με στόχο την ανακάλυψη ενδεχόμενων αλλαγών στον μεταβολισμό των φυτών κάνναβης ύστερα από τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες. Η συγκεκριμένη ανάλυση δύναται να καλύψει ένα σημαντικό μέρος του μεταβολώματος, συνεπώς η μέθοδος εφαρμόστηκε για την αξιολόγηση της επίδρασης των επεμβάσεων στο μεταβολισμό των φυτών. Η ανάλυση με GC/EI/MS είναι μια διαδεδομένη πλατφόρμα μεταβολομικής ευρείας χρήσεως που μπορεί να απεικονίσει ένα προφίλ με εκατοντάδες μεταβολίτες, οι οποίοι ταξινομούνται σε διάφορες χημικές ομάδες (π.χ. αμινοξέα, λιπαρά οξέα, καρβοξυλικά οξέα, υδατάνθρακες, κανναβινοειδή). Ταυτόχρονα η παρουσία βάσεων δεδομένων στις οποίες καταγράφονται τα φάσματα μάζας τύπου MS, MS/MS πολλών μεταβολιτών, διευκολύνουν την ταυτοποίησή τους και δίνει μία επιπλέον δυναμική στην τεχνική. Η βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων έδειξε ότι οι επεμβάσεις είχαν μεγάλη επίδραση σε σημαντικούς μεταβολίτες των φυτών κάνναβης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στις παρακάτω ενότητες.

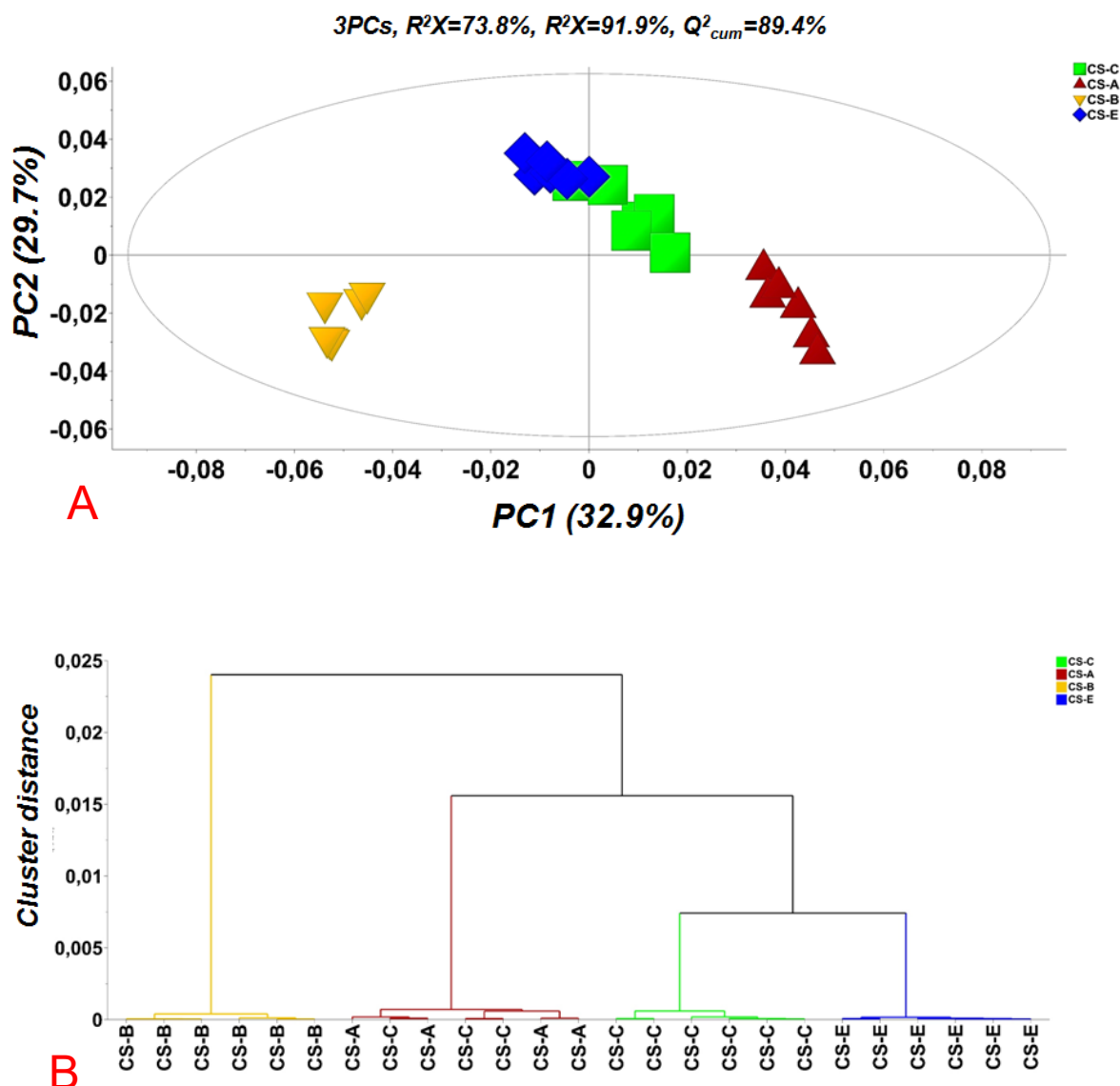
4.7 Γενική επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS στα φυτά κάνναβης

Από τα χρωματογραφήματα που επεξεργάστηκαν με μεθόδους βιοπληροφορικής μέσω του λογισμικού MS-Dial σε συνδυασμό με πολυπαραγοντική ανάλυση (PCA), προέκυψε μια στενή ομαδοποίηση σε όλες τις επαναλήψεις των επεμβάσεων (*replications*) στα διαφορετικά δείγματα των φύλλων κάνναβης και δίχως ακραίες τιμές (*outliers*). Επιπλέον μέσω της OPLS-DA επιτεύχθη η ανακάλυψη των τάσεων μεταξύ των επεμβάσεων αλλά και των μεταβολιτών-βιοσημαντών. Συγκεκριμένα καταγράφονται τα στατιστικά δεδομένα σε ομάδες και παρουσιάζονται οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης $R^2X=73,8\%$, $R^2Y=91,9\%$ και της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου $Q^2_{cum}=89,4\%$, οι οποίες επιβεβαιώνουν την επαναληψιμότητα στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ των δειγμάτων. Η αξιοπιστία αυτών των τιμών εξαρτάται από την ομοιόμορφη και επιτυχή πειραματική μεταχείριση και επεξεργασία των δειγμάτων κάνναβης που προορίζονταν για μεταβολομική ανάλυση GC/EI/MS.

Έπειτα σύμφωνα και με αντίστοιχο OPLS-DA scoreplot (Εικόνα 109 A) οι δύο από τους τρεις βιοδραστικούς παράγοντες είχαν φανερή επίδραση στα μεταβολικά προφίλ των φυτών κάνναβης με την μεγαλύτερη να έχει το

biochar, λόγω ότι οι επαναλήψεις με το σκεύασμα βιοδιεγέρτη Acadian που περιείχε εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum* (CS-A) και ιδίως με το biochar (CS-B) διαφέρουν σημαντικά από τις αντίστοιχες του μάρτυρα (CS-C). Στην επέμβαση με το σκεύασμα βιοδιεγέρτη σπορίων ωφέλιμων μικροοργανισμών EkorporG (CS-E) οι επαναλήψεις δεν διαφέρουν όλες σημαντικά από αυτές του μάρτυρα. Επιπλέον πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στα OPLS-DA scoreplots, οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες με τις διαφορές των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ.

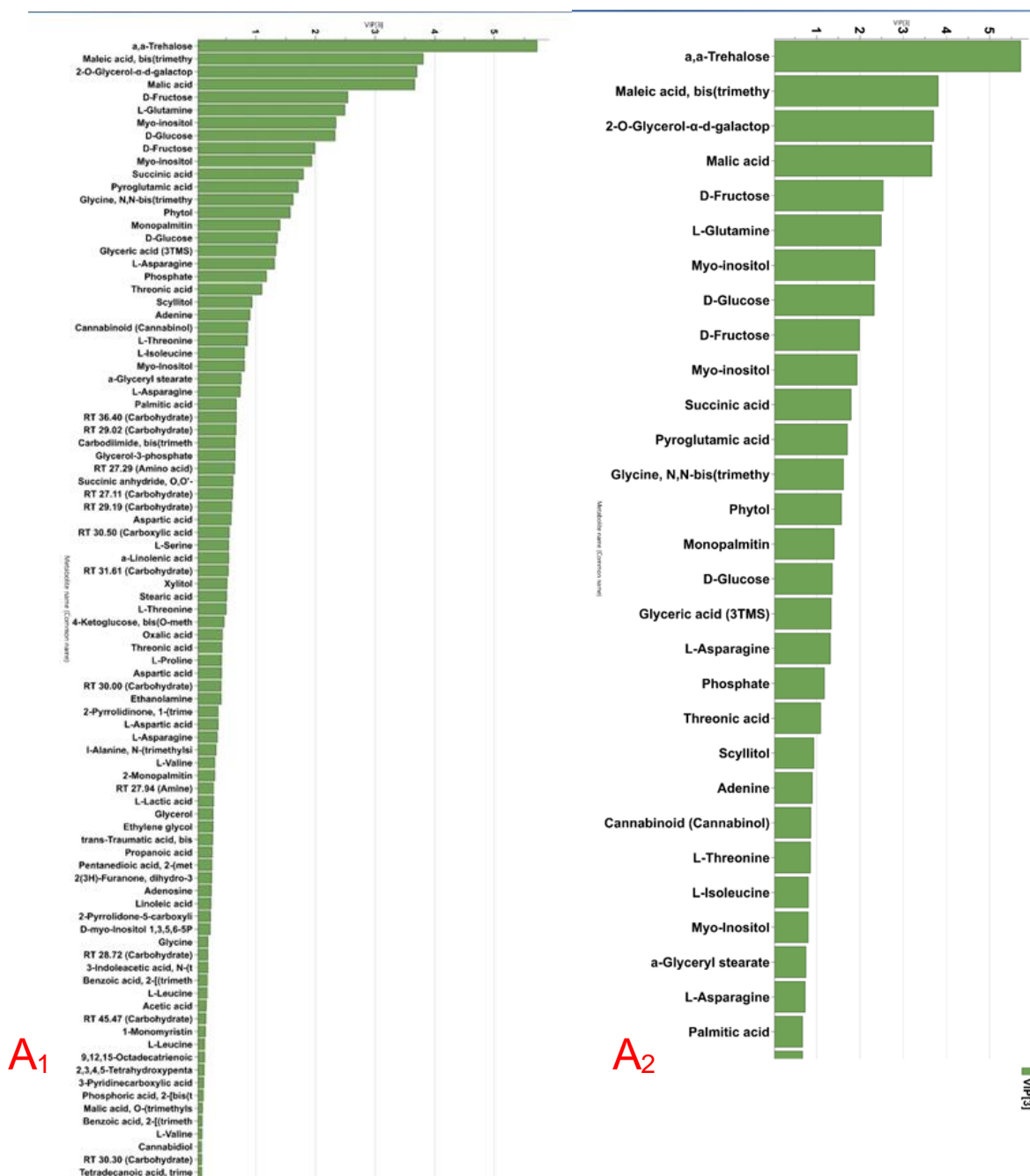
Πέραν της OPLS-DA εφαρμόστηκε και ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες HCA, με τα αποτελέσματα να συμφωνούν με αυτή. Βάσει του δένδρογράμματος κατά συστάδες (HCA dendrogram) διακρίνεται καλός διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων, αναλόγων των επεμβάσεων (Εικόνα 109 B). Επιπλέον παρατηρείται ότι η επέμβαση με Biochar (CS-B) και δευτερευόντως με *Ascophyllum nodosum* του σκευάσματος Acadian (CS-A) επέφεραν τις μεγαλύτερες επιδράσεις στον μεταβολισμό των φυτών, ενώ μεταξύ της επέμβασης με ωφέλιμους μικροοργανισμούς του σκευάσματος Ekorpor 4G (CS-E) και του μάρτυρα (CS-C) παρατηρούνται μικρότερες διαφορές σε σχέση με τις άλλες επεμβάσεις και με ορισμένες επαναλήψεις να μην επιδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Επομένως τα παραπάνω δεδομένα φανερώνουν εμφανώς την επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στον μεταβολισμό των φυτών, αναδεικνύοντας την ευρεία δυναμική της μεταβολομικής ανάλυσης αλλά και την δυνατότητα εφαρμογής της.



Εικόνα 109 : OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό των μεταβολικών προφίλ φυτών κάνναβης μέσω GC/EI/MS για τις επεμβάσεις με βιοδραστικούς παράγοντες. Οι επεμβάσεις περιελάμβαναν τον μάρτυρα (CS-C) και τους βιοδραστικούς παράγοντες που αποτελούνταν από εκχύλισμα *Ascophyllum nodosum* του σκευάσματος Acadian (CS-A), σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών του σκευάσματος Ekorpor 4G (CS-E) και του οργανικού προσθετικού εδάφους biochar σφενδάμου (CS-B). Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hotelling's T2 σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. (A) PC: Κύριες Συμπτώσεις, Principal Component, (B) το αντίστοιχο δένδρογραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (*Hierarchical Cluster Analysis, HCA dendrogram*).

Επιπροσθέτως στο VIP plot αναπαρίσταται η επίδραση των μεταβολικών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό μεταξύ των φυτών κάνναβης που υπέστησαν τις επεμβάσεις, με τις υψηλότερες τιμές να αφορούν τους μεταβολίτες που είχαν την μεγαλύτερη επίπτωση στον παρατηρούμενο αυτό διαχωρισμό, ενώ οι αντίστοιχα οι χαμηλότερες τιμές αφορούσαν τους μεταβολίτες με μικρότερη

επίπτωση στον διαχωρισμό (Εικόνα 110 Α). Οι κυριότεροι μεταβολίτες με την μεγαλύτερη επίπτωση φαίνονται να ήταν οι α-α-Trehalose, Maleic acid, bis(trimethy), 2-O-Glycerol-α-d-galactop και Malic acid.



Εικόνα 110: Vpr plot της επίδρασης των μεταβολιτών στον διαχωρισμό που παρατηρήθηκε μεταξύ των φυτών βιομηχανικής κάνναβης ποικιλίας Futura 75 κατά την επέμβασή τους με νερό (μάρτυρας), με τους βιοδιεγέρτες Acadian και Ekorpor 4G και το οργανικό προσθετικό εδάφους Biochar. (A₁), οι συνολικοί μεταβολίτες που είχαν επίπτωση στον παραπάνω διαχωρισμό με τις υψηλότερες τιμές να ανιππροσωπεύουν τους μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη επίπτωση. (A₂) οι μεταβολίτες με την υψηλότερη επίπτωση στον παραπάνω διαχωρισμό.

4.7.1 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στην περιεκτικότητα των φύλλων φυταρίων κάνναβης σε επιλεγμένους μεταβολίτες

Ένα από τα πλάνα της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η αξιολόγηση της επίδρασης των βιοδραστικών παραγόντων στη περιεκτικότητα όλων των μεταβολιτών της κάνναβης που ταυτοποιήθηκαν από την GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση. Ως εκ τούτου στις παρακάτω ενότητες θα γίνει μια πλήρης χαρτογράφηση των αλλαγών στον συνολικό μεταβολισμό των φυτών. Αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μελέτης των κατηγοριών μεταβολιτών και της σύγκρισης των περιεκτικότητων τους μεταξύ φυτών του μάρτυρα και αυτών που δέχθηκαν τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες.

Θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στις αλλαγές που υφίστανται τα επίπεδα των μεταβολιτών που χρήζουν ιδιαίτερης σημασίας για το φυτό, καθώς λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια, συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών είτε σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες. Επομένως η μελέτη εστιάστηκε κυρίως στις ομάδες μεταβολιτών αμινοξέα, λιπαρά οξέα, καρβοξυλικά οξέα, κανναβινοειδή και υδατάνθρακες. Λαμβάνοντας δε υπόψη τα ζητήματα που αντιμετωπίζει ο κλάδος της φυτοπροστασίας στη κάνναβη, μπορούμε να πούμε ότι τα δεδομένα που προέκυψαν είναι ιδιαίτερος σημαντικά σε αυτό το πλαίσιο και δίνουν πολύτιμες πληροφορίες και συμπεράσματα για το ενδεχόμενο εφαρμογής των βιοδραστικών παραγόντων ως νέες πηγές φυτοπροστατευτικής δράσης. Μεταξύ όλων αυτών των μεταβολιτών που συνάδουν σε αυτά τα συμπεράσματα περιλαμβάνονται οι L-Alanine, L-Proline, L-Serine, L-Threonine, L-Glutamine, monopalmitin, α -Linolenic acid, Succinic acid, Malic acid, Cinnamic acid, Cannabidiol, Cannabinol, α - α -Trehalose, 2-O-Glycerol- α -d-galactopyranoside και Myo-inositol.

4.7.1.1 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα αμινοξέων

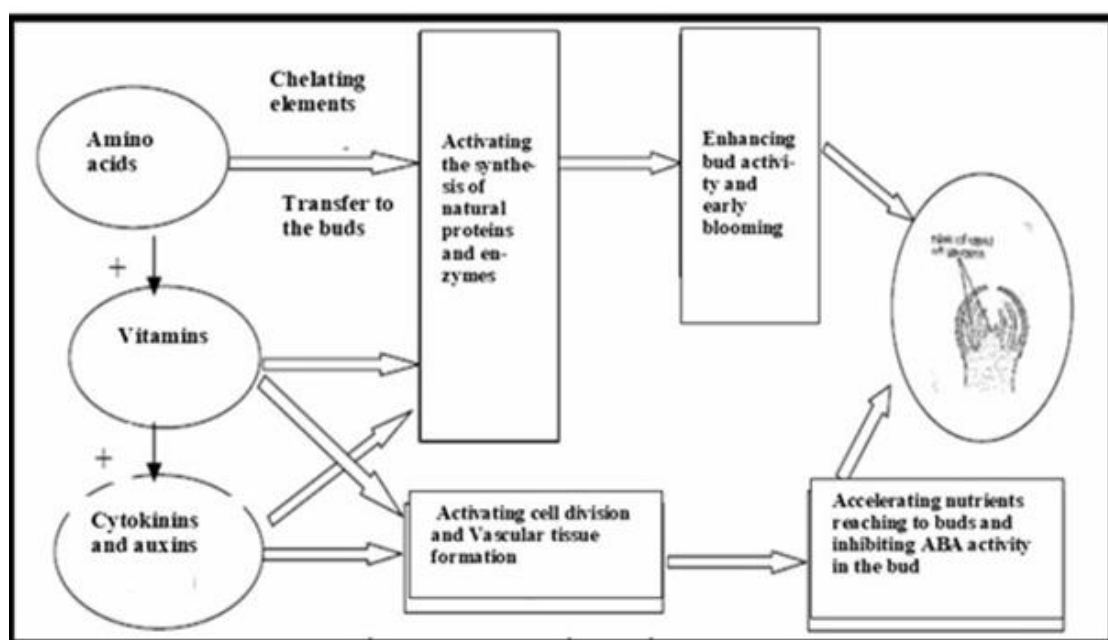
Τα αμινοξέα αποτελούν προκάτοχες ενώσεις και δομικά συστατικά των πρωτεϊνών (Belitz *et al.*, 2004). Πέραν αυτού του ρόλου τα αμινοξέα εμπλέκονται και σε μια πληθώρα από κυτταρικές αντιδράσεις και επομένως επηρεάζουν έναν αριθμό από φυσιολογικές διεργασίες όπως την αύξηση και ανάπτυξη, έλεγχο ενδοκυτταρικού pH, παραγωγή μεταβολικής ενέργειας και αντοχή σε βιοτικές και σε αβιοτικές καταπονήσεις (Hildebrandt *et al.*, 2015). Δεδομένου ότι η ζωή εξαρτάται από μια συνεχή ροή μεταβολικών που παρέχουν δομικά στοιχεία, καθώς και πηγή εξοικονόμησης ενέργειας για αύξηση, ανάπτυξη, εξέλιξη και αναπαραγωγή τα αμινοξέα ως τέτοια μόρια και με τον ρόλο των μεταβολικών διαμεσολαβιτών, μπορούν να εξυπηρετήσουν ως σηματοδοτικά μόρια συνεισφέροντας στο σύνθετο ρυθμιστικό δίκτυο, το οποίο εν τέλει προσαρμόζει την γονιδιακή έκφραση στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις κατά τον κύκλο της ζωής, ή ως ανταπόκριση σε ένα εναλλασσόμενο περιβάλλον (Hausler *et al.*, 2014).

Επιπλέον η ικανότητα των φυτών να ανταπεξέρχονται σε δυσμενείς αβιοτικές καταπονήσεις (*αλατότητα, ξηρασία, πλημμύρα, ακραίες θερμοκρασίες*) εκφράζεται και με την αυξημένη συσσώρευση διαφορετικών οσμωλυτών μεταβολικών (*υδατάνθρακες, βεταίνες proline, και άλλα αμινοξέα*), διεργασία που αποτελεί βασική πτυχή του μεταβολισμού των αμινοξέων στα φυτά (Ali *et al.*, 2019). Μεταξύ αυτών των μεταβολικών η συσσώρευση των αμινοξέων παίζει επίσης έναν σημαντικό ρόλο συμπεριλαμβανομένου του ανοίγματος και κλεισίματος των στοματίων που βοηθά στην διατήρηση της ισορροπίας του κυτταρικού ύδατος (Kamran *et al.*, 2009).

Στην **Εικόνα 112** αναφέρονται ορισμένες φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες που καθορίζουν τα αμινοξέα στα φυτά. Είναι εξίσου πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι ο μεταβολισμός των αμινοξέων είναι ζωτικής σημασίας για την βιοσύνθεση πολλών προστατευτικών φυτικών φυσικών προϊόντων και συνεπώς επηρεάζει το ανοσποιοητικό σύστημα των φυτών (Zeiger, 2013).

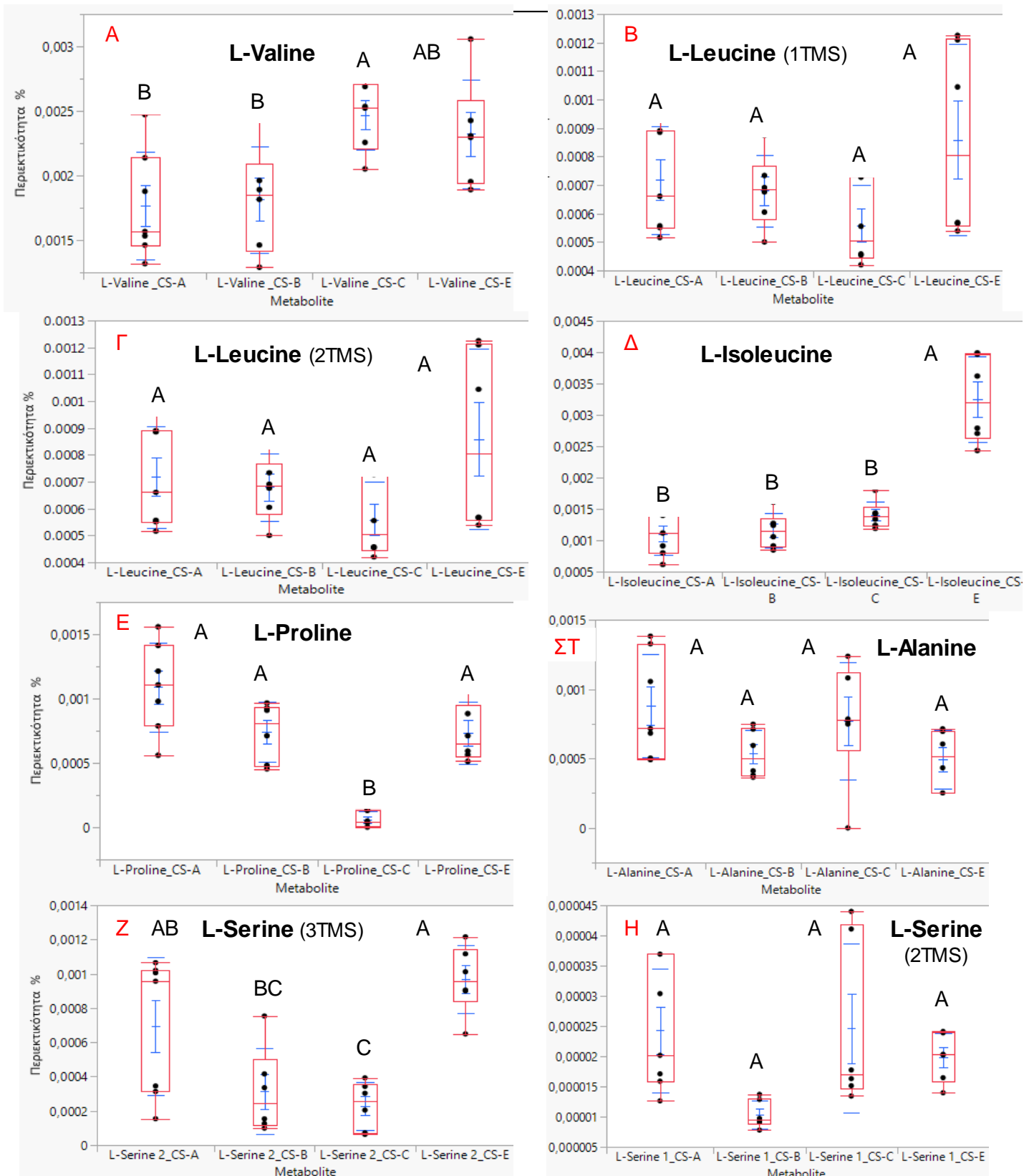
Πολλές φυτοπροστατευτικές ενώσεις παράγονται από προκάτοχες ενώσεις αμινοξέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι θειογλυκοζίτες (*glucosinates*), δευτερογενείς μεταβολίτες που συναντώνται κοινώς στα μέλη της οικογένειας *Brassicales*. Είναι τεκμηριωμένο ότι οι θειογλυκοζίτες και τα προϊόντα αποδόμησής τους μπορούν να προστατεύσουν τα φυτά από την επίθεση μυκητιακών και βακτηριακών παθογόνων αλλά και από φυτοφάγα έντομα (Barth & Jander, 2006; Bednarek *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2011). Σε σχέση με τα αμινοξέα προκατόχους τους, οι θειογλυκοζίτες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες: τους αλειφατικούς προερχόμενοι από L-Alanine, L-Leucine, L-Isoleucine, L-Valine και L-Methionine, τους βενζενικούς προερχόμενοι από Phenylalanine ή L-Tyrosine και τους ινδολικούς προερχόμενοι από Tryptophane (Sønderby *et al.*, 2010).

Επομένως εφόσον τα αμινοξέα αποτελούν μόρια μείζονος σημασίας συμμετέχοντας σε πολλές βιοχημικές, σηματοδοτικές, φυσιολογικές και κυτταρικές διεργασίες, η μεταβολή της περιεκτικότητάς τους (είτε αυξημένη, είτε μειωμένη) στα φυτάρια κάνναβης από τους βιοδραστικούς παράγοντες εξάγει χρήσιμα συμπεράσματα για το αντίκτυπο της επίδρασης αυτών των παραγόντων στο μεταβολισμό των φυτών, αλλά και για την υγιή φαινοτυπική κατάσταση των εμβολιασμένων με *R. solani* AG1-IC φυταρίων κάνναβης που δέχτηκαν τις επεμβάσεις. Στις **Εικόνες 113** και **114** συγκρίνονται οι σχετικές περιεκτικότητες από τα αμινοξέα που ανιχνεύτηκαν στα φύλλα των φυτών μετά από τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτές του μάρτυρα με τη βοήθεια θηκογραμμάτων (*boxplots*). Εναλλακτικά, στις **Εικόνες 115** και **116** απεικονίζονται τα ίδια αποτελέσματα με τη βοήθεια ραβδογραμμάτων.

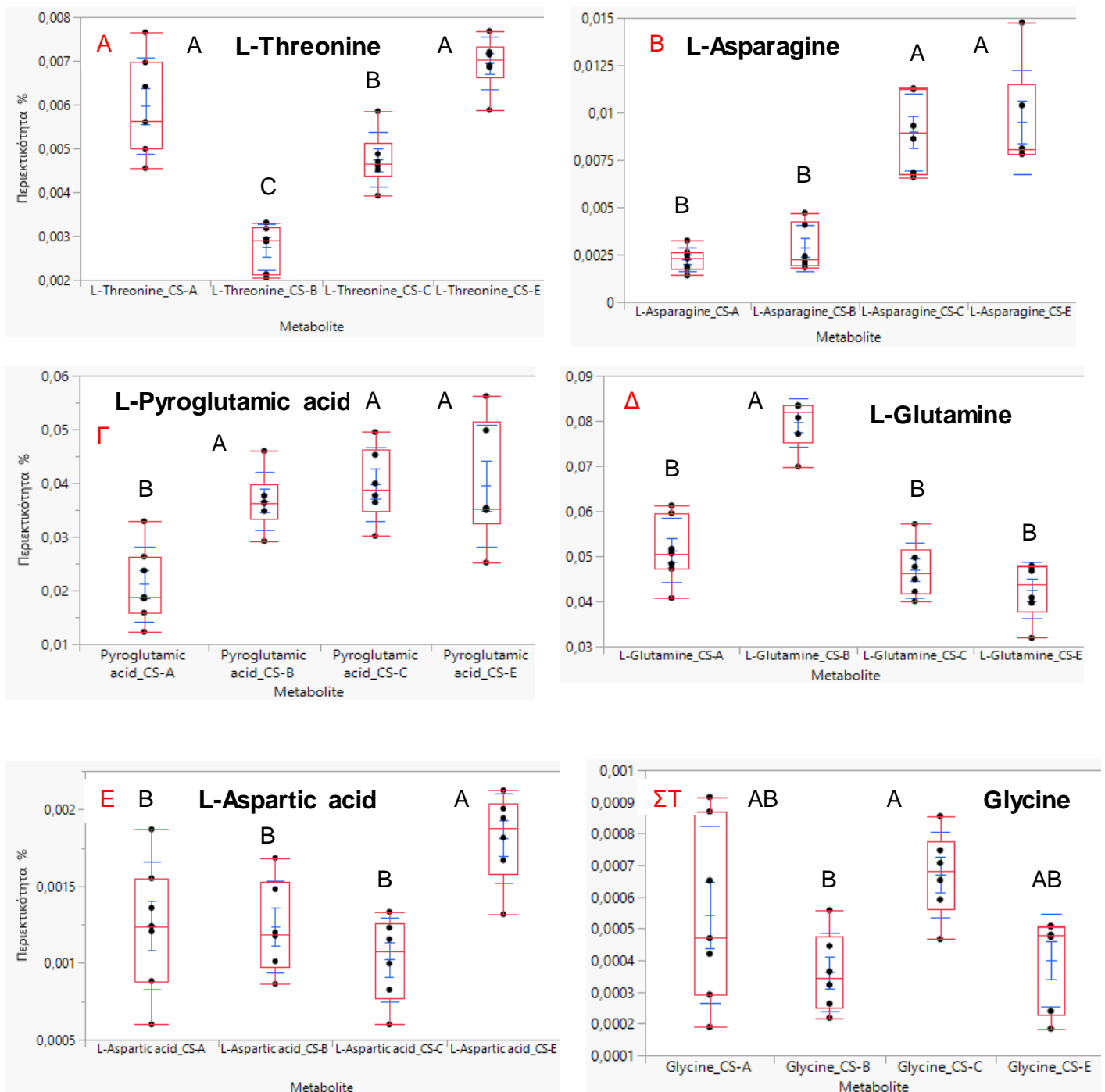


Εικόνα 112: Η συμβολή των αμινοξέων στις φυσιολογικές και βιοχημικές λειτουργίες των φυτών. Πηγή: Baqir *et al.*, (2019)

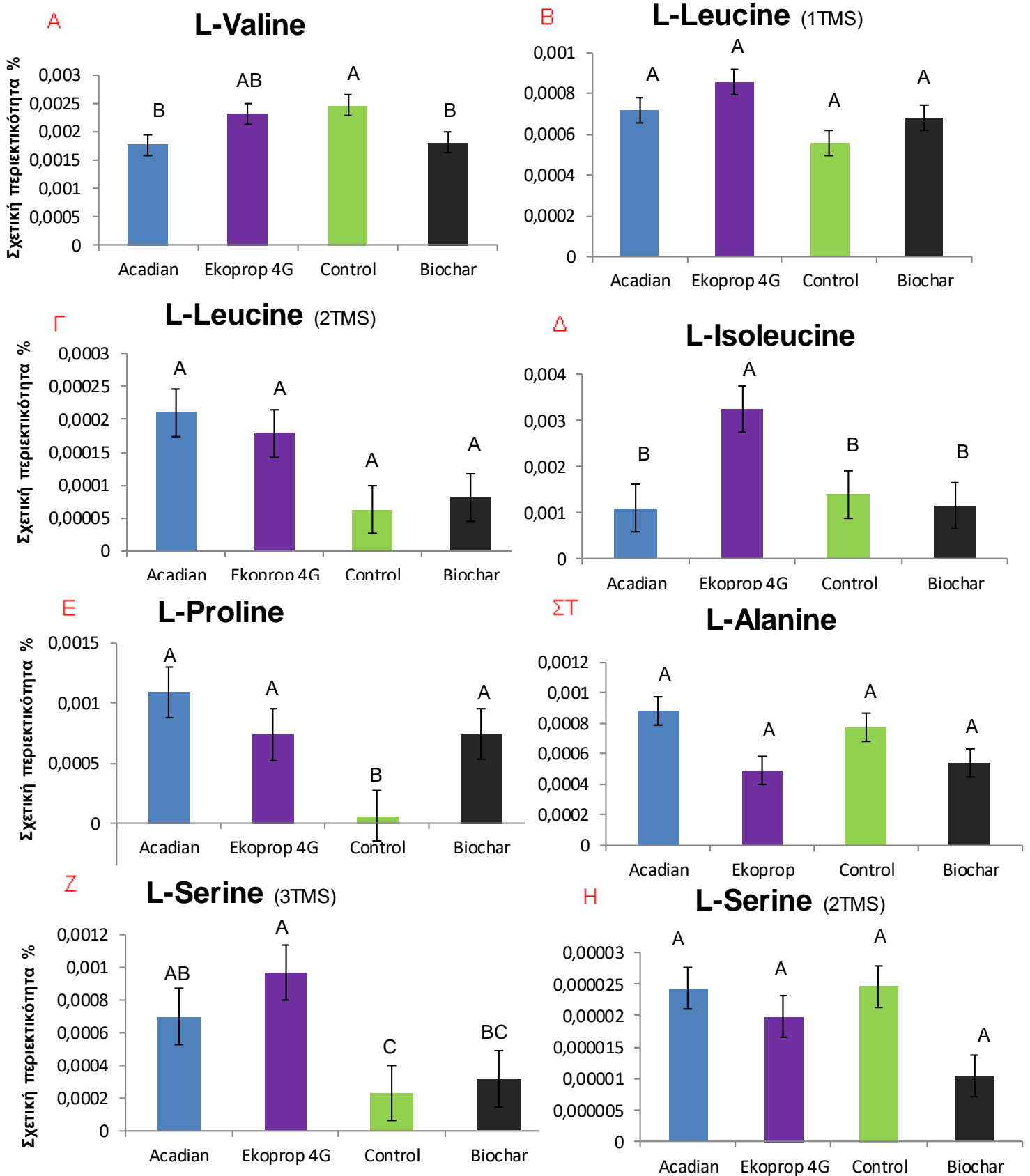
Σύμφωνα με τα διαγράμματα την μεγαλύτερη επίδραση στον μεταβολισμό των φυτών είχε η επέμβαση με Acadian επηρεάζοντας 7 αμινοξέα. Η επέμβαση με Ekorpor 4G είχε την μεγαλύτερη θετική επίδραση αυξάνοντας την περιεκτικότητα και των 5 αμινοξέων που επηρεάστηκαν, ενώ στον αντίποδα το biochar φάνηκε να έχει την πιο αρνητική επίδραση μειώνοντας την περιεκτικότητα των 4 αμινοξέων από τα 6 που επηρεάστηκαν.



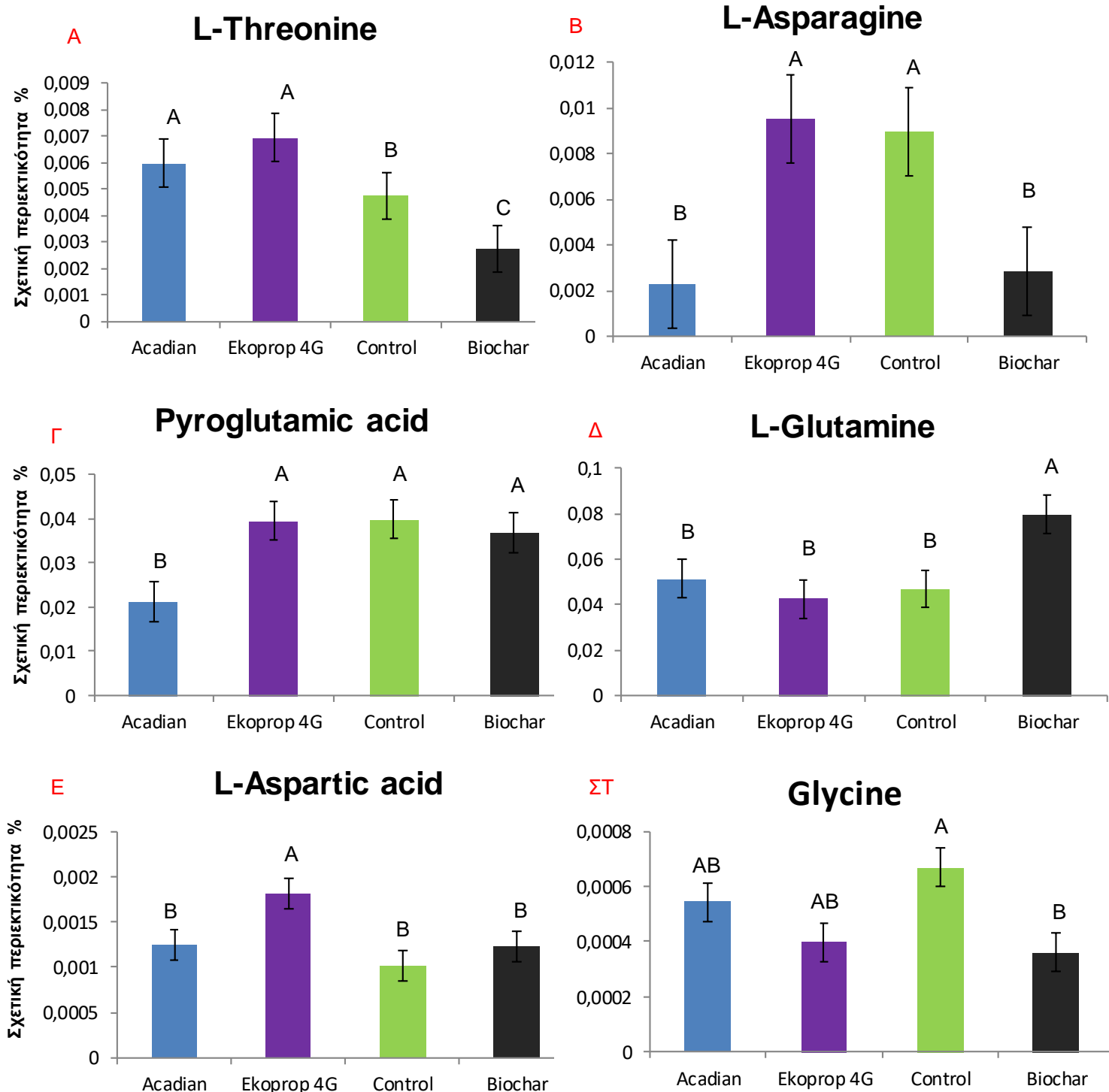
Εικόνα 113: Θηκογράμματα (boxplots) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekoprop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων αμινοξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε (A) L-Valine, (B) L-Leucine (1TMS), (Γ) L-Leucine (2TMS), (Δ) L-Isoleucine, (E) L-Proline, (ΣΤ) L-Alanine, (Z) L-Serine (3TMS), (H) L-Serine (2TMS). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.



Εικόνα 114 : Θηκογράμματα (boxplots) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekoprop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων αμινοξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε (A) L-Threonine, (B) L-Asparagine, (Γ) Pyroglutamic acid, (Δ) L-Glutamine, (E) L-Aspartic acid, (ΣΤ) Glycine. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.

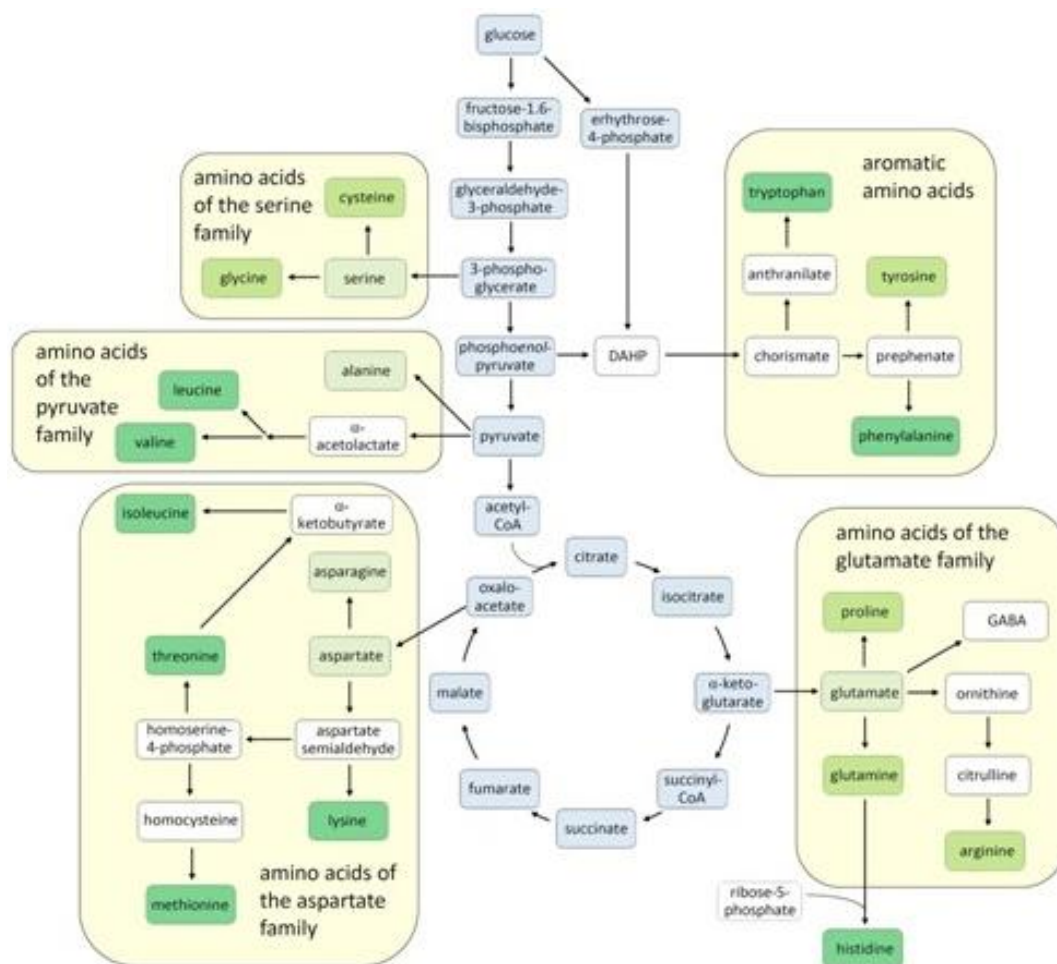


Εικόνα 115: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων αμινοξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε (Α) L-Valine, (Β) L-Leucine (1TMS), (Γ) L-Leucine (2TMS), (Δ) L-Isoleucine, (Ε) L-Proline, (ΣΤ) L-Alanine, (Ζ) L-Serine (3TMS), (Η) L-Serine (2TMS). Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P>95\%$).



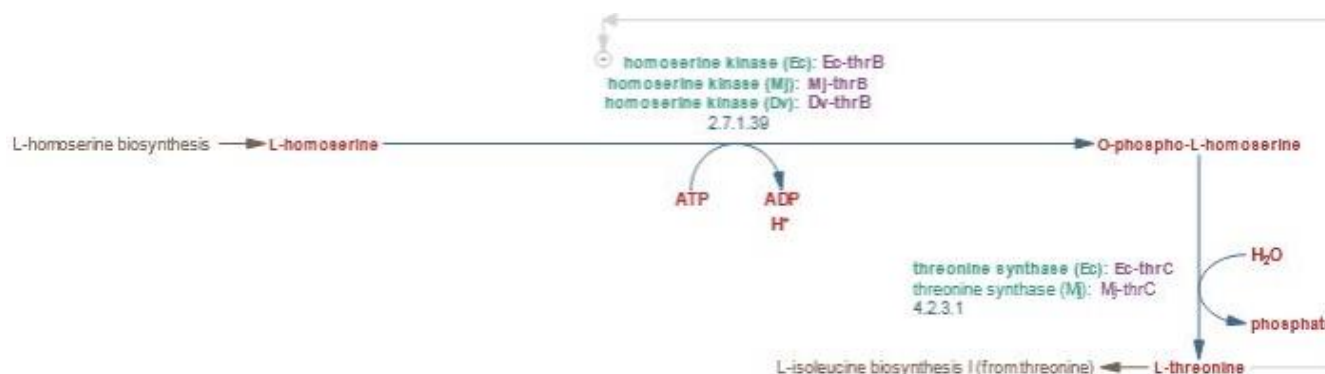
Εικόνα 116: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων αμινοξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κίνας σε (A) L-Threonine, (B) L-Asparagine, (Γ) L-Pyroglutamic acid, (Δ) L-Glutamine, (E) L-Aspartic acid, (ΣΤ) Glycine. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Τα L-Valine, L-Leucine, L-Isoleucine και L-Threonine είναι τέσσερα από τα εννέα αμινοξέα που έχουν ρόλους ζωτικής σημασίας στην ανθρώπινη διατροφή, είτε ως πηγή διατροφικών ενώσεων ή ως απαραίτητα διαιτητικά συστατικά. Πράγματι αυτά τα εννέα εκ των είκοσι ενός πρωτεϊνικών αμινοξέων δεν μπορούν να συντεθούν από τα ζωικούς οργανισμούς εκ των οποίων ο άνθρωπος, ενώ τρία ή περισσότερα δεν συντίθενται σε επαρκείς ποσότητες προς ικανοποίηση των μεταβολικών αναγκών (Εικόνα 117). Ως εκ τούτου αυτά τα αμινοξέα λογίζονται θρεπτικώς ως «απαραίτητα» και πρέπει να ληφθούν από τη διατροφή, με το μεγαλύτερο μερίδιο να προέρχεται ως επί των πλείστων από τα φυτά (Galili *et al.*, 2016; Hou & Wu, 2018). Καθώς σε αντίθεση με τους ανθρώπους και τα ζώα, τα φυτά συνθέτουν όλα τα είκοσι ένα πρωτεϊνικά αμινοξέα από μόνα τους (Εικόνα 117).



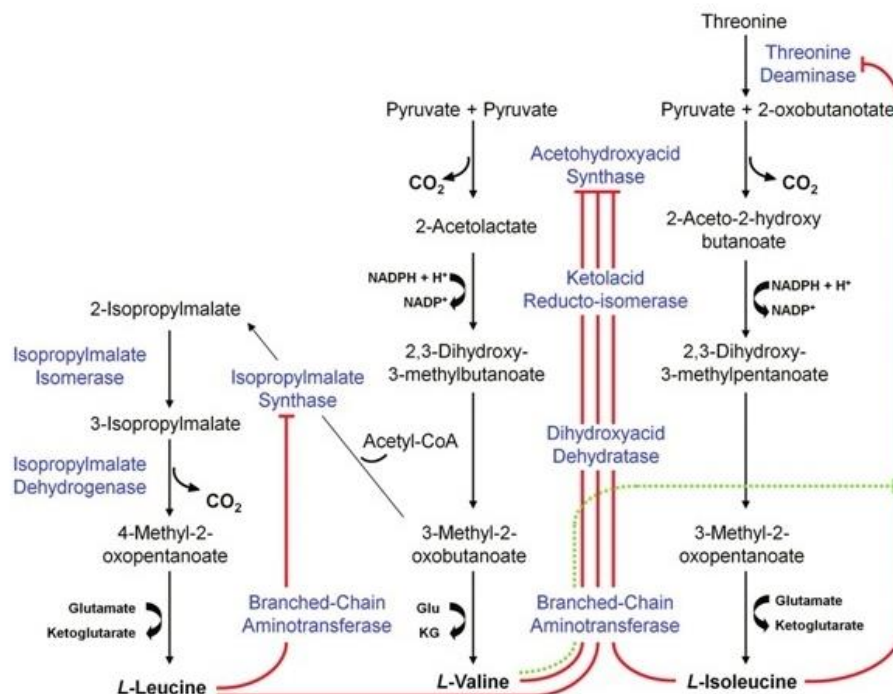
Εικόνα 117: Βιοσύνθεση αμινοξέων στα φυτά. Οι ανθρακικοί σκελετοί των αμινοξέων που παράγονται από τον μεταβολισμό του κεντρικού άνθρακα (*μπλε κουτιά*). Σύμφωνα με τους αντίστοιχους προκατόχους τους, τα αμινοξέα ομαδοποιούνται σε πέντε οικογένειες παραγόμενα από Glutamate, Serine, Pyruvate, Aspartate ή Chorismate. Τα εννέα αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν στα θηλαστικά απεικονίζονται σε σκουρο-πράσινα κουτιά, ενώ αυτά που μπορούν να συντεθούν αλλά πρέπει επιπροσθέτως να παρθούν με τη διατροφή είναι στα κουτιά πιο ανοιχτού χρώματος. Τα πρωτεϊνικά αμινοξέα που μπορούν να συντεθούν επαρκώς στα θηλαστικά είναι σε ανοιχτού πράσινου κουτιά και τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα και άλλα σημαντικά ενδιάμεσα συστατικά απεικονίζονται σε λευκά κουτιά. DAHP, 3-deoxy-D-arabinoheptulosanate-7phosphosphate. Πηγή: Trovato *et al.*, (2021).

Η **L-Threonine** προέρχεται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι δύο οδών που μετατρέπει την homoserine (προκάτοχος ουσία) μέσω ενός φωσφορυλιωμένου ενδιάμεσου στο τελικό αμινοξύ (Thr), που εξυπηρετεί ως δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και τροφοδοτεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι για την L-Isoleucine (Εικόνα 118). Θεωρείται ένας από τους φυτικούς μεταβολίτες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις χημικές άμυνες έναντι αβιοτικών καταπονήσεων όπως άλατος, ψύχους και ξηρασίας (Diedhiou *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2015). Επιπλέον οι μεταβολίτες Threonine εμπλέκονται στην φυτική αύξηση, ανάπτυξη και κυτταρική διαίρεση, αλλά ρυθμίζουν και τις φυτοορμόνες (Hardie 1999; Rudrabhatla & Rajasekharan, 2002; Ma *et al.*, 2013; Nam *et al.*, 2015). Οι επεμβάσεις με Acadian και Ekorpor 4G που εφαρμόστηκαν αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα της L-Threonine, ενώ με το biochar μειώθηκαν αντίστοιχα τα επίπεδα στα φυτά. Επιπλέον οι Paranidharan *et al.*, (2007) ανέφεραν την L-Theonine μαζί με άλλα αμινοξέα ως συστατικά μεταβολιτών άμυνας στο σιτάρι με πιθανή ανθεκτικότητα προσβολής στο εδαφογενές παθογόνο *Fusarium graminearum* λόγω της αυξημένης συσσώρευσής τους σε ανθεκτικές ποικιλίες. Δεδομένης της σημασίας της L-Threonine στα φυτά οι οποιοσδήποτε αυξήσεις επιφέρουν οι βιοδραστικοί παράγοντες όπως το εκχύλισμα *A. nodosum* και οι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, είναι άκρως επιθυμητές και ευεργετικές για τα φυτά κάνναβης.



Εικόνα 118: Το μονοπάτι σύνθεσης της L-Threonine από την homoserine σε ένα μονοπάτι δύο σταδίων που μετατρέπει την homoserine σε L-Threonine με ένα φωσφορυλιωμένο ενδιάμεσο. Το τελικό προϊόν αυτού του μονοπατιού η L-Threonine εξυπηρετεί ως δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και τροφοδοτεί το βιοσυνθετικό μονοπάτι για την Isoleucine. Τα ένζυμα που καταλύουν και τα δύο στάδια αυτού του μονοπατιού, ρυθμίζονται σε γονδιακό επίπεδο από την εξασθένηση που εξαρτώμενη από την L-Threonine και L-Isoleucine ως μέρος του ελέγχου της εξασθένησης ενός οπερονίου που περιλαμβάνει επίσης ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα ένζυμο στο πάνω τμήμα του μονοπατιού της βιοσύνθεσης της homoserine. Πηγή: την βάση δεδομένων METACYC database.

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι τα L-Valine, L-Leucine και L-Isoleucine ανήκουν στη μικρή ομάδα των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs). Τα θηλαστικά όπως ο άνθρωπος δεν μπορούν να συνθέσουν τα BCAAs, ως εκ τούτου πρέπει να τα παραλάβουν από την διατροφή τους (πχ. από τα φυτά) ή να βασιστούν σε άλλες πηγές όπως συμβιωτικά βακτήρια (Akman Gunduz & Douglas, 2009). Σχετικά με την βιοσύνθεση των BCAAs, είναι μοναδική η ιδιότητα των L-Valine και L-Isoleucine να συντίθενται σε δύο παράλληλα μονοπάτια. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα μεμονωμένο σύνολο τεσσάρων ενζύμων, τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις ενώπιον του σχηματισμού αυτών των αμινοξέων με διαφορετικά υποστρώματα (**Εικόνα 119**). Αυτά τα ένζυμα είναι τα acetohydroxyacid synthase (AHAS, EC 4.1.3.18), ketolacid deructoisomerase (KARI, EC 1.1.1.86), dihydroxyacid dehydrase (DHAD, EC 4.2.1.9) και aminotransferase διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAT, EC 2.6.1.42) (Singh & Shaner. 1995; Singh, 1999). Το μονοπάτι ενώπιον της L-Leucine ξεκινά από το 2-oxoisovalerate, το τελευταίο ενδιάμεσο μόριο που υφίσταται τρανσαμίνωση για να σχηματίσει την L-Valine (Binder 2010). Όπως ήδη αναφέρθηκε η L-Isoleucine συντίθεται μέσω της L-Threonine δια του ενζύμου Threonine deaminase (TD, EC 4.2.1.16) το οποίο καταλύει την διαμίνωση και αφυδάτωση της L-threonine (Binder, 2010).



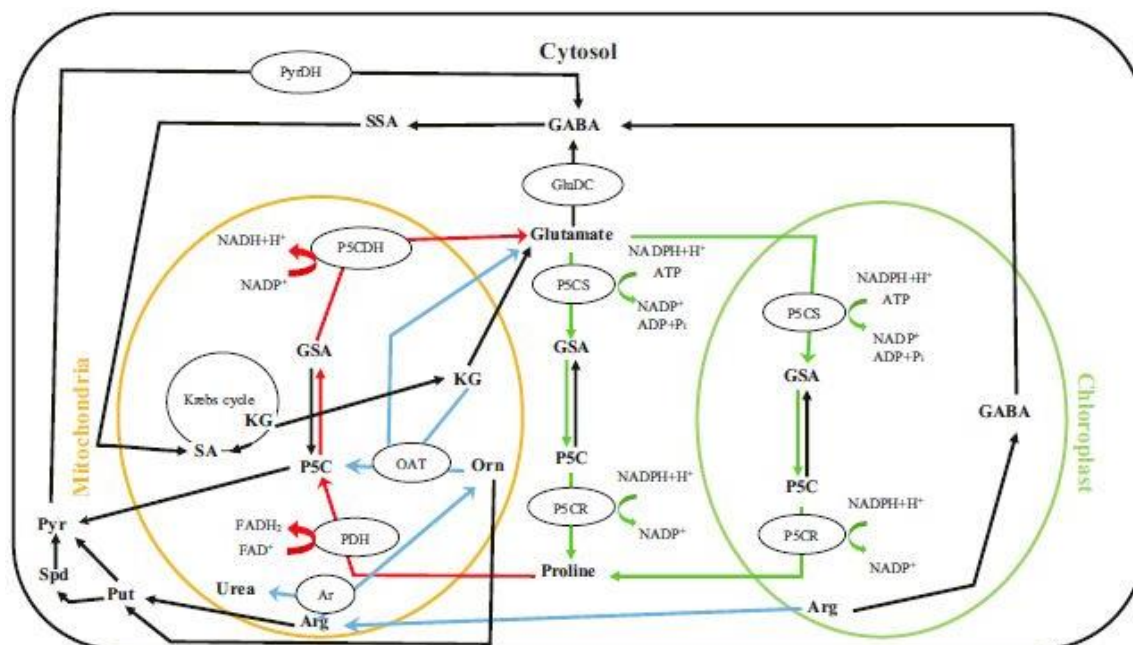
Εικόνα 119: Τα ένζυμα κλειδιά (μπλε) και οι μεταβολίτες της βιοσύνθεσης των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας BCAAs. Η αλλοστερική αναστολή υποδεικνύεται από τις κόκκινες γραμμές. Η επίδραση αποκατάστασης της L-Valine στην αναστολή της threonine deaminase από την L-Isoleucine απεικονίζεται ως γραμμή από πράσινες τελείες. Πηγή: Binder 2010.

Όσον αφορά την **L-Valine** οι επεμβάσεις με Acadian και biochar μείωσαν σημαντικά την περιεκτικότητά τους στα φυτά κάνναβης, ενώ το Ekorpor 4G δεν προκάλεσε κάποια σημαντική αλλαγή. Αντιθέτως το Ekorpor 4G αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της **L-Isoleucine** (Εικόνες 115, 116), ενώ οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν προκάλεσαν κάποια σημαντική μεταβολή. Όσον αφορά την **L-Leucine** δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή με κάποια επέμβαση. Δεδομένης της αξίας αυτών των αμινοξέων στην ανθρώπινη διατροφή με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν, οποιαδήποτε αύξηση μπορούν να επιφέρουν οι βιοδραστικοί παράγοντες είναι άκρως αποδεκτή και επιθυμητή.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της **L-Proline** καθώς η περιεκτικότητά της αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις επεμβάσεις (Εικόνες 115, 116). Η L-Proline αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αμινοξέα που ενισχύουν την αντοχή των φυτών έναντι αβιοτικών καταπονήσεων προσφέροντας ευεργετική δράση. Συγκεκριμένα το φαινόμενο της συσσώρευσης L-Proline είναι γνωστό ότι υφίσταται υπό συνθήκες έλλειψης ύδατος (Hare *et al.*, 1998), αλατότητας (Rhodes *et al.*, 2002; Manns 2005), ακραίων θερμοκρασιών (Hossain *et al.*, 2014), έκθεσης σε βαρέα μέταλλα (Bassi & Sharma 1993a, b; Sharma & Dietz 2006; Aslam *et al.*, 2017), ακτινοβολιών UV κτλ. Πέραν της δράσης του ως οσμωλύτης για οσμωτική προσαρμογή, η L-Proline συνεισφέρει στη σταθεροποίηση υπο-κυτταρικών δομών (μεμβρανών και πρωτεϊνών), απενεργοποίηση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (Smirnoff & Cumbes 1989; Matysik *et al.*, 2002) και στη ρύθμιση του κυτταρικού δυναμικού οξειδοαναγωγής υπό συνθήκες καταπόνησης (Ashraf & Foolad, 2007). Μπορεί επίσης να δράσει ως υδροτροπικό μόριο συμβατό με πρωτεΐνες (Strizhov *et al.*, 1997) ανακουφίζοντας την κυταροπλασματική οξειδωση και διατηρώντας τις κατάλληλες αναλογίες NADP⁺/NADPH συμβατές με τον μεταβολισμό (Gholami Zali & Ehsanzadeh, 2018).

Σε πολλά φυτά η συσσώρευση L-Proline υπό καταπόνηση άλατος έχει σχετιστεί με αντοχή στην καταπόνηση και η συγκέντρωσή της έχει φανεί να είναι σε γενικές γραμμές υψηλότερη σε φυτά ανθεκτικά στην αλατότητα από ότι σε ευαίσθητα (Madan *et al.*, 1995; Fougere *et al.*, 1997; Gangoradhay *et al.*, 1997; Petrassa *et al.*, 1997; Hayat *et al.*, 2012). Επιπλέον κάποιες μελέτες κάνουν λόγο για μεταφορικό ρόλο της L-Proline. Συγκεκριμένα το περιεχόμενο της L-Proline μπορεί να καθοριστεί είτε από τον καταβολισμό της βιοσύνθεσης είτε από την μεταφορά μεταξύ κυτάρων και διαφορετικών κυτταρικών διαμερισμάτων (Szabados & Savoure, 2010). Η ενδοκυτταρική μεταφορά της L-Proline τυγχάνει μέσω κυτοσόλης, χλωροπλαστών και μιτοχονδρίων όπως υπονοείται από τον διαμερισμό του μεταβολισμού της L-Proline (Εικόνα 120). Έπειτα έχει προταθεί ότι η απορρόφηση της L-Proline από τα μιτοχόνδρια είναι μια ενεργή διαδικασία συνιστώντας την ύπαρξη μεταφορέων των αμινοξέων (Yu *et al.*, 1983). Επιπροσθέτως κάποιες αναφορές αποδίδουν και σηματοδοτικό ρόλο στην L-Proline (Zhang *et al.*, 2008; Roychoudhyry *et al.*, 2015).

Στα φυτά η L-Proline συντίθεται από δύο μονοπάτια, του Glutamic acid και της L-Ornithine. Στην **Εικόνα 120** παρουσιάζεται η διαγραμματική απεικόνιση του μεταβολικού μονοπατιού της L-Proline και της ενδοσύνδεσης με τα μεταβολικά μονοπάτια του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) και πολυαμινών (PA). Το μονοπάτι του L-Glutamic acid ευθύνεται για την κύρια συσσώρευση L-Proline κατά την οσμωπική καταπόνηση. Η L-Proline συντίθεται από το Glutamic acid δια της ενδιάμεσης ένωσης Δ-pyrroline-5-carboxylate (P5C) με την αντίδραση να καταλύεται από τα αντίστοιχα ένζυμα Δ-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) και Δ-pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) (**Εικόνα 120**) (Sekhar *et al.*, 2007).



Εικόνα 120: Μεταβολικό μονοπάτι της L-Proline στα ανώτερα φυτά και πιθανή ενδοσύνδεση με τα μονοπάτια του gamma-aminobutyric acid και πολυαμινών. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της L-Proline εμφανίζεται με πράσινα βέλη, το καταβολικό μονοπάτι εμφανίζεται με κίτρινο βέλος και το μονοπάτι της L-Ornithine αναπαρίσταται με μπλε βέλος. ADP adenosine diphosphatase, Ar argininase, Arg arginine, ATP adenosine triphosphatase, FAD flavin adenine dinucleotide, FADH₂ flavin adenine dinucleotide reduced, GABA gamma-aminobutyric acid, GSA glutamate-semialdehyde, GluDC glutamate decarboxylase, KG alpha-ketoglutarate, NADP⁺ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, OAT ornithine-delta-aminotransferase, Orn ornithine, P5C Δ'-pyrroline-5-carboxylate, P5CR pyrroline-5-carboxylate reductase, P5CS Δ'-pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CDH Δ'-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, SA succinic acid, Spd spermidine, SSA succinic acid semialdehyde. Πηγή: Zouari *et al.*, 2019, (αναδημοσίευση από Huang *et al.*, 2008, Szabados & Savoure 2010, Signorelli *et al.*, 2015, Pal *et al.*, 2018).

Ο καταβολισμός της L-Proline υφίσταται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια της χρονολογικής δράσης της proline dehydrogenase ή proline oxidase (PDH) παράγοντας P5C από L-Proline και P5C dehydrogenase (P5CDH) η οποία

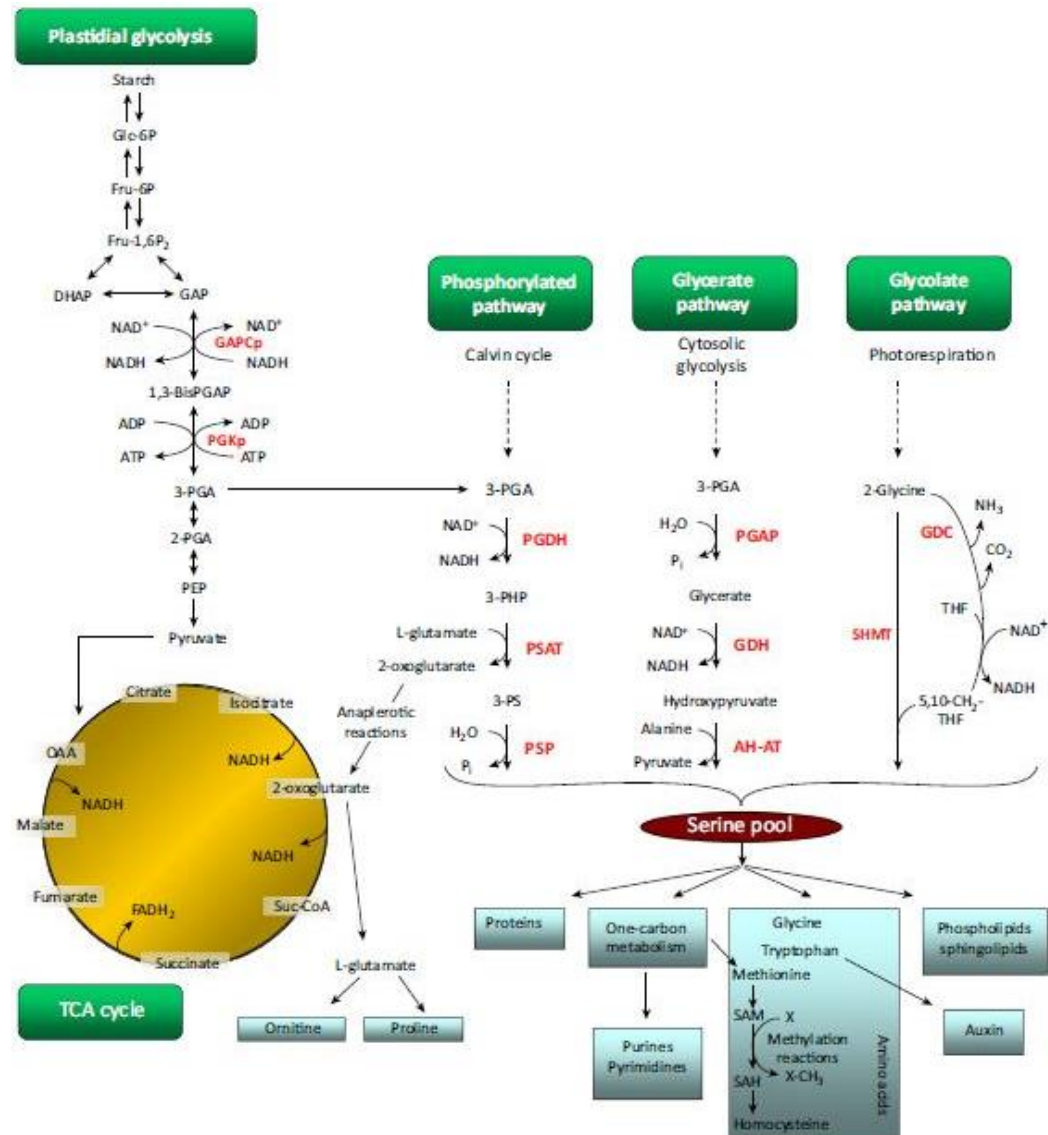
μετατρέπει την P5C σε L-Glutamic acid (Deuschle *et al.*, 2001). Η μεταγραφή της PHD ενεργοποιείται από επανυδάτωση αλλά καταστέλλεται από αφυδάτωση, αποτρέποντας συνεπώς την αποδόμηση της L-Proline κατά τις αβιοτικές καταπονήσεις (Kiyosue *et al.*, 1996; Verbruggen *et al.*, 1996). Στο εναλλακτικό μονοπάτι η L-Proline μπορεί να συντεθεί από την L-Ornithine, η οποία τρανσαμινώνεται σε P5C από την ornithine- δ -aminotransferase (Verbruggen & Hermans 2008). Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο μονοπάτι είναι σημαντικό κατά την ανάπτυξη των σποροφύτων και σε κάποια φυτά για συσσώρευση L-Proline επαγόμενης από καταπονήσεις (Roosens *et al.*, 1998; Armegaud *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2009). Επομένως βάσει όλων αυτών των ευεργετικών ιδιοτήτων που προσδίδει η L-Proline στα φυτά, τα αυξημένα επίπεδά της από όλες τις επεμβάσεις λογίζονται ιδιαίτερα ευπρόσδεκτες για την ανάπτυξη των φυτών κάνναβης.

Σχετικά με την **L-Serine** παρατηρούνται σημαντικές αυξήσεις στην περιεκτικότητά της στην 3TMS παραγωγοποιημένη μορφή της από τις επεμβάσεις με Acadian και Ekorop 4G και δίχως μεταβολή στην επέμβαση με biochar, ενώ στην 2TMS μορφή της δεν παρατηρήθηκε μεταβολή με κάποια επέμβαση (Εικόνες 115 και 116).

Όσον αφορά τον ρόλο της στα φυτά, πέραν τον σχηματισμό μέρους των πρωτεϊνών και την τέλεση καταλυτικών λειτουργιών σε πολλά ένζυμα, η L-Serine συμμετέχει στην βιοσύνθεση αρκετών βιομορίων που απαιτούνται για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως αμινοξέα, αζωτούχες βάσεις, φωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια (Εικόνα 121). Η L-Serine παρουσιάζει επίσης έναν ρόλο ενδιάμεσου μορίου σε αρκετές κυτταρικές διεργασίες όπως στον μεταβολισμό των μονάδων του ενός άνθρακα (C1) (Kalhan & Hanson 2012) ή σε σηματοδοτικούς μηχανισμούς, όπου θεωρείται ένα εκ των τριών αμινοξέων που φωσφωρυλιώνονται από τις κινάσες. Η παρουσία της στα φυτά κρίνεται απαραίτητη καθώς έχουν δημοσιευτεί έρευνες όπου οι ελλείψεις μορίων που παράγονται από την L-Serine έχουν δραστικές συνέπειες. Οι Yamaoka *et al.*, (2011) ανέφεραν αλλοιώσεις στην ανάπτυξη μικροσπορίων και υψηλό ρυθμό διακοπής εμβρύων στην αραβιδοψη λόγω ανεπάρκειας σε ένα σχετικά ήσσονος σημασίας λιπίδιο φυτικού κυττάρου, την phosphatidylserine.

Επιπλέον μεταλλαγμένες ποικιλίες που στερούνται το ένζυμο Serine palmitoyltransferase που συμμετέχει στο πρώτο βήμα βιοσύνθεσης δεσμευμένων σφιγγολιπιδίων από την συμπύκνωση της L-Serine με το palmitoyl-CoA, επιδεικνύουν θνησιμότητα εμβρύου και αρσενικού γαμετόφυτου (Chen *et al.*, 2006; Dietrich *et al.*, 2008). Επίσης ενήλικα φυτά με μειωμένο περιεχόμενο σφιγγολιπιδίων παρουσιάζουν αλλοιωμένη ομοιόσταση μεταλλικών ιόντων και δεν δύναται να επιβιώσουν (Dietrich *et al.*, 2008; Chao *et al.*, 2011). Η L-Serine είναι επίσης κρίσιμη για την ρύθμιση της μεταφοράς μεθυλομάδας παρέχοντας στον μεταβολισμό του tetrahydrofolate με μονάδες C1 (Hanson & Roje 2001; Hanson & Gregory 2011). Έπειτα ο μεταβολισμός του folate έχει αποδειχτεί απαραίτητος για την εμβρυογένεση, μεταεμβρυονική ανάπτυξη ρίζας και φωτοαναπνοή (Collakova *et al.*, 2008;

Srivastava *et al.*, 2011). Και τέλος υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η L-Serine σχετίζεται στην απόκριση των φυτών σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Ho & Saito 2001; Waditee *et al.*, 2007; Benstein *et al.*, 2013).



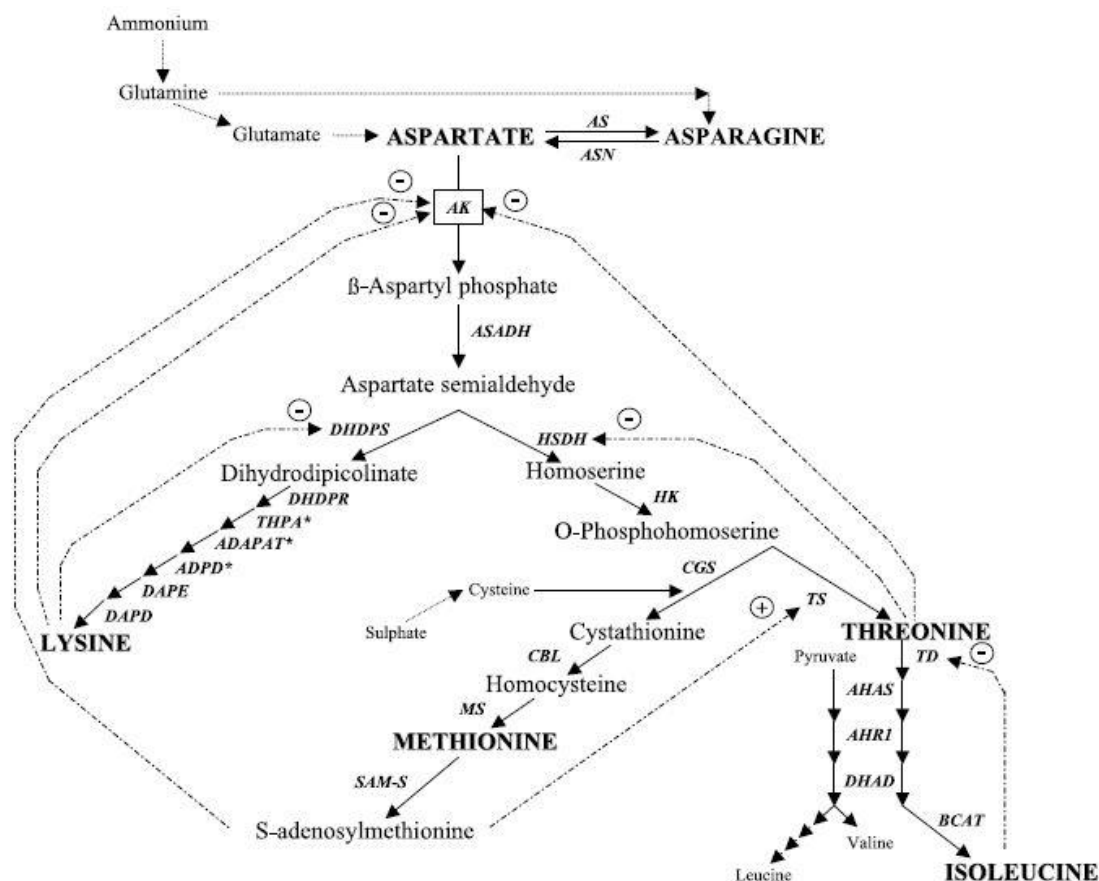
Εικόνα 121: Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης της L-Serine (Ser) και των συνδόμενων μονοπατιών. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε μονοπάτι είναι τα εξής: φωσφορυλιωμένο μονοπάτι: PGDH 3-phosphoglycerate, PSAT 3-phosphoserine aminotransferase, PSP 3-phosphoserine phosphatase. Μονοπάτι Glycerate: PGAP 3-phosphoglycerate phosphatase, GDH glycerate dehydrogenase, AH-AT alanine-hydroxypyruvate aminotransferase. Φωτοαναπνευστικό μονοπάτι (μονοπάτι glycolate): GDC glycine decarboxylase, SHMT serine hydroxymethyltransferase. Γλυκόλυση πλαστιδίων: δίνεται έμφαση στις αντιδράσεις που καταλύονται από τις glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPCp) και phosphoglycerate kinase (PGKp). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν αρκετές ενζυματικές αντιδράσεις. Συνομογραφίες: DHAP dihydroxyacetone phosphate, Fru-1,6P2 fructose-1,6-bisphosphate, Fru-6P fructose-6-phosphate, GAP glyceraldehyde-3-phosphate, Glc-6P glucose-6-phosphate, OAA oxaloacetate, PEP phosphoenolpyruvate, SAH S-adenosylhomocysteine, SAM S-adenosylmethionine, Suc-CoA succinyl Coenzyme A, TCA tricarboxylic acid, THF tetrahydrofolate, 1,3- BisPGAP 1,3-bisphosphoglycerate, 2-PGA 2-phosphoglycerate, 3-PGA 3-phosphoglycerate, 3-PHP 3-phosphohydroxypyruvate, 3-PS 3-phosphoserine, 5,10-CH₂-THF 5,10-methylene-tetrahydrofolate. Πηγή: Ros *et al.*, (2014).

Επομένως σύμφωνα με όλα αυτά τα οφέλη στα φυτά οι αυξήσεις που προκάλεσαν οι βιοδιεγέρτες με *A. nodosum* και ωφέλιμους μικροοργανισμούς κρίνονται πέρα για πέρα μείζονος σημασίας.

Για την **L-Glutamine** μόνο η επέμβαση με biochar προκάλεσε σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητά της, ενώ οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν οδήγησαν σε κάποια μεταβολή (Εικόνες 115 και 116). Η L-Glutamine πέραν της σύνθεσης πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων αποτελεί τον κύριο αμινο δότη για την σύνθεση των αμινοξέων και άλλων ενώσεων που περιέχουν άζωτο (Forde & Lea 2007). Επιπροσθέτως οι Kan *et al.*, (2015) αναφέρουν ότι η L-Glutamine μπορεί επίσης να λειτουργήσει και ως σηματοδοτικό μόριο για να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στα φυτά. Άλλωστε η ταχεία επαγωγή γονιδίων μεταγραφικών παραγόντων συνιστά ότι η L-Glutamine μπορεί να ενισχύσει αποτελεσματικά το σήμα της και να αλληλεπιδράσει με όλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, για να ρυθμίσει την ανάπτυξη των φυτών και τις αποκρίσεις σε καταπονήσεις (Kan *et al.*, 2015). Ως εκ τούτου η L-Glutamine είναι ένα λειτουργικό αμινοξύ και παίζει σημαντικούς ρόλους στη φυτική διατροφή και μεταγωγή σήματος. Επιπλέον πρέπει να αναφερθεί η σημασία της λήψης της L-Glutamine από τον άνθρωπο καθώς λειτουργεί ως καύσιμο του μεταβολισμού και ως προκάτοχος πρωτεϊνών, αλλά επίσης ρυθμίζει και την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, κυτταρική άμυνα και μεταγωγή σήματος (Curi *et al.*, 2007; Brasse-Lagnel *et al.*, 2009). Επομένως η αύξηση της περιεκτικότητας της L-Glutamine που προκάλεσε το biochar στα φυτά κάνναβης είναι άκρως χρήσιμη τόσο για το φυτό, όσο και για την ανθρώπινη διατροφή κατά την οποία θα προσληφθεί το αμινοξύ από την κατανάλωση προϊόντων αυξημένης συγκέντρωσης.

Όσον αφορά το **L-Aspartic acid**, η επέμβαση με Ekopro 4G αύξησε σημαντικά την περιεκτικότητά της στα φυτά κάνναβης, ενώ με τις υπόλοιπες επεμβάσεις παρέμεινε αμετάβλητη (Εικόνες 115 και 116). Η σημασία του L-Aspartic acid στα φυτά είναι ότι λειτουργεί ως προκάτοχη ένωση για την σύνθεση των «απαραίτητων» αμινοξέων Lysine, L-Threonine, L-Isoleucine και Methionine, σε ένα διακλαδισμένο και πολύπλοκα ρυθμιζόμενο μονοπάτι (Εικόνα 122) (Azevedo & Lea, 2001). Το L-Aspartic acid είναι το αρχικό προϊόν, το οποίο σχηματίζεται από την τρανσαμίνωση του oxaloacetate και μπορεί να παράγεται από τον κύκλο Krebs των τρικαρβοξυλικών οξέων στα μιτοχόνδρια, ή μέσω της λειτουργίας της phosphoenolpyruvate carboxylase ή phosphoenolpyruvate carboxykinase στο κυτόπλασμα (Lea *et al.*, 2001). Το L-Aspartic acid είναι ο προκάτοχος για δύο μονοπάτια, με το πρώτο να οδηγεί στην σύνθεση της L-Asparagine, ενός συστατικού κλειδιού που χρησιμοποιείται για την μεταφορά και αποθήκευση του αζώτου στα φυτά, η οποία συντίθεται δια της μεταφοράς του αζώτου από την αμιδομάδα της L-Glutamine στο L-Aspartic acid, καταλυόμενη από την asparagine synthetase. Το ένζυμο asparaginase σχηματίζει αμμωνία, η οποία επαναφομοιώνεται μέσω του κύκλου της L-Glutamic synthase (Andrews *et al.*, 2004). Το L-Aspartic acid είναι επίσης ο προκάτοχος των παραγόμενων από αυτό

αμινοξέων Lysine, L-Threonine, Methionine και L-Isoleucine (Azevedo *et al.*, 1997) (Εικόνα 122).

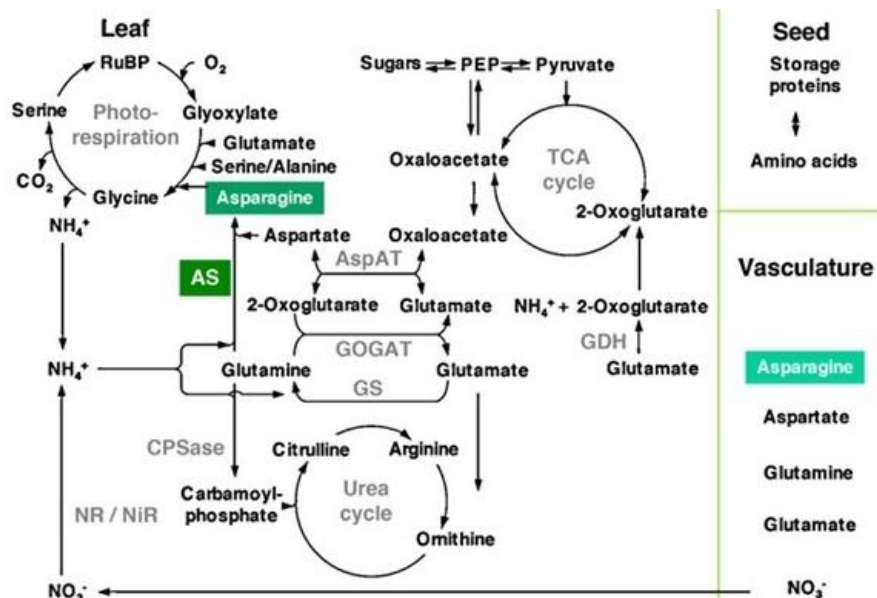


Εικόνα 122: Το μεταβολικό μονοπάτι του L-Aspartic acid στα ανώτερα φυτά. AS asparagine synthetase (E.C. 6.3.5.4), ASN, asparaginase (E.C. 3.5.1.1), AK aspartate kinase (E.C. 2.7.2.4), ASADH aspartate semialdehyde dehydrogenase (E.C. 1.2.1.11), HSDH, homoserine dehydrogenase (E.C. 1.1.1.3), HK homoserine kinase (E.C. 2.7.1.39), CGS cystathionine synthase (E.C. 4.9.99.9), TS threonine synthase (E.C. 4.2.99.2), CBL cystathionine lyase (E.C. 4.4.1.8), MS methionine synthase (E.C. 2.1.1.13), SAM-S S-adenosylmethionine synthetase (E.C. 2.5.1.6), TD threonine deaminase (E.C. 4.2.1.16), AHAS acetohydroxy acid synthase (E.C. 4.1.3.18), AHRI, acetohydroxy acid isomeroreductase (E.C. 1.1.1.86), DHAD dihydroxy acid dehydratase (E.C. 4.2.1.9), BCAT branched-chain amino acid aminotransferase (E.C. 2.6.1.42), DHDPS dihydrodipicolinate synthase (E.C. 4.2.1.52), DHDPR dihydrodipicolinate reductase (E.C. 1.3.1.26), THPA* tetrahydrodipicolinate acylase (E.C. 2.3.1.117), ADPAT* N-acyl-L,L-diaminopimelate aminotransferase (E.C. 2.6.1.17), ADPD* N-acyl-L,L-diaminopimelate deacylase, (E.C. 3.5.1.18), DAPE diaminopimelate epimerase (E.C. 5.1.1.7), DAPD diaminopimelate decarboxylase (E.C. 4.1.1.20). (-) αρνητική ανατροφοδότηση, (+) θετική ανατροφοδότηση. Ο αστερίσκος δείχνει ένα ένζυμο για το οποίο οι Andre'O *et al.* (2005) δεν μπόρεσαν να αποκομίσουν πληροφορίες που να σχετίζονταν στην βιοσύνθεση της Lysine στα ανώτερα φυτά. Πηγή: Azevedo *et al.*, (2005)

Λαμβάνοντας υπόψη τους ρόλους του L-Aspartic acid, η αύξηση της περιεκτικότητας στα φυτά κάνναβης από το biochar σφενδάμου στη παρούσα μελέτη είναι εξίσου επιθυμητή για την ευρωστία των φυτών.

Στην **Glycine** μόνο η επέμβαση με biochar προκάλεσε σημαντική αλλαγή στην περιεκτικότητά της στα φύλλα κάνναβης αλλά μείωση. Οι άλλες επεμβάσεις δεν διέτελεσαν κάποια μεταβολή (Εικόνες 115 και 116). Η Glycine είναι μακράν το πιο διαδεδομένο αμινοξύ που χρησιμοποιείται στην διατροφή των φυτών. Χρησιμοποιείται συχνά για παραγωγή ευρείας φάσματος αμινοχηλικά λιπάσματα (χηλικά θρεπτικά συστατικά με αμινοξέα). Παρόλο που η εξωγενής εφαρμογή των αμινοξέων μπορεί να αυξήσει την κατάσταση αζώτου και την συγκέντρωση των μεταλλικών ιχνοστοιχείων στους φυτικούς ιστούς (Khan *et al.*, 2019), υπάρχουν πολλοί παράγοντες που διέπουν την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής Glycine συμπεριλαμβανομένων του σταδίου ηλικίας, κλιματικών συνθηκών, αριθμού διαφυλλικών ή εδαφικών εφαρμογών και ιδίως της εφαρμόζουσας συγκέντρωσης (Garcia *et al.*, 2011; Souri & Hatamian 2019). Στην παρούσα μελέτη η μείωση της συγκέντρωσης της Glycine στα φυτά κάνναβης από το biochar σφενδάμου είναι μια αρνητική πτυχή για την θρέψη των φυτών, ωστόσο δεν φάνηκε να επηρέασε την ανάπτυξή τους όντας φαινοτυπικά ακμαία και πιο εύρωστα από του μάρτυρα.

Όσο για την **L-Asparagine**, οι επεμβάσεις με Acadian και biochar μείωσαν σημαντικά τα επίπεδά της στα φύλλα κάνναβης, ενώ το Ekorgop 4G δεν επέβαλε αλλαγές (Εικόνες 115 και 116). Ο ρόλος της L-Asparagine στα φυτά σχετίζεται κυρίως με φυσιολογικές λειτουργίες όπως στην κινητοποίηση του αζώτου σε βλαστώντες σπόρους, επαναφομοίωση στα φύλλα και επανακινητοποίηση του αζώτου από γηράσκοντα φύλλα προς τους αναπτυσσόμενους σπόρους (Gaufichon *et al.*, 2010). Η L-Asparagine και η L-Glutamine εξυπηρετούν ως το κύριο μέσο μεταφοράς αζώτου και αποθήκευσης θρεπτικών συστατικών από την πηγή προς τα καταβόθρα όργανα στα περισσότερα μη οσπριοειδή φυτά (Ireland & Lea 1999) (Εικόνα 123). Η L-Asparagine είναι ένα βέλτιστο μεταφορικό αζώτου και αποθεματική ένωση λόγω της υψηλής αναλογίας αζώτου/άνθρακα και σταθερότητας (Gaufichon *et al.*, 2010). Συγκεκριμένα η L-Asparagine είναι το κυριότερο αμινοξύ που εντοπίζεται στο ξύλωμα από τις ρίζες προς τα φύλλα των όσπριων όπως αλφαλφα, μπιζέλι, μηδική και τριφύλλι (Miller & Con 1980; Peiser *et al.*, 1984 Sieciechowicz *et al.*, 1988). Η μείωση της σχετικής περιεκτικότητας της L-Asparagine στα φυτά κάνναβης στην παρούσα εργασία δεν είναι ιδανική για τα φυτά δεδομένου του ρόλου πάνω στην μεταφορά αζώτου και θρεπτικών συστατικών εντός των οργάνων τους, ωστόσο η εμφάνιση πιο εύρωστης εικόνας των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα δεν μας προβλημάτισε από αυτή την μείωση.



Εικόνα 123: Αλληλεπίδραση της L-Asparagine και της asparagine synthetase στην αφομοίωση του αζώτου, φωτοαναπνευστικό κύκλο του αζώτου και μετατόπιση του αζώτου. Η στοιχειομετρία των ενδοσυνδεδεμένων ενζυματικών αντιδράσεων και του εντοπισμού των οργάνων δεν συμπεριλαμβάνονται. AS asparagine synthetase (EC 6.3.5.4), AspAT aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1), CPSase carbamoylphosphate synthetase (EC 6.3.5.5), GDH glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.2), GOGAT glutamate synthase (EC 1.4.7.1, EC 1.4.1.14), GS glutamine synthetase (EC 6.3.1.2), NiR nitrite reductase (EC 1.6.6.4), NR nitrate reductase (EC 1.6.6.1), PEP phosphoenolpyruvate, RuBP ribulose 1,5-bisphosphate. Πηγή: Gaufichon *et al.*, (2010), αναδημοσιευμένο από Potel *et al.* (2009).

Η **L-Alanine** είναι ένας ακόμη μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη, ωστόσο οι επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν δεν προκάλεσαν κάποια σημαντική αλλαγή της περιεκτικότητάς της στα φυτά κάνναβης (**Εικόνες 115** και **116**). Σαν αμινοξύ δεν εντάσσεται στα «απαραίτητα» για τον άνθρωπο, καθώς μπορεί να συντεθεί μεταβολικά στον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως δεν θεωρείται απαραίτητη η πρόσληψή του δια της διατροφής. Η βιοσύνθεσή του προέρχεται από το πυροσταφυλικό οξύ (*pyruvate*) μέσω τρανσαμίνωσης ή από τα BCAAs. Επιπλέον η L-Alanine προτάθηκε από τους Chen *et al.*, (2006) για την συμμετοχή της σε επαγωγή κυτταρικού θανάτου σε κυτταρικές καλλιέργειες του αμπελιού *Vitis labrusca*. Επομένως η αμετάβλητη περιεκτικότητα της L-Alanine από όλους τους βιοδραστικούς παράγοντες που εφαρμόστηκαν, λογίζεται ως ήσσονος σημασίας αποτέλεσμα για το παρόν πείραμα.

Στην περίπτωση του **L-Pyroglutamic acid** η επέμβαση με το Acadian προκάλεσε σημαντική μείωση της περιεκτικότητάς του στα φυτά κάνναβης, ενώ οι άλλες επεμβάσεις δεν οδήγησαν σε κάποια σημαντική μεταβολή (**Εικόνες 115** και **116**). Το L-Pyroglutamic acid είναι ένα μη πρωτεϊνικό παράγωγο του αμινοξέος και συντίθεται όταν το Glutamic acid ή η L-Glutamine κυκλοποιούνται ως lactam και γίνεται μεταβολίτης στον κύκλο της

glutathione. Σύμφωνα με την μελετημένη επίδραση της εφαρμογής του Glutamic acid στην αυξανόμενη αντιοξειδωτική ικανότητα των φυτών υπό δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και του ρόλου των ROS στον μεταβολισμό της L-Proline (Rejeb *et al.*, 2014), οι Jimenes-Arias *et al.*, (2019) υπέθεσαν ότι η εξωγενής προσθήκη L-Pyroglutamic acid θα μπορούσε να δράσει ως προκάτοχος της L-Proline υπό συνθήκες καταπόνησης για να ανημετωπίσει μια οσμωτική ανισορροπία.

Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο σκευάσματα βιοδιεγερτών που περιέχουν αμινοξέα με σκοπό να βελτιώσουν την αύξηση και να επιταχύνουν την ανάπτυξη των φυτών και ταυτόχρονα να ενισχύσουν την αντοχή τους σε καταπονήσεις από δυσμενείς αβιοτικούς παράγοντες όπως ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασία, υπερ-συσσώρευση ύδατος, αλατότητα, ρύπανση από βαρέα μέταλλα, ακτινοβολία UV και σε κάποιες περιπτώσεις για καλύτερη ανταπόκριση των φυτών έναντι βιοτικών καταπονήσεων από προσβολή ασθενειών λόγω φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών. Σε διάφορες μελέτες μεταβολομικής βρέθηκαν αυξημένες ποσότητες L-Proline μετά από εμβολιασμό φυτών σιταριού και κριθαριού με παθογόνα, επιδεικνύοντας ανθεκτικότητα στην προσβολή (Hamzhezarghani *et al.*, 2005; Kumaraswamy *et al.*, 2011; Cajka *et al.*, 2014). Σε πιο σύγχρονες μελέτες οι Cheng *et al.*, 2018 μέσω ^1H NMR ανέλυσαν το μεταβολομικό προφίλ της ριζόσφαιρας σποροφύτων αραβόσιτου μετά από προσθήκη biochar αχύρου και ταυτόχρονη μείωση της αζωτούχου λίπανσης, με τα αποτελέσματα να δείχνουν σημαντική μεταβολή των εκκριμάτων της ρίζας σε μεταβολίτες όπως κάποιων αμινοξέων με αύξηση στην συγκέντρωση της L-Isoleucine κατά 1,75 φορές. Οι Khan *et al.*, (2019) με μεταβολομική UPLC-HRMS αξιολόγησαν την επίδραση ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών με salicylic acid και putrescine σε ευαίσθητες ποικιλίες ρεβυθιού (*Cicer arietinum*) υπό συνθήκες ξηρασίας με τα φυτά να παρουσιάζουν αυξημένη συσσώρευση διαφόρων ενώσεων όπως L-Leucine. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν οι Orsak *et al.*, (2021) εφαρμόζοντας HPLC-RI μεταβολομική, διαπιστώνοντας αύξηση στα αμινοξέα που περιείχαν οι κόνδυλοι πατάτας σε συνθήκες ξηρασίας μεταξύ των οποίων τα L-Proline, L-Leucine και L-Threonine. Οι Staykov *et al.*, (2021) με ανάλυση GC/MS αξιολόγησαν την επίδραση του παραγόμενου από *A. nodosum* βιοδιεγέρτη «SuperFifty» σε καλλιεργήσιμα φυτά τομάτας, πιπεριάς και φυτά μοντέλα αραβίδοψης στην ικανότητα προστασίας τους από οξειδωτικό stress που προκάλεσε η εφαρμογή του παράγοντα επαγωγής υπεροξειδίων paraquat. Οι συσσωρεύσεις σε μεταβολίτες όπως τα απαραίτητα αμινοξέα από την εφαρμογή του paraquat ανισταθμίστηκαν από το «SuperFifty», το οποίο κατέστειλε τις νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, συγκέντρωση H_2O_2 , κυτταρική καταστροφή και αναστολή φωτοσύνθεσης που προκάλεσε το paraquat. Οι Nephali *et al.*, (2021) μέσω UHPLC-HDMS μη στοχευμένης μεταβολομικής εξέτασαν την επίδραση μικροβιακού βιοδιεγέρτη «BACSTIM® 100» σε σύγκριση μεταβολικών προφίλ φυτών αραβόσιτου με συνθήκες

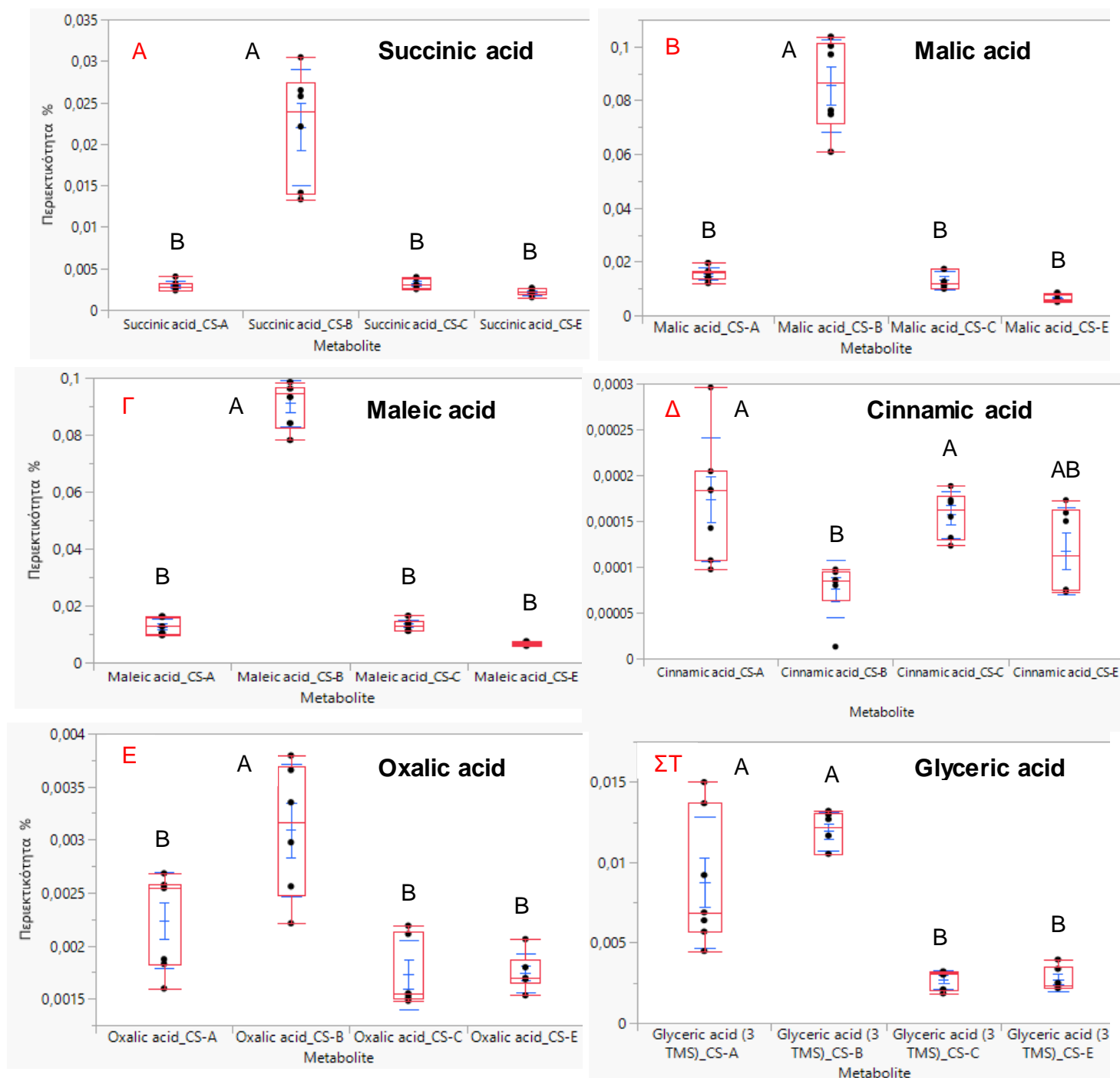
ξηρασίας και διαπίστωσαν μειωμένη συγκέντρωση L-Serine στα φυτά εφαρμογής του βιοδιεγέρτη και αυξημένη στην L-Alanine.

Συνοψίζοντας είναι σημαντικό να αναφερθούν οι θετικές επιδράσεις που είχαν οι βιοδραστικοί παράγοντες σε ορισμένα αμινοξέα. Συγκεκριμένα το Acadian αύξησε σημαντικά τα επίπεδα των L-Threonine, L-Proline και L-Serine, το Ekorpor 4G των L-Threonine, L-Proline, L-Serine, L-Isoleucine και L-Aspartic acid και το Biochar των L-Glutamine και L-Proline. Μεταξύ αυτών των αμινοξέων κάποια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των φυτών, ενώ άλλα συμβάλλουν στην άμυνα έναντι αβιοτικών ή/και βιοτικών παραγόντων και στην σωστή λειτουργία διαφόρων διαδικασιών στα φυτά όπως φωτοαναπνοή, φωτοσύνθεση, βιοσύνθεση άλλων μεταβολιτών και ενώσεων κ.α. Επιπλέον το γεγονός ότι κάποια εξ αυτών αμινοξέα λογίζονται ως «απαραίτητα» και δεν βιοσυντίθενται από τον ανθρώπινο οργανισμό, επιβεβαιώνει την ανάγκη να προσληφθούν από την διατροφή. Συνεπώς δεδομένης της χρήσης της βιομηχανικής κάνναβης και ως προϊόν διατροφής, μπορεί να ειπωθεί ότι η πιθανή αύξηση της περιεκτικότητας αυτών των αμινοξέων με σκοπό την απευθείας πρόσληψή τους από τον οργανισμό, θα βελτιώσει ακόμη περισσότερο την διατροφική αξία των προϊόντων. Στον αντίποδα οι υπήρξαν και αμινοξέα στα οποία επέδρασαν αρνητικά οι βιοδραστικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα το Acadian μείωσε την συγκέντρωση των L-Asparagine, L-Pyroglutamic acid, L-Valine και L-Isoleucine, το Biochar των L-Asparagine, L-Threonine, L-Valine και Glycine, αποτελέσματα που δεν είναι ιδανικά και θα μπορούσαν να επιφέρουν αρνητική επίπτωση στην άμυνα και στην εύρυθμη λειτουργία των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα φυτά κάνναβης. Τέλος το σκεύασμα Ekorpor 4G με ωφέλιμους μικροοργανισμούς δεν επέδρασε αρνητικά σε κανένα αμινοξύ και δεδομένου ότι αύξησε την συγκέντρωση των περισσότερων αμινοξέων σε σχέση με τους άλλους παράγοντες, μπορεί να ειπωθεί ότι προτιμάται για χρήση καλλιέργειας βιομηχανικής κάνναβης όταν το πλάνο αποσκοπεί στην βελτίωσή της μέσω συσσώρευσης αμινοξέων.

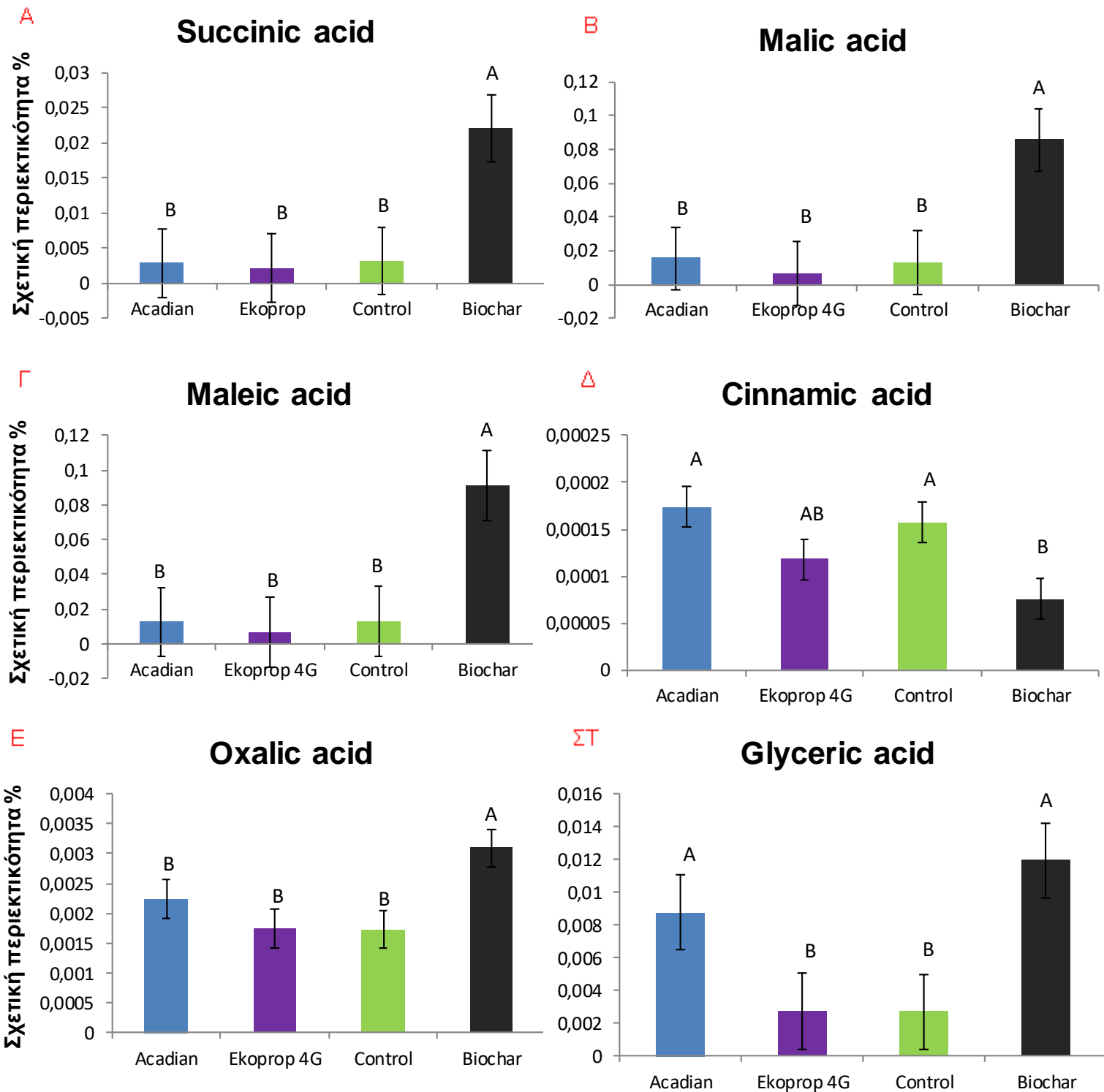
4.7.1.2 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα καρβοξυλικών οξέων

Τα καρβοξυλικά οξέα απασχολούν το παγκόσμιο ενδιαφέρον καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στα φυτά όπως φυτο-αποκατάσταση των τοξικών βαρέων μετάλλων (μέσω της αύξησης της διαλυτότητας των μετάλλων) (Ehsan *et al.*, 2014) και ενίσχυσης της ανοχής έναντι αβιοτικών καταπονήσεων (μέσω της ρύθμισης διαφορετικών αντιοξειδωτικών ενζύμων) (Zaheer *et al.*, 2015). Για του λόγου το αληθές διαφορετικοί γονότυποι φυτών έδειξαν αυξημένη συσσώρευση μετάλλων και ανοχή έναντι έκθεσης στα μέταλλα μετά από χρήση διάφορων οργανικών οξέων (Asfan *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2015; Hawrylak-Nowak *et al.*, 2015; Zaheer *et al.*, 2015). Η σημαντικότερη συνεισφορά όμως των καρβοξυλικών οξέων στα φυτά εμπίπτει στην συμμετοχή κάποιων εξ αυτών στον κύκλο του Krebs, που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα και ένα σημαντικό μέρος της αερόβιας αναπνοής και θα αναλυθεί παρακάτω (Weitzman 1987).

Τα συμπεράσματα που θα προκύψουν από τα δεδομένα της παρούσας GC/EIMS μεταβολομικής ανάλυσης για την επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα των καρβοξυλικών οξέων, καθίστανται άκρως σημαντικά για την ανάπτυξη, ομαλή λειτουργία και αντοχή των φυτών έναντι δυσμενών αβιοτικών καταπονήσεων. Στην **Εικόνα 124** συγκρίνονται οι σχετικές περιεκτικότητες από τα καρβοξυλικά οξέα που ανιχνεύτηκαν στα φύλλα των φυτών μετά από τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτές του μάρτυρα με τη βοήθεια θηκογραμμάτων (*boxplots*) και αντίστοιχα στην **Εικόνα 125** τα ίδια αποτελέσματα με τη χρήση ραβδογραμμάτων. Σύμφωνα με τα διαγράμματα την μεγαλύτερη και ταυτόχρονα θετική επίδραση στον μεταβολισμό των φυτών κάνναβης είχε το Biochar επηρεάζοντας και τα 6 καρβοξυλικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν, αυξάνοντας την περιεκτικότητά τους σε 5 εξ αυτών. Η επέμβαση με το Ekorrp 4G κρίθηκε αδιάφορη από άποψη αποτελέσματος καθώς δεν επηρέασε κανένα καρβοξυλικό οξύ, ενώ το Acadian επηρέασε μόνο ένα καρβοξυλικό οξύ αυξάνοντας την συγκέντρωσή του.



Εικόνα 124: Θηκογράμματα (boxplots) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekoprop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων καρβοξυλικών οξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε (A) Succinic acid, (B) Malic acid, (Γ) Maleic acid, (Δ) Cinnamic acid, (E) Oxalic acid, (ΣΤ) Glyceric acid. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.

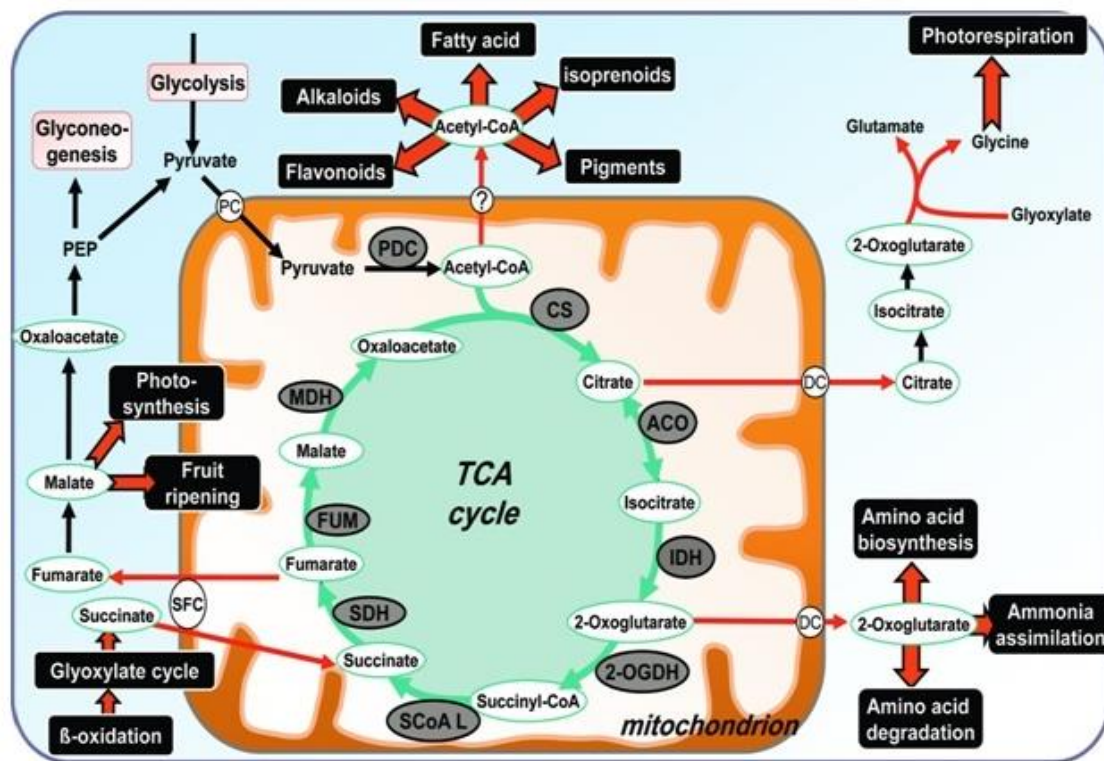


Εικόνα 125: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων καρβοξυλικών οξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάναβης σε (Α) Succinic acid, (Β) Malic acid, (Γ) Maleic acid, (Δ) Cinnamic acid, (Ε) Oxalic acid, (ΣΤ) Glyceric acid. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Από τα καρβοξυλικά οξέα που ταυτοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία το **ηλεκτρικό οξύ (Succinic acid)** και το **μηλικό οξύ (Malic acid)** συμμετέχουν ενεργά στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (*κύκλο TCA*) ή Krebs ή κύκλο του κιτρικού οξέος. Ο κύκλος προτάθηκε από τον Krebs το 1937 και τα καρβοξυλικά οξέα που συμμετέχουν, αποτελούν κρίσιμης σημασίας ενώσεις για τον αναπνευστικό μεταβολισμό σε φωτοσυνθετικά και ετεροτροφικά φυτικά όργανα ταυτόχρονα (Araujo *et al.*, 2012). Ο κύκλος TCA είναι μια αλληλουχία καταβολικών ανπιδράσεων που υποστηρίζει την σύνθεση ATP, αλλά ταυτόχρονα ενσωματώνεται και σε ένα ευρύτερο μεταβολικό δίκτυο που επιτρέπει στην δράση του κύκλου TCA να συνεισφέρει και σε άλλες πτυχές του μεταβολισμού (**Εικόνα 126**) (Araujo *et al.*, 2012). Στα φυτά ο κύκλος λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Όπως αναφλερθηκε ο κύκλος διαδραματίζει έναν κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό οργανικών μακρομορίων. Πρωτού αυτά τα σχετικά μεγάλα μόρια εισέλθουν στον κύκλο TCA, πρέπει να διασπαστούν σε μια ένωση δύο ανθράκων, το ακέτυλο συνένζυμο ή A(acetyl CoA) το οποίο μόλις τροφοδοτηθεί στον κύκλο TCA, μετατρέπεται σε CO₂ και ενέργεια (Britannica 2022). Πιο συγκεκριμένα ο κύκλος TCA αποτελείται από 8 στάδια καταλυόμενος και από 8 διαφορετικά ένζυμα εντός της μιτοχονδριακής μεμβράνης που ενώνουν το προϊόν της οξειδωσης του πυροσταφυλικού οξέος (pyruvate) και μαλικού οξέος (*παραγώμενο σε κυτοσόλιο*) σε CO₂, με την παραγωγή NADH για την οξειδωση από την αναπνευστική αλυσίδα (Fernie *et al.*, 2004).

Όπως περιγράφεται στην Britannica (2022) ο κύκλος ξεκινά (1) όταν το acetyl CoA ανπιδρά με το οξαλοξεικό οξύ (oxaloacetate) για να σχηματίσει κιτρικό οξύ (citrate) και να απελευθερώσει το συνένζυμο A (CoA-SH). Εν συνεχεία ακολουθεί μια διαδοχή από ανπιδράσεις. (2) Το κιτρικό οξύ αναδιατάσσεται για να σχηματίσει το ισοκιτρικό οξύ (isocitrate), στου οποίου (3) αφαιρείται ένα μόριο CO₂ και μετά υφίσταται οξειδωση για να σχηματίσει α-ketoglutarate. Το συγκεκριμένο μόριο με τη σειρά του (4) στερείται ένα μόριο CO₂ και οξειδώνεται για σχηματισμό succinyl CoA, με το τελευταίο (5) να μετατρέπεται ενζυματικά σε ηλεκτρικό οξύ. Έπειτα (6) το ηλεκτρικό οξύ οξειδώνεται στο φουμαρικό οξύ (fumaric acid) και το τελευταίο (7) υδρολύεται προς παραγωγή μηλικού οξέος και προς το τέλος του κύκλου το μηλικό οξύ (8) οξειδώνεται σε οξαλοξεικό. Ουσιαστικά κάθε πλήρης σειρά του κύκλου καταλήγει στην παραγωγή οξαλοξεικού οξέος και στον σχηματισμό δύο μορίων CO₂ (**Εικόνα 126**). Η σχετική ενέργεια παράγεται σε έναν αριθμό σταδίων σε αυτόν τον κύκλο ανπιδράσεων. Στο πέμπτο στάδιο το παράγεται το μόριο που τροφοδοτεί τις περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες adenosine triphosphate (ATP). Ωστόσο η περισσότερη ενέργεια που αποκομίζεται από τον κύκλο TCA δεσμεύεται από τις ενώσεις nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) και flavin adenine dinucleotide (FAD) και μετατρέπεται αργότερα σε ATP. Η μεταφορά ενέργειας τυγχάνει μέσω της αναμετάδοσης ηλεκτρονίων από μία ένωση στην άλλη μέσω οξειδοαναγωγικών ανπιδράσεων. Για κάθε σειρά του κύκλου TCA τρία μόρια NAD⁺ ανάγονται σε NADH και ένα μόριο

FAD ανάγεται σε FADH₂. Εν συνεχεία αυτά τα μόρια μεταφέρουν την ενέργειά τους στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (μέρος του τρίτου σταδίου της κυτταρικής αναπνοής) η οποία με την σειρά της απελευθερώνει την ενέργεια ώστε να μεταταραπεί σε ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



Εικόνα 126: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου Krebs και των συγκλίσεων και αποκλίσεων μονοπατιών δείχνοντας ότι ο κύκλος ενσωματώνεται σε ένα σύνθετο μεταβολικό δίκτυο. Οι λευκές σφαίρες αντιπροσωπεύουν μεταφορείς ή ανιπαγωγούς. Για καλύτερη ευκρίνεια οι συμπαραγόντες παραλείπονται- οι αντιδράσεις PCD και 2-OGDH απαιτούν και οι δύο CoA. Οι αντιδράσεις των CS και SCoA L παράγουν CoA. Το NAD⁺ μετατρέπεται σε NADH μέσω των αντιδράσεων PDC, IDH, 2-OGDH και MDH. Το NADP⁺ μετατρέπεται σε NADPH μέσω ενός εξειδικευμένου ισόμορφου του IDH. Το ADP μετατρέπεται σε ATP από την αντίδραση SCoA L. CS, citrate synthase. ACO, aconitase. IDH, isocitrate dehydrogenase. 2-OGDH, 2-oxoglutarate dehydrogenase σύμπλοκο. SCoA L, succinyl CoA ligase. SDH, succinate dehydrogenase. FUM, fumarase. MDH, malate dehydrogenase. PDC, pyruvate dehydrogenase complex. PC, pyruvate carrier. DC, dicarboxylate carrier. SFC, μεταφορέας succinate/fumarate. PEP, phosphoenolpyruvate. TCA cycle, κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων (Krebs). Πηγή: Araujo *et al.*, (2012).

Για το **μηλικό οξύ** τα αποτελέσματα της παρούσας μεταβολομικής ανάλυσης έδειξαν ότι από τις επεμβάσεις μόνο το biochar είχε επίδραση στον μεταβολισμό των φύλλων κάνναβης, αυξάνοντας μάλιστα σημαντικά την περιεκτικότητά του (**Εικόνες 124 και 125**). Το ενδογενή οργανικά οξέα των φυτών όπως το μηλικό αποτελούν πηγή ανθρακικών σκελετών τόσο για άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια, όσο και για πηγή ενέργειας των κυττάρων στον αναπνευστικό κύκλο (da Silva 2003). Στα φυτά το μηλικό οξύ μεταβολίζεται στα μιτοχόνδρια, δρα ως κοινή δεξαμενή ανιόντων στο φυτικό vacuole και ως ανισταθμιστικό ιόν για κατιόντα καλίου και ασβεστίου, ιδίως σε αζωτο-

εξαρτώμενα φυτά (Osmond & Laties 1969; Day 1977; Ting 1981). Επιπλέον το μηλικό οξύ που εκκρίνεται από ρίζες φυτών που αναπτύσσονται σε αλκαλικά εδάφη διευκολύνουν την εκχύλιση φωσφόρου και σιδήρου από τέτοια εδάφη. Σε πείραμα που διενεργήθηκε η διαφυλλική εφαρμογή μηλικού και κιτρικού οξέος είχε θετικές επιδράσεις στην ανταπόκριση ριζοβολίας των τριανταφύλλων ποικιλίας Sherbet (Ghazijahani *et al.*, 2018). Οι ερευνητές ανέφεραν επίσης ότι ενώ τα δύο αυτά οργανικά οξέα ενίσχυσαν την φυσιολογική απόδοση των σποροφύτων, μπόρεσαν ταυτόχρονα να ενισχύσουν με παρόμοιο τρόπο την ριζοβολία, καθώς και την ανάπτυξη των βλαστών των νέων φυταρίων. Η αύξηση της περιεκτικότητας του μηλικού οξέος στα φυτά κάνναβης από το biochar σφενδάμου θεωρείται αξιόλογο αποτέλεσμα καθώς δεδομένης της σημασίας αυτού του μεταβολίτη στην κυτταρική αναπνοή, μπορούμε να πούμε ότι συντελεί με ουσιαστικό τρόπο στην ομαλή λειτουργία της. Επιπλέον η μη σημαντική μεταβολή του μηλικού οξέος από τους άλλους βιοδραστικούς παράγοντες λογίζεται εξίσου θετική εξέλιξη, δεδομένου ότι δεν διαταράσσεται αρνητικά η κυτταρική αναπνοή, όπως ενδεχομένως να συνέβαινε από μια υποβιοσύνθεση.

Ίδια αποτελέσματα είχαμε και στην περίπτωση του **ηλεκτρικού οξέος** με την μοναδική σημαντική μεταβολή να παρατηρείται στην επέμβαση με biochar και να είναι αύξηση περιεκτικότητας (Εικόνες 124 και 125). Το ηλεκτρικό οξύ είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ που κατέχει σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών όπως της κυτταρικής αναπνοής δια της συμμετοχής του στον κύκλο του Krebs. Επιπλέον σε κάποιες μελέτες έχει αναφερθεί και ως παράγοντας προώθησης φυτικής ανάπτυξης, όπως σε καλλιέργεια λαχάνου cv. golden acre αυξάνοντας την διαφυλλική επιφάνεια μετά από δύο ψεκασμούς (Yadav *et al.*, 2000) και σε φυτά σπαραγιού (Yoshikawa *et al.*, 1993). Επίσης σε μια σύγχρονη μελέτη (Song *et al.*, 2018) η εξωγενής εφαρμογή ηλεκτρικού οξέος ενίσχυσε την αντοχή σποροφύτων αγρίου πεύκου (*Larix olgensis*) σε καταπόνηση από μόλυβδο. Όσον αφορά την παρούσα μελέτη και σε αυτήν την περίπτωση η αύξηση της περιεκτικότητας του ηλεκτρικού οξέος από το biochar σφενδάμου είναι άκρως επιθυμητή. Όπως το μηλικό οξύ έτσι και το ηλεκτρικό οξύ συμβάλλει στην διεργασία της κυτταρικής αναπνοής των φυτών κάνναβης και επιπλέον αφού οι άλλες επεμβάσεις δεν προκαλούν κάποια μείωση στα επίπεδα αυτού του οξέος, μπορούμε να πούμε ότι δεν υφίσταται κάποια αρνητική παρεμβολή η κυτταρική αναπνοή.

Αντίστοιχου ενδιαφέροντος αποτελούν τα αποτελέσματα στα επίπεδα του **maleic acid**, με το biochar να είναι ο μόνος βιοδραστικός παράγοντας που το επηρέασε και μάλιστα με υπερβιοσύνθεση (Εικόνες 124 και 125). Το maleic acid ανήκει στα δικαρβοξυλικά οξέα και είναι διαθέσιμο στα φυτά ως μεταβολίτης (Ekinici *et al.*, 2014). Βάσει της μελέτης των Ekinici *et al.*, (2014) όπου η εφαρμογή PGPRs σε κουνουπίδι αύξησε τα ενδογενή επίπεδα του maleic acid, ενισχύοντας και την φυτική ανάπτυξη, θεωρήθηκε ότι μπορεί να διαθέτει κάποιο θετικό ρόλο στην εξουδετέρωση των συνθηκών καταπόνησης. Οι Al Mahmud *et al.*, (2017) ανέφεραν ότι η εξωγενής προσθήκη maleic acid

που συνδράμει στη βελτίωση της χηλίωσης μετάλλων και αντιοξειδωτικού μεταβολισμού, παρέχει αντοχή σε ρύπανση χρωμίου στη καφέ μουστάρδα (*Brassica juncea* L.). Επομένως τα αυξημένα επίπεδα του maleic acid από το biochar σφενδάμου στη παρούσα μελέτη λογίζονται ως θετικά για την αύξηση, ανάπτυξη, μεταβολισμό και φυσιολογία των φυτών κάνναβης με την όποια συμβολή του. Ομοίως, θετικά μπορούν να θεωρηθούν και τα αποτελέσματα για τα άλλα σκευάσματα παρόλο που δεν επηρέασαν αυτό το καρβοξυλικό οξύ. Ουσιαστικά η μη μείωση ενός μεταβολίτη που ενδέχεται να διαθέτει προωθητικό ρόλο φυτικής ανάπτυξης, ή αντοχής σε καταπονήσεις από ρυπάνσεις με βαρέα μέταλλα, σίγουρα αποτελεί θετική πτυχή στην εξέλιξη του πειράματος.

Όσον αφορά το **κινναμωμικό οξύ (cinnamic acid)**, για μία ακόμη φορά μόνο η επέμβαση με biochar επηρέασε την περιεκτικότητά της στα φύλλα κάνναβης, ωστόσο σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάστηκε σημαντική μείωση (Εικόνες 124 και 125). Το κινναμωμικό οξύ είναι γνωστή αλληλοχημική ένωση για τα φυτά και επηρεάζει την βλάστηση σπόρων και ριζική ανάπτυξη (Ding *et al.*, 2007; Relgosa & Pazos-Maldivo 2007). Στις περισσότερες μελέτες οι επιδράσεις του κινναμωμικού οξέος σχετίστηκαν με την δράση του επί της μεμβράνης πλάσματος και σχετικών διεργασιών, όπως της επαγωγής οξειδωτικού stress (Ye *et al.*, 2006), αύξησης στα επίπεδα ROS (Ding *et al.*, 2007), διαταραχής στην ομοιόσταση Ca^{2+} (Yu *et al.*, 2009) και μείωσης στο δίκτυο της απορρόφησης αζώτου και της δράσης της H^+ -ATPase μεμβράνης πλάσματος (Abenavoli *et al.*, 2010). Ωστόσο στα ανώτερα φυτά το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένας από τους πρώτους ιστούς που επηρεάζονται από αυτά τα σήματα καταπόνησης και εν συνεχεία μεταδίδονται στο εσωτερικό του κυττάρου επηρεάζοντας διάφορες διεργασίες (Komatsu *et al.*, 2010). Επιπλέον το κινναμωμικό οξύ αποτελεί τον πρώτο μεταβολίτη στο μονοπάτι των φαινυλοπροπανοειδών ενώσεων, συνεπώς κατατάσσεται ως προκάτοχο μόριο για τη βιοσύνθεση λιγνίνης αλλά και αντιοξειδωτικών φλαβονοειδών (Boerjan *et al.*, 2003; Kováčik *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011).

Στη παρούσα μελέτη η σημαντική μείωση του κινναμωμικού οξέος από το biochar σφενδάμου στα φυτά κάνναβης προβληματίζει αρκετά. Βασική αιτία θεωρείται η υποβιοσύνθεση ενός μεταβολίτη με αλληλοπαθητικές ιδιότητες, καθιστώντας το φυτό πιο ευάλωτο τόσο στη δράση ανταγωνιστικών ζιζανίων στην καλλιέργειά του, όσο και στην ενδεχόμενη παρεμπόδιση της δράσης άλλων υποψήφιων φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας. Ακόμα πιο σημαντικός παράγοντας είναι η παρεμβολή στη βιοσύνθεση των αντιοξειδωτικών φλαβονοειδών τα οποία κατατάσσονται ως μεγάλης σημασίας συστατικά για την αντοχή και άμυνα των φυτών σε διάφορους παράγοντες, όπως δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες [π.χ. ψύχος Chalker-Scott & Kraemer (1989), ξηρασία Moore *et al.*, (2004), τοξικότητα μετάλλων Barcelo & Poschenrieder (2002), ακτινοβολία UV Ryan *et al.*, (2002)], για αλληλεπιδράσεις συστημάτων ξενιστή-παθογόνου ως σηματοδοτικά μόρια βελπώνοντας την φυτική ανάπτυξη και σιλουέτα (Webster

et al., 1998; Cohen & Yamaseki 2000; Mathesius 2003; Cooper 2004) αλλά και για αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή ως αντιμυκητιακή δράση (Grayer & Harborne 1994; Skadhauge *et al.*, 1997). Επίσης παράγονται ως ανταπόκριση σε μηχανική ζημιά, μόλυνση ή διάφορους τύπους καταπόνησης σαν φυτοαλεξίνες μετά από επαγόμενη σύνθεση λόγω καταπόνησης (Treutter 2006), αλλά σχηματίζονται και φλαβονοειδή σαν επαγωγή άμυνας λόγω προσβολής παθογόνων ή εχθρών (Barry *et al.*, 2002; Gallet *et al.*, 2004).

Επιπλέον τα φλαβονοειδή λειτουργούν επίσης ως αλληλοχημικά σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών προσδίδοντας και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Chou 1999; Iderjit & Gross 2000). Και ασφαλώς η μειωμένη βιοσύνθεση φλαβονοειδών μειώνει και την διατροφική αξία του φυτού καθώς αποτελούν τους βιοδραστικούς παράγοντες πολλών φαρμακευτικών φυτών με ισχυρές φαρμακολογικές ιδιότητες (Kong *et al.*, 2003; Marles *et al.*, 2003; Yilmaz & Toledo 2004).

Επιπροσθέτως η έμμεση υποβιοσύνθεση και της λιγνίνης από την μείωση του κινναμωμικού οξέος μπορεί να διαταράξει και την λιγνοποίηση που αποτελεί σημαντική μεταβολική διεργασία στη πορεία της κανονικής ανάπτυξης των ιστών και είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη της ρίζας. Πράγματι η λιγνίνη είναι το τελευταίο προϊόν του μεταβολισμού των φαιυλοπροπανοειδών στα φυτά και στοιχειοθετεί ένα σημαντικό ρόλο στην αντοχή του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις (Chen *et al.*, 2013). Παρόλα αυτά, τουλάχιστον οι επεμβάσεις με τους άλλους βιοδραστικούς παράγοντες που δεν μετέβαλαν την περιεκτικότητα του κινναμωμικού οξέος, δεν θα επιφέρουν τις αναφερθείσες συνέπειες στα φυτά κάνναβης. Επιπλέον η λιγνίνη αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος, παρέχοντας και μηχανική υποστήριξη στους βλαστούς, ενώ συμμετέχει ενεργά και στην μεταφορά ύδατος και ανόργανων στοιχείων (Taiz 2013).

Σχετικά με το **οξαλικό οξύ (oxalic acid)**, η επέμβαση με biochar ήταν η μοναδική που επηρέασε την συγκέντρωσή του σε βαθμό σημαντικής αύξησης (Εικόνες 124 και 125). Το οξαλικό οξύ απομονώθηκε πρώτη φορά από το εκχύλισμα του ριζωματώδους φυτού οξαλίδας (*Oxalis acetosella*) στην Σουηδία από τον Pierre (Gmelin & Watts 1855). Το οξαλικό οξύ και τα αντίστοιχα άλατά του είναι παρόντα στα φύλλα, ρίζες, μίσχους, καρπούς και σπόρους πολλών φυτών και αποτελεί πιθανότατα το πιο ισχυρό οργανικό οξύ στα φυτά. Όταν αντιδράσει με κατιόντα καταλήγει στον σχηματισμό διαφόρων οξαλικών αλάτων. Ένας βασικός του ρόλος στα φυτά είναι ο σχηματισμός αδιάλυτου οξαλικού ασβεστίου που τους επιτρέπει να ρυθμίζουν την συγκέντρωση του ασβεστίου και του οξαλικού οξέος, τα οποία ωστόσο μπορεί να καταστούν τοξικά όντας σε περίσσεια (Webb *et al.*, 1995). Παράδειγμα αποτελεί ο σημαντικός ρόλος του ασβεστίου στην μετάδοση του σήματος στα προστατευτικά κύτταρα των στοματίων, ωστόσο σε μεγαλύτερη από την επιθυμητή συγκέντρωση η λειτουργία αυτή αναστέλλεται (Prasad & Shivay 2017). Η ρύθμιση του ασβεστίου αναφέρθηκε από τους Ruiz & Mansfield (1994) για το φυτό *Commelina communis* L., όπου προτάθηκε ο σχηματισμός

αδιάλυτου οξαλικού ασβεστίου ως μηχανισμός αποθήκευσης ασβεστίου για μελλοντικές ανάγκες του φυτού (Herpler & Wayne 1985; Franceschi 1989).

Επιπλέον το οξαλικό οξύ και τα άλατά του παρέχουν τόσο βιοχημική όσο και μηχανική άμυνα ενάντια σε εχθρούς και ζώα (Franceschi & Nakata 2005; Korth *et al.*, 2006; Nakata 2012). Μια ακόμη χρήσιμη ιδιότητά του είναι το ξεπέραςμα της τοξικότητας από αλουμίνιο, του οποίου είναι περιοριστικός παράγοντας για την παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε όξινα εδάφη με υψηλή συγκέντρωση ανταλλάξιμων Al^{3+} (Taylor 1991; Foy *et al.*, 1992). Οι Morita *et al.*, (2008, 2011) επέδειξαν ότι τα οξαλικά άλατα ήταν η ένωση κλειδί για τον μηχανισμό ανοχής αργιλίου που χρησιμοποιήθηκε από το φυτό καμέλια (*Camellia sinensis*), ο οποίος αποτοξικοποιεί τα Al^{3+} εξωτερικά στη ριζόσφαιρα. Παρομοίως το οξαλικό οξύ εκκρίνεται και από τις ρίζες του φαγόπυρου (*Fagopyrum esculentum*), το οποίο έδειξε εξίσου υψηλή ανοχή σε αργίλιο (Ma *et al.*, 1997, 1998).

Η αύξηση της περιεκτικότητας σε οξαλικό οξύ στα φυτά κάνναβης από την επέμβαση με biochar σφενδάμου που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, κρίνεται μεν ως θετική δεδομένου ότι το οξαλικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της επιθυμητής συγκέντρωσης ασβεστίου στα κύτταρα, στην αυτοάμυνα έναντι εντόμων και φυτοφάγων ζώων και στην φυτοαποκατάσταση, συνεπώς χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ωστόσο είναι εξίσου απαραίτητο να προσδιοριστούν και τα επιθυμητά επίπεδά του με βάση το είδος και τις ανάγκες του φυτού, για να μην οδηγήσει σε υπερσυσσώρευση ασβεστίου και εν τέλει σε κάποια τοξικότητα.

Τέλος στο **γλυκερικό οξύ (glyceric acid)** οι επεμβάσεις με biochar και Acadian αύξησαν σημαντικά την περιεκτικότητά του στα φυτά κάνναβης, ενώ με Ekorpor 4G δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή (Εικόνες 124 και 125). Το γλυκερικό οξύ αποτελεί το οξειδωτικό προϊόν της γλυκερόλης και το D-ισομερές του απομονώθηκε πρώτη φορά ως φυτοχημικό συστατικό των φύλλων του καπνού (Palmer 1956) και έχει αναφερθεί να διαθέτει κάποιες βιολογικές δράσεις όπως αντιοξειδωτική (Barbakadze *et al.*, 2007, 2009) και διέγερση του ήπατος (Hando 1986). Σαν ένωση παράγεται χημικά με τεχνητό τρόπο ή βιοχημικά από μικροβιακούς οργανισμούς και έχει αναφερθεί η εφαρμογή του σε βιο-σχετιζόμενα λειτουργικά υλικά (Sato 2012). Η αύξηση της συγκέντρωσης του στα φύλλα κάνναβης της παρούσας μελέτης από εφαρμογή biochar σφενδάμου και εκχυλίσματος *A. nodosum* μπορεί να θεωρηθεί κάποιας αξίας. Δεδομένης της έρευνας που γίνεται για τις καινοτόμες εφαρμογές του γλυκερικού οξέος στην βιομηχανία βιο-υλικών η διαθεσιμότητά του στα φυτά κάνναβης μπορεί να αξιοποιηθεί με απομόνωσή του για μετέπειτα χρήση.

Σε σύγκριση με άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί οι Copley *et al.*, (2015) αξιολόγησαν την επίδραση biochar σφενδάμου στον μεταβολισμό του *R. solani* AG-4 καταλήγοντας ότι η προσθήκη του υλικού επιδείνωσε την σοβαρότητα της ασθένειας πλαγιάσματος σε διάφορα είδη σποροφυτών. Η ανάλυση με GC-MS στο μεταβολικό προφίλ του μύκητα έδειξε σημαντική

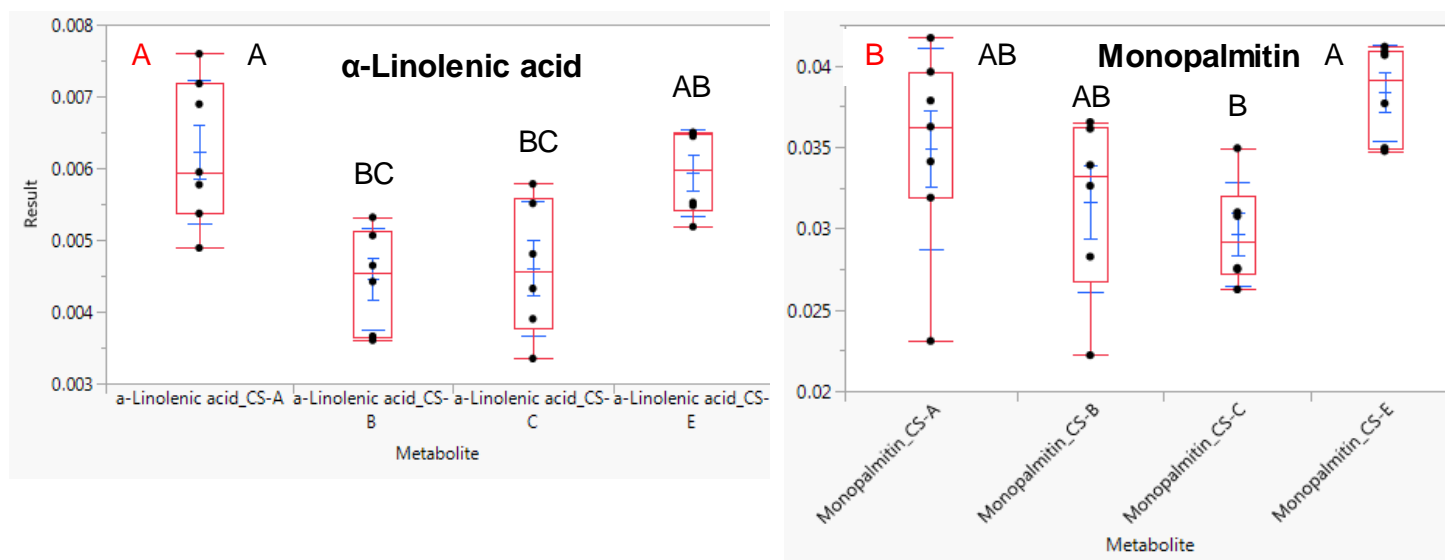
μείωση των επιπέδων καρβοξυλικών οξέων του κύκλου Krebs (μηλικό οξύ, φουμαρικό οξύ, γαλακτικό οξύ). Σε σύγχρονες μελέτες μεταβολομικής οι Barrajon-Catalan *et al.*, 2019 μελέτησαν μέσω HPLC-ESI-QTOF-MS το μεταβολικό προφίλ φύλλων και καρπών πιπεριάς (*Capsicum annuum* L. cv Palermo) κατά το στάδιο ωρίμανσης των καρπών μετά από εφαρμογή του σκευάσματος βιοδιεγέρτη «Actium®», με τα αποτελέσματα να δείχνουν σημαντική αύξηση στην περιεκτικότητα του κιτρικού οξέος και σημαντική μείωση του μηλικού οξέος στα φύλλα και σημαντική αύξηση ισομερών ενώσεων του κιτρικού οξέος στους καρπούς με την πάροδο του χρόνου. Σε αντίστοιχη μελέτη ωστόσο οι Manikharda *et al.*, 2018 είχαν βρει αύξηση οργανικών οξέων όπως ασκορβικό, κιτρικό και μηλικό κατά την ωρίμανση. Οι Khanna *et al.*, (2019) εφαρμόζοντας GC/MS ανάλυση εκτίμησαν την ικανότητα βιολογικού ελέγχου των PGPRs *Pseudomonas aeruginosa* (M1) και *Burkholderia gladioli* (M2) έναντι του νηματώδους σκώληκα *Meloidogyne incognita* σε φυτά τομάτας και τα αποτελέσματα έδειξαν εξαιρετική μείωση των προνυμφών 2ου σταδίου του νηματώδους. Στο μεταβόλωμα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των οργανικών οξέων όπως φουμαρικό, ηλεκτρικό, κιτρικό και μηλικό. Επιπλέον οι Zuluaga *et al.*, (2021) μέσω UHPLC/QTOF-MS αξιολόγησαν την ικανότητα επανάκαμψης φυτών τομάτας σε συνθήκες καταπόνησης από αλατότητα μετά από εμβολιασμό με τα PGPRs *Pseudomonas* 16S και *Enterobacter* 15S αναλύοντας το μεταβολομικό προφίλ της ριζόσφαιρας. Τα δεδομένα έδειξαν σημαντικές μεταβολές σε 3 διακαρβοξυλικά οξέα με αυξήσεις σε ένα οξύ για κάθε επέμβαση (NaCl, NaCl+16S, NaCl+15S) και μειώσεις σε δύο οξέα για κάθε επέμβαση αντίστοιχα, με το τελικό συμπέρασμα να επιδεικνύει υψηλότερη απόδοση βιομάζας στα φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή των PGPRs. Σε άλλη μελέτη οι Pereira *et al.*, (2019) εξέτασαν την επίδραση των βιοδιεγερτών «Megafol» (αποτελούμενο από βιατμίνες, αμινοξέα, βεταΐνες, πρωτεΐνες και ρυθμιστές ανάπτυξης) και «Veramin» (αποτελούμενο από αμινοξέα, σίδηρο, μικροστοιχεία) στην ικανότητα μετρίασης stress από περίσσεια ύδατος σε δύο γονοτύπους σπανακιού (Fuji και Viroflay) με την GC-FID ανάλυση να δείχνει τα υψηλότερα περιεχόμενα καρβοξυλικών οξέων όπως μηλικό και οξαλικό οξύ στα φυτά που τους χορηγήθηκαν οι βιοδιεγέρτες υπό συνθήκες stress ύδατος. Επίσης από το σκεύασμα βιοδιεγέρτη με *A. nodosum* «SyperFifty» (SF) οι Omidbakhshfard *et al.*, (2020) συμπέραναν ότι προστατεύονται τα φυτά αραβίδοψης από οξειδωτικό stress από την δράση του γνωστού οξειδωτικού με υπεροξειδία paraquat (PQ) που προκαλεί νεκρωτικές κηλίδες. Η επέμβαση με τον βιοδιεγέρτη προστάτησε τα φυτά τα οποία δεν επηρεάστηκαν από την προσθήκη του PQ, με την μεταγραφωματική ανάλυση να αποκαλύπτει επαγωγή των γονιδίων δεικτών ROS, γονιδίων που συμμετείχαν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λόγω επαγωγής από ROS και γονίδια σχετιζόμενα με αυτοφαγία μετά από προσθήκη PQ. Οι συγκεκριμένες αλλαγές δεν συνέβησαν στα καταπονημένα από PQ φυτά στα οποία εφαρμόστηκε το SF, με τις GC/MS μεταβολομικές αναλύσεις να αποκαλύπτουν την

συσσώρευση των ενδιάμεσων για τον κύκλο τρικαρβοξυλικών οξέων μορίων, φουμαρικό και μηλικό οξύ.

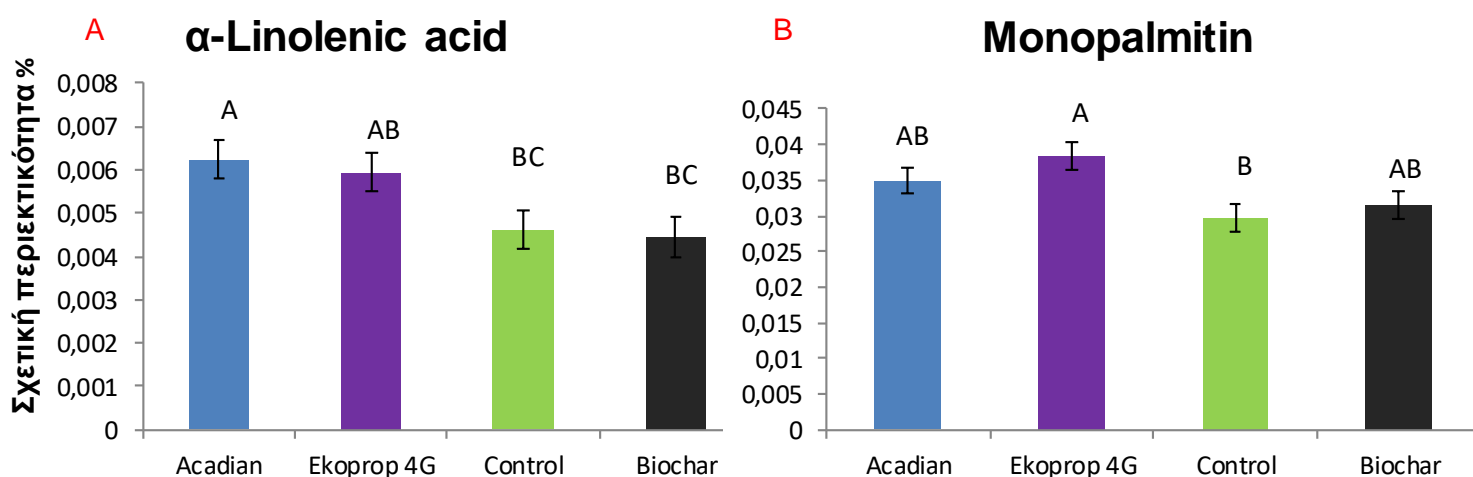
Συνοψίζοντας το biochar ήταν ο βιοδραστικός παράγοντας που επηρέασε ως επί τω πλείστον τον μεταβολισμό στα φυτά της κάνναβης, αυξάνοντας σημαντικά την συγκέντρωση σε καρβοξυλικά οξέα υψηλής σημασίας για τα φυτά λόγω συμμετοχής τους στον κύκλο krebs (*μηλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ*), καθώς και σε άλλα οξέα που διέθεταν σηματοδοτικό ή ρόλο φυτοαποκατάστασης (*οξαλικό οξύ*), συμμετοχή στην ρύθμιση ανάπτυξης (*ηλεκτρικό οξύ*) με πιθανό ρόλο στην άμυνα και αντοχή από το stress αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων (*maleic acid*) ή οξέα με πιο περιορισμένο ρόλο για τα φυτά αλλά με προοπτικές στην βιομηχανία υλικών (*γλυκερικό οξύ*). Μοναδική εξαίρεση η σημαντική μείωση στα επίπεδα του κινναμωμικού οξέος, μεταβολίτη με αλληλοχημικές ιδιότητες και ενεργό ρόλο στην άμυνα και αντοχή από το stress αβιοτικών και βιοτικών καταπονήσεων. Ως εκ τούτου εστιάζοντας στα οφέλη της υπερβιοσύνθεσης των καρβοξυλικών οξέων στην ανάπτυξη και ευρωστία των φυτών, το biochar σφενδάμου συνίσταται περισσότερο από τους άλλους βιοδραστικούς παράγοντες για την καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης.

4.7.1.3 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε διαφορετικά επίπεδα αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου, συμπεριλαμβανομένης της παροχής κυτταρικής ενέργειας προς υποστήριξη των μεταβολικών διεργασιών, επικοινωνίας μεταξύ του ξενιστή και του παθογόνου, ενεργοποίησης και υλοποίησης της φυτικής άμυνας (Shah & Chaturvedi 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μονοπάτι της lipoxygenase, το οποίο προμηθεύει την παραγωγή ενός ευρέως φάσματος μεταβολιτών τις oxylipins που δημιουργούνται από αυτο-οξειδωση ή ενζυματική οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Wasternack & Feussner 2018). Στην **Εικόνα 127** συγκρίνονται οι σχετικές περιεκτικότητες από τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των φυτών μετά από τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτές του μάρτυρα με τη βοήθεια θηκογραμμάτων (*boxplots*) και αντίστοιχα στην **Εικόνα 128** τα ίδια αποτελέσματα με τη χρήση ραβδογραμμάτων. Συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν το α-Λινολενικό οξύ και το Monopalmitin. Σύμφωνα με τις εικόνες δεν επηρέασαν όλες οι επεμβάσεις τα λιπαρά οξέα, με του biochar να κρίνεται αδιάφορη.



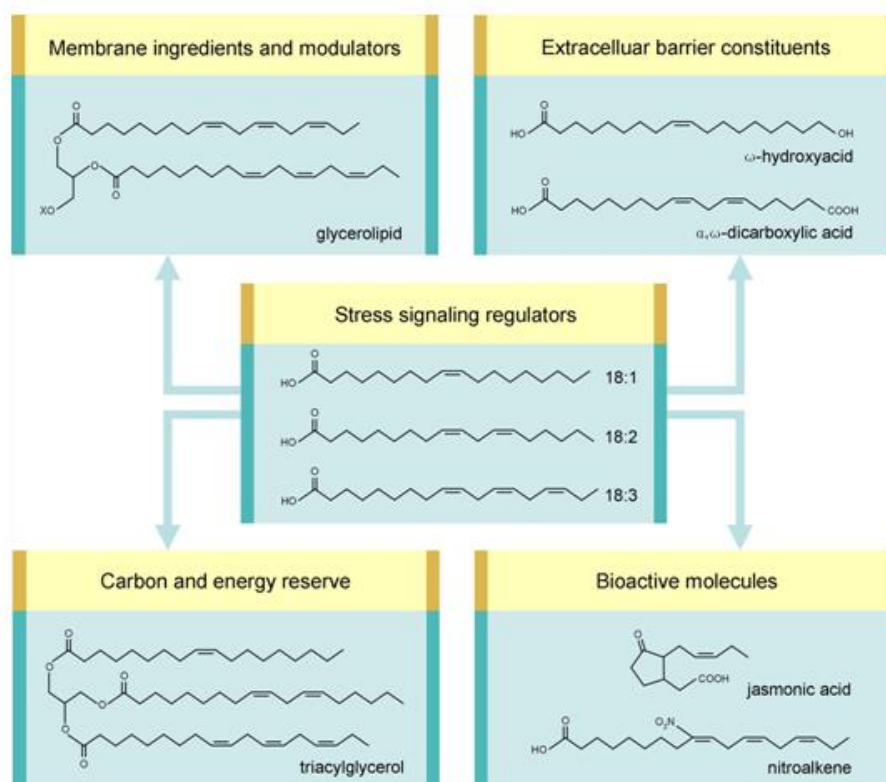
Εικόνα 127: Θηκογράμματα (boxplots) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekoprop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων λιπαρών οξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε (A) α -Linolenic acid, (B) Monopalmitin. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.



Εικόνα 128: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων λιπαρών οξέων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε (A) α -Linolenic acid, (B) Monopalmitin. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Στην παρούσα μελέτη η επέμβαση με Acadian επηρέασε σημαντικά αυξάνοντας τα επίπεδα του **α -λινολενικού οξέος** (α -linolenic acid), ενώ οι υπόλοιπες επεμβάσεις δεν είχαν σημαντική επίδραση (Εικόνες 127 και 128). Το α -Λινολενικό οξύ κατατάσσεται στην ομάδα των λιπαρών οξέων αλυσίδας

18-ανθράκων και συγκεκριμένα ως 18:3. Μαζί με τα υπόλοιπα (ολεϊκό 18:1, λινολεϊκό 18:2) θεωρούνται οι γενικοί μηχανισμοί άμυνας των φυτών. Ιδίως σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης δρουν ως διαμορφωτές κυτταρικών μεμβρανών στα γλυκερολιπίδια, αποθήκες άνθρακα και ενέργειας στην triacylglycerol, αποθέματα συστατικών εξωκυτταρικού τοιχώματος (π.χ. *cutin* και *suberin*), προκάτοχα μόρια (π.χ. παραγώγων του Ιασμονικού οξέος και νιτροαλκένια) και ρυθμιστές σημάτων καταπόνησης (Εικόνα 129), αλλά αποτελούν ωστόσο και δυνητικοί επαγωγείς οξειδωτικού stress (He & Ding 2020). Όλα αυτά τα προϊόντα μαζί με το α-λινολενικό οξύ είναι αξιοσημείωτο ότι συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών έναντι διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Επομένως η άμεση και έμμεση εμπλοκή του επιτυγχάνεται δια πολλαπλών μηχανισμών που καταγράφονται στον Πίνακα 29. Επίσης τα λιπαρά οξέα και τα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο σε διαφορετικά στάδια αλληλεπιδράσεων παθογόνου-ξενιστή, όπως παροχή κυτταρικής ενέργειας προς υποστήριξη μεταβολικών διεργασιών, επικοινωνίας μεταξύ ξενιστή και του παθογόνου και εφαρμογή της άμυνας των φυτών (Ali & Baek 2020).



Εικόνα 129: Πολλαπλοί ρόλοι των C18 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην άμυνα κατά του stress, με αναφορά παραδειγμάτων. Το «X» αντιπροσωπεύει την επικεφαλή ομάδα των γλυκερολιπιδίων. Πηγή: Xe & Ding (2020).

Εσπάζοντας στα βιοενεργά μόρια το Ιασμονικό οξύ (Jasmonic acid, JA) είναι ίσως η ένωση με την μεγαλύτερη σημασία για τις αμυντικές αποκρίσεις

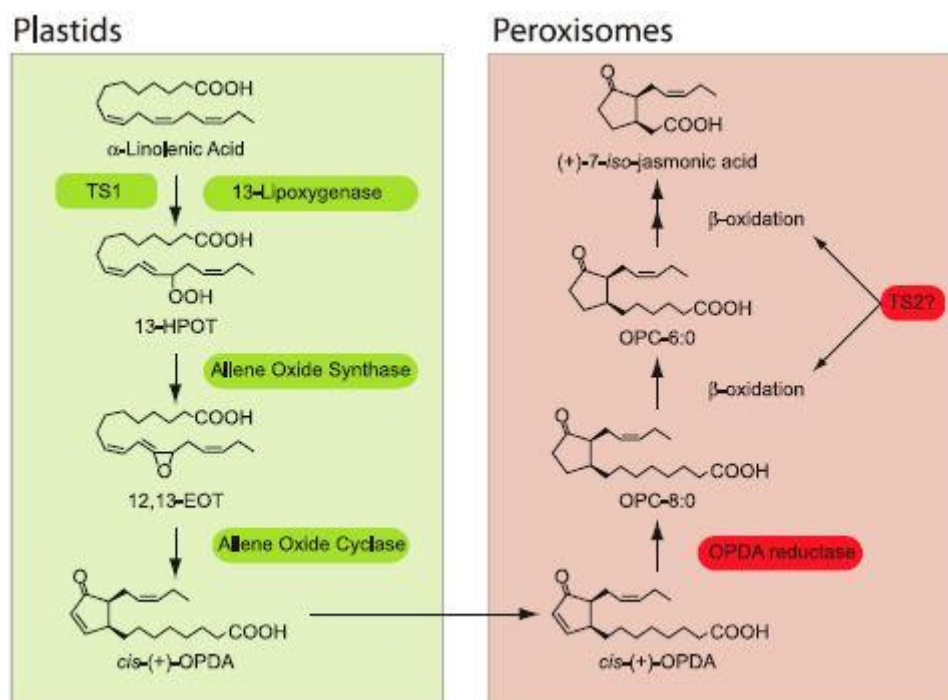
των φυτών. Η βιοσύνθεσή του πραγματοποιείται δια του οκτανοδεκανοειδούς μονοπατιού κατά το οποίο το α-Λινολενικό οξύ μετατρέπεται σε JA και η διαδικασία λαμβάνει χώρα εντός των οργανιδίων χλωροπλάστη και υπεροξεισώμα σε τρία στάδια (Acosta *et al.*, 2009) (Εικόνα 130).

Πίνακας 29: Μηχανισμοί για α-Λινολενικό οξύ στην άμυνα κατά του stress. Πηγή: He & Ding (2015).

Σχετικά μέρη	Μηχανισμοί
Γλυκερολιπίδια μεμβράνης	Διατήρηση της κατάλληλης ρευστότητας της μεμβράνης που απαιτείται για πολλαπλές διεργασίες που εξαρτώνται από την μεμβράνη, π.χ. σηματοδότηση Ca^{2+} Ρυθμίζοντας άμεσα τις δραστηριότητες των πρωτεϊνών που συνδέονται με τη μεμβράνη, π.χ. πλασματική μεμβράνη (PM) H^+ -ATPase Μετριάζοντας την επαγόμενη από stress φωτοαναστολή στο φωτοσύστημα II Σηματοδότηση για ρύθμιση άμυνας stress, π.χ., το phosphatidic acid (PA) μπορεί να ανταγωνιστεί τα H_2O_2 συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού θανάτου
Triacylglycerol	Προμήθεια άνθρακα και ενέργειας για επιβίωση ή επανακάμψη από το stress
Cutin/Suberin	Κατασκευή σωματικής και χημικής ανθεκτικού φράγματος
Jasmonates	Σηματοδότηση προς οργάνωση τοπικής ή/και συστημικής άμυνας
Nitroalkenes	Σηματοδότηση προς κινητοποίηση πρωτεϊνών θερμικού σοκ και αντιοξειδωτικών ενζύμων
18:03	Διέγερση PM NADPH oxidase (NOX) και επομένως παραγωγής ριζών O_2

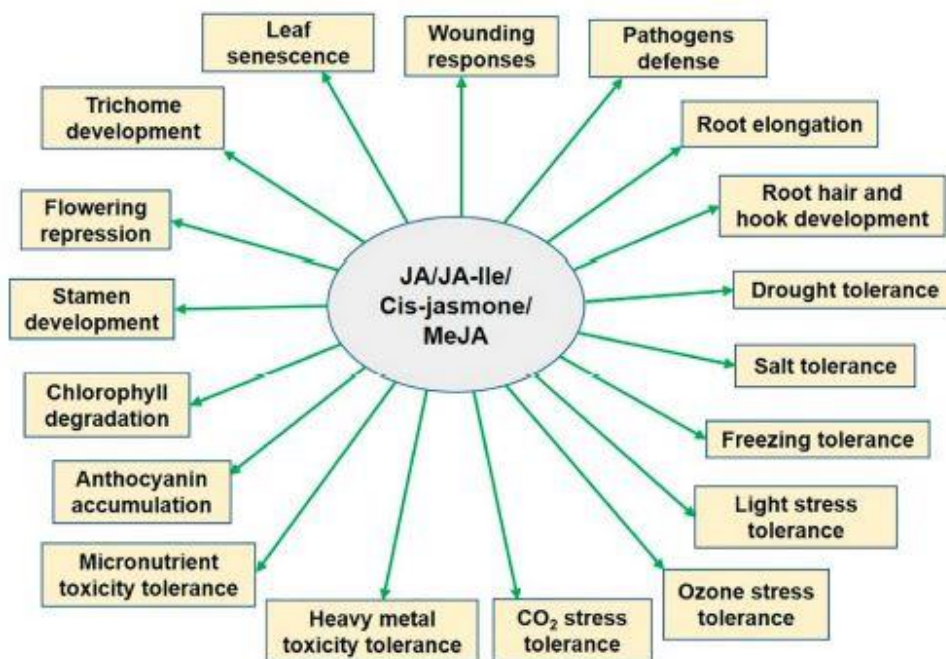
Η φυτορμόνη JA μεσολαβεί για διάφορες διεργασίες κατά την φυτική ανάπτυξη όπως ανάπτυξης αρσενικών και θηλυκών οργάνων, καθώς και ανάπτυξης εμβρύου, βλάστηση σπόρου, ανάπτυξη σποροφύτου, αύξηση ρίζας, βαρεοτροπισμό, σχηματισμό τριχώματος και κονδύλων, κίνηση και γήρανση φύλλων (Wasternack 2014a). Επιπλέον το JA (και τα παράγωγά του) συμμετέχει σε πολυάριθμα μονοπάτια μεταγωγής σήματος συμπεριλαμβανομένων και αυτών των γονιδιακών δικτύων, ρυθμιστικών πρωτεϊνών, σηματοδοτικών ενδιάμεσων μορίων και πρωτεϊνών, ενζύμων και μορίων που προστατεύουν τα κύτταρα από τις τοξικές επιδράσεις των αβιοτικών καταπονήσεων, διαμορφώνοντας διάφορες φυτικές διεργασίες ως ανταπόκριση σε αυτές τις καταπονήσεις (Ali & Baek 2020) (Εικόνα 131). Όσον αφορά την συμβολή του JA στην άμυνα των φυτών έναντι προσβολών από έντομα και παθογόνα, σύμφωνα με τους Creelman & Muller (1997) αυτό συσσωρεύεται τόσο στα τραυματισμένα φυτά, όσο και σε φυτά ή κυτταρικές καλλιέργειες στις οποίες εφαρμόζονται εκκινητές ενεργοποίησης της άμυνας κατά παθογόνων. Έπειτα το JA ρυθμίζει γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα αναστολέων της πρωτεάσης, τα οποία βοηθούν στην προστασία των φυτών από εντομολογικές προσβολές. Επιπλέον το JA ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με αντιμυκητιακή δράση όπως

osmotin, thionin και ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών κυτταρικού τοιχώματος με πιθανή συμμετοχή στην κατασκευή προστατευτικού «τείχους» έναντι μολύνσεων. Επίσης το JA επάγει την έκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη βιοσύνθεση φυτοαλεξινών και φαινολικών συστατικών που συμμετέχουν στους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού. Τέλος αποτελεί και προκάτοχο μόριο του μονοπατιού των oxylipins, οι οποίες με την σειρά τους παράγουν κι άλλες πτητικές ενώσεις (π.χ. αλκοόλες, αλδεύδες) που συμβάλλουν στην φυτική άμυνα και επούλωση των πληγών.



Εικόνα 130: Βιοσύνθεση του Ιασμονικού οξέος μέσω του οκταδεκανοειδούς μονοπατιού. Το πρώτο βήμα αφιερώνεται στην υπεροξειδωση του α-λινολενικού οξέος (18:3) από την 13-lipoxygenase στην χημικά ασταθή μορφή (13-S)-hydroperoxyoctadecatrienoic acid (13-HPOT). Αυτή είναι η υποθετική λειτουργία του TS1. Το 13-HPOT μετατρέπεται στο συγκεκριμένο στερεοϊσομερές cis-(+)-12-oxophytodienoic acid (OPDA) μέσω της διαδοχικής δράσης της allene oxide synthase [αποδίδοντας (13-S)-12,13-epoxy-octadecatrienoic acid (12,13-EOT)] και allene oxide cyclase. Αυτά τα βήματα στην βιοσύνθεση του JA λαμβάνουν χώρα στα πλαστίδια του φυτού (πράσινα κουτιά) όπου εντοπίζονται τα αναπτοκρινόμενα ένζυμα. Οι μεταγενέστερες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στα υπεροξεισώματα (κόκκινα κουτιά). Αρχικά ο δακτύλιος cyclopentanone του OPDA ανάγεται σε 12-oxophytenoic acid (OPC-8) από την OPDA reductase. Εν συνεχεία προτείνονται τρεις κύκλοι β-οξειδωσης για να βραχύνουν την καρβοξυλική πλευρά της αλυσίδας του OPC-8 για να παραγάγουν την JA-12 ανθράκων (Westernack 2007), (Goerfert & Poirier 2007). Ένας κύκλος οξειδωσης καθορίζεται από τέσσερις ενζυματικές αντιδράσεις: οξείδωση, ενυδάτωση, οξείδωση και θειόλυση. Δεν έχουν ταυτοποιηθεί όλα τα δρόντα ένζυμα στην β-οξειδωση κατά την βιοσύνθεση του JA. Λόγω ότι η οξείδωση στο τρίτο βήμα εκτελείται κανονικά από την δράση της dehydrogenase, είναι πιθανό το TS2 να συμμετέχει σε αυτό το στάδιο της βιοσύνθεσης. Πηγή: Acosta *et al.*, (2009), αναδημοσιευμένο από (Westernack 2007).

Στο παρόν πείραμα αν ληφθεί υπόψη η σημασία του α-λινολενικού οξέος στην ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών των φυτών κάνναβης, η αύξηση της συγκέντρωσης στα φύλλα από την επέμβαση με εκχύλισμα *A. nodosum* είναι πλήρως επιθυμητή, καθώς αυξάνεται η ικανότητα των φυτών για έγκαιρη παρέμβαση σε περιπτώσεις αβιοτικών καταπονήσεων, πόσο μάλλον για προσβολές από φυτοπαθογόνους μύκητες όποτε αυτή καταστεί απαραίτητη, όπως στην υπάρχουσα περίπτωση του *R. solani*. Αντιθέτως η αμετάβλητη συγκέντρωση α-λινολενικού οξέος με την εφαρμογή των άλλων βιοδραστικών παραγόντων δεν λογίζεται ως ιδανική, αφήνοντας ερωτήματα για το κατά πόσο διατηρήθηκε (ή μειώθηκε) η ικανότητα του φυτού να ανταποκριθεί εγκαίρως σε προσβολές, ενεργοποιώντας αποτελεσματικά τους μηχανισμούς άμυνας του. Ως εκ τούτου προτείνεται η διεξαγωγή περαιτέρω έρευνας για να ανακαλυφθεί και ο τρόπος δράσης (Mode of Action) των συγκεκριμένων δραστικών παραγόντων στην αντίδραση του φυτού από την μεταβολή της περιεκτικότητάς του σε α-λινολενικό οξύ.



Εικόνα 131: Διάφορες διεργασίες που διαμορφώνονται από το Ιασμονικό οξύ και το παράγωγό του από την isoleucine ως ανταπόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις. JA ιασμονικό οξύ, JA-Ile jasmonyl isoleucine, MeJA methyl jasmonate. Πηγή: Ali & Baek (2020).

Σχετικά με το **monopalmitin** μόνο η επέμβαση με Ekorpor 4G προκάλεσε σημαντική επίδραση στην συγκέντρωσή του στα φύλλα των φυτών κάνναβης και συγκεκριμένα αύξηση (Εικόνες 127 και 128). Το monopalmitin αποτελεί προϊόν της χημικής αντίδρασης της γλυκερίνης με το παλμιτικό οξύ. Η σημασία του εστιάζεται σαν πηγή άνθρακα για τα φυτά, μικροβίωμα που σχετίζεται με φυτά και φυτά όσπρια ώστε να διατηρείται η συμβίωση με δενδρόμορφους μυκορριζικούς μύκητες, οι οποίοι εντοπίζονται σε εκκρίματα

ρίζας διαφόρων φυτικών ειδών (Feng *et al.*, 2019). Στα φύλλα φυτών ζαχαροκάλαμου τα περιεχόμενα της 2-μονοραλμιτίνης αυξήθηκαν μετά από εμβολιασμό με PGPRs (*Gluconacetobacter diazotrophicus* και *Herbasirillum seropedicae*) αλλά μόνο σε συνδυασμό προσθήκης χουμικών οξέων (Aguilar *et al.*, 2018). Ωστόσο δεν είναι γνωστός ο ακριβής ρόλος της μονοραλμιτίνης. Πάντως στην παρούσα μελέτη η αύξησή του στην επέμβαση με ωφέλιμους μικροοργανισμούς που αποίκισαν τις ρίζες των φυτών κάνναβης, δείχνει ότι μπορεί να σχετίζεται με την συμβίωση φυτού/ωφέλιμων μικροοργανισμών.

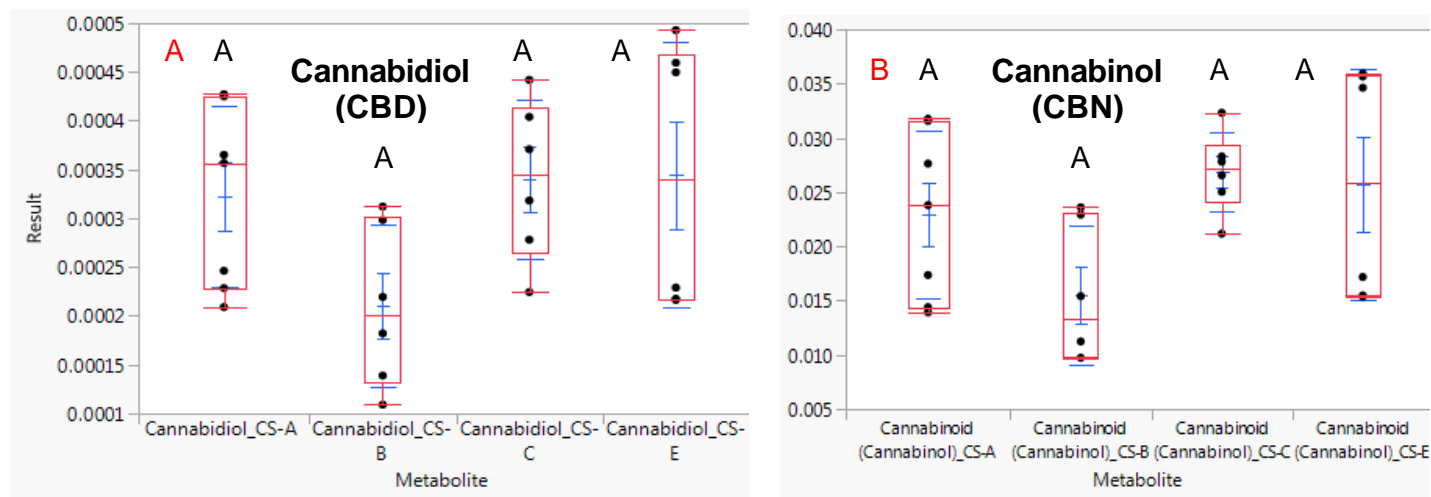
Σε άλλες μεταβολομικές μελέτες οι Silva *et al.*, (2021) ανέλυσαν με UHPLC-MS/MS το μεταβολικό προφίλ φυτών σόγιας σε μια συμβατή απόκριση του φυτού σε σύστημα παθογένειας με τον βιοτροφικό μύκητα *Phakopsora pachyrhizi*, υπεύθυνο για την ασθένεια της σκωρίασης της ασιατικής σόγιας με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι η εισβολή του παθογόνου στα φυτά ενεργοποίησε τα ένζυμα phospholipases στην πλαστιδιακή μεμβράνη προκαλώντας την σύνθεση του α-λινολενικού οξέος. Σε παρεμφερείς μελέτες αξιολόγησης βιοδιεγερτών, οι El-Arroussi *et al.*, (2018) εξέτασαν την επίδραση του φυκιού *Dunaliella salina* στην ικανότητα μείωσης του stress αλατότητας σε φυτά τομάτας και παρά τα θετικά συμπεράσματα, η GC/MS μεταβολομική ανάλυση ανέφερε τόσο μείωση στα επίπεδα λιπαρών οξέων όπως λινολενικό οξύ και παλμιτικό οξύ στα καταπονημένα από αλατότητα φυτά, όσο και περαιτέρω μείωση στο λινολενικό οξύ μετά την επέμβαση με το *D. salina* στα πληγέντα εξ αλατότητας φυτά. Οι Pereira *et al.*, (2019) σε πείραμα αξιολόγησης των βιοδιεγερτών «Megafol» και «Veramin» για βελτίωση της ανάπτυξης δύο γονοτύπων σπανακιού υπό συνθήκες καταπόνησης λόγω συσσώρευσης ύδατος, το α-λινολενικό οξύ δεν παρουσίασε κάποια σημαντική αλλαγή στην συγκέντρωσή του από τις επεμβάσεις με τα σκευάσματα. Τέλος στην μελέτη των Kalozoumis *et al.*, (2021) η επίδραση εμβολιασμού διαφόρων PGPRs σε συνδυασμένο stress έλλειψης ύδατος και θρεπτικών στοιχείων σε φυτά τομάτας, έδειξε ότι με το *E. mori* C3.1 αυξήθηκε σημαντικά ο μεταβολίτης μονοραλμιτίνης, που θεωρείται σημαντικός για την συμβίωση φυτού-μικροβίων.

4.7.1.4 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα κανναβινοειδών

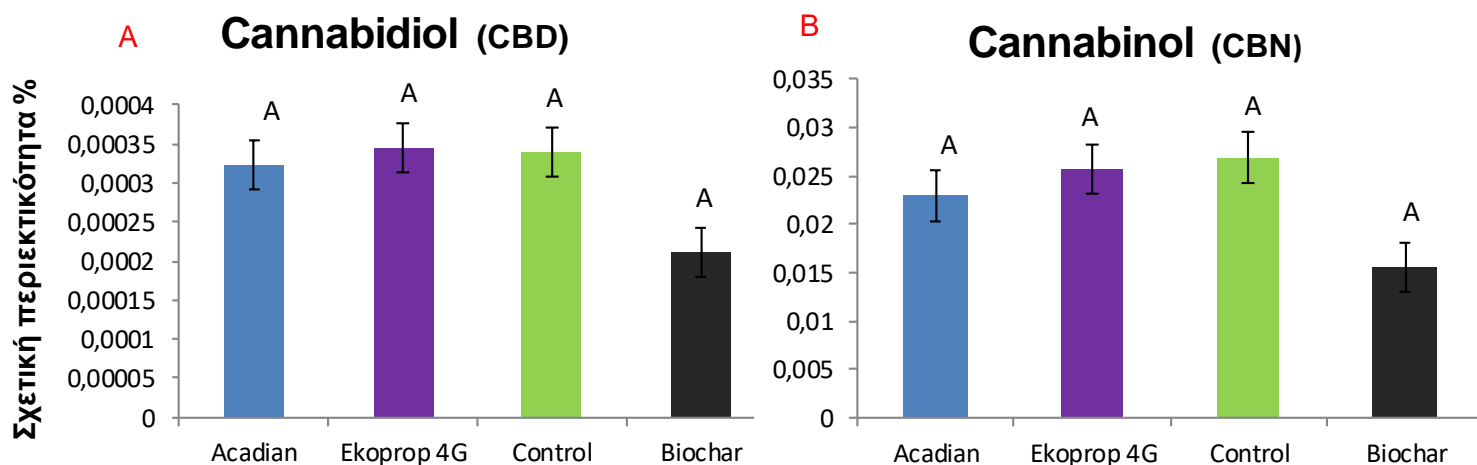
Η αξία των κανναβινοειδών για τον άνθρωπο θεωρείται μεγάλης σημασίας στην φαρμακευτική και ιατρική ιδίως με την βιοδραστικότητα που διακατέχουν, της οποίας η επίδραση επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των κανναβινοειδών στους υποδοχείς CB1 και CB2 του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος με περισσότερες λεπτομέρειες στις **Ενότητες** 1.1.1 και 1.1.5. Ο ρόλος τους στα φυτά σχετίζεται κυρίως με την άμυνα του φυτού έναντι προσβολών από εχθρούς, φυτοφάγα ζώα και συγκεκριμένων αβιοτικών καταπονήσεων. Συγκεκριμένα όταν σχίζεται το τρίχωμα του φυτού λόγω υψηλής θερμοκρασίας περιβάλλοντος ή σαν αποτέλεσμα δράσης φυτοφάγων, τα περιεχόμενά του σχηματίζουν μια κολλώδη επίστρωση στην φυτική επιφάνεια η οποία ενορχηστρώνεται από τις ιξώδεις και μη κρυσταλλικές ιδιότητες των κανναβινοειδών (Garrett & Hunt 1974). Αυτή η βλαβερή ουσία προσκολλάται στις γνάθους και τα πόδια των πιθανών φυτοφάγων εντόμων και αποτρέπει την ξηρασία, μοιάζοντας με το κηρώδες και υαλώδες υγρό των κακτοειδών και άλλων παχύφυτων από ξηρά περιβάλλοντα (Mauseth 2006). Η ποσότητα των κανναβινοειδών που σχηματίζεται σχετίζεται θετικά τόσο με τις αυξημένες θερμοκρασίες και επιβαλλόμενες καταπονήσεις θέρμανσης, όσο και με την χαμηλή εδαφική υγρασία και πτωχό περιεχόμενο σε ιχνοστοιχεία (Bazzaz *et al.*, 1975; Mutari *et al.*, 1993). Επιπλέον η παραγωγή των κανναβινοειδών μπορεί επίσης να παράσχει ένα εξελικτικό πλεονέκτημα, λειτουργώντας ως αντηλιακό που απορροφά την βιολογικά καταστρεπτική ακτινοβολία UV-B (280-315 nm) (Einchhorn Bilodeau *et al.*, 2019). Για του λόγου το αληθές μετρήθηκε σημαντικώς αυξημένη παραγωγή κανναβινοειδών στα άνθη της κάνναβης μετά από επαγόμενο stress λόγω UV-B ακτινοβολίας (Einchhorn Bilodeau *et al.*, 2019).

Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με την GC/MS μεταβολομική ανάλυση και στατιστικές επεξεργασίες (**Εικόνες 132 και 133**) καμία από τις επεμβάσεις δεν επηρέασε την συγκέντρωση των κανναβινοειδών στα φύλλα των φυτών κάνναβης. Και για τα δύο κανναβινοειδή που ανιχνεύτηκαν στα φυτά σε όλες τις επεμβάσεις, κανναβιδιόλη (CBD) και κανναβινόλη (CBN) δεν άλλαξαν σημαντικά τα επίπεδά τους. Η τετραϋδροκανναβινόλη (THC) πέραν ότι δεν ανιχνεύτηκε σε όλες τις επαναλήψεις των επεμβάσεων, βρέθηκε και σε πάρα πολύ μικρή περιεκτικότητα και ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκε στο matrix της μεταβολομικής ανάλυσης. Παρά τα φαινομενικά μη ιδανικά αποτελέσματα των επεμβάσεων στα κανναβινοειδή, μπορεί να ειπωθεί ότι δεν είναι αποθαρρυντική η χρήση των βιοδραστικών παραγόντων στα φυτά της κάνναβης. Εστιάζοντας στα οφέλη που παρατηρήθηκαν στην ανάπτυξη των φυτών σύμφωνα με τους φαινοτύπους που εμφάνισαν (**Ενότητες 4.2.1 - 4.2.3**) αλλά και με τις αλλαγές στο μεταβόλωμα σε σημαντικούς μεταβολίτες για την φυσιολογία, άμυνα, αύξηση και ανάπτυξη, καταλήγουμε ότι η εφαρμογή των παραγόντων αυξάνει την απόδοση των φυτών με σημαντικά οφέλη στα φυτικά

τους προϊόντα που χρησιμοποιούνται στους κλάδους της βιομηχανίας και τροφίμων. Ως εκ τούτου ενδείκνυται η χρήση τους στην βιομηχανική κάνναβη.



Εικόνα 132: Θηκογράμματα (boxplots) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekoprop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων κανναβιοειδών των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε (A) Καναβιδιόλη (CBD) και (B) Καναβινόλη (CBN). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.



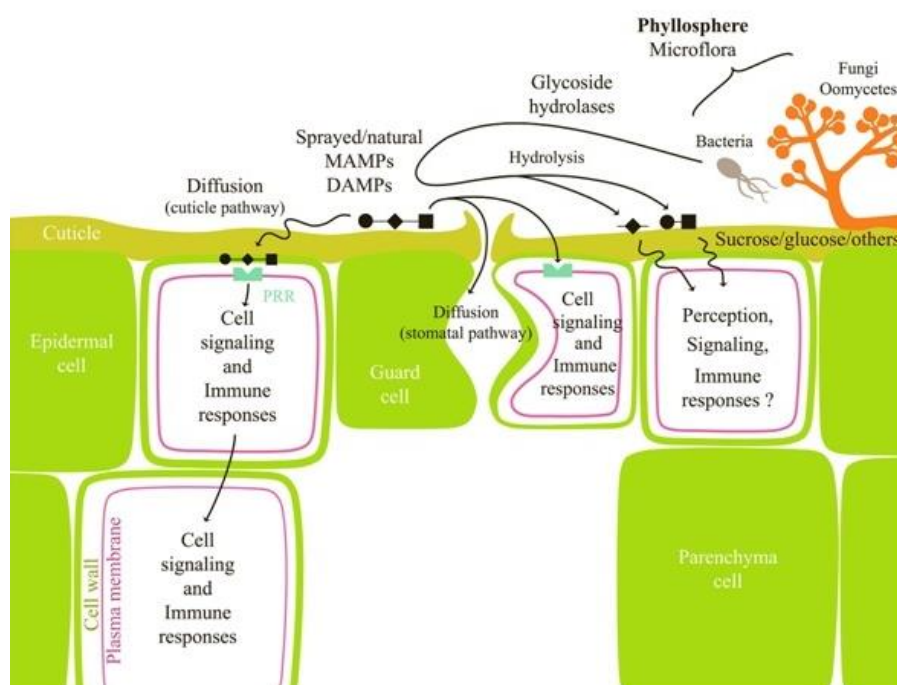
Εικόνα 133: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων κανναβιοειδών των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε (A) κανναβιδιόλη (CBD), (B) Καναβινόλη (CBN). Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Σε άλλες μελέτες οι Conant et al., (2017) ανέφεραν ότι το προϊόν μικροβιακού βιοδιεγέρτη «*Mammoth PTM*» αποτελούμενο από τη συνεργιστική κοινωμία (*consortium*) των *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Conamonas testosteroni* και *Pseudomonas putida*, προήγαγε την ανάπτυξη κάνναβης στο στάδιο της άνθησης αλλά δεν επέδρασε μεταβολικά στην συγκέντρωση των κανναβινοειδών. Ενώ σε πρόσφατη μελέτη οι Bernstein et al., (2019) ανέφεραν ότι η επίδραση χουμικών οξέων στο χημικό προφίλ φαρμακευτικής κάνναβης προκάλεσε σημαντική μείωση της φυσικής βιοσύνθεσης όλων των υπό μελέτη κανναβινοειδών.

4.7.1.5 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα υδατανθράκων

Στα φυτά οι υδατάνθρακες (ή σάκχαρα) παράγονται από την φωτοσύνθεση και είναι πολύ γνωστοί για τον απαραίτητο ρόλο τους ως ζωικές πηγές ενέργειας και ανθρακικοί σκελετοί για οργανικές ενώσεις και αποθηκεύουν συστατικά. Επιπλέον έχει μελετηθεί και η ζωική τους λειτουργία ως σηματοδοτικά μόρια, κατά τέτοιο τρόπο παρόμοιο με των ορμονών (Koch 1996, 2004; Sheen et al., 1999; Rolland et al., 2006; Smeekens et al., 2010). Ως εκ τούτου αλληλεπιδρώντας με ημερήσιες αλλαγές, αβιοτικές και βιοτικές καταπονήσεις και σηματοδότηση ορμονών τα σάκχαρα θεωρούνται ως δραστικοί παράγοντες ενός πολύπλοκου συστήματος επικοινωνίας, απαραίτητο για τον συντονισμό του μεταβολισμού με αύξηση, ανάπτυξη και ανταποκρίσεις στις περιβαλλοντικές αλλαγές και καταπονήσεις (Roland et al., 2002, 2006). Τα σάκχαρα και ιδιαίτερα οι ολιγοσακχαρίτες (όπως η **trehalose**) διαδραματίζουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο σχετικά με τα ενεργά είδη οξυγόνου (ROS) που παράγονται από τα φυτά ως ανταπόκριση σε αβιοτικές καταπονήσεις, καθώς υπάρχουν αυξανόμενα αποδεικτικά στοιχεία για τον ρόλο τους ως ανποξειδωτικά, δεδομένων των ιδιοτήτων τους ως απενεργοποιητές ROS (Matros et al., 2015). Για αυτόν τον λόγο τα σάκχαρα μπορούν να θεωρηθούν ως συστατικά κλειδιά για ένα ολοκληρωμένο κυτταρικό οξειδοαναγωγικό δίκτυο (Keunen et al., 2013). Επιπλέον σε αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων τα σάκχαρα είναι απαραίτητα για την τροφοδοσία της ενέργειας που απαιτείται για τις άμυνες και εξυπηρετούν ως σήματα για την ρύθμιση γονιδίων άμυνας (Ehness et al., 1997; Roitsch et al., 2003; Bolton 2009). Σχετικά με τον ρόλο των υδατανθράκων στην φυτική ανοσία, τίθεται το ερώτημα κατά πόσο θα μπορούσαν να βοηθήσουν στον έλεγχο των φυτικών ασθενειών σε συνθήκες αγρού (Delaunoy et al., 2014). Τα σάκχαρα ως σηματοδοτικά μόρια συμμετέχουν επίσης στην φυτική ανοσία (Sheen et al., 1999; Rolland et al., 2006). Ωστόσο η ιδιότητα αφορά μόνο τα «μικρά σάκχαρα». Μόνο τα μονο-δι και μικρά ολιγοσακχαρίδια (σαν σάκχαρα) όπως sucrose, **trehalose**, reffinose ή galactinol δύνανται να ενεργοποιήσουν

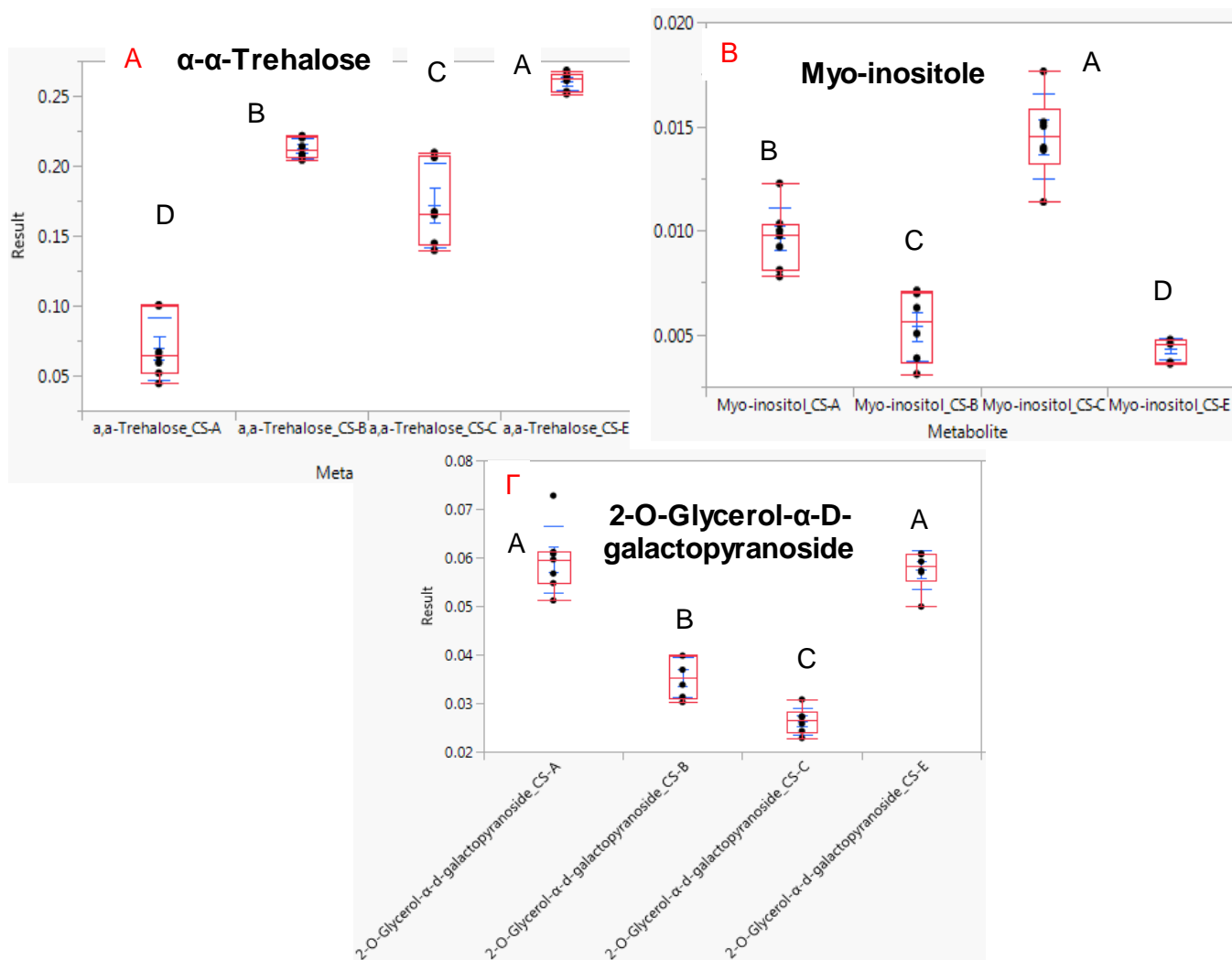
αποκρίσεις φυτικής άμυνας και να αυξάνουν την ανθεκτικότητα στα παθογόνα υπό εργαστηριακές συνθήκες (Bolouri-Moghaddam & Van Den Ende, 2013). Σχετικά με τις εξωγενείς εφαρμογές ολισακχαριτών για την φυτοπροστασία, η αποτελεσματικότητά τους έναντι ασθενειών γενικά θεωρείται ασυνεπής (Delaunoy *et al.*, 2014). Παρόλα αυτά εξετάζεται επί του παρόντος ο ρόλος των παραγόντων που είναι ευαίσθητοι στο να επηρεάσουν τα επίπεδα ολισακχαριτών επαγωγής ανθεκτικότητας στα φυτά, με σκοπό την ανάπτυξη αυτής της στρατηγικής (Walters *et al.*, 2013). Μεταξύ αυτών των παραγόντων ανήκουν το εφυμενικό φράγμα (cuticular barrier) (Εικόνα 134) και η φυλλόσφαιρα της μικροχλωρίδας.



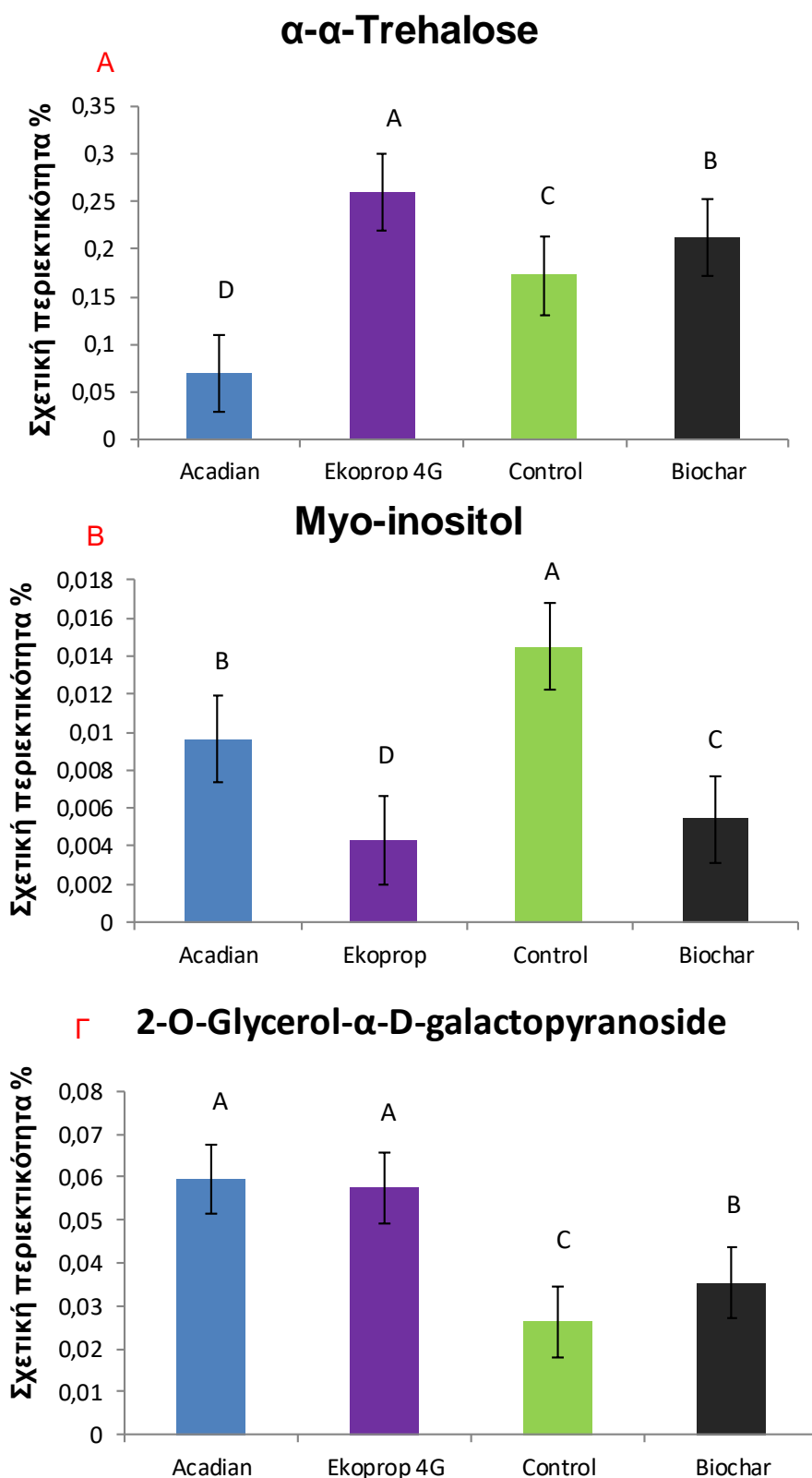
Εικόνα 134: Αποτέλεσμα των φυσικών/ψεκασμένων υδατανθράκων στην φυλλική επιφάνεια. Οι υδατάνθρακες πρέπει να διεισδύσουν δια μέσου της υδροφοβικής εφυμενίδας για να φτάσουν τα επιδερμικά ή αμυντικά κύτταρα, για να γίνουν ανιληπτά από τους υποδοχείς PRR και να ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά γεγονότα και αμυντικές αντιδράσεις (αποκρίσεις ανοσίας). Μπορούν επίσης να εισέλθουν στα φύλλα κατά μήκος των επιφανειών των στοματικών πόρων. Οι μικροοργανισμοί που ζουν στην φυλλόσφαιρα εκκρίνουν ένζυμα ευαίσθητα στην υδρόλυση των ολιγοσακχαριτών. Εξαρτώμενα από την δομή τους τα απελευθερωμένα θραύσματα μπορεί είτε να επάγουν σηματοδότηση άμυνας και αποκρίσεις, είτε όχι. PRR υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου, DAMPs μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με την ζημιά, Mamps μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με μικροοργανισμούς. Πηγή: Trounelot *et al.*, (2014).

Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκαν τρεις ολιγοσακχαρίτες, οι α-α-Trehalose, Myo-inositol και 2-O-glycerol-α-D-galactopyranoside. Με βάση όλων των παραπάνω, τα αποτελέσματα της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης δίνουν πληροφορίες για την ανάπτυξη των φυτών κάνναβης και το ενδεχόμενο συμμετοχής των υδατανθράκων στην άμυνα έναντι αβιοτικών

καταπονήσεων και ανθεκτικότητα των φυτών έναντι παθογόνων όπως του *R. solani* AG1-IC της παρούσας μελέτης. Στην **Εικόνα 135** συγκρίνονται οι σχετικές περιεκτικότητες από τους υδατάνθρακες που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα των φυτών μετά από τις επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτές του μάρτυρα με τη βοήθεια θηκογραμμάτων (*boxplots*) και αντίστοιχα στην **Εικόνα 136** τα ίδια αποτελέσματα με τη χρήση ραβδογραμμάτων. Όπως διακρίνεται στις εικόνες όλοι οι βιοδραστικοί παράγοντες επηρέασαν σημαντικά τις συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα φύλλα των φυτών κάνναβης. Οι επεμβάσεις με Ekorpor 4G και biochar αύξησαν τα επίπεδα δύο υδατανθράκων και μείωσαν τους ενός, ενώ το αντίθετα το Acadian μείωσε σε δύο και αύξησε σε έναν.



Εικόνα 135: Θηκογράμματα (*boxplots*) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekorpor 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων υδατανθράκων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε (A) α-α-Trehalose, (B) Myo-inositol, (Γ) 2-O-Glycerol-α-D-galactopyranoside. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.



Εικόνα 136: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων υδατανθράκων των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κίναβης σε **(Α)** α-α-Trehalose, **(Β)** Myo-inositol, **(Γ)** 2-O-Glycerol-α-D-galactopyranoside. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Στην **α - α -Trehalose** οι επεμβάσεις με Ekorpor 4G και biochar αύξησαν σημαντικά τα επίπεδά της στα φύλλα των φυτών κάνναβης, ενώ η επέμβαση με Acadian προκάλεσε σημαντική μείωσή της (Εικόνες 135 και 136). Στα φυτά η trehalose εξυπηρετεί κυρίως ως αποθήκη γλυκόζης για ενέργεια και/ή για σύνθεση κυτταρικών συστατικών. Επιπλέον η συσσώρευσή της συνδέεται και σε λειτουργίες που προστατεύουν τις μεμβράνες και πρωτεΐνες έναντι καταπονήσεων (Elbein *et al.*, 2003) μέσω σταθεροποίησης (Asaf *et al.*, 2017) και αντίθεσης στην μετουσίωσή τους (Farooq *et al.*, 2018) αντίστοιχα. Πράγματι η trehalose έχει αναφερθεί ότι διαδραματίζει έναν ξεκάθαρο ρόλο στην ανοχή από καταπονήσεις, με συσσωρεύσεις υψηλών συγκεντρώσεων της σε αντίξοες συνθήκες αλλά κυρίως για κρυπτοβιοτικά είδη όπως το ανεκτικό στην ξηρασία φυτό *Selaginella lepidophylla* (Zentella *et al.*, 1999; Van Dijk *et al.*, 2002). Για τα ανώτερα φυτά ωστόσο η συσσώρευση της trehalose υπό αντίξοες συνθήκες είναι σπάνια (Müller *et al.*, 1995) και μάλιστα έχει προταθεί ότι στα περισσότερα φυτά η σακχαρόζη (sucrose) έχει αναλάβει τον ρόλο της trehalose ως συντηρητικό κατά την ξήρανση (Wiemken 1990). Ωστόσο υπάρχουν κάποιες έρευνες με το ανθεκτικό στην ξηρασία *Myrothamnus flabellifolius* που κατέγραψαν έστω και μικρά επίπεδα συσσώρευσης trehalose έως 3% επί του ξηρού βάρους του και αντίστοιχα της σακχαρόζης από 3 έως 6% υπό συνθήκες ξηρασίας, καταλήγοντας ότι η συνδυασμένη συσσώρευση των δύο αυτών σακχάρων μπορεί να επαρκεί για την φυτική προστασία έναντι αντίξοων επιδράσεων από την ξήρανση (Drennan *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 1993).

Η παρατήρηση ότι η trehalose μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην συντήρηση βιολογικών δομών βασίστηκε από μελέτες *in vitro*. Η trehalose μπορεί να σταθεροποιήσει αφυδατωμένες βιολογικές δομές όπως λιπίδια μεμβρανών ή ένζυμα, πιο αποτελεσματικά από ότι άλλα σάκχαρα (Colaco *et al.*, 1995). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων η trehalose έχει επιλεγεί ως μόριο στόχος για γενετική μηχανική φυτών, ταυτόχρονα για μεγάλης κλίμακας οικονομικώς αποδοτική παραγωγή αυτής της ένωσης και για την μηχανική της ανοχής των καλλιεργειών σε ξηρασία (Goddijn *et al.*, 1995). Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Liang *et al.*, (2021) ανέφεραν ότι η εξωγενής προσθήκη trehalose μετριάζει τις μειώσεις στον αριθμό των κόκκων ανά στάχυ που προκαλούνται από την καταπόνηση χαμηλής θερμοκρασίας κατά το στάδιο ξεσταχυάσματος (*booting stage*) προωθώντας τη γονιμότητα των ανθέων στο σιτάρι. Επιπλέον όπως τα μικρά σάκχαρα λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια στην φυτική ανοσία, έτσι και η trehalose δεν αποτελεί εξαίρεση με τους Reignault *et al.*, (2001) να καταγράφουν επαγωγή ενζύμων PAL αλλά και δράσεις υπεροξειδάσης που σχετίζονταν με μερική ανθεκτικότητα του σιταριού σε σύστημα παθογένειας με ωίδιο. Άλλες παρόμοιες μελέτες αναφοράς της trehalose στην επαγωγή αμυνών ή/και φυτικής ανθεκτικότητας ή συμβίωσης έγιναν από τους Müller *et al.*, (1994), Muchembled *et al.*, (2006), Renard-Merlier *et al.*, (2007), Fernandez *et al.*, (2010) και Singh *et al.*, (2011).

Βάσει όλων των παραπάνω η σημαντική αύξηση της α-α-trehalose από την προσθήκη ωφέλιμων μικροοργανισμών και biochar σφενδάμου παρουσιάζει ενδιαφέρον με πιθανή συμμετοχή στην βελτιωμένη ανάπτυξη των φυταρίων κάνναβης σε σχέση με των μαρτύρων. Για την πρώτη επέμβαση μπορεί μάλιστα να ειπωθεί ότι η συσσώρευση α-α-trehalose προάγει την αποίκιση των ωφέλιμων μικροοργανισμών στα φυτά επιδεικνύοντας επιτυχημένη συμβίωση και εν συγκρίσει με τα φυτά μάρτυρα, μπορεί να προταθεί υποθετικά σαν μηχανισμός που συνειφέρει στην εγκατάσταση αυτών των μικροβίων του συγκεκριμένου συστήματος συμβίωσης. Επίσης φαίνεται πως αυτές οι αυξήσεις συμβάλλουν και στην εύρωστη εμφάνιση των εμβολιασμένων με *R. solani* AG1-IC φυτών που δέχτηκαν τις επεμβάσεις με αυτά τα βιοδραστικά υλικά σε σχέση με τα αντίστοιχα ανεμβολίαστα φυτά του μάρτυρα των ίδιων επεμβάσεων. Όσον αφορά τις αναφορές για ανοχή των φυτών στην καταπόνηση ξηρασίας, δεν υφίσταται στην παρούσα εργασία καθώς οι συνθήκες καλλιέργειας των φυτών κάνναβης ήταν ελεγχόμενες εντός εσωτερικού ελέγχου ανάπτυξης δίχως καταπόνηση από αβιοτικούς παράγοντες. Στον αντίποδα η μείωση που προκάλεσε η εφαρμογή του εκχυλίσματος *A. nodosum*, δεν λογίζεται ως επιθυμητή. Η μείωση της διαθέσιμης ενέργειας που παρέχει ένας υδατάνθρακας στα φυτά κάνναβης, μπορεί να εξασθενήσει την ομαλή λειτουργία των φυτών ελλείψει άλλων εναλλακτικών πηγών ενέργειας και επιπλέον να επιφέρει δυσμενείς συνέπειες από ενδεχόμενες καταπονήσεις ξηρασίας και προσβολές παθογόνων.

Στην περίπτωση της **Myo-inositol** όλες οι επεμβάσεις προκάλεσαν σημαντική μείωση στην συγκέντρωσή της (**Εικόνες 135** και **136**). Η Myo-inositol (MYO) αποτελεί έναν ζωτικής σημασίας φυσιολογικό μεταβολίτη κοινό σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Michell 2008; Case *et al.*, 2018). Η MYO σχηματίζει την δομική βάση πολλών σηματοδοτικών παραγόντων των λιπιδίων που ρυθμίζουν σύνθετα κυτταρικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των ανταποκρίσεων στην καταπόνηση, βιοσύνθεση κυτταρικού τοιχώματος και ασκορβικού οξέος και αντίληψη της αυξίνης (Echardt 2010; Valluru & Van den Ende 2011; Jia *et al.*, 2019). Η σύνθεση της MYO ρυθμίζεται γενετικώς και έχει αναφερθεί ότι μεταλλαγμένα στελέχη εκθέτοντας μειωμένη σύνθεσή της είναι πολύ πιο ευαίσθητα σε καταπονήσεις (Murphy *et al.*, 2008) και επιδεικνύουν αυθόρμητο κυτταρικό θάνατο (Meng *et al.*, 2009). Προσφάτως οι Hu *et al.*, (2020) ανέφεραν ότι η μειωμένη σύνθεση MYO προκαλεί κυτταρικό θάνατο στα φύλλα και ρίζες. Επιπλέον η MYO ενεργοποιεί την παραγωγή μορίων stress, διακυτταρική επικοινωνία, αποθήκευση και μεταφορά φυτοορμονών και αποθήκευση φωσφόρου στους σπόρους (Michelle 2008; Jia *et al.*, 2019). Σε μία πρόσφατη μελέτη (Al-Mushhin *et al.*, 2021) αναφέρθηκε ότι η εξωγενής διαφυλλική προσθήκη MYO μετριάζει την καταπόνηση αλατότητας μέσω της ενίσχυσης αντιοξειδωτικών συστατικών (ασκορβικό οξύ και glutathione) και σταθερότητας μεμβράνης δια της υπερέκφρασης γονιδίων ανατόκρισης στην καταπόνηση σε φυτά κινόα (*Chenopodium quinoa* L.).

Η σημαντική μείωση των επιπέδων της στα φυτά κάνναβης της παρούσας μελέτης από όλους τους βιοδραστικούς παράγοντες εφαρμογής καθίσταται ανησυχητική. Όχι τόσο από άποψη καταπόνησης βιοτικού stress (δεν υφίσταται λόγω ελεγχόμενων συνθηκών καλλιέργειας) αλλά από την μη επαρκή τροφοδοσία του φυτού σε φώσφορο και φυτοορμόνες με ενδεχόμενο θάνατο ρίζας ή φύλλων σε κυτταρικό επίπεδο και λόγω δομικής διαταραχής στην σύνθεση λιπιδίων κυτταρικής μεμβράνης.

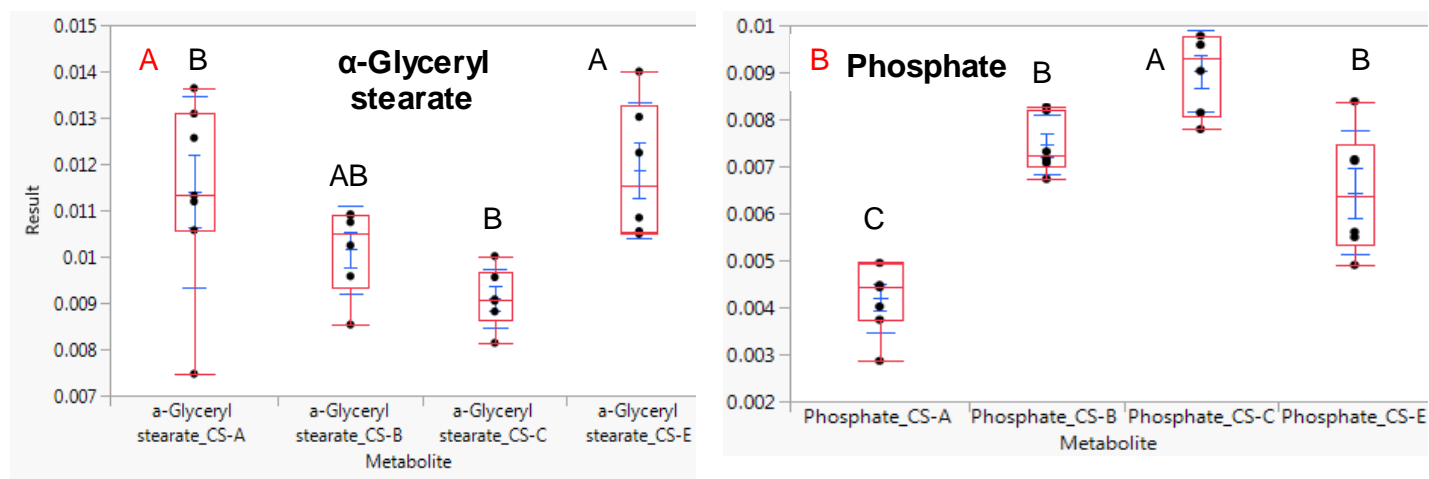
Παντελώς αντίθετα αποτελέσματα έχουμε για το **2-O-glycerol- α -D-galactopyranoside** με όλες τις επεμβάσεις να επιδεικνύουν σημαντική αύξηση στα επίπεδά της (Εικόνες 135 και 136). Ωστόσο δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον ρόλο του συγκεκριμένου μεταβολίτη στα φυτά και γενικότερα υπάρχει μια ευρύτερη έλλειψη δεδομένων για την χρήση του.

Σε άλλες μελέτες μεταβολομικής που αξιολογούν την επίδραση βιοδιεγερτών στους υδατάνθρακες οι Paul *et al.*, (2019) εφάρμοσαν διαφυλλικά και δια εμβλαππίσματος σπόρων βιοδιεγέρτη προερχόμενο από υδρολύματα πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης σε τομάτα που αναπτυσσόταν σε περιορισμένη διαθεσιμότητα ύδατος. Η UHPLC/QTOF-MS ανάλυση έδειξε αυξημένη συσσώρευση στην συγκέντρωση της trehalose, με τα τελικά αποτελέσματα να κάνουν λόγο για θετική επίδραση του βιοδιεγέρτη τόσο στην συσσώρευση βιομάζας όσο και στο μεταβολικό προφίλ των φυτών και με τις δύο μεθόδους εφαρμογής, με το εμβλάππισμα ωστόσο να επιφέρει πιο θεαματικά αποτελέσματα. Οι Kalozoumis *et al.*, (2021) ανέφεραν την επίδραση εμβολιασμού διαφόρων PGPRs (*Enterobacter* sp. στέλεχος C1:2 και C2:5, *Paenibacillus* sp. στέλεχος DN1.2, *Enterobacter mori* στέλεχος C3.1 και *Lelliottia* sp. στέλεχος D2.4) σε συνδυασμένη καταπόνηση έλλειψης ύδατος και θρεπτικών στοιχείων σε φυτά τομάτας. Τα αποτελέσματα της GC/EI/MS ανάλυσης έδειξαν ότι με το *E. mori* C3.1 αυξήθηκαν σημαντικά οι μεταβολίτες myo-inositol και trehalose που θεωρούνται σημαντικοί για την συμβίωση φυτού-μικροβίων. Σε πείραμα επίδρασης του βιοδιεγέρτη με *A. nodosum* «SuperFifty» σε φυτά αραβίδοψης, τομάτας και πιπεριάς για προστασία έναντι οξειδωτικού stress από το paraquat (Staykov *et al.*, 2021) τα αποτελέσματα ήταν ευνοϊκά για τα καππονημένα φυτά που τους χορηγήθηκε το σκεύασμα και το μεταβολομικό προφίλ έδειξε αυξημένες συγκεντρώσεις και στους μεταβολίτες σακχάρων myo-inositol στην αραβίδοψη και trehalose στην τομάτα. Τέλος σε μια μελέτη εφαρμογής biochar (Kong *et al.*, 2019) οι συγγραφείς εφάρμοσαν μεταβολομική ανάλυση στην επίδραση biochar από οργανικά αστικά απόβλητα υπό διαφορετικές θερμοκρασίες πυρόλυσης (300°C, 500°C και 700°C) στον μεταβολισμό του σιταριού, για να εξετάσουν τους τοξικολογικούς μηχανισμούς του biochar που επέδρασαν στα φυτά. Η ανάλυση έδειξε αξιοσημείωτες διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μεταξύ των μαρτύρων και επεμβάσεων με biochar πυρόλυσης 300°C και 700°C. Οι τοξικολογικοί μηχανισμοί που συμμετείχαν βρέθηκαν να σχετίζονται με την ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών των πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και υδατανθράκων, με την τελευταία κατηγορία να περιλαμβάνει ιδιαίτερα μεγάλη

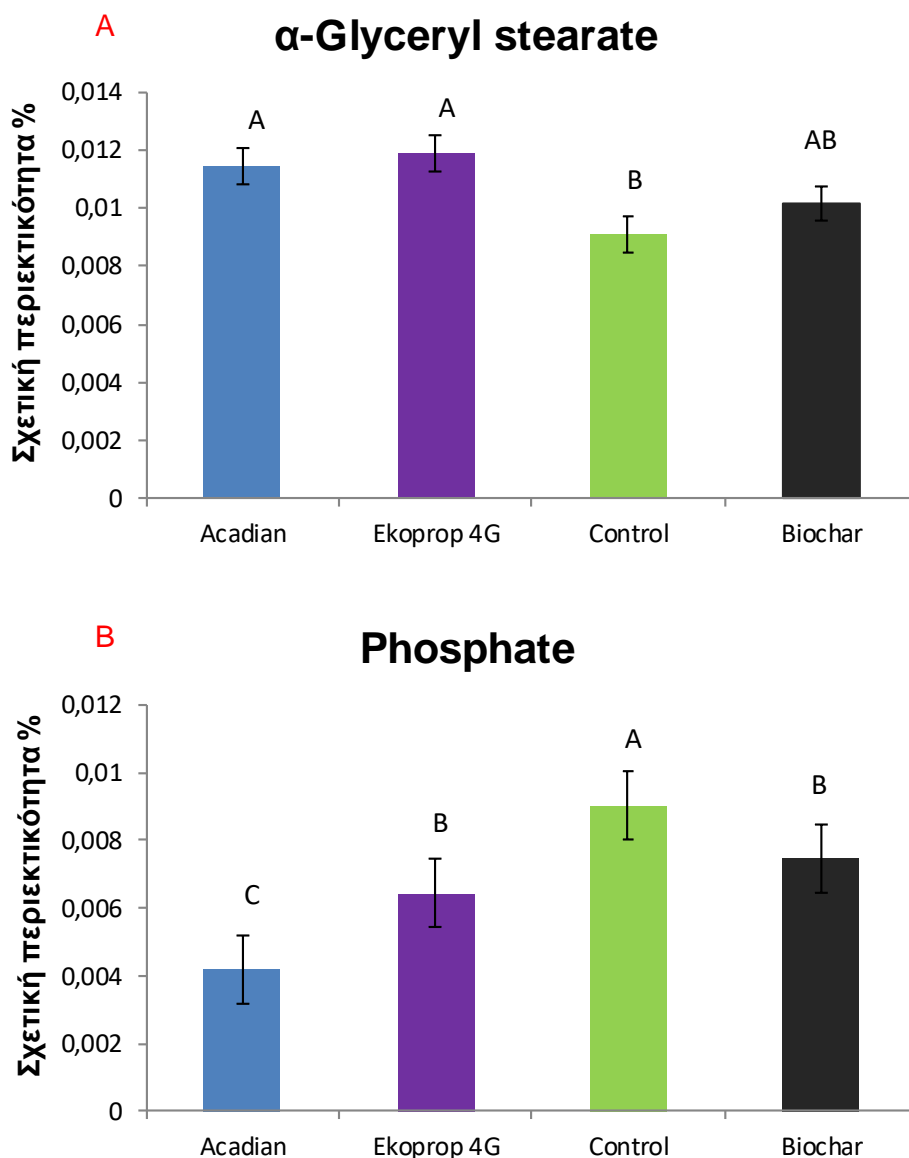
αύξηση στην trehalose ιδίως στην προσθήκη biochar 700°C (και λιγότερο στους 300°C). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα συνιστούν ότι το biochar οργανικών αστικών αποβλήτων δεν παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων στις ρίζες του σπαριού καθώς όλοι οι άλλοι μονο και δι-σακχαρίτες υποβιοσυντέθηκαν.

4.7.1.6 Επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων στα επίπεδα του φωσφορικού οξέος και α-Glyceryl stearate

Το φωσφορικό οξύ και το α-Glyceryl stearate συμπεριλήφθηκαν στο matrix της παρούσας μεταβολομικής ανάλυσης και τα αποτελέσματα από την επίδραση των βιοδραστικών παραγόντων απεικονίζονται με την μορφή διαγραμμάτων (Εικόνα 137) και ραβδογραμμάτων (Εικόνα 138).



Εικόνα 137. Θηκογράμματα (*boxplots*) των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων CS-C: μάρτυρας, CS-A: Acadian, CS-E: Ekorop 4G, CS-B: Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων υπολοίπων συστατικών των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κίναβης σε (A) α-Glyceryl stearate και (B) Phosphate. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$) με τα γράμματα A, B, C.



Εικόνα 138: Ραβδογράμματα των τεσσάρων διαφορετικών επεμβάσεων Acadian, Ekoproprop 4G, Control και Biochar για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικοτήτων υπολοίπων συστατικών των επεμβάσεων με τους βιοδραστικούς παράγοντες με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κίνας σε (A) α-Glyceryl stearate και (B) Phosphate. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο 7 επαναλήψεων. Τα γράμματα (A, B, C) προέρχονται από την στατιστική ανάλυση Tukey-Kramer's test ($P > 95\%$).

Το **φωσφορικό οξύ** (phosphate) καθορίζεται ως μεταβολίτης που αντιπροσωπεύει όλες τις μορφές των φωσφορικών ενώσεων που στον μεταβολισμό των κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί από τους Wasaki *et al.*, (2003) η ανεπάρκεια P επιβάλλει υπερέκφραση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό P και ταυτόχρονα ενισχύει την βιοσύνθεση των μεταβολιτών που συνδέονται στον μεταβολισμό του P, όπως pyruvate kinase και τα συνοδευτικά phosphoenolpyruvate phosphatase, glucose-6-phosphatase isomerase, ανόργανη pyrophosphatase, phosphatase του μωβ

οξέος και μεταφορείς ανόργανης phosphatase. Παρόλα αυτά η ανεπάρκεια P επίσης υποεκφράζει γονίδια που σχετίζονται στον μεταβολισμό του P, όπως την phosphatase οξέος (Wasaki *et al.*, 2003). Στην περίπτωση συνθηκών καταπόνησης η ανάγκη για μεταφορά ενέργειας που στοχεύει στην κινητοποίηση μηχανισμών άμυνας, συνεπάγεται με αυξημένη βιοσύνθεση των φωσφορυλιωμένων ενδιάμεσων μορίων (Latz *et al.*, 2013). Σύμφωνα με τις **Εικόνες 137** και **138** το φωσφορικό οξύ στα φυτά κάνναβης της παρούσας μελέτης μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις επεμβάσεις. Επειδή στην μελέτη δεν έχουμε συνθήκες καταπόνησης από κλιματολογικούς παράγοντες (αλλά ενδεχομένως από την μείωση P που προκάλεσαν οι επεμβάσεις), ουσιαστικά μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι βιοδραστικοί παράγοντες προκάλεσαν μια υποέκφραση των γονιδίων που σχετίστηκαν με την βιοσύνθεση των φωσφορικών ενώσεων που περιέχουν μεταβολίτες, η οποία συμβάλλει με την υποέκφραση από την μείωση P και ως εκ τούτου τα επίπεδα των μεταβολικά σχετιζόμενων φωσφορικών ενώσεων όπως του φωσφορικού οξέος μειώνονται. Αυτή η υπόθεση ουσιαστικά επιβεβαιώνεται και με τους Wasaki *et al.*, (2003) οι οποίοι ανέφεραν ότι η καταπόνηση λόγω έλλειψης P διεγείρει την υπερέκφραση γονιδίων που ελέγχουν την βιοσύνθεση των μεταβολιτών που υποκαθιστούν τα φωσφολιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη, ενισχύοντας ως εκ τούτου την αύξηση των επιπέδων των διαθέσιμων φωσφορικών ενώσεων για μεταβολικές λειτουργίες που συνεισφέρουν στην μεταφορά ενέργειας. Στην δεδομένη περίπτωση δεν είχαμε συνθήκες καταπόνησης οπότε η μείωση του φωσφορικού οξέος πιθανόν να προκλήθηκε από την υποέκφραση των γονιδίων βιοσύνθεσης μεταβολιτών υποκατάστασης φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης που επέβαλλαν οι επεμβάσεις. Δεδομένου ότι τα φωσφολιπίδια αποτελούν το 17% του P στα φύλλα (Lampers *et al.*, 2012), η μη υποκατάστασή τους με μη φωσφορούχα λιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες ως μη απόκριση των φυτών εν απουσία συνθηκών καταπόνησης (όπως στην αντίθετη περίπτωση που περιέγραψαν οι Tawarayama *et al.*, 2018 με υπαρκτές συνθήκες καταπόνησης) θα μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα των μεταβολιτών που περιέχουν P όπως το φωσφορικό οξύ. Στην μελέτη των Kalozoumis *et al.*, (2021) με GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση αξιολόγησης PGPRs σε φυτά τομάτας υπό ταυτόχρονες συνθήκες καταπόνησης έλλειψης ύδατος και στοιχείων, αναφέρθηκε αύξηση κατά 10% στο φωσφορικό οξύ των καταπονημένων φυτών από τις συγκεκριμένες καταπονήσεις επιβεβαιώνοντας ότι η καταπόνηση μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα φωσφορικού οξέος, εξηγώντας έμμεσα ότι κατά αντίθετο τρόπο η μη καταπόνηση από αβιοτικές καταπονήσεις μπορεί και να μειώσει τα επίπεδα του φωσφορικού οξέος εν παρουσία παραγόντων βελτίωσης της ανάπτυξης.

Το **Glycerol stearate** (ή Glycerol monostearate, GMS) είναι ένα γλυκερολιπίδιο που αποτελείται από μια μεμονωμένη αλυσίδα του λιπαρού οξέος στεαρικό οξύ προσκολλημένη σε μια ραχοκοκαλιά γλυκερόλης (Tatele *et al.*, 2018). Σαν ουσία είναι λευκής ή ωχροκίτρινης απόχρωσης με κηρώδη υφή που προέρχεται κυρίως από το έλαιο πυρήνα φοίνικα, καρπό ελιάς και

καρύδας (puracy.com). Λόγω της αμφιφυλλικής του φύσης τα μόρια GMS αυτοσυναρμολογούνται ταυτόχρονα σε νερό και έλαιο εντός διαφόρων μεσοφάσεων (Wang & Marangoni 2015). Οι πολυμορφικές και μεσομορφικές ιδιότητες του GMS μπορούν να επιδράσουν την συμπεριφορά των συστημάτων γαλακτώματος (Wang & Marangoni 2015). Το GMS χρησιμοποιείται εκτεταμένα σαν γαλακτωματοποιητικός, συμπυκνωτικός, ανπιπηκτικός και συντηρητικός παράγοντας στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, ενώ βρίσκει εφαρμογή και σαν γαλακτωματοποιητικό σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα (Lauridsen 1976; Wang *et al.*, 2016).

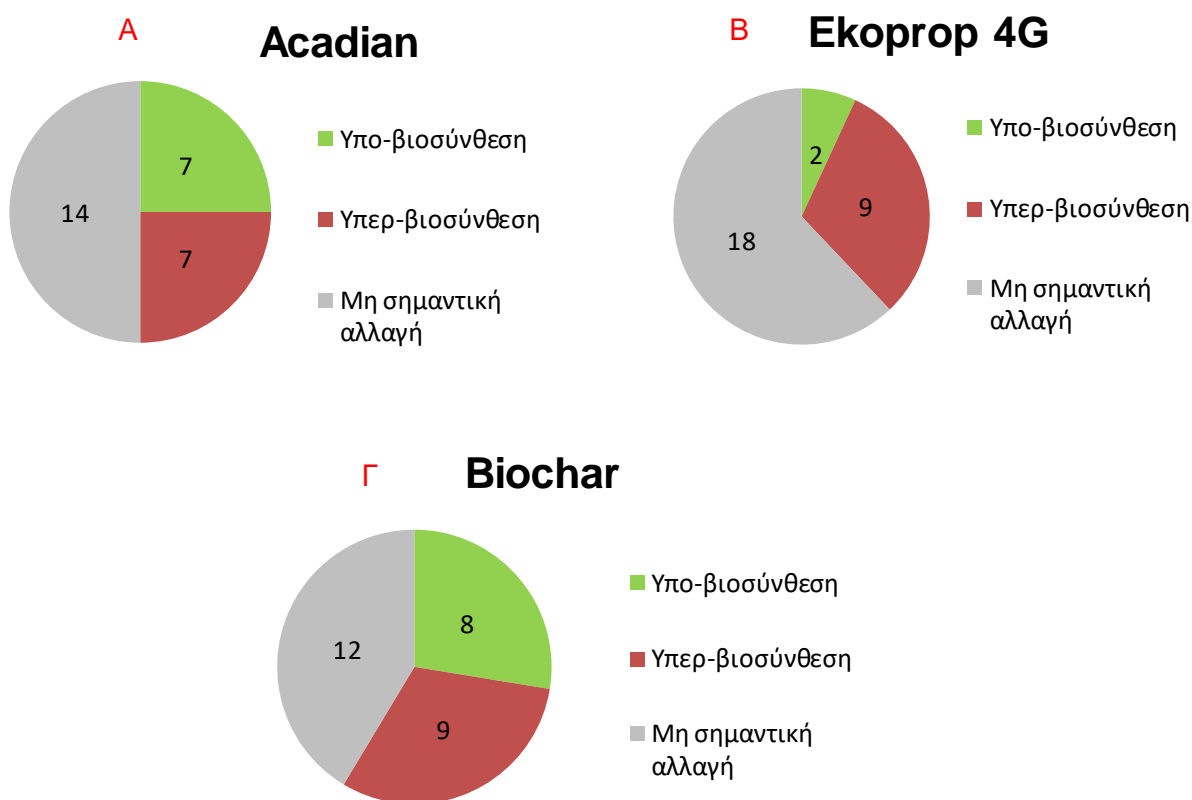
Στην παρούσα μελέτη οι επεμβάσεις με Acadia και Ekorpor 4G αύξησαν σημαντικά την περιεκτικότητα του GMS στα φυτά κάνναβης, ενώ με biochar παρέμεινε σταθερή (Εικόνες 137 και 138). Παρόλο που δεν είναι ιδιαίτερα σαφής ο ρόλος του στα φυτά, η υπερβιοσύνθεσή του από την προσθήκη εκχυλίσματος *A. nodosum* και ωφέλιμων μικροοργανισμών λογίζεται ως θετική. Η δυνατότητα παραλαβής και απομόνωσής της από τα φυτά κάνναβης δίνει την δυνατότητα για περαιτέρω χρήση του στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και καλλυντικών.

4.7.1.7 Σύνοψη των αλλαγών στο μεταβολικό προφίλ των φυτών κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)

Στον Πίνακα 30 συνοψίζονται όλες οι μεταβολικές αλλαγές που προκάλεσαν οι επεμβάσεις με τους βιοδραστικούς παράγοντες στα φύλλα των φυτών κάνναβης στις κατηγορίες αμινοξέων, καρβοξυλικών οξέων, λιπαρών οξέων, κανναβινοειδών, υδατανθράκων και υπολοίπων συστατικών. Επιπλέον στην Εικόνα 139 απεικονίζονται σε διαγράμματα πίτας ο αριθμός των μεταβολιτών που επηρεάστηκαν (ή δεν) για κάθε επέμβαση. Σύμφωνα με τα διαγράμματα η επέμβαση με Acadia επηρέασε σημαντικά 14 μεταβολίτες εκ των οποίων 7 αυξήθηκαν και μειώθηκαν αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιποι 14 παρέμειναν σταθεροί. Στην επέμβαση με Ekorpor 4G επηρέαστηκαν σημαντικά 11 μεταβολίτες εκ των οποίων οι 9 υπερβιοσυντέθηκαν και μόλις 2 υποβιοσυντέθηκαν, ενώ οι υπόλοιποι 18 παρέμειναν αμετάβλητοι. Στην επέμβαση με biochar επηρέαστηκαν 17 μεταβολίτες και των οποίων οι 9 υπερβιοσυντέθηκαν και οι 8 υποβιοσυντέθηκαν, ενώ οι υπόλοιποι 12 δεν μεταβλήθηκαν. Ειδικά για την επέμβαση με biochar οι σημαντικές αλλαγές 17 μεταβολιτών επιβεβαιώνουν τις βιοπληροφορικές αναλύσεις της μεταβολομικής (Ενότητα 4.7 Εικόνα 109), ότι είχε την μεγαλύτερη επίδραση στον μεταβολισμό των φυτών κάνναβης.

Πίνακας 30: Σύνοψη αλλαγών στο μεταβολικό προφίλ των φύλλων κάνναβης με την προσθήκη των βιοδραστικών παραγόντων Acadian (εκχύλισμα *Ascorhyllum nodosum*), Ekoprop 4G (σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών) και Biochar σφενδάμου. Με πράσινα τετράγωνα οι μεταβολίτες που υπερβιοσυντέθηκαν, με κόκκινα τετράγωνα αυτοί που υποβιοσυντέθηκαν και με γκριζα τετράγωνα αυτοί που παρέμειναν σταθεροί.

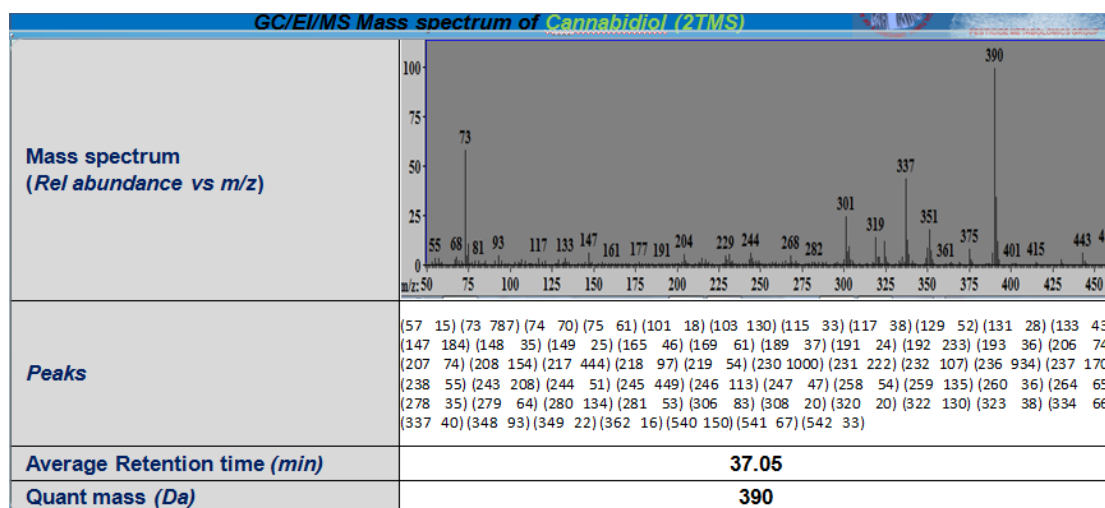
Χημική ομάδα	Μεταβολίτης	Επεμβάσεις σε σχέση με μάρτυρα		
		Acadian	Ekoprop 4G	Biochar
Αμινοξέα	L-Asparagine	↓	-	↓
	L-Threonine	↑	↑	↓
	L-Glutamine	-	-	↑
	L-Pyroglutamic acid	↓	-	-
	L-Proline	↑	↑	↑
	L-Serine (2TMS)	-	-	-
	L-Serine (3TMS)	↑	↑	-
	L-Valine	↓	-	↓
	L-Isoleucine	↓	↑	-
	L-Aspartic acid	-	↑	-
	L-Alanine	-	-	-
	Glycine	-	-	↓
	L-Leucine (1TMS)	-	-	-
	L-Leucine (2TMS)	-	-	-
Λιπαρά οξέα	α-Linolenic acid	↑	-	-
	Monopalmitin	-	↑	-
Καρβοξυλικά οξέα	Maleic acid	-	-	↑
	Malic acid (3TMS)	-	-	↑
	Succinic acid	-	-	↑
	Glyceric acid	↑	-	↑
	Cinnamic acid	-	-	↓
	Oxalic acid	-	-	↑
	Malic acid (Ortho)	-	-	↓
Κανναβινοειδή	Cannabidiol (CBD)	-	-	-
	Cannabinol (CBN)	-	-	-
Υδατάνθρακες	Myo-inositol	↓	↓	↓
	2-O-Glycerol-α-d-galactopyranoside	↑	↑	↑
	α-α-Trehalose	↓	↑	↑
Υπόλοιπα συστατικά	Glyceryl stearate	↑	↑	-
	Phosphoric acid	↓	↓	↓



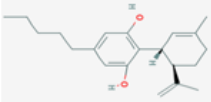
Εικόνα 139: Διαγράμματα πίτας με την σύνοψη αλλαγών στο μεταβολικό προφίλ των φύλλων κάνναβης με την προσθήκη των βιοδραστικών παραγόντων (A) Acadian (εκχύλισμα *Ascorphyllum nodosum*), (B) Ekothrop 4G (σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών) και (Γ) Biochar σφενδάμου.

4.8 Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάση δεδομένων μεταβολικών κάνναβης

Στο πλαίσιο της κατασκευής ανοιχτής πρόσβασης βάσης δεδομένων η μορφή που θα έχει ο ιστότοπος παρουσιάζεται στις **Εικόνες 141** και **142**. Στην πρώτη εικόνα παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των μεταβολικών κάνναβης που συλλέγονται από λογισμικά ταυτοποίησης χημικών ενώσεων, ενώ στην δεύτερη διάφορες πληροφορίες που συλλέγονται από άλλες βιβλιοθήκες βάσεων δεδομένων όπως ατομική μάζα, μοριακός τύπος, αριθμοί καταγραφής, βιοσυνθετικά μονοπάτια συμμετοχής, δομή, χημική ομάδα κ.α.



Εικόνα 141: Φασματοσκοπικά δεδομένα των μεταβολιτών κάνναβης που θα αναγράφονται στον ιστότοπο της ανοιχτής πρόσβασης βάσης δεδομένων των μεταβολιτών κάνναβης. Αναφορά στον μεταβολίτη Cannabidiol ως χαρακτηριστικό παράδειγμα. Στην εικόνα διακρίνονται το φάσμα μάζας της μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS, οι αντίστοιχες κορυφές, ο χρόνος κατακράτησης και η μοριακή μάζα του μεταβολίτη

Cannabidiol-Metabolite information	
Common Name	Cannabidiol (CBD)
Structure	
Synonym(s)	(-)-trans-Cannabidiol, (-)-Cannabidiol
KEGG ID	C07578
GoIm Metabolome Database ID	N/A
PubChem CID	644019
CAS Registry Number	13956-29-1
Biosynthetic pathway(s) (KEGG)	map00999 Biosynthesis of various secondary metabolites - part 1 map01100 Metabolic Pathways map01110 Biosynthesis of secondary metabolites
Monoisotopic mass (Da)	314.224579
Average Molecular Mass (Da)	314.462
Molecular Formula	C₂₁H₃₀O₂
Chemical group	Cannabinoids

Εικόνα 141: Πληροφορίες των μεταβολιτών που θα αναγράφονται στην ανοιχτή πρόσβασης βάση δεδομένων των μεταβολιτών κάνναβης. Αναφορά στον μεταβολίτη Cannabidiol ως χαρακτηριστικό παράδειγμα. Στην εικόνα αναφέρονται το όνομα, δομή, συνώνυμα, αριθμός ταυτοποίησης από τις βάσεις δεδομένων KEGG, PubChem, Cas, βιοσυνθετικά μονοπάτια συμμετοχής, ατομική μάζα, μοριακός τύπος, χημική ομάδα και μέση μοριακή μάζα

5. Συμπεράσματα

Η καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) θεωρείται μια αναπτυσσόμενη καλλιέργεια στην Ελλάδα με προσοδοφόρες προοπτικές για τον αγροτικό κλάδο, χάρη στις βιομηχανικές και φαρμακευτικές χρήσεις του φυτού και ιδιαίτερα λόγω της έντονης βιοδραστικότητας του. Το γεγονός ότι μόλις προ τετραετίας αποποινικοποιήθηκε η καλλιέργειά της, δίνει το έναυσμα για εκτενέστερη μελέτη κατά την οποία θα αποκομιστούν πληροφορίες τόσο σχετικά με τις αποδόσεις της, όσο και για τη φυτοπροστασία της. Δεδομένου ότι καταναλωτές με πολύπλευρα ζητήματα υγείας αξιοποιούν τα προϊόντα της κάνναβης για φαρμακευτικούς σκοπούς, κρίνεται απαραίτητο τα προϊόντα να είναι ασφαλή, απαλλαγμένα από υπολείμματα χημικών και τοξικών Φ.Π είτε από μυκοτοξίνες που θα μπορούσαν να θέσουν σε περαιτέρω κίνδυνο την υγεία τους. Σε συνδυασμό με τα ζητήματα αναποτελεσματικότητας που αντιμετωπίζει η φυτοπροστασία της κάνναβης, καθίσταται απαραίτητη η ανακάλυψη νέων, εναλλακτικών και καινοτόμων βιοδραστικών παραγόντων που αφενός να βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών, αφετέρου να προστατεύουν και τη καλλιέργεια από προσβολές δυσεξόντωτων παθογόνων με καταστρεπτικές συνέπειες όπως τον *Rhizoctonia solani* και ταυτόχρονα να είναι πιο φιλικό προς το περιβάλλον και τους καταναλωτές.

Σε αυτό το πλάνο θα μπορούσαν να συμβάλλουν σκευάσματα βιοδιεγερτών καθώς και οργανικά τροποποιητικά εδάφους, με τα πρώτα να χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε πολλές καλλιέργειες. Επιπλέον λογίζοντας υπόψη και τη μη έγκριση Φ.Π. από τις αρμόδιες αρχές για τη καλλιέργεια κάνναβης συντελείται η ανάγκη της ανακάλυψης νέων βιοδραστικών Φ.Π. Στο πλαίσιο αυτό αξιολογήθηκαν βιοδραστικά προϊόντα, όπως η επίδρασή τους στα κανναβινοειδή ως τους σημαντικότερους μεταβολίτες του φυτού που διαμορφώνουν τη βιοδραστικότητά του. Για το λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν φυτάρια κάνναβης στα οποία εφαρμόστηκαν βιοδιεγέρτες και οργανικό προσθετικό εδάφους, μελετώντας την επίδρασή τους στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των φυτών με τη χρήση μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS. Επιπλέον εκτιμήθηκε και φαινοτυπικά η ικανότητα των βιοδραστικών παραγόντων να μειώνουν τη σοβαρότητα της ασθένειας στα φυτάρια σε εμβολιασμό τους από τον μύκητα *Rhizoctonia solani* AG-1-IC.

Τα αποτελέσματα καθίστανται ενθαρρυντικά, προσφέροντας δυνατότητες για πιθανή εφαρμογή των μελετηθέντων βιοδραστικών παραγόντων στη φυτοπροστασία της κάνναβης. Αναλυτικότερα όλοι οι βιοδραστικοί παράγοντες επηρέασαν θετικά την ανάπτυξη των φυτών σε σχέση με του μάρτυρα και μάλιστα ορισμένοι προκάλεσαν σημαντική αύξηση ορισμένων σημαντικών μεταβολιτών. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η αύξηση του α-λινολενικού οξέος από το σκεύασμα Acadian με εκχύλισμα *Ascophylum nodosum*, βασικός μεταβολίτης που σχετίζεται με την άμυνα των φυτών και πιθανότατα σχετίστηκε με την υγιή φαινοτυπικά εμφάνιση των εμβολιασμένων με *Rhizoctonia solani* φυταρίων, αυξάνοντας ενδεχομένως την αντοχή του φυτού στη προσβολή. Επιπλέον στη κατηγορία λιπαρών οξέων το σκεύασμα Ekorpor 4G με σπόρια ωφέλιμων μικροοργανισμών αύξησε σημαντικά την

Monopalmitin, ενός μεταβολίτη παραγώγου του παλμιτικού οξέος το οποίο έχει σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο στο φυτό, αλλά επίσης συνθέτει δευτερογενείς μεταβολίτες και επάγει το ένζυμο αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) το οποίο συμμετέχει στη βιοσύνθεση ανθοξειδωτικών πολυφαινολών (φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή) με αντιμικροβιακή δράση αλλά και λιγνινών. Στα καρβοξυλικά οξέα το Acadian και το biochar σφενδάμου αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα του Glyceric acid, ενώ το biochar αύξησε σημαντικά τα Oxalic acid, Maleic acid, Malic acid και Succinic acid με τα δύο τελευταία να είναι σημαντικοί μεταβολίτες που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs. Στον αντίποδα το biochar μείωσε τα επίπεδα του Cinnamic acid. Από τα αμινοξέα το Acadian αύξησε σημαντικά τα Threonine, Serine και Proline με το πρώτο να παίζει ρόλο τόσο στις χημικές άμυνες έναντι σε αβιοτικές καταπονήσεις όσο και στις λειτουργίες του φυτού και το τελευταίο όντας σε αυξημένα επίπεδα, βοηθά τα φυτά να προσαρμόζονται σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης λόγω αλατότητας και ξηρασίας, ενώ μειώθηκαν τα Asparagine, Valine και Isoleucine. Το Ekorop 4G αύξησε τα Proline, Serine, Aspartic acid, Isoleucine και L-Threonine. Το biochar αύξησε την Glutamine με ρόλο ρύθμισης ανάπτυξης του φυτού και αποκρίσεων στις καταπονήσεις και την Proline, ενώ μείωσε τα Asparagine, Threonine, Valine και Glycine. Στους υδατάνθρακες όλες οι εφαρμογές αύξησαν το 2-O-Glycerol- α -D-galactopyranoside και τα Ekorop 4G και biochar αύξησαν και την α - α -Trehalose, δύο υδατάνθρακες που αποτελούν είτε πηγή ενέργειας, είτε σηματοδοτικά μόρια, είτε εμπλέκονται στις ανοσο-αποκρίσεις του φυτού σε βιοτικούς ή/και αβιοτικούς παράγοντες. Στον αντίποδα το Acadian μείωσε τα επίπεδα α - α -Trehalose. Αυτό που σχετικά προβληματίζει είναι η μείωση του μεταβολίτη Myo-inositol με όλες τις εφαρμογές καθώς αποτελεί μόριο με πολλαπλές δομικές και φυσιολογικές λειτουργίες για τα φυτά. Το γεγονός ότι τα επίπεδα των κανναβινοειδών παρέμειναν αμετάβλητα με όλες τις εφαρμογές, δεν προβληματίζει ιδιαίτερα καθώς το όφελος που προσφέρουν οι βιοδραστικοί παράγοντες στα φυτά μπορεί να εσπαστεί στην πιο εύρωστη ανάπτυξη τους με υψηλότερες αποδόσεις και καλύτερα προϊόντα για βιομηχανική και διατροφική χρήση, αλλά και στη θετική τους επίδραση στη φυτοπροστασία όπως φάνηκε φαινοτυπικά στη μείωση της σοβαρότητας της ασθένειας από τη προσβολή του *Rhizoctonia solani* AG1-IC. Μοναδική επιφύλαξη το biochar σφενδάμου το οποίο πριν εφαρμοστεί στο έδαφος ως παράγοντας φυτοπροστασίας, πρέπει να ληφθεί υπόψη η θετική του επίδραση στον μεταβολισμό του *Rhizoctonia solani*.

Επιπλέον οι βιοδοκιμές από ριζοσφαιρικά βακτήρια και ενδόφυτα βακτήρια κάνναβης έδειξαν ότι τα *Bacillus humi* 3Ba30, *B. licheniformis* 1Ba18, *B. subtilis* 1Ba19, *B. subtilis* 2Ba19S και *Bacillus* S₂ (PLS 176) και *B. L₅* (PLS 182) αντίστοιχα έδειξαν παρεμποδιστική δράση *in vitro* στην ανάπτυξη του *Rhizoctonia solani* AG-1-IC, γεγονός που τα καθιστά υποψήφιους μικροβιακούς παράγοντες τόσο για προώθηση της ανάπτυξης των φυτών και για σχεδιασμένα πειράματα βιολογικού ελέγχου όπως του *Rhizoctonia solani*

σε καλλιέργειες αγρού, πληρώνοντας ταυτόχρονα όλα τα κριτήρια ασφάλειας και ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων από τη καλλιέργεια κάνναβης, όπως επιβάλλει η σύγχρονη φυτοπροστασία.

5.1 Μελλοντικές προοπτικές

Επομένως μελλοντική ερευνητική προοπτική αποτελεί η επίδειξη εμβολιασμών με γνωστούς βιοδραστικούς παράγοντες που να **τροποποιούν (1) τη συσσώρευση κανναβινοειδών, (2) να αυξάνουν την παραγωγή απόδοσης ανθέων** πόσο μάλλον για καλλιεργήσιμες ποικιλίες φαρμακευτικής κάνναβης, **(3) να προστατεύουν τα φυτά ενάντια σε φυτοπαθογόνα μέσω παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων και εκκίνησης ανοσοαποκρίσεων του φυτού** και **4) μείωσης του αντίκτυπου των αβιοτικών καταπονήσεων** που συνδέονται είτε με εντατική εσωτερική καλλιέργεια φαρμακευτικής κάνναβης (π.χ., *καταπόνηση αλατότητας*) και με προκλήσεις που συνδέονται με κλιματική αλλαγή για εξωτερική καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης (π.χ., *ξηρασία, υψηλές θερμοκρασίας, κατάκλυση με νερό*).

Παρόλα αυτά κρίνεται απαραίτητο να διεξαχθούν και άλλες έρευνες για την απόκτηση μιας πιο λεπτομερούς εικόνας του τρόπου δράσης (*Mode of Action*) των βιοδραστικών αυτών παραγόντων σε πειράματα αγρού και σε φυτά μεγαλύτερης κλίμακας, ώστε να καταγραφούν οι επίδρασεις τους σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της κάνναβης έως τα τελικά προϊόντα (π.χ. *στέλεχος, άνθος, σπόρος, εκχύλισμα*). Επιπλέον να εκτιμηθεί ενδεχομένως η δοσολογία των παραγόντων (π.χ. *αύξηση στους βιοδιεγέρτες, εφαρμογή biochar μέχρι 5% w/v επί της συνολικής έκτασης*), να ληφθούν υπόψη οι κλιματολογικές συνθήκες, όπως και οι συνθήκες βιοτικής ή/και αβιοτικής καταπόνησης. Τέλος συνίσταται να αξιολογηθούν οι συγκεκριμένοι βιοδραστικοί παράγοντες συνδυαστικά και με άλλες τεχνικές ομικής όπως πρωτεομική ή μεταγραφομική, είτε αλληλούχιση με RNA ώστε να ανακαλυφθεί και ο MoA με τον οποίο συμβάλλουν στο μεταβολισμό της κάνναβης.

6. Βιβλιογραφία

Ξενογλωσση

- Abbas, S. M. (2013). The influence of biostimulants on the growth and on the biochemical composition of *Vicia faba* CV. Giza 3 beans. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(2), 8061-8068.
- Abbas, A., Jiang, D., & Fu, Y. (2017). *Trichoderma* spp. as antagonist of *Rhizoctonia solani*. *J Plant Pathol Microbiol*, 8(3), 1-9.
- Abdalla, M. M. (2013). The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plant. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 5, 42–49.
- Abdeljalil, N., Renault, D., Gerbore, J., Vallance, J., Rey, P., & Daami-Remadi, M. (2016). Comparative efficacy of three tomato-associated rhizobacteria used singly or in combination in suppressing *Rhizoctonia* Root Rot and enhancing tomato growth. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 8(2), 110-119.
- Abdel-Mawgoud, A. M. R., Tantaway, A. S., Hafez, M. M., & Habib, H. A. (2010). Seaweed extract improves growth, yield and quality of different watermelon hybrids. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(2), 161-168.
- Abenavoli, M. R., Lupini, A., Oliva, S., & Sorgonà, A. (2010). Allelochemical effects on net nitrate uptake and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize seedlings. *Biologia Plantarum*, 54(1), 149-153.
- Abeyasinghe, S. (2009). Effect of combined use of *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01 on biological control of *Rhizoctonia solani* on *Solanum melongena* and *Capsicum annum*. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 8(1), 9-16.
- Abiusso, N. G. (1954). Fungitoxicad de productos quimicos en ensayos de laboratorio. *Eva Peron Univ. Nac. Facultad de Agron., Rev.* 30:149-161.
- Abkhoo, J., & Sabbagh, S. K. (2016). Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1333-1342.
- Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S. P., Schmelz, E., Hamberg, M., Mottinger, J. P., ... & Dellaporta, S. L. (2009). tasselseed1 is a lipoxygenase affecting jasmonic acid signaling in sex determination of maize. *Science*, 323(5911), 262-265.
- Adams, G. C. (1996). Genetics of *Rhizoctonia* species. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 101–16.
- Adams, R., Baker, B. R., & Wearn, R. B. (1940). Structure of cannabinol. III. Synthesis of cannabinol, 1-Hydroxy-3-n-amy-6, 6, 9-trimethyl-6-dibenzopyran-1. *Journal of the American Chemical Society*, 62(8), 2204-2207.
- Adams Jr, G. C., & Butler, E. E. (1982). A re-interpretation of the sexuality of *Thanatephorus cucumeris* anastomosis group four. *Mycologia*, 74(5), 793-800.

- Adams, R., Hunt, M., & Clark, J. H. (1940). Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. I. *Journal of the American Chemical Society*, 62(1), 196-200.
- Adams, R., Pease, D. C. & Clark, J. H. (1940) Isolation of cannabinol, cannabidiol and quebrachitol from red oil of Minnesota wild hemp. *J. Am. Chem. Soc.*, 62: 2194.
- Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F., ... & Abbasi, G. H. (2015). Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11679-11689.
- Afzal, I. M. R. A. N., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pak. J. Bot*, 47(5), 1999-2008.
- Aggarwal, B. B., & Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical pharmacology*, 71(10), 1397-1421
- Agostini, A. (1927). Osservazioni informi a due ifomiceti saprofiti dannosi di tessuti di canapa. *Atti della Reale Accademia dei Fisiocritici* 1(3), 25-33
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology fifth edition. *Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA*.
- Agrios, G. N. (2006). Plant Pathology, 4th Ed. *Academic Press*. 616 p.
- Aguiar, N. O., Olivares, F. L., Novotny, E. H., & Canellas, L. P. (2018). Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ*, 6, e5445.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- Ahmad, I., Pichtel, J., & Hayat, S. (Eds.). (2008). *Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth*. John Wiley & Sons.
- Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., ... & Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. *Chemosphere*, 99, 19-33.
- Ahmed, S. A., Ross, S. A., Slade, D., Radwan, M. M., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2015). Minor oxygenated cannabinoids from high potency *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry*, 117, 194-199.
- Aizpurua-Olaizola, O., Elezgarai, I., Rico-Barrio, I., Zarandona, I., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2017). Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discovery Today*, 22(1), 105-110.
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *rhizoctonia* seedling disease of soybean. *Plant Pathology*, 67(1), 3-17.

Akladios, S. A., Gomaa, E. Z., & El-Mahdy, O. M. (2019). Efficiency of bacterial biosurfactant for biocontrol of *Rhizoctonia solani* (AG-4) causing root rot in *faba bean* (*Vicia faba*) plants. *European Journal of Plant Pathology*, 153(4), 1237-1257.

Akman Gündüz, E., & Douglas, A. E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), 987-991.

Al Mahmud, J., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Hossain, M. S., & Fujita, M. (2017). Maleic acid assisted improvement of metal chelation and antioxidant metabolism confers chromium tolerance in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 144, 216-226.

Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., & Hodges, D. M. (2013). Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(1), 23-36.

Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., & Mark Hodges, D. (2014). *Ascophyllum* extract application can promote plant growth and root yield in carrot associated with increased root-zone soil microbial activity. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(2), 337-348.

Aldington, S., Harwood, M., Cox, B., Weatherall, M., Beckert, L., Hansell, A., ... & Beasley, R. (2008). Cannabis use and risk of lung cancer: a case-control study. *European Respiratory Journal*, 31(2), 280-286

Alghuthaymi, M. A. (2018). Cultural, anastomosis, and universally primed PCR typing of *Rhizoctonia solani* from potato. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 15(1), 119-130.

Ali, M., & Baek, K. H. (2020). Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 621.

Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Kanwal, S., Ali, Q., ... & Khan, M. D. (2015). Fulvic acid mediates chromium (Cr) tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) through lowering of Cr uptake and improved antioxidant defense system. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10601-10609.

Ali, S., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 160-167.

Ali, N., Farrell, A., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2016). The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. *Journal of applied phycology*, 28(2), 1353-1362.

Ali, Q., Haider, M. Z., Shahid, S., Aslam, N., Shehzad, F., Naseem, J., ... & Hussain, S. M. (2019). Role of amino acids in improving abiotic stress tolerance to plants. In *Plant Tolerance to Environmental Stress* (pp. 175-204). CRC Press.

Ali, N., Khan, S., Yao, H., & Wang, J. (2019). Biochars reduced the bioaccessibility and (bio) uptake of organochlorine pesticides and changed the microbial community dynamics in agricultural soils. *Chemosphere*, 224, 805-815.

- Ali, B., Sabri, A. N., & Hasnain, S. (2010). Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1379-1384.
- Ali, I., Ullah, S., He, L., Zhao, Q., Iqbal, A., Wei, S., ... & Jiang, L. (2020). Combined application of biochar and nitrogen fertilizer improves rice yield, microbial activity and N-metabolism in a pot experiment. *PeerJ*, 8, e10311.
- Ali, M. K. M., Yasir, S. M., Critchley, A. T., & Hurtado, A. Q. (2018). Impacts of *Ascophyllum* marine plant extract powder (AMPEP) on the growth, incidence of the endophyte *Neosiphonia apiculata* and associated carrageenan quality of three commercial cultivars of *Kappaphycus*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1185-1195.
- Aliferis, K. A. (2020). Metabolomics in plant protection product research and development: Discovering the mode (s)-of-action and mechanisms of toxicity. In *Environmental Metabolomics* (pp. 163-194). Elsevier.
- Aliferis, K. A., & Bernard-Perron, D. (2020). Cannabinomics: application of metabolomics in Cannabis (*Cannabis sativa* L.) research and development. *Frontiers in plant science*, 11, 554.
- Aliferis, K. A., Chamoun, R., & Jabaji, S. (2015). Metabolic responses of willow (*Salix purpurea* L.) leaves to mycorrhization as revealed by mass spectrometry and 1H NMR spectroscopy metabolite profiling. *Frontiers in Plant Science*, 6, 344.
- Aliferis, K. A., & Chrysayi-Tokousbalides, M. (2011). Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, 7(1), 35-53.
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2010). 1 H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani*sclerotia. *Metabolomics*, 6(1), 96-108.
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2011). Metabolomics—a robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: a review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 105-117.
- Allen, V. G., Pond, K. R., Saker, K. E., Fontenot, J. P., Bagley, C. P., Iy, R. L., ... & Melton, C. (2001). Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock—A review. *Journal of Animal Science*, 79(suppl_E), E21-E31.
- Allwood, J. W., Erban, A., de Koning, S., Dunn, W. B., Luedemann, A., Lommen, A., ... & Goodacre, R. (2009). Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics*, 5(4), 479-496.
- Al-Mushhin, A. A., Qari, S. H., Fakhr, M. A., Alnusairi, G. S., Alnusaire, T. S., Alrashidi, A. A., ... & Soliman, M. H. (2021). Exogenous Myo-Inositol Alleviates Salt Stress by Enhancing Antioxidants and Membrane Stability via the Upregulation of Stress Responsive Genes in *Chenopodium quinoa* L. *Plants*, 10(11), 2416.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 971.
- Alper, H., & Stephanopoulos, G. (2009). Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential?. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 715-723.
-

-
- Amareesan, N., Kumar, K., Naik, J. H., Bapatla, K. G., & Mishra, R. K. (2018). Streptomyces in plant growth promotion: Mechanisms and role. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 125-135). Elsevier.
- Andersen, T. F. (1996). A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. *Mycological Research*, 100(9), 1117-1128.
- Anderson, N. A. (1982). The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annual Review of Phytopathology* 20, 329–47.
- Anderson, N. A. (1984). Variation and heterokaryosis in *Rhizoctonia solani*. In: Jennings DH, Rayner ADM, eds. *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge, UK: *Cambridge University Press*, 367–82.
- Anderson, N. A., Stretton, H. M., Groth, J. V., & Flentje, N. T. (1972). Genetics of heterokaryosis in *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 62, 1057–65.
- Anderson, J. P., Sperschneider, J., Win, J., Kidd, B., Yoshida, K., Hane, J., ... & Singh, K. B. (2017). Comparative secretome analysis of *Rhizoctonia solani* isolates with different host ranges reveals unique secretomes and cell death inducing effectors. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Andre'O, H., Bless, C., Macedo, P., Chatterjee, S. P., Singh, B. K., Gilvarg, C., & Leustek, T. (2005). Biosynthesis of lysine in plants: evidence for a variant of the known bacterial pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1-3), 27-36.
- Andrews, M., Lea, P. J., Raven, J. A., & Lindsey, K. (2004). Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. *Annals of Applied Biology*, 145(1), 25-40.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Faloya, V., & Steinberg, C. (2009). Biotic changes in relation to local decrease in soil conduciveness to disease caused by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology* 126, 29–41.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 114(9), 691-701.
- Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N., & Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin (s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, 100(2), 872-877.
- Aoyagi, T., Kageyama, K., & Hyakumachi, M. (1998). Characterization and survival of *Rhizoctonia solani* AG2-2 LP associated with large patch disease of zoysia grass. *Plant Disease*, 82(8), 857-863.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., ... & Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure– activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427-1430.
-

-
- Araujo, W. L., NUNES-NESI, A. D. R. I. A. N. O., Nikoloski, Z., Sweetlove, L. J., & Fernie, A. R. (2012). Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant, Cell & Environment*, 35(1), 1-21.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C. D., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4885-4911.
- Archer, R. A., Boyd, D. B., Demarco, P. V., Tyminski, I. J., & Allinger, N. L. (1970). Structural studies of cannabinoids. Theoretical and proton magnetic resonance analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 92(17), 5200-5206.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., & Kudoyarova, G. R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272(1), 201-209.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G., & Savoré, A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum*, 120(3), 442-450.
- Armin, R., Zühlke, S., Grunewaldt-Stöcker, G., Mahnkopp-Dirks, F., & Kusari, S. (2021). Production of Siderophores by an Apple Root-Associated *Streptomyces ciscaucasicus* Strain GS2 Using Chemical and Biological OSMAC Approaches. *Molecules*, 26(12), 3517.
- Armstrong, G. M., & Armstrong, J. K. (1975). Reflections on the wilt fusaria. *Annual Review of Phytopathology*, 13(1), 95-103.
- Arru, L., Francia, E., & Pecchioni, N. (2003). Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the 'Steptoe' 9 'Morex' spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 668–75.
- Asad, S. A., Ali, N., Hameed, A., Khan, S. A., Ahmad, R., Bilal, M., ... & Tabassum, A. (2014). Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Polish Journal of Microbiology*, 63(1), 95-103.
- Asaf, S., Khan, A. L., Khan, M. A., Imran, Q. M., Yun, B. W., & Lee, I. J. (2017). Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiological Research*, 205, 135-145.
- Aseel, D. G., Rashad, Y. M., & Hammad, S. M. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi trigger transcriptional expression of flavonoid and chlorogenic acid biosynthetic pathways genes in tomato against Tomato Mosaic Virus. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 206-216.
- Aslam, M., Saeed, M. S., Sattar, S., Sajad, S., Sajjad, M., Adnan, M., ... & Sharif, M. T. (2017). Specific role of proline against heavy metals toxicity in plants. *Int J Pure Appl Biosci*, 5(6), 27-34.
- Atwa, M. (2018). Combination of biocontrol agents for controlling soybean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 46(2), 15-38.
-

- Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3–42.
- Azevedo, R. A., Arruda, P., Turner, W. L., & Lea, P. J. (1997). The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry*, 46(3), 395-419.
- Azevedo, R. A., Lancien, M., & Lea, P. J. (2006). The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids*, 30(2), 143-162.
- Azevedo, R. A., & Lea, P. J. (2001). Lysine metabolism in higher plants. *Amino Acids*, 20(3), 261-279.
- Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559-1570.
- Babiceanu, M. C., Howard, B. A., Rumore, A. C., Kita, H. and Lawrence, C. B. (2013). Analysis of global gene expression changes in human bronchial epithelial cells exposed to spores of the allergenic fungus, *Alternaria alternata*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 196.
- Babu, R., Roy, A. N., Gupta, Y. K. Gupta, M. N. (1977). Fungi associated with deteriorating seeds of *Cannabis sativa* L. *Current Science* 46(20), 719-720
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., ... & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1473.
- Bagy, H. M. K., Hassan, E. A., Nafady, N. A., & Dawood, M. F. (2019). Efficacy of arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic strain *Epicoccum nigrum* ASU11 as biocontrol agents against blackleg disease of potato caused by bacterial strain *Pectobacterium carotovora* subsp. atrosepticum PHY7. *Biological Control*, 134, 103-113.
- Baird, R. E., Carting, D. E., & Mullinix, B. G. (1996). Characterization and comparison of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-7 from Arkansas, Indiana, and Japan, and select AG-4 isolates. *Plant Disease* 80, 1421–4.
- Bajpai, V. K., Kim, N. H., & Kim, K. (2016). Chemical derivatization of pharmaceutical samples prior to Gas-Chromatography and Mass-Spectrometry analysis. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(4), 852-855.
- Bakro, F., Wielgusz, K., Bunalski, M., & Jedryczka, M. (2018). An overview of pathogen and insect threats to fibre and oilseed hemp (*Cannabis sativa* L.) and methods for their biocontrol. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC-WPRS Bulletin*, 136(1), 9-20.
- Baldini, M., Ferfua, C., Piani, B., Sepulcri, A., Dorigo, G., Zuliani, F., ... & Cattivello, C. (2018). The performance and potentiality of monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars as a multipurpose crop. *Agronomy*, 8(9), 162.
- Banerjee, M. R., Yesmin, L., Vessey, J. K., & Rai, M. (2006). Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Food Products Press, New York, 137-181.

-
- Banks, J. M., & Percival, G. C. (2012). Evaluation of biostimulants to control *Guignardia* leaf blotch (*Guignardia aesculi*) of horse chestnut and black spot (*Diplocarpon rosae*) of roses. *Arboriculture and Urban Forestry*, 38(6), 258.
- Baqir, H. A., Zeboon, N. H., & Al-behadli, A. A. J. (2019). The role and importance of amino acids within plants: a review. *Plant Archives*, 19(2), 1402-1410.
- Barbakadze, V. V., Kemertelidze, E. P., Mulkijanyan, K. G., Van Den Berg, A. J. J., Beukelman, C. J., Van Den Worm, E., ... & Usov, A. I. (2007). Antioxidant and anticomplement activity of poly [3-(3, 4-dihydroxyphenyl) glyceric acid] from *Symphytum asperum* and *Symphytum caucasicum* plants. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 41(1), 14-16.
- Barbakadze, V., Van Den Berg, A. J. J., Beukelman, C. J., Kemmink, J., & van Ufford, H. C. (2009). Poly [3-(3, 4-dihydroxyphenyl) glyceric acid] from *Symphytum officinale* roots and its biological activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(1), 6-10.
- Barcelo, J., & Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 75-92.
- Barceloux, D. G. (2012). *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants*. John Wiley & Sons.
- Barloy, J., & Pelhate, J. (1962). Premieres observations phytopathologiques relatives aux cultures de chavre en Anjou. *Annales des Epiphyties* 13, 117-149.
- Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2012). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 58, 227-235.
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology* 4th edition, Galveston (Tx): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Barrajon-Catalan, E., Álvarez-Martínez, F. J., Borrás, F., Pérez, D., Herrero, N., Ruiz, J. J., & Micol, V. (2020). Metabolomic analysis of the effects of a commercial complex biostimulant on pepper crops. *Food Chemistry*, 310, 125818.
- Barry, K. M., Davies, N. W., & Mohammed, C. L. (2002). Effect of season and different fungi on phenolics in response to xylem wounding and inoculation in *Eucalyptus nitens*. *Forest Pathology*, 32(3), 163-178.
- Barth, C., & Jander, G. (2006). *Arabidopsis* myrosinases TGG1 and TGG2 have redundant function in glucosinolate breakdown and insect defense. *The Plant Journal*, 46(4), 549-562.
- Basak, A. (2008). Biostimulators. Definitions, classification and legislation. *Biostimulators in modern agriculture. General aspects. H. Gawrońska (ed.). Editorial House Wieś Jutra, Warszawa, Poland, 7-17.*
- Basak, A. (2008). Effect of preharvest treatment with seaweed products, Kelpak® and Goëmar BM 86®, on fruit quality in apple. *International Journal of Fruit Science*, 8(1-2), 1-14.
-

-
- Bassi, R., & Sharma, S. S. (1993). Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. *Annals of Botany*, 72(2), 151-154.
- Bassi, R., & Sharma, S. S. (1993). Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry*, 33(6), 1339-1342.
- Batalla, A., Bhattachayyria, S., Yucel, M., Fusar-Poli, P., Crippa, J. A., Nogué, S., ... & Martín-Santos, R. (2013). 1301—Structural and functional imaging studies in chronic cannabis users: a systematic review of adolescent and adult findings. *European Psychiatry*, 28, 1.
- Bateman, D. F., & Basham, H. G. (1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. In *Physiological Plant Pathology* (pp. 316-355). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., & Prithviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48.
- Bazzaz, F. A., Dusek, D., Seigler, D. S., & Haney, A. W. (1975). Photosynthesis and cannabinoid content of temperate and tropical populations of *Cannabis sativa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(1), 15-18.
- Beale, D. J., Pinu, F. R., Kouremenos, K. A., Poojary, M. M., Narayana, V. K., Boughton, B. A., ... & Dias, D. A. (2018). Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics*, 14(11), 1-31.
- Bean, K. M., Kisiala, A. B., Morrison, E. N., & Emery, R. J. (2021). *Trichoderma* synthesizes cytokinins and alters cytokinin dynamics of inoculated Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-17.
- Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., ... & Schulze-Lefert, P. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, 323(5910), 101-106.
- Begg, M., Pacher, P., Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F. M., ... & Kunos, G. (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(2), 133-145.
- Behie, S. W., & Bidochka, M. J. (2014). Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. *Trends Plant Sci.* 19, 734–740.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Amino acids, peptides, proteins. In *Food Chemistry* (pp. 8-91). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C., & Guckert, A. (1998). Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M. 3.1. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10-11), 1481-1484.
- Benson, J. J., Watson, S. J., Joy, J. (1999). Marijuana and Medicine Assessing the Science Base. *National Academies Press*;
- Benstein, R. M., Ludewig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., ... & Krueger, S. (2013). Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase1 of the phosphoserine
-

pathway is essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *The Plant Cell*, 25(12), 5011-5029.

Bercht, C. A. L., Lousberg, R. J. J., Küppers, F. J. E. M., Salemink, C. A., Vree, T. B., & Van Rossum, J. M. (1973). Cannabis: VII. Identification of cannabinol methyl ether from hashish. *Journal of Chromatography A*, 81(1), 163-166.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 1360–1385.

Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front. Microbiol.* 5, 1–7, Article 148.

Berg, G., Marten, P., & Ballin, G. (1996). *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape—occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research*, 151(1), 19-27.

Berg, G., Marten, P., Minkwitz, A., & Bruckner, S. (2001). Efficient biological control of fungal plant diseases by *Streptomyces* sp. DSMZ 12424/Effiziente biologische Bekämpfung pilzlicher Pflanzenkrankheiten durch *Streptomyces* sp. DSMZ 12424. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-10.

Bernardes-de-Assis, J., Peyer, P., Rush, M. C., Zala, M., McDonald, B. A., & Ceresini, P. C. (2008). Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA. *Phytopathology* 98, 1326–33.

Bernstein, N., Gorelick, J., Zerahia, R., & Koch, S. (2019). Impact of N, P, K, and humic acid supplementation on the chemical profile of medical cannabis (*Cannabis sativa* L). *Frontiers in plant science*, 10, 736.

Berta, G., Sampo, S., Gamalero, E., Massa, N., & Lemanceau, P. (2005). Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mossae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. *European Journal of Plant Pathology*, 111(3), 279-288.

Bertagnolli, B. L., Dal Soglio, F. K., & Sinclair, J. B. (1996). Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possible correlations with inhibition of growth and biocontrol. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48(3), 145-160.

Bertoli, A., Tozzi, S., Pistelli, L., & Angelini, L. G. (2010). Fibre hemp inflorescences: From crop-residues to essential oil production. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 329-337.

Bharathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A., & Samiyappan, R. (2004). Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Protection*, 23(9), 835-843.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350.

Bhetariya P. J, Shankar J., Singh Y., Madan T., Varma A., Basir S. F. and Sarma P. U. (2009). Multiplex PCR for Detection of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*, *J. Allergy Clin. Immun.*, Vol. 123, No. 2, pp. S160-S160.

-
- Biais, B., Allwood, J. W., Deborde, C., Xu, Y., Maucourt, M., Beauvoit, B., ... & Moing, A. (2009). 1H NMR, GC– EI-TOFMS, and data set correlation for fruit metabolomics: application to spatial metabolite analysis in melon. *Analytical Chemistry*, 81(8), 2884-2894.
- Bianchi, G., Gamba, A., Limiroli, R., Pozzi, N., Elster, R., Salamini, F., & Bartels, D. (1993). The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiologia Plantarum*, 87(2), 223-226.
- Billard, V., Ourry, A., Maillard, A., Garnica, M., Coquet, L., Jouenne, T., ... & Etienne, P. (2014). Copper-deficiency in *Brassica napus* induces copper remobilization, molybdenum accumulation and modification of the expression of chloroplastic proteins. *PLoS One*, 9(10), e109889.
- Binder, S. (2010). Branched-chain amino acid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Blázquez, C., Casanova, M. L., Planas, A., del Pulgar, T. G., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M. J., ... & Guzmán, M. (2003). Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *The FASEB Journal*, 17(3), 529-531.
- Blunden, G., Jenkins, T., & Liu, Y. W. (1996). Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *Journal of Applied Phycology*, 8(6), 535-543.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519-546.
- Bolkan, H. A., & Butler, E. E. (1974). Studies on heterokaryosis and virulence of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 64, 513–22.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1439-1449.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487-497.
- Bolton, M. D., Panella, L., Campbell, L., and Khan, M. F. R. (2010). Temperature, moisture, and fungicide effects in managing *Rhizoctonia* root and crown rot of sugar beet. *Phytopathology* 100, 689-69.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Barile, E., Lanzotti, V., & Scala, F. (2011). Decomposition of Medicago Sativa Residues Affects Phytotoxicity, Fungal Growth and Soil-Borne Pathogen Diseases. *Decomposition of Medicago Sativa Residues Affects Phytotoxicity, Fungal Growth and Soil-Borne Pathogen Diseases.*, 57-69.
- Bonanomi, G., Ippolito, F., & Scala, F. (2015). A "black" future for plant pathology? Biochar as a new soil amendment for controlling plant diseases. *Journal of Plant Pathology*, 97(2).
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* 1, 1–11.
-

-
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-11.
- Bonomelli, C., Celis, V., Lombardi, G., & Mártiz, J. (2018). Salt stress effects on avocado (*Persea americana* Mill.) plants with and without seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) application. *Agronomy*, *8*(5), 64.
- Booth, J. K., & Bohlmann, J. (2019). Terpenes in *Cannabis sativa*—From plant genome to humans. *Plant Science*.
- Booth, J. K., Page, J. E., & Bohlmann, J. (2017). Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *Plos One*, *12*(3), e0173911.
- Bozhkov, A. I., Menzyanova, N. G., & Leontovich, V. P. (1996). Lipid composition and antibacterial activity of root exudates secreted by wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, *43*(6), 795-799.
- Bradley, C. A., Hartman, G. L., Nelson, R. L., Mueller, D. S., & Pederson, W. L. (2001). Response of ancestral soybean lines and commercial cultivars to *rhizoctonia* root and hypocotyl rot. *Plant Disease* *85*, 1091–5.
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 86-98.
- Brahmaprakash, G. P., & Sahu, P. K. (2012). Biofertilizers for Sustainability. *J. Indian Inst.Sci.* *92*, 37–62.
- Brasse-Lagnel, C., Lavoine, A., & Husson, A. (2009). Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *The FEBS Journal*, *276*(7), 1826-1844.
- Breitling, R., Ritchie, S., Goodenowe, D., Stewart, M. L., & Barrett, M. P. (2006). Ab initio prediction of metabolic networks using Fourier transform mass spectrometry data. *Metabolomics*, *2*(3), 155-164.
- Brenneman, T. B. (1996). Peanut diseases incited by *Rhizoctonia* species. In *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 315-320). Springer, Dordrecht.
- Brewer, M. T., & Larkin, R. P. (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection*, *24*(11), 939-950.
- Brian, G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J. Exp. Bot.* *58*(9), 2339-2358.
- Brito, R. G., Guimarães, A. G., Quintans, J. S., Santos, M. R., De Sousa, D. P., Badaue-Passos, D., Quintans, L. J. (2012). Citronellol, a monoterpene alcohol, reduces nociceptive and inflammatory activities in rodents. *Journal of Natural Medicines*, *66*(4), 637-644.
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, *220*(4), 1108-1115.
-

-
- Bryndina, L., Ilyina, N., Baklanova, O., & Moiseyeva, E. (2019). Comparative evaluation of biostimulator efficiency on corn seeds germination: keratin protein and preparation Ribav Extra. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 392, No. 1, p. 012068). IOP Publishing.
- Bucar, F., Wube, A., & Schmid, M. (2013). Natural product isolation—how to get from biological material to pure compounds. *Natural Product Reports*, 30(4), 525-545.
- Buddemeyer, J., Pfähler, B., Petersen, J., & Märländer, B. (2004). Genetic variation in susceptibility of maize to *Rhizoctonia solani* (AG 2-2III B)—symptoms and damage under field conditions in Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 521-533.
- Buening, G. M., Mann, D. D., Hook, B., & Osweiler, G. D. (1982). The effect of T-2 toxin on the bovine immune system: cellular factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3(4), 411-417.
- Buggeln, R. G., & Craigie, J. S. (1971). Evaluation of evidence for the presence of indole-3-acetic acid in marine algae. *Planta*, 97(2), 173-178.
- Bulgari, R., Cocetta, G., Trivellini, A., Vernieri, P., & Ferrante, A. (2015). Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31(1), 1-17.
- Bunn, R. A., Simpson, D. T., Bullington, L. S., Lekberg, Y., & Janos, D. P. (2019). Revisiting the 'direct mineral cycling' hypothesis: arbuscular mycorrhizal fungi colonize leaf litter, but why?. *The ISME Journal*, 13(8), 1891-1898.
- Burchett, S., Fuller, M. P., & Jellings, A. J. (1998, March). Application of seaweed extract improves winter hardiness of winter barley cv Igri. In *The Society for Experimental Biology, Annual Meeting, The York University*.
- Burke, C. C., Wildung, M. R., & Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13062-13067.
- Burke, Y. D., Stark, M. J., Roach, S. L., Sen, S. E., & Crowell, P. L. (1997). Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol. *Lipids*, 32(2), 151.
- Caesar, L. K., Kvalheim, O. M., & Cech, N. B. (2018). Hierarchical cluster analysis of technical replicates to identify interferents in untargeted mass spectrometry metabolomics. *Analytica Chimica Acta*, 1021, 69-77.
- Cajka, T., Vaclavikova, M., Dzuman, Z., Vaclavik, L., Ovesna, J., & Hajslova, J. (2014). Rapid LC-MS-based metabolomics method to study the *Fusarium* infection of barley. *Journal of Separation Science*, 37(8), 912-919.
- Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., et al. (2004). Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94, 370–9.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3–41.
-

-
- Candido, V., Campanelli, G., D'Addabbo, T., Castronuovo, D., Perniola, M., & Camele, I. (2015). Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization on fieldtomato at different irrigation regimes. *Sci. Hortic.* 187, 35–43.
- Candido, V., Campanelli, G., D'Addabbo, T. D., Castronuovo, D., Renco, M., & Camele, I. (2013). Growth and yield promoting effect of artificial mycorrhization combined with different fertiliser rates on field-grown tomato. *Ital. J. Agron.* 8, 168–174.
- Canero, D. C., & Roncero, M. I. G. (2008). Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, 98(5), 509-518.
- Carling, D. E., & Kuninaga S. (1990). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn : Inter- and intragroup relatedness of anastomosis group-9. *Phytopathology* 80, 1362–4.
- Carling, D. E., Kuninaga, S., & Brainard, K. A. (2002). Hyphal anastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-B1. *Phytopathology* 92, 43–50.
- Carling, D. E., Leiner, R. H., & Kebler, K. M. (1987). Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 77, 1609–12.
- Carling, D. E., Pope, E. J., Brainard, K. A., & Carter, D. A. (1999). Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis Group. *Phytopathology* 89, 942–6.
- Carling, D. E., Rothrock, C. S., MacNish, G. C., Sweetingham, M. W., Brainard, K. A., & Winters, S. W. (1994). Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 84, 1387–93.
- Carlo, G. D., & Izzo, A. A. (2003). Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert opinion on investigational drugs*, 12(1), 39-49.
- Carter, G. T., & Rosen, B. S. (2001). Marijuana in the management of amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*®, 18(4), 264-270.
- Casanova, M. L., Blázquez, C., Martínez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M. J., Huffman, J. W., Guzmán, M. (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis *in vivo* by activation of cannabinoid receptors. *The Journal of clinical investigation*, 111(1), 43-50.
- Case, K. C., Salsaa, M., Yu, W., & Greenberg, M. L. (2018). Regulation of inositol biosynthesis: Balancing health and pathophysiology. In *Lipid Signaling in Human Diseases* (pp. 221-260). Springer, Cham.
- Cassan, L., Jeannin, I., Lamaze, T., & Morot-Gaudry, J. F. (1992). The effect of the *Ascophyllum nodosum* extract Goëmar GA 14 on the growth of spinach.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 302.
-

- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2015). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281-295.
- Ceapoiu N. (1958). Cinepa Studiu monografic. *Editura Academiei Republicii Populare Romine. Bucharest*. 652 pp.
- Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Jordá, J. D., Juárez, M., & Sánchez-Andreu, J. (2013). Effect of commercial amino acids on iron nutrition of tomato plants grown under lime-induced iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 859-866.
- Ceresini, P. C., Shew, H. D., Vilgalys, R. J., & Cubeta, M. A. (2002). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, 94(3), 437-449.
- Chalker-Scott, L., & Krahmer, R. L. (1989). Microscopic studies of tannin formation and distribution in plant tissues. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins* (pp. 345-368). Springer, Boston, MA.
- Chan, W. R., Magnus, K. E., & Watson, H. A. (1976). The structure of cannabitol. *Experientia*, 32(3), 283-284.
- Chandrasekaran, M., & Chun, S. C. (2016). Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(11), 2277-2283.
- Chao, D. Y., Gable, K., Chen, M., Baxter, I., Dietrich, C. R., Cahoon, E. B., ... & Salt, D. E. (2011). Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(3), 1061-1081.
- Chapelle, E., Mendes, R., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2015). Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *ISME J*, 10, 265–268.
- Chaudhary, N., & Marr, K. A. (2011). Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway diseases. *Clinical and Translational Allergy*, 1(1), 1-7.
- Chawla, S., Bowen, C. R., Slaminko, T. L., Hobbs, H. A., & Hartman, G. L. (2013). A public program to evaluate commercial soybean cultivars for pathogen and pest resistance. *Plant Disease* 97, 568–78.
- Chen, M., Alim, N., Zhang, Y., Xu, N., & Cao, X. (2018). Contrasting effects of biochar nanoparticles on the retention and transport of phosphorus in acidic and alkaline soils. *Environmental Pollution*, 239, 562-570.
- Chen F., Tholl D., Bohlmann J., Pichersky E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom, *Plant J*. 66, 212–229.
- Chen, J., Hall, D. E., Murata, J., & De Luca, V. (2006). L-Alanine induces programmed cell death in *V. labrusca* cell suspension cultures. *Plant Science*, 171(6), 734-744.
-

-
- Chen, M., Han, G., Dietrich, C. R., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the Arabidopsis LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *The Plant Cell*, 18(12), 3576-3593.
- Chen, F., Liu, C., Zhang, J., Lei, H., Li, H. P., Liao, Y. C., & Tang, H. (2018). Combined metabolomic and quantitative RT-PCR analyses revealed metabolic reprogramming associated with *Fusarium graminearum* resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2177.
- Chen, T. H. H., & Murata, N. (2011). Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 34,1–20.
- Chen, H. C., Song, J., Williams, C. M., Shuford, C. M., Liu, J., Wang, J. P., ... & Chiang, V. L. (2013). Monolignol pathway 4-coumaric acid: Coenzyme a ligases in *Populus. trichocarpa*: Novel specificity, metabolic regulation, and simulation of coenzyme a ligation fluxes. *Plant Physiology*, 161(3), 1501-1516.
- Chen, K., & Zhuang, W. Y. (2016). *Trichoderma shennongjianum* and *Trichoderma tibetense*, two new soil-inhabiting species in the *Strictipile* clade. *Mycoscience*, 57(5), 311-319.
- Cheng, N., Peng, Y., Kong, Y., Li, J., & Sun, C. (2018). Combined effects of biochar addition and nitrogen fertilizer reduction on the rhizosphere metabolomics of maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant and Soil*, 433(1), 19-35.
- Chernin, L., & Chet, I. (2002). Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, New York, 171-225.
- Chester, K. (1941). Cotton root rot or Texas root rot. *Oklahoma Agricultural Experiment Station Circular* No 53. 4 pp.
- Chin-A-Woeng, T. F., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H., Dekkers, L. C., & Lugtenberg, B. J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12), 1340-1345.
- Choi, Y. K., & Park, S. J. (2015). Hydrogen storage capacity of highly porous carbons synthesized from biomass-derived aerogels. *Carbon Letters*, 16(2), 127-131.
- Chong, W. P., Goh, L. T., Reddy, S. G., Yusufi, F. N., Lee, D. Y., Wong, N. S., ... & Ho, Y. S. (2009). Metabolomics profiling of extracellular metabolites in recombinant Chinese Hamster Ovary fed-batch culture. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(23), 3763-3771.
- Chou, C. H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5), 609-636.
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493-513.
-

Chouliaras, V., Gerascapoulos, D., & Lionakis, S. (1995, September). Effects of seaweed extract on fruit growth, weight and maturation of 'Hayward' kiwi fruit. In *III International Symposium on Kiwifruit 444* (pp. 485-492).

Chouliaras, V., Tasioula, M., Chatzissawidis, C., Therios, I., & Tsabolatidou, E. (2009). The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *89*(6), 984-988.

Chrysargyris, A., Xylia, P., Anastasiou, M., Pantelides, I., & Tzortzakis, N. (2018). Effects of *Ascophyllum nodosum* seaweed extracts on lettuce growth, physiology and fresh-cut salad storage under potassium deficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(15), 5861-5872.

Chung, Y. R., Hoitink, H. A. J., Dick, W. A., & Herr, L. J. (1988). Effects of organic matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in hardwood bark media. *Phytopathology*, *78*(6), 836-840.

Ciftci, O., Ozdemir, I., Tanyildizi, S., Yildiz, S., & Oguzturk, H. (2011). Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicology and Industrial Health*, *27*(5), 447-453.

Citti, C., Palazzoli, F., Licata, M., Vilella, A., Leo, G., Zoli, M., ... & Cannazza, G. (2018). Untargeted rat brain metabolomics after oral administration of a single high dose of cannabidiol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *161*, 1-11.

Clarke, R. C., Watson, D. P. (2007). in: ElSohly, M. A. (Eds), Marijuana and the Cannabinoids.

Claussen, E., Spulak, F. V. & Korte, F. (1966). Zur chemischen klassifizierung von pflanzen-XXXI, Hashish-X Cannabichromen, ein neuer haschischinhaltstoff. *Tetrahedron.*, *22*, 1477.

Claussen, U., von Spulak, F. & Korte, F. (1968). Haschish-XIV. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe des Haschisch. *Tetrahedron*, *24*, 1021.

Cohen, M. F., & Mazzola, M. (2006). Resident bacteria, nitric oxide emission and particle size modulate the effect of *Brassica napus* seed meal on disease incited by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Plant and Soil*, *286*(1), 75-86.

Cohen, M. F., & Yamasaki, H. (2000). Flavonoid-induced expression of a symbiosis-related gene in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Journal of Bacteriology*, *182*(16), 4644-4646.

Cohen, M. F., Yamasaki, H., & Mazzola, M. (2005). *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(7), 1215-1227.

Colaco, C., Kampinga, J., & Roser, B. (1995). Amorphous stability and trehalose. *Science*, *268*(5212), 788-788.

Colasanti, B. K. (1990). A comparison of the ocular and central effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabigerol. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, *6*(4), 259-269.

-
- Colla, G., Roupshael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 5, 1–6.
- Colla, G., Roupshael, Y., Di Mattia, E., El-Nakhel, C., & Cardarelli, M. (2015). Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as abiostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *J. Sci. Food Agric.* 95, 1706–1715
- Collakova, E., Goyer, A., Naponelli, V., Krassovskaya, I., Gregory III, J. F., Hanson, A. D., & Shachar-Hill, Y. (2008). Arabidopsis 10-formyl tetrahydrofolate deformylases are essential for photorespiration. *The Plant Cell*, 20(7), 1818-1832.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959.
- Conant, R. T., Walsh, R. P., Walsh, M., Bell, C. W., & Wallenstein, M. D. (2017). Effects of a microbial biostimulant, Mammoth PTM, on *Cannabis sativa* bud yield. *J. Hortic*, 4(191), 2376-0354.
- Cook, R. J. (2006). Toward cropping systems that enhance productivity and sustainability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18389–18394
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. *St Paul, MN, USA: American Phytopathological Society.*
- Cook, J., Zhang, J., Norrie, J., Blal, B., & Cheng, Z. (2018). Seaweed extract (*Stella Maris*®) activates innate immune responses in *Arabidopsis thaliana* and protects host against bacterial pathogens. *Marine Drugs*, 16(7), 221.
- Cooper, J. E. (2004). Dominant role of flavonoids among signal molecules involved in the formation of legume-rhizobia symbiosis. *Polyphenol Commun*, 87.
- Copley, T. R., Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2015). Maple bark biochar affects *Rhizoctonia solani* metabolism and increases damping-off severity. *Phytopathology*, 105(10), 1334-1346.
- Copley, T. R., Duggavathi, R., & Jabaji, S. (2017). The transcriptional landscape of *Rhizoctonia solani* AG1-IA during infection of soybean as defined by RNA-seq. *PLoS One*, 12(9), e0184095.
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 75.
- Corte, L., Dell'Abate, M. T., Magini, A., Migliore, M., Felici, B., Roscini, L., Sardella, R., Tancini, B., Emiliani, C., Cardinali, G., & Benedetti, A. (2014). Assessment of safety and efficiency of nitrogen organic fertilizers from animal-based protein hydrolysates—a laboratory multidisciplinary approach. *J. Sci. Food Agric.* 94, 235–245.
- Costa P., Islam J., Santos S. T., Ferreira P. B., Oliveira P. L. S., Alencar G. V. O. B., & Sousa, D.M. P. (2016). Evaluation of antioxidant activity of phytol using non-and pre-clinical models. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1278-1284.
-

- Cox, C. (2018). The Canadian Cannabis Act legalizes and regulates recreational cannabis use in 2018. *Health Policy*, 122(3), 205-209.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371-393.
- Craigie, J. S., MacKinnon, S. L., & Walter, J. A. (2008). Liquid seaweed extracts identified using ¹H NMR profiles. *J. Appl. Phycol.* 20, 665–671.
- Creamer, A. E., Gao, B., & Zhang, M. (2014). Carbon dioxide capture using biochar produced from sugarcane bagasse and hickory wood. *Chemical Engineering Journal*, 249, 174-179.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 355-381.
- Crombie, L., & Ponsford, R. (1968). Synthesis of hashish cannabinoids by terpenic cyclisation. *Chemical Communications (London)*, (15), 894-895.
- Crombie, L., Ponsford, R., Shani, A., Yagnitinsky, B., & Mechoulam, R. (1968). Hashish components. Photochemical production of cannabicyclol from cannabichromene. *Tetrahedron Letters*, (55), 5771-5772.
- Crouch, I. J., & Van Staden, J. (1993). Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*, 13(1), 21-29.
- Cubeta, M. A., Briones-Ortega, R., & Vilgalys, R. (1993). Reassessment of heterokaryon formation in *Rhizoctonia-solani* anastomosis group-4. *Mycologia* 85, 777–87.
- Cubeta, M. A., & Vilgalys, R. (1997). Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87, 480–4.
- Cunha, J. M., Carlini, E. A., Pereira, A. E., Ramos, O. L., Pimentel, C., Gagliardi, R., Sanvito, W. L., Lander, N., Mechoulam, R. (1980). Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 1980, 21, 175-185.
- Curi, R., Newsholme, P., Procopio, J., Lagranha, C., Gorjão, R., & Pithon-Curi, T. C. (2007). Glutamine, gene expression, and cell function. *Front Biosci*, 12(1), 344-357.
- Currah, R. S., Sigler, L., & Hambleton, S., (1987). New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Canadian Journal of Botany* 65, 2473-82.
- Curzi, M., Barabaini, M. (1927). Fungi atemenses. *Atti dell' Istituto Botanico della Università di Pavia*, Series 3, 3:147-202.
- Cuykx, M., Claes, L., Rodrigues, R. M., Vanhaecke, T., & Covaci, A. (2018). Metabolomics profiling of steatosis progression in HepaRG® cells using sodium valproate. *Toxicology Letters*, 286, 22-30.
- D'Mello, J. P. F., Placinta, C. M., Macdonald, A. M. C. (1999). *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1999, 80, 183–205.
-

- da Rocha, M. E. B., da Chagas Oliveira Freire, F., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 2014, 36, 159–165.
- Da Silva, J. T. (2003). The cut flower: postharvest considerations. *J. Biol. Sci*, 3(4), 406-442.
- Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B., Ezzat, M. O., Majid, A. S., & Majid, A. M. (2015). The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*, 20(7), 11808-1182
- Dalpe, Y., & Monreal, M. (2004). Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *Crop Management*, 3(1), 1-11.
- Darvishzadeh R., Kiani S. P., Dechamp-Guillaume G., Gentzbittel L., Sarrafi A. (2007). Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate nonspecific partial resistance to *Phoma macdonaldii* in sunflower. *Plant Pathology* 56, 855–61.
- Day, D. A., & Hanson, J. B. (1977). Pyruvate and malate transport and oxidation in corn mitochondria. *Plant Physiology*, 59(4), 630-635.
- de Candolle A.P, (1815). Memoire sur les rhizoctones, nouveau genre de champignons qui attaque les racines, de plantes et en particulier celle de la luzerne cultivee. *Memoires du Museum National D'Histoire Naturelle* 2, 209–16.
- de Carvalho, M. E. A., de Camargo, P. R., Gallo, L. A., & Junior, M. V. C. F. (2014). Seaweed extract provides development and production of wheat. *Agrarian*, 7(23), 166-170.
- De Corato, U. (1997). Le malattie della canapa in Basilicata. *Informatorie Fitopatologica* 47(5), 57-59.
- de França, S. K. S., Cardoso, A. F., Lustosa, D. C., Ramos, E. M. L. S., de Filippi, M. C. C., & da Silva, G. B. (2015). Biocontrol of sheath blight by *Trichoderma asperellum* in tropical lowland rice. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 317-324.
- De Maunder, M. J. F. (1970). Comparative evaluation of the Δ 9-tetrahydrocannabinol content of cannabis plants. *Journal of the Association of Public Analysts*, 8(2), 42-47.
- de Medeiros, E. V., dos Santos Moraes, M. D. C. H., da Costa, D. P., Duda, G. P., de Oliveira, J. B., Araujo da Silva, J. S., ... & Hammecker, C. (2020). Effect of biochar and inoculation with *Trichoderma aureoviride* on melon growth and sandy Entisol quality. *Australian Journal of Crop Science*, 14(6), 971-977.
- de Meijer, E. P. M. (2011). *Cannabis sativa* plants rich in cannabichromene and its acid, extracts thereof and methods of obtaining extracts therefrom. U.S. Patent No. 2011/0098348 A1.
- de Meijer, E. P. M., Hammond, K., & Micheler, M. (2009). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L.(III): variation in cannabichromene proportion. *Euphytica*, 165, 293–311.
-

-
- de Zeeuw, A., Wijsbek, J., Breimer, D. D., Vree, T. B., van Ginneken, C. A., & van Ossum, J. M. (1972). Cannabinoids with a propyl side chain in Cannabis: occurrence and chromatographic behaviour. *Science*, *175*, 778–779
- Degenhardt, F., Stehle, F., & Kayser, O. (2017). The biosynthesis of cannabinoids. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. 13-23). Academic Press.
- Deja-Sikora, E., Mercy, L., Baum, C., & Hryniewicz, K. (2019). The contribution of endomycorrhiza to the performance of potato virus Y-Infected solanaceous plants: disease alleviation or exacerbation?. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 516.
- Deka, H., Deka, S., & Baruah, C. K. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria for value addition: mechanism of action. In *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants* (pp. 305-321). Springer, Cham.
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., & Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(7), 4837-4846.
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Prot.* *29*, 1059–1075.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., & Frommer, W. B. (2001). A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal*, *27*(4), 345-356.
- Devane, W. A., Dysarz, F. 3., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, *34*(5), 605-613.
- Di Marco, S., & Osti, F. (2009). Effect of biostimulant sprays on *Phaeoemoniella chlamydospora* and esca proper infected vines under greenhouse and field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*(1), 47-58.
- Di Stasio, E., Van Oosten, M. J., Silletti, S., Raimondi, G., dell'Aversana, E., Carillo, P., & Maggio, A. (2018). *Ascophyllum nodosum*-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, *30*(4), 2675-2686.
- Diédhiou, C. J., Popova, O. V., Dietz, K. J., & Gollmack, D. (2008). The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biology*, *8*(1), 1-13.
- Dietrich, C. R., Han, G., Chen, M., Berg, R. H., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2008). Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal*, *54*(2), 284-298.
- Ding, J. U., Sun, Y., Xiao, C. L., Shi, K., Zhou, Y. H., & Yu, J. Q. (2007). Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany*, *58*(13), 3765-3773.
-

-
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., & Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212, 155-164. A bibliographic analysis. Ad hoc Study Report to the European Commission, DG ENTR.
- Donk M. A. 1956. Notes on resupinate *hymenomyces*. II. The tulasnelloid fungi. *Reinwardtia* 3, 363–79.
- Donn, S., Almario, J., Muller, D., Moëne-Loccoz, Y., Gupta, V. V., Kirkegaard, J. A., & Richardson, A. E. (2014). Rhizosphere microbial communities associated with *Rhizoctonia* damage at the field and disease patch scale. *Applied Soil Ecology*, 78, 37-47.
- Dorrance A. E., Kleinhenz M. D., McClure S. A., Tuttle N. T. (2003). Temperature, moisture, and seed treatment effects on *Rhizoctonia solani* root rot of soybean. *Plant Disease* 87, 533–8.
- Dos Santos, R. G., Hallak, J. E., & Crippa, J. A. S. (2021). Neuropharmacological effects of the main phytocannabinoids: a narrative review. *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*, 29-45.
- Douds Jr, D. D., Nagahashi, G., & Abney, G. D. (1996). The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. *New Phytologist*, 133(2), 289-294.
- Dragovoz, I. V., Yavorskaya, V. K., Antoniuk, V. P., & Kurchii, B. A. (2009). Hormonal substances produced by microorganism association from ginseng roots. *Physiol. Biochem. Cultivated Plants*, 41, 393-399.
- Drennan, P. M., Smith, M. T., Goldsworthy, D., & Van Staden, J. (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *Journal of Plant Physiology*, 142(4), 493-496.
- Drew, D. P., Andersen, T. B., Sweetman, C., Møller, B. L., Ford, C., & Simonsen, H. T. (2016). Two key polymorphisms in a newly discovered allele of the *Vitis vinifera* TPS24 gene are responsible for the production of the rotundone precursor α -guaiene. *Journal of Experimental Botany*, 67(3), 799-808.
- Drew, M. C., & Sisworo, E. J. (1977). Early effects of flooding on nitrogen deficiency and leaf chlorosis in barley. *New Phytologist*, 79(3), 567-571.
- Dryburgh, L. M., Bolan, N. S., Grof, C. P., Galettis, P., Schneider, J., Lucas, C. J., & Martin, J. H. (2018). Cannabis contaminants: sources, distribution, human toxicity and pharmacologic effects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(11), 2468-2476.
- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Duggar, B. M. (1915). *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC. and *R. solani* Kuhn (*Corticium vagum* B. and C.), with notes on other species. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 2, 403–58.
- Duku, M. H., Gu, S., & Hagan, E. B. (2011). Biochar production potential in Ghana—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 3539-3551.
-

- Dunn, W. B. (2008). Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical Biology*, 5(1), 011001.
- Dwivedi, P., Schultz, A. J., & Hill Jr, H. H. (2010). Metabolic profiling of human blood by high-resolution ion mobility mass spectrometry (IM-MS). *International Journal of Mass Spectrometry*, 298(1-3), 78-90.
- Ebrahimi-Zarandi, M., Bonjar, G. H. S., Riseh, R. S., El-Shetehy, M., Saadoun, I., & Barka, E. A. (2021). Exploring two *Streptomyces* species to control *Rhizoctonia solani* in tomato. *Agronomy*, 11(7), 1384.
- Eckardt, N. A. (2010). Myo-inositol biosynthesis genes in Arabidopsis: Differential patterns of gene expression and role in cell death.
- Edrington, T. S., Kamps-Holtzapfel, C. A., Harvey, R. B., Kubena, L. F., Elissalde, M. H., & Rottinghaus, G. E. (1995). Acute hepatic and renal toxicity in lambs dosed with fumonisin-containing culture material. *Journal of Animal Science*, 73(2), 508-515.
- Edwards, S. G. (2004). Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 2004, 153, 29–35.
- EFSA. (2011). Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal*, 9, 2407.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. E., & Roitsch, T. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell*, 9(10), 1825-1841.
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., ... & Rizwan, M. (2014). Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 164-172.
- Eichhorn Bilodeau, S., Wu, B. S., Ruffykiri, A. S., MacPherson, S., & Lefsrud, M. (2019). An update on plant photobiology and implications for cannabis production. *Frontiers in Plant Science*, 10, 296.
- Eisohly, H. N., Turner, C. E., Clark, A. M., Eisohly, M. A. (1982). Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds. *J Pharm Sci* 1982, 71, 319-1323.
- Ekinci, M., Turan, M., Yildirim, E., Güneş, A., Kotan, R., & Dursun, A. (2014). Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organic acid, amino acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) transplants. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*, 13(6), 71-85.
- El Arroussi, H., Benhima, R., Elbaouchi, A., Sijilmassi, B., El Mernissi, N., Aafsar, A., ... & Smouni, A. (2018). *Dunaliella salina* exopolysaccharides: a promising biostimulant for salt stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2929-2941.

- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs* 8, 968–987.
- Elad, Y., David, D. R., Harel, Y. M., Borenshtein, M., Kalifa, H. B., Silber, A., & Graber, E. R. (2010). Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology*, 100(9), 913-921.
- Elad, Y., David, D. R., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B., Guvrin, E., ... & Sisler, H. D. (1999). *Trichoderma harzianum* T-39-mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds Andover, Hants, UK: Intercept*, 459-467.
- El-Alfy, A. T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M. A., Ross, S. (2010). Antidepressant-like effect of D9- tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 2010, 95, 434-442.
- Elansary, H. O., Norrie, J., Ali, H. M., Salem, M. Z., Mahmoud, E. A., & Yessoufou, K. (2016). Enhancement of *Calibrachoa* growth, secondary metabolites and bioactivity using seaweed extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1-11.
- Elansary, H. O., Skalicka-Woźniak, K., & King, I. W. (2016). Enhancing stress growth traits as well as phytochemical and antioxidant contents of *Spiraea* and *Pittosporum* under seaweed extract treatments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 310-320.
- El-Banna, N. & Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against *streptomycetes*. *J Appl Microbiol* 85, 69–78.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Elisabetsky, E., Marschner, J., & Onofre Souza, D. (1995). Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*, 20(4), 461-465.
- Elleuch, A., Boussetta, A., Yu, J., Halouani, K., & Li, Y. (2013). Experimental investigation of direct carbon fuel cell fueled by almond shell biochar: Part I. Physico-chemical characterization of the biochar fuel and cell performance examination. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(36), 16590-16604.
- Ellis, D. I., Dunn, W. B., Griffin, J. L., Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2007). Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool.
- ElSohly, M. A., Boeren, E. G., & Turner, C. E. (1978). (±) 9, 10-dihydroxy-Δ 6a (10a)-tetrahydrocannabinol and (±) 8, 9-dihydroxy-Δ 6a (10a)-tetrahydrocannabinol: 2 new cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *Experientia*, 34(9), 1127-1128.
- Elsohly, M. A., el Feraly, F. S., & Turner, C. E. (1977). Isolation and characterization of (+)-cannabitriol and (-)-10-ethoxy-9-hydroxy-delta 6a [10a]-tetrahydrocannabinol: two new cannabinoids from *Cannabis sativa* L.[hemp] extract. *Lloydia*.
- ElSohly, M. A, Gul, W. (2014). Constituents of *Cannabis sativa*. In: Pertwee RG (ed) Handbook of cannabis. *Oxford University Press*, UK, pp 3–22.
- ElSohly, M. A. & Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.*, 2005, 78, 539-548.
-

-
- El-Tarabily, K. A. (2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing *streptomyces actinomycetes*. *Plant and Soil*, 308(1), 161-174.
- El-Tarabily, K. A., Soliman, M. H., Nassar, A. H., Al-Hassani, H. A., Sivasithamparam, K., McKenna, F., & Hardy, G. S. J. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, 49(5), 573-583.
- Elzinga, S., Fishedick, J., Podkolinski, R., & Raber, J. C. (2015). Cannabinoids and terpenes as chemotaxonomic markers in cannabis. *Nat. Prod. Chem. Res*, 3(81), 10-4172.
- Endo, S. (1931). The host plants of *Hypochnus centrifugus* (Lev.) Tul. ever recorded in Japan. *Transaction Tottori Society of Agricultural Science* 3, 254-270.
- Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., & Vikström, C. (2013). *Multi-and megavariate data analysis basic principles and applications* (Vol. 1). *Umetrics Academy*.
- Eris, A., Sivritepe, H. Ö., & Sivritepe, N. (1995, March). The effect of seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract on yield and quality criteria in peppers. In *International Symposium on Solanacea for Fresh Market 412* (pp. 185-192).
- Erper, I., Karaca, G. H., Turkkan, M., & Ozkoc, I. (2006). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from onion in Amasya, Turkey. *Journal of Phytopathology*, 154(2), 75-79.
- Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(2), 237-244.
- Ertani, A., Francioso, O., Tinti, A., Schiavon, M., Pizzeghello, D., & Nardi, S. (2018). Evaluation of seaweed extracts from *Laminaria* and *Ascophyllum nodosum* spp. as biostimulants in *Zea mays* L. using a combination of chemical, biochemical and morphological approaches. *Frontiers in Plant Science*, 9, 428.
- Ertani, A., Schiavon, M., Altissimo, A., Franceschi, C., & Nardi, S. (2011a). Phenol-containing organic substances stimulate phenylpropanoid metabolism in *Zea mays*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(3), 496-503.
- Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013a). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant Soil* 364, 145–158
- Esipov, S. E., Adanin, V. M., Baskunov, B. P., Kiprianova, E. A., & Garagulia, A. D. (1975). New antibiotically active fluoroglucide from *Pseudomonas aurantiaca*. *Antibiotiki*, 20(12), 1077-1081.
- Esser, K. (2006). Heterogenic incompatibility in fungi. In *Growth, Differentiation and Sexuality* (pp. 141-165). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Etesami, H. (2020). Enhanced phosphorus fertilizer use efficiency with microorganisms. In *Nutrient Dynamics for Sustainable Crop Production* (pp. 215-245). Springer, Singapore.
- Euzéby, J. P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 590-592.
-

- Euzeby, J. Á. (2008). Genus *Streptomyces*. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
- Eveland, A. L., & Jackson, D. P. (2012). Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3367-3377.
- Eyheraguibel, B., Silvestre, J., & Morard, P. (2008). Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Biores. Technol.* 99, 4206–4212.
- Eziashi, E. I., Omamor, I. B., Dimaro-Oruade, E. A., & Ogunkanmi, L. A. (2007). Control of phytotoxin from *Ceratocystis paradoxa* using *Trichoderma* species phytotoxins on oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq.) sprouted seeds. *Plant Pathology Journal*.
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 467.
- Falardeau, J., Wise, C., Novitsky, L., & Avis, T. J. (2013). Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 869-878.
- Falcón-Rodríguez, A. B., Costales, D., Rogers, H. J., Diosdado, E., González, S., Cabrera, G., ... & Nápoles, M. C. (2012). Practical use of oligosaccharins in agriculture. In *1 World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 195-212).
- Fan, J., Crooks, C., Creissen, G., Hill, L., Fairhurst, S., Doerner, P., & Lamb, C. (2011). *Pseudomonas* sax genes overcome aliphatic isothiocyanate-mediated non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 331(6021), 1185-1188.
- Fan, D., Hodges, D. M., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2013). A commercial extract of brown macroalga (*Ascophyllum nodosum*) affects yield and the nutritional quality of spinach in vitro. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(12), 1873-1884.
- Fan, D., Hodges, D. M., Zhang, J., Kirby, C. W., Ji, X., Locke, S. J., ... & Prithiviraj, B. (2011). Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chemistry*, 124(1), 195-202.
- Fan, D., Kandasamy, S., Hodges, D. M., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2014). Pre-harvest treatment of spinach with *Ascophyllum nodosum* extract improves post-harvest storage and quality. *Scientia Horticulturae*, 170, 70-74.
- Farag, M. A., Rasheed, D. M., & Kamal, I. M. (2015). Volatiles and primary metabolites profiling in two *Hibiscus sabdariffa* (roselle) cultivars via headspace SPME-GC-MS and chemometrics. *Food Research International*, 78, 327-335.
- Farha, M. A., El-Halfawy, O. M., Gale, R. T., MacNair, C. R., Carfrae, L. A., Zhang, X., ... & Brown, E. D. (2020). Uncovering the hidden antibiotic potential of cannabis. *ACS Infectious Diseases*, 6(3), 338-346.

-
- Farooq, M., Ullah, A., Lee, D. J., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. (2018). Desi chickpea genotypes tolerate drought stress better than kabuli types by modulating germination metabolism, trehalose accumulation, and carbon assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126, 47-54.
- Farrimond, J. A., Whalley, B. J., & Williams, C. M. (2012). Cannabinol and cannabidiol exert opposing effects on rat feeding patterns. *Psychopharmacology*, 223(1), 117-129.
- Fellermeier, M., & Zenk, M. H. (1998). Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetra-hydrocannabinol. *FEBS Letters*, 427, 283–285.
- Fellermeier, M., Isenreich, W., Bacher, A., & Zenk, M. H. (2001). Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses. *European Journal of Biochemistry*, 268, 1596–1604
- Feng, H., Zhang, N., Fu, R., Liu, Y., Krell, T., Du, W., ... & Zhang, R. (2019). Recognition of dominant attractants by key chemoreceptors mediates recruitment of plant growth-promoting rhizobacteria. *Environmental Microbiology*, 21(1), 402-415.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., & Clément, C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science*, 15(7), 409-417.
- Fernandes, E. S., Passos, G. F., Medeiros, R., da Cunha, F. M., Ferreira, J., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 228-236.
- Fernie, A. R., Carrari, F., & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 254-261.
- Ferri, F. (1961). Microflora dei semi di canapa. *Progresso Agricolo (Bologna)*, 7(3), 349-356.
- Ferri, M., Franceschetti, M., Naldrett, M. J., Saalbach, G., & Tassoni, A. (2014). Effects of chitosan on the protein profile of grape cell culture subcellular fractions. *Electrophoresis* 35, 1685–1692.
- Ferrucho, R. L., Ceresini, P. C., Ramirez-Escobar, U. M., McDonald, B. A., Cubeta, M. A., & Garcia-Dominguez, C. (2013). The population genetic structure of *Rhizoctonia solani* AG-3PT from potato in the Colombian Andes. *Phytopathology* 103, 862–9.
- Fetterman, P. S., & Turner, C. E. (1972). Constituents of *Cannabis sativa* L. I: Propyl homologs of cannabinoids from an Indian variant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(9), 1476-1477.
- Fidy, K., Fiedorowicz, A., Strzdała, L., & Szumny, A. (2016). β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*, 5(10), 3007-3017.
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology*, 114(1), 30-4.
-

-
- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Héraud, C., Gautheron, N., Chatot, C., Le Hingrat, Y., ... & Steinberg, C. (2011). Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. *Mycologia*, 103(6), 1230-1244.
- Fischedick, J. T. (2017). Identification of terpenoid chemotypes among high (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-producing *Cannabis sativa* L. cultivars. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 34-47.
- Fischedick, J. T., Glas, R., Hazekamp, A., Verpoorte, R. (2009). A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L.. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/pca.1143>
- 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(17-18), 2058-2073
- Flentje, N. T., & Stretton H. M. (1964). Mechanisms of variation in *Thanatephorus cucumeris* and *T. praticolus*. *Australian Journal of Biological Sciences* 17, 686–704.
- Flentje, N. T., Stretton, H. M., & Hawn, E. J. (1963). Nuclear distribution and behavior throughout the life cycles of *Thanatephorus*, *Waitea*, and *Ceratobasidium* species. *Australian Journal of Biological Sciences* 16,450–67.
- Flentje, N. T., Stretton, H. M., & McKenzie, A. R. (1970). Mechanisms of variation in *Rhizoctonia solani*. In: Parmeter JR Jr, ed. *Rhizoctonia solani*, *Biology and Pathology*. Berkeley, CA, USA: *University of California Press*, 52–6.
- Flores-Sanchez, I. J., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2012). Metabolite analysis of *Cannabis sativa* L. by NMR spectroscopy. In *Functional Genomics* (pp. 363-375). Springer, New York, NY.
- Fogaca, M. V., Reis, F. M. C. V., Campos, A. C., Guimaraes, F. S. (2014). Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: involvement of 5HT 1A receptors and previous stressful experience. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 24, 410-419.
- Forde, B. G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2339-2358.
- Fornes, F., Sánchez-Perales, M., & Guardiola, J. L. (1993, September). Effect of a seaweed extract on citrus fruit maturation. In *International Symposium on Quality of Fruit and Vegetables: Influence of Pre-and Post-Harvest Factors and Technology* 379 (pp. 75-82).
- Fornes, F., Sanchez-Perales, M., & Guardiola, J. L. (2002). Effect of a seaweed extract on the productivity of de Nules' clementine mandarin and navelina orange.
- Fougere, F., Le Rudulier, D., & Streeter, J. G. (1991). Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant physiology*, 96(4), 1228-1236.
- Fox, S. H., Kellett, M., Moore, A. P., Crossman, A. R., & Brotchie, J. M. (2002). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial to assess the potential of cannabinoid receptor stimulation in the treatment of dystonia. *Movement Disorders*, 17(1), 145-149.
-

-
- Foy, C. D. (1992). Soil chemical factors limiting plant root growth. In *Limitations to Plant Root Growth* (pp. 97-149). Springer, New York, NY.
- Franceschi, V. R. (1989). Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma*, 148(2), 130-137.
- Franceschi, V. R., & Nakata, P. A. (2005). Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 41-71.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431-2452.
- Fries, L. L., Pacovsky, R. S., Safir, G. R., & Siqueira, J. O. (1997). Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), 1755-1767.
- Froni, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., & Palliotti, A. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. *Scientia Horticulturae*, 232, 97-106.
- Fuller, W. H., Norman, A. G. (1945). Biochemical changes involved in the decomposition of hemp bark by pure cultures of fungi. *J Bact.* 50, 667-671.
- Gabriel, M. F., Postigo, I., Tomaz, C. T., Martínez, J. (2016). *Alternaria alternata* allergens: Markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ. Int.* 2016, 89–90, 71–80.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... & Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261(5122), 754-756.
- Gafurov, R. G., & Zefirov, N. S. (2007). A role of the molecular structure of phytohormones in chemical signal perception by receptors of plant hormonal systems. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 62(1), 52-56.
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Dayu, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am. J. Bot.* 100, 1738–1750.
- Gajera, H. P., Hirpara, D. G., Katakpara, Z. A., Patel, S. V., & Golakiya, B. A. (2016). Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Infection, Genetics and Evolution*, 45, 383-392.
- Gajic, B. R. (1989). *U.S. Patent No. 4,872,900*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., ... & Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54-61.
-

-
- Galili, G., Amir, R., & Fernie, A. R. (2016). The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 153-178.
- Gallet, C., Després, L., & Tollenaere, C. (2004). Phenolic response of *Trollius europaeus* to *Chiastocheta* invasion. *Polyphenol Commun*, 2004, 759-760.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270(5244), 1986-1988.
- Gangopadhyay, G., Basu, S., Mukherjee, B. B., & Gupta, S. (1997). Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49(1), 45-52.
- Ganon-Elazar, E., & Akirav, I. (2009). Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *Journal of Neuroscience*, 29(36), 11078-11088.
- Gao, J., Tarcea, V. G., Karnovsky, A., Mirel, B. R., Weymouth, T. E., Beecher, C. W., ... & Jagadish, H. V. (2010). Metscape: a Cytoscape plug-in for visualizing and interpreting metabolomic data in the context of human metabolic networks. *Bioinformatics*, 26(7), 971-973.
- Gao, P., Li, Y., Guo, Y., & Duan, T. (2018). Co-inoculation of lucerne (*Medicago sativa*) with an AM fungus and a rhizobium reduces occurrence of spring black stem and leaf spot caused by *Phoma medicaginis*. *Crop and Pasture Science*, 69(9), 933-943.
- Gao, S., Hoffman-Krull, K., Bidwell, A. L., & DeLuca, T. H. (2016). Locally produced wood biochar increases nutrient retention and availability in agricultural soils of the San Juan Islands, USA. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 43-54.
- Gaoni, T. & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. AM. Chem. Soc.*, 86, 1646
- Gaoni, T. & Mechoulam, R. (1964). The structure and synthesis of cannabigerol a new hashish constituent. *Proc. Ciieni. Soc.*, p. 82.
- Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1966). Cannabichromene, a new active principle in hashish. *Chem. Commun.*, 1: 20.
- Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., and De Boer, W. (2014). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 289.
- Garbeva, P., Silby, M. W., Raaijmakers, J. M., Levy, S. B., & Boer, W. (2011). Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *ISME J* 5, 973–985.
- Garbeva, P., Van Elsas, J. D., & Van Veen, J. A. (2008). Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant and soil*, 302(1), 19-32.
- Garcia, A. L., Madrid, R., Gimeno, V., Rodriguez-Ortega, W. M., Nicolas, N., & Garcia-Sanchez, F. (2011). The effects of amino acids fertilization incorporated to the nutrient solution on mineral composition and growth in tomato seedlings. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(3), 852-861.
-

-
- Garg, A., Prasanna, B. M., Sharma, R. C., Rathore, R. S., Saxena, S. C., & Chauhan, S. V. S. (2011). Identification of resistance sources to banded leaf and sheath blight (*Rhizoctonia solani* f. sp. sasakil) in maize. *Indian Phytopathology*.
- Garganese, F., Schena, L., Siciliano, I., Prigigallo, M. I., Spadaro, D., De Grassi, A., ... & Sanzani, S. M. (2016). Characterization of citrus-associated *Alternaria* species in Mediterranean areas. *PloS One*, *11*(9), e0163255.
- Gargani, Y., Bishop, P., Denning, D. W. (2011). Too many mouldy joints—Marijuana and chronic pulmonary aspergillosis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2011, *3*, e2011005
- Garrett, E. R., & Hunt, C. A. (1974). Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ 9-tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *63*(7), 1056-1064.
- Gaskin, J. W., Speir, R. A., Harris, K., Das, K. C., Lee, R. D., Morris, L. A., & Fisher, D. S. (2010). Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. *Agronomy Journal*, *102*(2), 623-633.
- Gaufichon, L., Reisdorf-Cren, M., Rothstein, S. J., Chardon, F., & Suzuki, A. (2010). Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Science*, *179*(3), 141-153.
- Gautam, A. K., Kant, M., & Thakur, Y. (2013). Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archives of phytopathology and plant protection*, *46*(6), 627-635.
- Ge, X., Yang, Z., Zhou, B., Cao, Y., Xiao, W., Wang, X., & Li, M. H. (2019). Biochar fertilization significantly increases nutrient levels in plants and soil but has no effect on biomass of *Pinus massoniana* (lamb.) and *Cunninghamia lanceolata* (lamb.) hook saplings during the first growing season. *Forests*, *10*(8), 612.
- Geiselman, J. A., & McConnell, O. J. (1981). Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology*. *7*(6), 1115–1133. doi:10.1007/BF00987632. PMID 24420835
- Gerard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G., & Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochemical Journal*, *279*(1), 129-134.
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, *20*(8), 338-343.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xi, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M., Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, *105*, 9099-9104.
- Ghannam, A., Abbas, A., Alek, H., Al-Waari, Z., & Al-Ktaifani, M. (2013). Enhancement of local plant immunity against tobacco mosaic virus infection after treatment with sulphated-carrageenan from red alga (*Hypnea musciformis*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *84*, 19-27.
-

- Ghazijahani, N., Hadavi, E., Son, M. S., & Jeong, B. R. (2018). Foliar application of citric and malic acid to stock plants of rose alters the rooting of stem cuttings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 5(1), 1-6.
- Ghazy, N., & El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of microbiology*, 203(3), 1195-1209.
- Ghillini, C. A. (1951). I parassiti nemici vegetali della canapa. *Notiz. Sulle Malat. Delle Piante* 15, 29-36
- Ghini, R., & Morandi, M. A. B. (2006). Biotic and abiotic factors associated with soil suppressiveness to *Rhizoctonia solani*. *Scientia Agricola* 63, 153–60.
- Gholami, A., Shahsavani, S., & Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Int J Biol Life Sci*, 1(1), 35-40
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20, 519–530.
- Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., & Smith, K. M. (2015). Method for the analysis of cannabinoids and terpenes in Cannabis. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1503-1522.
- Gilbert, A. N., & DiVerdi, J. A. (2018). Consumer perceptions of strain differences in Cannabis aroma. *PloS One*, 13(2).
- Gill, E. W. (1971). Propyl homologue of tetrahydrocannabinol: its isolation from Cannabis, properties, and synthesis. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 579-582.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*, 329-339.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68.
- Glicksman, M. (1987). Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. In *Twelfth International Seaweed Symposium* (pp. 31-47). Springer, Dordrecht.
- Gmelin, L. & Watts, H. 1855. *Handbook of Chemistry*, Cavendish Society, London, UK, vol. 9, p. 111.
- Goddijn, O. J., & Pen, J. (1995). Plants as bioreactors. *Trends in Biotechnology*, 13(9), 379-387.
- Goepfert, S., & Poirier, Y. (2007). β -Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 245-251.

-
- Gomez Expósito, R., De Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology* 8, 2529.
- Goni, O., Fort, A., Quille, P., McKeown, P. C., Spillane, C., & O'Connell, S. (2016). Comparative transcriptome analysis of two *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants: same seaweed but different. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(14), 2980-2989.
- González-Domínguez, R., Sayago, A., & Fernández-Recamales, Á. (2017). Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology. *Journal of Chromatography B*, 1071, 75-92.
- Gonzalez-Vera, A. D., Bernardes-de-Assis, J., Zala, M., McDonald, B. A., Correa-Victoria, F., Graterol-Matute, E. J., & Ceresini, P. C. (2010). Divergence between sympatric rice-and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from Latin America. *Phytopathology*, 100(2), 172-182.
- González García, V., Portal Onco, M., & Rubio, V. (2006). Biology and Systematics of the fom genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1), 55-79.
- Gonzalez, M., Pujol, M., Metraux, J. P., Gonzalez-garcia, V. I. C. E. N. T. E., Bolton, M. D., & Borrás-Hidalgo, O. R. L. A. N. D. O. (2011). Tobacco leaf spot and root rot caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Molecular Plant pathology*, 12(3), 209-216.
- González-Domínguez, R., Sayago, A., & Fernández-Recamales, Á. (2017). Metabolomics in Alzheimer's disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology. *Journal of Chromatography B*, 1071, 75-92.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1).
- Goudjal, Y., Zamoum, M., Meklat, A., Sabaou, N., Mathieu, F., & Zitouni, A. (2016). Plant-growth-promoting potential of endosymbiotic actinobacteria isolated from sand truffles (*Terfezia leonis* Tul.) of the Algerian Sahara. *Annals of Microbiology*, 66(1), 91-100.
- Gould, M. N. (1997). Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes, *Environ. Health Perspect.* 105. 977–979.
- Gozzo, F., & Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 Years after discovery): moving from the lab to the field. *J. Agric. Food Chem.* 61, 12473–1249.
- Graham, E. S., Ashton, J. C., & Glass, M. (2009). Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot". *Front Biosci*, 14, 944-957.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R., & Elstner, E. F. (2005). The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytochemistry*, 12(6-7), 416-423.
- Gray, R. (2011). Cannabis could be used to treat epilepsy. *The Daily Telegraph*. Retrieved 2011-04-20
- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19-42.
-

- Grinspoon, L., & Bakalar, J. B. (1998). The use of cannabis as a mood stabilizer in bipolar disorder: anecdotal evidence and the need for clinical research. *Journal of Psychoactive Drugs*, 30(2), 171-177.
- Grobelak, A., Napora, A., & Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22-28.
- Grosch, R., Schneider, J. H. M., & Kofoet, A. (2004). Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 110(1), 53-62.
- Großkinsky, D. K., Tafner, R., Moreno, M. V., Stenglein, S. A., de Salamone, I. E. G., Nelson, L. M., ... & Röitsch, T. (2016). Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- Grote, H., & Spiteller, G. (1978). NEW CANNABINOIDS. 2. *Journal of Chromatography*, 154(1), 13-23.
- Grotenhermen, F., & Müller-Vahl, K. (2012). The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Deutsches Ärzteblatt International*, 109(29-30), 495.
- Grotenhermen, F., Russo, E. (2002). Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential. *The Haworth Interactive Press*, New York, London, Oxford
- Gruyter, J. de Noordeloos, M. E., & Boerema, G. H. (1933). Contribution towards a monograph of *Phoma* (*Coelomyces*)- 1.2 Section Phoma: additional taxa with very small conidia up to 7 µm long. *Persoonia* 15, 369-400.
- Gruzdevienė E., Brazauskienė I., Repečkienė J., & Lugauskas, A. (2008). The occurrence of pathogenic fungi during flax growing season in Central Lithuania. *Journal of Plant Protection Research*.
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471.
- Guimarães, A. G., Serafini, M. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2014). Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(3), 243-265.
- Guinan, K. J., Sujeeth, N., Copeland, R. B., Jones, P. W., O'Brien, N. M., Sharma, H. S. S., ... & O'Sullivan, J. T. (2012, November). Discrete roles for extracts of *Ascophyllum nodosum* in enhancing plant growth and tolerance to abiotic and biotic stresses. In *1 World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 127-135).
- Günnewich, N., Page, J. E., Köllner, T. G., Degenhardt, J., & Kutchan, T. M. (2007). Functional expression and characterization of trichome-specific (-)-limonene synthase and (+)- α -pinene synthase from *Cannabis sativa*. *Natural Product Communications*, 2(3), 1934578X0700200301.

-
- Guo, Q., Dong, W., Li, S., Lu, X., Wang, P., Zhang, X, ... & Ma, P. (2014). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169(7-8), 533-540.
- Guo, S., Zhang, J. W., Dong, L. H., Li, X., Asif, M., Guo, Q. G., ... & Zhang, L. Q. (2019). Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 is involved in suppression of clubroot on Chinese cabbage. *Biological Control*, 136, 104001.
- Gupta, R. K., Dubey, M., Kharel, P., Gu, Z., & Fan, Q. H. (2015). Biochar activated by oxygen plasma for supercapacitors. *Journal of Power Sources*, 274, 1300-1305.
- Gupta, K., Dubey, N. K., Singh, S. P., Kheni, J. K., Gupta, S., & Varshney, A. (2021). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Crop Improvement. In *Current Trends in Microbial Biotechnology for Sustainable Agriculture* (pp. 203-226). Springer, Singapore.
- Gupta, S. K., Gupta, P. P., & Kaushik, C. D. (1995). Changes in leaf peroxidase, polyphenol oxidase, catalase and total phenols due to *Alternaria* leaf blight in *Brassica* species. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology (India)*.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *J Microb Biochem Technol*, 7(2), 096-102.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A. N., Mehouchi, J., R. Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211.
- Gutner, L. S. (1933). (New diseases of hemp, okra and Spanish broom), p. 71. Diseases and Pests of Newly Cultivated Fibre Plants. *Institute of New Best Raw Materials*, Moscow.
- Guy, G. W., Whittle, B. A., & Robson, P. (Eds.). (2004). The medicinal uses of cannabis and cannabinoids (p. 74). London, UK:: *Pharmaceutical Press*.
- Guzmán-Gutiérrez, S. L., Gómez-Cansino, R., García-Zebadúa, J. C., Jiménez-Pérez, N. C., & Reyes-Chilpa, R. (2012). Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 673-679.
- Gzebenyuk, N. V. (1984). The occurrence of fungi on hemp stems. *Mikologiya i Fitopatologiya*, 18(4), 322-326.
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Hadwiger, L. A. (2013). Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci*. 208, 42–49.
- Hagenbach, U., Luz, S., Ghafoor, N., Berger, J. M., Grotenhermen F., Brenneisen R., Mader M. 2007. The treatment of spasticity with D9-tetrahydrocannabinol in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord* 45,551–562
-

- Hall, D. E., Robert, J. A., Keeling, C. I., Domanski, D., Quesada, A. L., Jancsik, S., ... & Bohlmann, J. (2011). An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in *Sitka spruce* (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil. *The Plant Journal*, 65(6), 936-948.
- Hall, W. (2003). *Cannabis use and dependence : public health and public policy*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN 9780521800242. 52594455
- Hall, W., & Degenhardt, L. (2009). Adverse health effects of non-medical cannabis use. *The Lancet*, 374(9698), 1383-1391.
- Halmann, M. (1990). Synthetic plant growth regulators. *Advances in Agronomy*, 43, 47-105.
- Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: Sparks, D. L. (Ed.), *Advances in Agronomy*, Vol. 129, pp. 141–174.
- Hamany Djande, C. Y., Pretorius, C., Tugizimana, F., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2020). Metabolomics: A tool for cultivar phenotyping and investigation of grain crops. *Agronomy*, 10(6), 831.
- Hamel, C., & Plenchette, C. (2007). *Mycorrhizae in Crop Production*. The Haworth Press Inc., New York, USA.
- Hamza, B., & Suggars, A. (2001). Biostimulants: myths and realities. *TurfGrass Trends*, 8, 6-10
- Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., ... & Mather, D. E. (2005). Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(4), 119-133.
- Handa, S. S. (1986). Natural products and plants as liver protecting drugs. *Fitoterapia*, 57(5), 307-351.
- Hanson, A. D., & Gregory III, J. F. (2011). Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 105-125.
- Hanson, A. D., & Roje, S. (2001). One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 119-137.
- Hanus, L. & Krejci, Z. (1975). Isolation of two new cannabinoid acids from *Cannabis sativa* L. of Czechoslovakian origin. *Acta Univ. Palacki Olomuc. Fac. Med.*, 14, 161.
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliabatella-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357-139.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., Calfon, M., ... & Ron, D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular Cell*, 11(3), 619-633.
-

-
- Happyana, N., & Kayser, O. (2013). Monitoring metabolites production and cannabinoids analysis in medicinal Cannabis trichomes during flowering period by ¹H NMR-based metabolomics. *Planta Medica*, 79(13), SL44.
- Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A., & Chet, I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology*, 86(9), 980-985.
- Haratian, M., Safaie, N., Sharifnabi, B., Mahmud, S. B., & Ariana, A. (2013). Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* AG-4 from five provinces in Iran. *Plant Pathology* 62, 649–56.
- Hardie, D. G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 97-131.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21(6), 535-553.
- Harel, Y. M., Elad, Y., Rav-David, D., Borenstein, M., Shulchani, R., Lew, B., & Graber, E. R. (2012). Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. *Plant and Soil*, 357(1), 245-257.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Harrier, L. A., & Watson, C. A. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manage. Sci.* 60,149–157.
- Harries, E., Berruezo, L. A., Galván, M. Z., Rajal, V. B., & Mercado Cardenas, G. E. (2019). Soil properties related to suppression of *Rhizoctonia solani* on tobacco fields from north west Argentina.
- Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). *Cannabis sativa* and Hemp. In *Nutraceuticals* (pp. 735-754). Academic Press.
- Harvey, D. J. 1976. Characterization of the butyl homologues of A'-tetra hydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol in samples of *Cuntibis* by combined gas chromatography and mass spectrometry. *J. Pharm. Phormoc.*, 28: 280
- Häusler, R. E., Ludewig, F., & Krueger, S. (2014). Amino acids—a life between metabolism and signaling. *Plant Science*, 229, 225-237.
- Hawksworth, D. L. (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *MycKeys* 1,7–20.
- Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., & Matraszek, R. (2015). Exogenous malic and acetic acids reduce cadmium phytotoxicity and enhance cadmium accumulation in roots of sunflower plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 225-234.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456-1466.
-

-
- Hayden, H. L., Savin, K. W., Wadson, J., Gupta, V. V. S. R. & Mele, P. M. (2018). Comparative Metatranscriptomics of Wheat Rhizosphere Microbiomes in Disease Suppressive and Non-suppressive Soils for *Rhizoctonia solani* AG8. *Front. Microbiol.* 9, 859.
- Hayes, M., García-García, M., Fitzgerald, C., & Lafarga, T. (2015). Seaweed and milk derived bioactive peptides and small molecules in functional foods and cosmeceuticals. *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and applications*, eds VK Gupta and MG Tuohy (Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.), 669-691.
- Hayes, T., Rumore, A., Howard, B., He, X., Luo, M., Wuenschmann, S., et al. (2018). Innate immunity induced by the major allergen alt a 1 from the fungus *Alternaria* is dependent upon toll-like receptors 2/4 in human lung epithelial cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 1507.
- Hazekamp, A., & Fishedick, J. T. (2012). Cannabis-from cultivar to chemovar. *Drug Testing and Analysis*, 4(7-8), 660-667.
- Hazekamp, A., Fishedick, J. T., Diez, M. L., Lubbe, A., Ruhaak, R. L. (2010). Chemistry of Cannabis. Leiden University. Leiden, The Netherlands, Elsevier Ltd.
- Hazekamp, A., Tejkalová, K., & Papadimitriou, S. (2016). Cannabis: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to Cannabis classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 202-215.
- He, M., & Ding, N. Z. (2020). Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. *Frontiers in Plant Science*, 1378.
- Hector, G. P. (1931). Bengal Department of Agriculture, *Annual Report for the Year 1930-31*, pp. 35-44.
- Henda, Y. B., & Bordenave-Juchereau, S. (2013). Using marine cryptides against metabolic syndrome. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*, 95-112.
- Hendriks, H., Malingré, T. M., Batterman, S., & Bos, R. (1978, January). ESSENTIAL OIL OF CANNABIS-SATIVA L. In *Planta Medica* (Vol. 33, No. 3, pp. 280-281). PO BOX30 11 20, D-70451 STUTTGART, GERMANY: GEORG THIEME VERLAG.
- Hepler, P. K., & Wayne, R. O. (1985). Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), 397-439.
- Hidangmayum, A., & Sharma, R. (2017). Effect of different concentrations of commercial seaweed liquid extract of *Ascophyllum nodosum* as a plant bio stimulant on growth, yield and biochemical constituents of onion (*Allium cepa* L.). *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6(4), 658-663.
- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563-1579.
- Hill, A. J. (2013). Cannabidiol-rich cannabis extracts are anticonvulsant in mouse and rat via a CB1 receptor-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology*, 170(3), 679-692.
-

-
- Hill, T. D. M., Cascio, M. G., Romano, B., Duncan, M., Pertwee, R. G., Williams, C. M., & Hillig, K. W. (2004). A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(10), 875-891.
- Hillig, K. W., & Mahlberg, P. G. (2004). A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (*Cannabaceae*). *American Journal of Botany*, 91(6), 966-975.
- Hirata, K. (1966). Host Range and Geographical Distribution of the Powdery Mildews. *Niigata University Press*, Niigata, Japan. 422 pp.
- Hively, R. L., Mosher, W. A., & Hoffmann, F. W. (1966). Isolation of trans- Δ^6 -tetrahydrocannabinol from marijuana. *Journal of the American Chemical Society*, 88(8), 1832-1833.
- Ho, C. L., & Saito, K. (2001). Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino acids*, 20(3), 243-259.
- Hoffman, G. M. (1959). Untersuchungen über die Anthraknose des Hanfes in Mecklenburg und Brandenburg. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutz-Dienst NF 12, 96-99.
- Höfte, M., & Bakker, P. A. (2007). Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In *Microbial Siderophores* (pp. 121-133). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1825-1831.
- Homma, Y., Yamashita, Y., & Ishii, M. (1983). New anastomosis group (AG-7) of *Rhizoctonia solani* Kuhn from Japanese radish fields. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 49, 184-90.
- Hossain, M. A., Hoque, M. A., Burritt, D. J., & Fujita, M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: biochemical and molecular mechanisms. In *Oxidative Damage to Plants* (pp. 477-522). Academic press.
- Hou, Y., & Wu, G. (2018). Nutritionally essential amino acids. *Advances in Nutrition*, 9(6), 849-851.
- Howard, J., Anie, K. A., Holdcroft, A., Korn, S., & Davies, S. C. (2005). Cannabis use in sickle cell disease: a questionnaire study. *British Journal of Haematology*, 131(1), 123-128.
- Howell, C. R., Hanson, L. E., Stipanovic, R. D., & Puckhaber, L. S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252.
- Howlett, A. C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68, 619-631.
-

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54, 161–202

Hu, L., Zhou, K., Ren, G., Yang, S., Liu, Y., Zhang, Z., ... & Ma, F. (2020). Myo-inositol mediates reactive oxygen species-induced programmed cell death via salicylic acid-dependent and ethylene-dependent pathways in apple. *Horticulture Research*, 7.

Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., K, Shi, Zhou, H., Yu, J. Q., Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol.* 153, 1526–1538.

Huang, T. C., Teng, C. S., Chang, J. L., Chuang, H. S., Ho, C. T., & Wu, M. L. (2008). Biosynthetic mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline and its relationship with Δ 1-pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7399-7404.

Huang, X., Liu, L., Wen, T., Zhang, J., Shen, Q., & Cai, Z. (2016). Reductive soil disinfection combined or not with *Trichoderma* for the treatment of a degraded and *Rhizoctonia solani* infested greenhouse soil. *Scientia Horticulturae* 206, 51–61.

Humana Press, New York 2007, pp. 1-15

Hurtado, A. Q., & Critchley, A. T. (2018). A review of multiple biostimulant and bioeffector benefits of AMPEP, an extract of the brown alga *Ascophyllum nodosum*, as applied to the enhanced cultivation and micropropagation of the commercially important red algal carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* and its selected cultivars. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2859-2873.

Hurtado, A. Q., Yunque, D. A., Tibubos, K., & Critchley, A. T. (2009). Use of Acadian marine plant extract powder from *Ascophyllum nodosum* in tissue culture of *Kappaphycus* varieties. *Journal of Applied Phycology*, 21(6), 633-639.

Hwang, S. F., Gossen, B. D., Chang, K. F., Turnbull, G. D., Howard, R. J., & Blade, S. F. (2003). Etiology, impact and control of *Rhizoctonia* seedling blight and root rot of chickpea on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Science*, 83(4), 959-967.

Hwang, S. F., Gossen, B. D., Conner, R. L., Chang, K. F., Turnbull, G. D., Lopetinsky, K., & Howard, R. J. (2007). Management strategies to reduce losses caused by *Rhizoctonia* seedling blight of field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 87(1), 145-155.

Hyakumachi, M., Mushika, T., Ogiso, Y., Toda, T., Kageyama, K., & Tsuge, T. (1998). Characterization of a new cultural type (LP) of *Rhizoctonia solani* AG2-2 isolated from warm-season turfgrasses, and its genetic differentiation from other cultural types. *Plant Pathol.* 47, 1-9.

Illera-Vives, M., López-Fabal, A., López-Mosquera, M. E., & Ribeiro, H. M. (2015). Mineralization dynamics in soil fertilized with seaweed–fish waste compost. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3047-3054.

Inderjit, S., & Gross, E. (2000). Plant phenolics: potential role in aquatic and terrestrial ecosystems. *Proceedings of the Polyphenols*.

-
- Ireland, R. J., & Lea, P. J. (1998). The Enzymes of Glutamine. Glutamate, Asparagine, and Aspartate Metabolism. In *Plant Amino Acids* (pp. 63-124). CRC Press.
- Iribarne, C., Berthou, F., Baird, S., Dréano, Y., Picard, D., Bail, J. P., Beaune, P., Ménez, J. F. (1966). Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, 1966, 9, 365-373.
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environ. Exp. Bot.* 66, 493–500.
- Ivanov, V. T. (2010). Peptides as universal biological regulators. *Herald of the Russian Academy of Sciences*, 80(5), 419-429.
- Iversen, L. L. (2008). The Science of Marijuana. Oxford: *Oxford University Press*.
- Iwata, N., & Kitanaka, S. (2011). New cannabinoid-like chromane and chromene derivatives from *Rhododendron anthopogonoides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(11), 1409-1412.
- Jacob, A., & Todd, A. R. (1940). 119. Cannabis indica. Part II. Isolation of cannabidiol from Egyptian hashish. Observations on the structure of cannabinol. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 649-653.
- Jaczewski, A. (1927). Mucnisto-rosjanye griby [Powdery mildew fungi]. *Karmannyi Opreiditel' Gribov*5(2): 412
- Jaeger, C., & Lisec, J. (2018). Statistical and multivariate analysis of MS-based plant metabolomics data. In *Plant Metabolomics* (pp. 285-296). Humana Press, New York, NY.
- Jain, S., Vaishnav, A., Kumari, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2017). Chitinolytic Bacillus-mediated induction of jasmonic acid and defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plant against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 200-214.
- Jaiswal, A. K., Elad, Y., Graber, E. R., & Frenkel, O. (2014). *Rhizoctonia solani* suppression and plant growth promotion in cucumber as affected by biochar pyrolysis temperature, feedstock and concentration. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 110-118.
- Jaiswal, A. K., Frenkel, O., Elad, Y., Lew, B., & Graber, E. R. (2015). Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the "Shifted R max-Effect". *Plant and Soil*, 395(1), 125-140.
- Jaiswal, A. K., Frenkel, O., Tsechansky, L., Elad, Y., & Graber, E. R. (2018). Immobilization and deactivation of pathogenic enzymes and toxic metabolites by biochar: a possible mechanism involved in soilborne disease suppression. *Soil Biology and Biochemistry*, 121, 59-66.
- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., ... & Ourry, A. (2013). *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 31-52.
-

-
- Jannin, L., Arkoun, M., Ourry, A., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., ... & Etienne, P. (2012). Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: involvement of N, C and S metabolisms. *Plant and Soil*, 359(1), 297-319.
- Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F. A., & Smith, S. E. (2011). Role of mycorrhizal symbioses in phosphorus cycling. In *Phosphorus in Action* (pp. 137-168). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jäpelt, K. B., Nielsen, N. J., Wiese, S., & Christensen, J. H. (2015). Metabolic fingerprinting of *Lactobacillus paracasei*: a multi-criteria evaluation of methods for extraction of intracellular metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(20), 6095-6104.
- Jarolim, K., Del Favero, G., Pahlke, G., Dostal, V., Zimmermann, K., Heiss, E., *et al.* (2017). Activation of the Nrf2-ARE pathway by the *Alternaria alternata* mycotoxins altertoxin I and II. *Archives of Toxicology*, 91, 203– 216.
- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M., & Punja, Z. K. (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*, 27(10), 1360-1366.
- Jayaraman, J., Norrie, J., & Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 353-361.
- Jentschel, K., Thiel, D., Rehn, F., & Ludwig-Müller, J. (2007). Arbuscular mycorrhiza enhances auxin levels and alters auxin biosynthesis in *Tropaeolum majus* during early stages of colonization. *Physiologia Plantarum*, 129(2), 320-333.
- Jeong, H., Jeong, D. E., Kim, S. H., Song, G. C., Park, S. Y., Ryu, C. M., ... & Choi, S. K. (2012). Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T.
- Jeong, M. H., Lee, Y. S., Cho, J. Y., Ahn, Y. S., Moon, J. H., Hyun, H. N., ... & Kim, K. Y. (2017). Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 110, 645-653.
- Jerushalmi, S., Maymon, M., Dombrovsky, A., & Freeman, S. (2020). Fungal Pathogens Affecting the Production and Quality of Medical Cannabis in Israel. *Plants*, 9(7), 882.
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., ... & Huang, J. (2019). The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 3999.
- Jiang, J., Zhang, L., Wang, X., Holm, N., Rajagopalan, K., Chen, F., & Ma, S. (2013). Highly ordered macroporous woody biochar with ultra-high carbon content as supercapacitor electrodes. *Electrochimica Acta*, 113, 481-489.
- Jiménez-Arias, D., Garcia-Machado, F. J., Morales-Sierra, S., Luis, J. C., Suarez, E., Hernández, M., ... & Borges, A. A. (2019). Lettuce plants treated with L-pyroglutamic acid increase yield under water deficit stress. *Environmental and Experimental Botany*, 158, 215-222.
-

-
- Jindo, K., Martim, S. A., Navarro, E. C., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil* 353, 209–220.
- Jithesh, M. N., Wally, O. S., Manfield, I., Critchley, A. T., Hiltz, D., & Prithiviraj, B. (2012). Analysis of seaweed extract-induced transcriptome leads to identification of a negative regulator of salt tolerance in *Arabidopsis*. *HortScience*, 47(6), 704-709.
- Johnk, J. S., Jones, R. K., Shew, H. D., & Carling, D. E. (1993). Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco. *Phytopathology*, 83(8), 854-858.
- Johnsen, M. G., Hansen, O. C., & Stougaard, P. (2010). Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. strain 4239. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-9.
- Johnson, D., & Gilbert, L. (2015). Interplant signalling through hyphal networks. *NewPhytol.* 205, 1448–1453
- Johnson, N. C., Graham, J. H. 2013. The continuum concept remains a useful framework for studying mycorrhizal functioning. *Plant Soil* 363, 411–41.
- Jolinda, M., Leitão, E. T., Gomes, C. D., Rodrigues, M. H., Valéria, F. D. O., dos Santos, G. L., & Santos, A. D. S. (2018). The initial growth of passion fruit plant irrigated with saline water and the application of biostimulants. *J. Agric. Sci*, 10, 357-363.
- Jones, S. E., Ho, L., Rees, C. A., Hill, J. E., Nodwell, J. R., & Elliot, M. A. (2017). *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *Elife*, 6, e21738.
- Jones, C. R., & Samac, D. A. (1996). Biological Control of Fungi Causing Alfalfa Seedling Damping-Off with a Disease-Suppressive Strain of *Streptomyces*. *Biological Control*, 7(2), 196-204.
- Jordan, C. J., & Xi, Z. X. (2019). Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 98, 208-220.
- Joshi, M. V., & Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 751-758.
- Julian, M. C., Debets, F., & Keijer, J. (1996). Independence of sexual and vegetative incompatibility mechanisms of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) anastomosis group 1. *Phytopathology* 86, 566 –74.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., & González-Jaén, M. T. (2008). Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2032-2036.
- Jurado, M. M., Suárez-Estrella, F., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. (2019). Bioprospecting from plant waste composting: Actinobacteria against phytopathogens producing damping-off. *Biotechnology Reports*, 23, e00354.
-

-
- Jürgensen, C. W., Madsen, A. M. (2009). Exposure to the airborne mould *Botrytis* and its health effects. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2009, 16, 183–196.
- Justesen, A. F., Yohalem, D., Bay, A., & Nicolaisen, M. (2003). Genetic diversity in potato field populations of *Thanatephorus cucumeris* AG-3, revealed by ITS polymorphism and RAPD markers. *Mycological Research* 107, 1323–31.
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2009). Fatty acid–derived signals in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 153-176.
- Kajima, M., & Piraux, M. (1982). The biogenesis of cannabinoids in *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 21(1), 67-69.
- Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2012). Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 287(24), 19786-19791.
- Kalozoumis, P., Sawas, D., Aliferis, K., Ntatsi, G., Marakis, G., Simou, E., ... & Karapanos, I. (2021). Impact of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation and Grafting on Tolerance of Tomato to Combined Water and Nutrient Stress Assessed via Metabolomics Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 814.
- Kałużewicz, A., Gąsecka, M., & Spizewski, T. (2017). Influence of biostimulants on phenolic content in broccoli heads directly after harvest and after storage. *Folia Horticulturae*, 29(2), 221.
- Kambo, H. S., & Dutta, A. (2015). A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 359-378.
- Kämpfer, P. (2006). The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy. *The Prokaryotes*, 3, 538-604.
- Kamran, M., Shahbaz, M., Ashraf, M., & Akram, N. A. (2009). Alleviation of drought -induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. *Pak. J. Bot*, 41(2), 621-632.
- Kan, C. C., Chung, T. Y., Juo, Y. A., & Hsieh, M. H. (2015). Glutamine rapidly induces the expression of key transcription factor genes involved in nitrogen and stress responses in rice roots. *BMC Genomics*, 16(1), 1-15.
- Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kim, M. J., Park, J. M., Kim, B. R., ... & Lee, I. J. (2014). Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 115-124.
- Kapoor, R., & Kaur, M. (2016). Cytokinins production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from rhizospheric soils of *Malus* and *Pyrus*. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32), 1274-1279.
- Karaca, G. H., Ozkoc, I., & Erper, I. (2002). Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates associated with bean plants grown in Samsun/Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(4), 434-437.
-

-
- Karlson, J., Borg-Karlson, A. K., Unelius, R., Shoshan, M. C., Wilking, N., Ringborg, U., & Linder, S. (1996). Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anti-Cancer Drugs*, 7(4), 422-429.
- Karniol, I. G., Shirakawa, I., Takahashi, R. N., Knobel, E., & Musty, R. E. (1975). Effects of Δ9-tetrahydrocannabinol and cannabimol in man. *Pharmacology*, 13(6), 502-512.
- Kashiwada, Y., Yamazaki, K., Ikeshiro, Y., Yamagishi, T., Fujioka, T., Mihashi, K., Lee, K. H. (2001). Isolation of rhododaurichromanic acid B and the anti-HIV principles rhododaurichromanic acid A and rhododaurichromenic acid from *Rhododendron dauricum*. *Tetrahedron*, 57(8), 1559-1563.
- Kataria, H. R., & Gisi, U. (1996). Chemical control of *Rhizoctonia* species. In: *Parmeter JJR, ed. Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Berkeley, CA, USA: California Press, 537-47.
- Kataria, H. R., & Verma, P. R. (1992). *Rhizoctonia solani* damping-off and root rot in oilseed rape and canola. *Crop Protection*, 11(1), 8-13.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., & Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J. Plant Physiol.* 20, 1-9.
- Katsuyama, S., Mizoguchi, H., Kuwahata, H., Komatsu, T., Nagaoka, K., Nakamura, H., Sakurada, S. (2013). Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β-caryophyllene-induced antinociception. *European Journal of Pain*, 17(5), 664-675.
- Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci.* 47, 261-267.
- Kaur, H., Heinzl, N., Schöttner, M., Baldwin, I. T., & Gális, I. (2010). R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology*, 152(3), 1731-1747.
- Keijer, J. (1996). The initial steps of the infection process in *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 149-162). Springer, Dordrecht.
- Kershengolts, B. M., Zhuravskaya, A. N., Filippova, G. V., Anshakova, V. V., Shein, A. A., Khlebny, E. S., et al. (2008). Innovational nano-biotechnologies in decision of problems in northern regions of Russia. *Bull. Yakut. State Univ.* 5, 20-31.
- Keunen, E. L. S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. I. M., & Cuypers, A. N. N. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, 36(7), 1242-1255.
- Khan, N., Bano, A., & Babar, M. A. (2019). Metabolic and physiological changes induced by plant growth regulators and plant growth promoting rhizobacteria and their impact on drought tolerance in *Cicer arietinum* L. *PLoS One*, 14(3), e0213040.
-

-
- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2011). Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 409-414.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *J. Plant Growth Regul.* 28(4), 386–399.
- Khan, A. L., Waqas, M., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Hamayun, M., & Lee, I. J. (2015). Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum*: An examples of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA3. *Journal of Hazardous Materials*, 295, 70-78.
- Khan, S., Yu, H., Li, Q., Gao, Y., Sallam, B. N., Wang, H., ... & Jiang, W. (2019). Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy*, 9(5), 266.
- Khan, W., Zhai, R., Souleimanov, A., Critchley, A. T., Smith, D. L., & Prithiviraj, B. (2012). Commercial extract of *Ascophyllum nodosum* improves root colonization of alfalfa by its bacterial symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(18), 2425-2436.
- Khangura, R. K., Barbetti, M. J., & Sweetingham, M. W. (1999). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species on canola. *Plant Disease*, 83(8), 714-721.
- Khanna, K., Sharma, A., Ohri, P., Bhardwaj, R., Abd_Allah, E. F., Hashem, A., & Ahmad, P. (2019). Impact of plant growth promoting rhizobacteria in the orchestration of *Lycopersicon esculentum* Mill. resistance to plant parasitic nematodes: a metabolomic approach to evaluate defense responses under field conditions. *Biomolecules*, 9(11), 676.
- Khosro M. (2012). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Resour Environ*, 2, 80–85.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics* (Vol. 291, p. 397). Norwich: John Innes Foundation.
- Kim, D. S., Lee, H. J., Jeon, Y. D., Han, Y. H., Kee, J. Y., Kim, H. J., ... & Kim, S. J. (2015). Alpha-pinene exhibits anti-inflammatory activity through the suppression of MAPKs and the NF-κB pathway in mouse peritoneal macrophages. *The American Journal of Chinese Medicine*, 43(04), 731-742.
- Kim, Y. C., Leveau, J., McSpadden Gardener, B. B., Pierson, E. A., Pierson III, L. S., & Ryu, C. M. (2011). The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1548-1555.
- Kim, E. S., Mahlberg, P. G. (2003): Secretory vesicle formation in the secretory cavity of glandular trichomes of *Cannabis sativa* L. (*Cannabaceae*). *Molecules and Cells*, 15(3), 387-395.
- Kind, T., & Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1-20
-

- Kinsella, K., Schulthess, C. P., Morris, T. F., & Stuart, J. D. (2009). Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 374-379.
- Kirchner, H. A. (1966). *Phytopathologie und Pflanzenschutz*. [Phytopathology and plant protection]. Vol. II, *Akademie Verlag*, Berlin. 617 pp.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1996). A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 8(8), 1323-1335.
- Knapp, D. R. (1979). *Handbook of analytical derivatization reaction*. Vol. 10. New York, *Wiley and Sons*. p 10.
- Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal biology*, 119(4), 179-190.
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 509-540.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 235-246.
- Kocira, S., Szparaga, A., Hara, P., Treder, K., Findura, P., Bartoš, P., & Filip, M. (2020). Biochemical and economical effect of application biostimulants containing seaweed extracts and amino acids as an element of agroecological management of bean cultivation. *Scientific Reports*, 10(1), 1-16.
- Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C., & Hankemeier, T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, 7(3), 307-328.
- Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2007). Cannabinoids in health and disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(4), 413-430.
- Kogel, R. W., Johnson, P. B., Chintam, R., Robinson, C. J., & Nemchausky, B. A. (1995). Treatment of Spasticity in Spinal Cord Injury with Dronabinol, a Tetrahydrocannabinol Derivative. *American Journal of Therapeutics*, 2(10), 799-805.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., & Roldan, A. (2007). Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*, 35(3), 480-487.
- Kohler, I., Verhoeven, A., Derks, R. J., & Giera, M. (2016). Analytical pitfalls and challenges in clinical metabolomics. *Bioanalysis*, 8(14), 1509-1532.
- Kolomazník, K., Pecha, J., Friebrová, V., Janáčková, D., & Vašek, V. (2012). Diffusion of biostimulators into plant tissues. *Heat and Mass Transfer*, 48(9), 1505-1512.
- Komatsu, S., Kobayashi, Y., Nishizawa, K., Nanjo, Y., & Furukawa, K. (2010). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids*, 39(5), 1435-1449.
-

-
- Komori, T., Fujiwara, R., Tanida, M., Nomura, J., & Yokoyama, M. M. (1995). Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*, 2(3), 174-180
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in Microbial Physiology*, 71, 97-132.
- Kong, L., Liu, J., Han, Q., Zhou, Q., & He, J. (2019). Integrating metabolomics and physiological analysis to investigate the toxicological mechanisms of sewage sludge-derived biochars to wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 185, 109664.
- Konwar, L. J., Boro, J., & Deka, D. (2014). Review on latest developments in biodiesel production using carbon-based catalysts. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 29, 546-564.
- Kopka, J., Fernie, A., Weckwerth, W., Gibon, Y., & Stitt, M. (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology*, 5(6), 1-9.
- Korte, F., Haag, M., & Claussen, U. (1965). Tetrahydrocannabinol-carbonsäure, ein neuer Haschisch-Inhaltsstoff. *Angewandte Chemie*, 77(19), 862-862.
- Korte, F. & Sieper, H. (1964). Zur chemischen klassifizierung vonpflanzen XXIV-. Untersuchung von Hashish-Inhalt sst off en durch Dunnschicht chromat ographie. *J. Chromatogr.*, 13, 90.
- Korte, F., Sieper, H., & Tira, S. (1965). New results on hashish-specific constituents. *Bull. Narcotics.*, 17, 35.
- Korth, K. L., Doege, S. J., Park, S. H., Goggin, F. L., Wang, Q., Gomez, S. K., ... & Nakata, P. A. (2006). *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology*, 141(1), 188-195.
- Kotasthane, A., Agrawal, T., Kushwah, R., & Rahatkar, O. V. (2015). In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. *European Journal of Plant Pathology*, 141(3), 523-543.
- Koulman, A., Woffendin, G., Narayana, V. K., Welchman, H., Crone, C., & Volmer, D. A. (2009). High-resolution extracted ion chromatography, a new tool for metabolomics and lipidomics using a second-generation orbitrap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(10), 1411-1418.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M., & Repčák, M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science*, 172(2), 393-399.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2007). Endocannabinoid-mediated rescue of striatal LTD and motor deficits in Parkinson's disease models. *Nature*, 445(7128), 643-647.
-

-
- Krejci, Z., Horak, M., & Santavy, F. (1958). Constitution of the cannabidiolic acid, MP 133, isolated from *Cannabis sativa*. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 16(9).
- Krejci, Z. & Santavy, F., (1955). Isolace DalSich Latek Z Listi Indick eho Konopi *Cannabis sativa* L. *Acta Univ. Palacki Olomuc. Fac. Med.*, 6, 59.
- Krishnamurthy, J., Samiyappan, R., Vidhyasekaran, P., Nakkeeran, S., Rajeswari, E., Raja, J. A. J., & Balasubramanian, P. (1999). Efficacy of *Trichoderma* chitinases against *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Journal of Biosciences*, 24(2), 207-213.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 236-246.
- Kudoyarova, G. R., Melentiev, A. I., Martynenko, E. V., Timergalina, L. N., Arkhipova, T. N., Shendel, G. V., ... & Veselov, S. Y. (2014). Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 285-291.
- Kuhnel, E., Laffan, D. D. P., Lloyd-Jones, G. C., Martinez del Campo, T., Shepperson, I. R., & Slaughter, J. L. (2007). Mechanism of methyl esterification of carboxylic acids by trimethylsilyldiazomethane. *Angewandte Chem Int*. 46, 7075-78.
- Kumar, M., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2013). The ameliorating effect of Acadian marine plant extract against ionic liquids-induced oxidative stress and DNA damage in marine macroalga *Ulva lactuca*. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 369-378.
- Kumaraswamy, G. K., Bollina, V., Kushalappa, A. C., Choo, T. M., Dion, Y., Rioux, S., ... & Faubert, D. (2011). Metabolomics technology to phenotype resistance in barley against *Gibberella zeae*. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 29-43.
- Kumari, P., Trivedi, A., Meena, S., Deora, A., & Maurya, S. (2020). Identification of *Alternaria alternata*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(2), 1011-1015.
- Kuninaga, S., Godoy-Lutz, G. and Yokosawa, R. (2002). rDNA-ITS nucleotide sequences analysis of *Thanatephorus cucumeris* AG-1 associated with web blight on common beans in Central America and Caribbean. *Jpn J Phytopathol* 68, 187.
- Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., & Yokosawa, R. (1997). Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics* 32, 237-43.
- Kuninaga, S., Sayama, A., & Yokosawa, R. (2007). *Rhizoctonia solani* strains associated with a leaf blight of tomato are classified into a new subgroup within AG-3 (Abstract in Japanese). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 73, 184.
- Kuninaga, S., & Yokosawa, R. (1984a). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kühn IV. Genetic relatedness within AG-4. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 50, 322-30.
- Kuninaga, S., & Yokosawa, R. (1984b). DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. V. Genetic relatedness within AG-6. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 50, 346-52.
- Kuninaga, S., Yokosawa, R., & Ogoshi, A. (1978). Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from non-cultivated soils. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 44, 591-8
-

- Kurabachew, H., & Wydra, K. (2014). Induction of systemic resistance and defense-related enzymes after elicitation of resistance by rhizobacteria and silicon application against *Ralstonia solanacearum* in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Crop Protection*, 57, 1-7.
- Kurepin, L. V., Zaman, M., & Pharis, R. P. (2014). Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1715-1722.
- Kusari, P., Kusari, S., Lamshöft, M., Sezgin, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2014). Quorum quenching is an antivirulence strategy employed by endophytic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7173-7183.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, 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(1), 137-151.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2017). Cannabis endophytes and their application in breeding and physiological fitness. In *Cannabis sativa L.-Botany and Biotechnology* (pp. 419-437). Springer, Cham.
- Kyrou, I., Valsamakis, G., & Tsigos, C. (2006). The endocannabinoid system as a target for the treatment of visceral obesity and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083(1), 270-305.
- La Barbera, G., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Montone, C. M., Piovesana, S., Samperi, R., ... & Laganà, A. (2017). Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for the analysis of phytochemicals in vegetal-derived food and beverages. *Food Research International*, 100, 28-52.
- La Torre, A., Battaglia, V., & Caradonia, F. (2016). An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 727-734.
- Lachhab, N., Sanzani, S. M., Adrian, M., Chiltz, A., Balacey, S., Boselli, M., ... & Poinssot, B. (2014). Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 716.
- Lai, Z., Kind, T., & Fiehn, O. (2017). Using accurate mass gas chromatography–mass spectrometry with the MINE Database for epimetabolite annotation. *Analytical Chemistry*, 89(19), 10171-10180.
- Lambers, H., Cawthray, G. R., Giavalisco, P., Kuo, J., Laliberté, E., Pearse, S. J., ... & Turner, B. L. (2012). Proteaceae from severely phosphorus-impooverished soils extensively replace phospholipids with galactolipids and sulfolipids during leaf development to achieve a high photosynthetic phosphorus-use-efficiency. *New Phytologist*, 196(4), 1098-1108.
- Latek, D., Kolinski, M., Ghoshdastider, U., Debinski, A., Bombolewski, R., Plazinska, A., ... & Filipek, S. (2011). Modeling of ligand binding to G protein coupled receptors: cannabinoid CB1, CB2 and adrenergic β 2AR. *Journal of Molecular Modeling*, 17(9), 2353-2366.
-

-
- Latz, A., Mehlmer, N., Zapf, S., Mueller, T. D., Wurzing, B., Pfister, B., ... & Becker, D. (2013). Salt stress triggers phosphorylation of the *Arabidopsis* vacuolar K⁺ channel TPK1 by calcium-dependent protein kinases (CDPKs). *Molecular Plant*, 6(4), 1274-1289.
- Latz, E., Eisenhauer, N., Rall, B. C., Allan, E., Roscher, C., Scheu, S., & Jousset, A. (2012). Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities. *Journal of Ecology*, 100(3), 597-604.
- Lauridsen, J. B. (1976). Food emulsifiers: Surface activity, edibility, manufacture, composition, and application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(6Part2), 400-407.
- Lea, P. J., Chen, Z. H., Leegood, R. C., & Walker, R. P. (2001). Does phosphoenolpyruvate carboxykinase have a role in both amino acid and carbohydrate metabolism?. *Amino Acids*, 20(3), 225-241.
- Leal-Cardoso, J. H., da Silva-Alves, K. S., Ferreira-da-Silva, F. W., dos Santos-Nascimento, T., Joca, H. C., de Macedo, F. H. P., & Barbosa, R. (2010). Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na⁺ current in dissociated dorsal root ganglia neurons. *European Journal of Pharmacology*, 645(1-3), 86-93
- Lee, Y., Chen, F., Gallego-Giraldo, L., Dixon, R. A., & Voit, E. O. (2011). Integrative analysis of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) suggests new metabolic control mechanisms for monolignol biosynthesis. *PLoS Computational Biology*, 7(5), e1002047.
- Lee, H. B., Patriarca, A. and Magan, N. (2015). *Alternaria* in food: ecophysiology, mycotoxin production and toxicology. *Mycobiology*, 43, 93– 106.
- Lee, S., Yoon, J. Y., Jung, H. I., Shin, D. Y., Hyun, K. H., & Kuk, Y. I. (2012). Ameliorative effects of squash (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) leaf extracts on oxidative stress. *Plant Growth Regulation*, 67(1), 9-17.
- Lehmann, J., & Joseph, S. (2015). *Biochar for environmental management: an introduction* (pp. 33-46). Routledge.
- Lehr, N. A., Schrey, S. D., Bauer, R., Hampp, R., & Tarkka, M. T. (2007). Suppression of plant defence response by a mycorrhiza helper bacterium. *New Phytologist*, 174(4), 892-903.
- Lemberger, L., Weiss, J. L., Watanabe, A. M., Galanter, I. M., Wyatt, R. J., & Cardon, P. V., (1972). Delta-9-tetrahydrocannabinol: Temporal correlation of the psychologic effects and blood levels after various routes of administration. *N. Engl. J. Med.*, 1972, 286, 685-688.
- Lemons, A. R., Nayak, A. P., Couch, J. R., Victory, K. R., Beezhold, D. H., Burton, N. C., & Green, B. J. (2018). Microbial hazards during harvesting and processing at an outdoor United States cannabis farm. *J. Occup. Environ. Hyg.*
- Lentz, P. (1977). Fungi and diseases of cannabis. Unpublished manuscript, notes and collected literature. *National Fungus Collections*, USDA Bldg 011A ("the bunker"), Beltsville, MD.
- Leonhardt, V., Leal-Cardoso, J. H., Lahlou, S., Albuquerque, A. A., Porto, R. S., Celedônio, N. R., ... & Coelho-de-Souza, A. N. (2010). Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. *Fundamental & clinical pharmacology*, 24(6), 749-758.
-

-
- Leveau, J. H., Uroz, S., & De Boer, W. (2010). The bacterial genus *Collimonas*: mycophagy, weathering and other adaptive solutions to life in oligotrophic soil environments. *Environmental Microbiology*, 12(2), 281-292.
- Lewis, J. R. (1964). *The Ecology of Rocky Shores*. English Universities Press, London.
- Lewis, J. A., & Lumsden, R. D. (2001). Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop protection*, 20(1), 49-56.
- Lewis, M. A., Russo, E. B., & Smith, K. M. (2018). Pharmacological foundations of cannabis chemovars. *Planta Medica*, 84(04), 225-233.
- Li, Y., Duan, T., Nan, Z., & Li, Y. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungus alleviates alfalfa leaf spots caused by *Phoma medicaginis* revealed by RNA-seq analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 547-560.
- Li, S. Z., Lu, X. U., Ma, P., Gao, S. G., Liu, X. Z., & Liu, G. (2005). Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton verticillium wilt in field trials. *Acta Phytopathol Sinica*, 35(5), 451-455.
- Liang, Z., Luo, J., Wei, B., Liao, Y., & Liu, Y. (2021). Trehalose can alleviate decreases in grain number per spike caused by low-temperature stress at the booting stage by promoting floret fertility in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 207(4), 717-732
- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1375-1387.
- Lim, P. O., Woo, H. R., & Nam, H. G. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 8(6), 272-278.
- Lima, N. G., De Sousa, D. P., Pimenta, F. C. F., Alves, M. F., De Souza, F. S., Macedo, R. O., & de Almeida, R. N. (2013). Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 450-454.
- Lin, Q., Zhang, L., Riaz, M., Zhang, M., Xia, H., Lv, B., & Jiang, C. (2018). Assessing the potential of biochar and aged biochar to alleviate aluminum toxicity in an acid soil for achieving cabbage productivity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 290-295.
- Lisker, N., Katan, J., & Henis, Y. (1975). Sequential production of polygalacturonase, cellulase, and pectin lyase by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(9), 1298-1304.
- Liu, Y. R., & Ai, T. (2020). Plastic bronchitis associated with *Botrytis cinerea* infection in a child: A case report. *World Journal of Clinical Cases*, 8(20), 5019.
- Liu, N., Charrua, A. B., Weng, C. H., Yuan, X., & Ding, F. (2015). Characterization of biochars derived from agriculture wastes and their adsorptive removal of atrazine from aqueous solution: A comparative study. *Bioresource Technology*, 198, 55-62.
-

-
- Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, Z. M., Shi, Z. Y., Zhen, Y. Z., *et al.* (1991). Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Scientific Publications*, (151), 258–262
- Liu, Z., & Sinclair, J. B. (1991). Isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2-2 pathogenic to soybean. *Plant Disease* 75, 682–7.
- Llanes, A., Andrade, A., Alemano, S., & Luna, V. (2018). Metabolomic approach to understand plant adaptations to water and salt stress. In *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress* (pp. 133-144). Academic Press.
- Lola-Luz, T., Hennequart, F., & Gaffney, M. (2013). Enhancement of phenolic and flavonoid compounds in cabbage (*Brassica oleraceae*) following application of commercial seaweed extracts of the brown seaweed, (*Ascophyllum nodosum*). *Agricultural and Food Science*, 22(2), 288-295.
- Lorente, M., Carracedo, A., Torres, S., Natali, F., Egia, A., Hernández-Tiedra, S., & Velasco, G. (2009). Amphiregulin is a factor for resistance of glioma cells to cannabinoid-induced apoptosis. *Glia*, 57(13), 1374-1385.
- Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., & Kubicek, C. P. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6382-6385.
- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., & Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83(3), 302-307.
- Lorito, M., & Woo, S. L. (2015). *Trichoderma*: a multi-purpose tool for integrated pest management. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 345-353). Springer, Cham.
- Louis, B. W. S. (2018). *Cannabis A Clinician's Guide*, p. 288. CRC Press, Boca Raton
- Loureiro, R. R., Reis, R. P., Berrogain, F. D., & Critchley, A. T. (2012). Extract powder from the brown alga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis (AMPEP): a “vaccine-like” effect on *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex PC Silva. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 427-432.
- Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., ... & Michael, A. J. (2009). A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed. *The Plant Cell*, 21(1), 318-333.
- Luo, X., Reiter, M. A., d'Espaux, L., Wong, J., Denby, C. M., Lechner, A., ... & Keasling, J. D. (2019). Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast. *Nature*, 567(7746), 123-126.
- Lv, Y., Liu, X., Yan, S., Liang, X., Yang, Y., Dai, W., & Zhang, W. (2010). Metabolomic study of myocardial ischemia and intervention effects of Compound Danshen Tablets in rats using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(1), 129-135.
- Ma, J. F., Hiradate, S., & Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, 117(3), 753-759.
-

- Ma, N. L., Rahmat, Z., & Lam, S. S. (2013). A review of the “omics” approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 7515-7541.
- Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H., & Hiradate, S. (1997). Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature*, *390*(6660), 569-570.
- Mackie, K. (2008). Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*, *20*, 10-14.
- MacKinnon, S. L., Hiltz, D., Ugarte, R., & Craft, C. A. (2010). Improved methods of analysis for betaines in *Ascophyllum nodosum* and its commercial seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, *22*(4), 489-494.
- MacNish, G. C., Carling, D. E., & Brainard, K. A. (1993). Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme (zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology* *83*, 922–7.
- MacNish, G. C., Carling, D. E., Sweetingham, M. W., Ogoshi, A., & Brainard, K. A. (1995). Characterization of anastomosis group-10 (AG-10) of *Rhizoctonia solani*. *Australasian Journal of Plant Pathology* *24*, 252–60.
- Madan, S., Nainawatee, H. S., Jain, R. K., & Chowdhury, J. B. (1995). Proline and proline metabolising enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annals of Botany*, *76*(1), 51-57.
- Madigan, M. T., & Martinko, J. (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th edn.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Madslie, E. H., Rønning, H. T., Lindbäck, T., Hassel, B., Andersson, M. A., & Granum, P. E. (2013). Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(4), 1068-1080.
- Magagnini, G., Grassi, G., & Kotiranta, S. (2018). The effect of light spectrum on the morphology and cannabinoid content of *Cannabis sativa* L. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, *1*(1), 19-27.
- Mahadevan, B., & Crawford, D. L. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology*, *20*(7), 489-493.
- Mahadevan, A., Siegel, C., Martin, B. R., Abood, M. E., Beletskaya, I., & Razdan, R. K. (2000). Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *43*(20), 3778-3785.
- Mahall, B. E., & Callaway, R. M. (1992). Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs. *Ecology*, *73*(6), 2145-2151.

-
- Mahmoudi, E., Tabatabaei, B. E. S., & Venturi, V. (2011). Virulence attenuation of *Pectobacterium carotovorum* using N-acyl-homoserine lactone degrading bacteria isolated from potato rhizosphere. *The Plant Pathology Journal*, 27(3), 242-248.
- Maia, M., Ferreira, A. E., Nascimento, R., Monteiro, F., Traquete, F., Marques, A. P., ... & Silva, M. S. (2020). Integrating metabolomics and targeted gene expression to uncover potential biomarkers of fungal/oomycetes-associated disease susceptibility in grapevine. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15.
- Maini, P. (2006). The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum*, 1(1), 29-43
- Malec, J., Harvey, R. F., Cayner, J. J. (1982). Cannabis effect on spasticity in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil. Mar*, 63(3): 116-118.
- Marcel, T. C., Gorguet, B., Ta, M. T., Kohutova, Z., Vels, A., & Niks, R. E. (2008). Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytologist* 177, 743–55.
- Marchini, M., Charvoz, C., Dujourdy, L., Baldovini, N., & Filippi, J. J. (2014). Multidimensional analysis of cannabis volatile constituents: Identification of 5, 5-dimethyl-1-vinylbicyclo [2.1. 1] hexane as a volatile marker of hashish, the resin of *Cannabis sativa* L. *Journal of Chromatography A*, 1370, 200-215.
- Marcus, L., Barash, I., Sneh, B., Koltin, Y., Finkler, A. (1986). Purification and characterization of pectinolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Physiol Mol Plant Pathol* 29, 325-336.
- Marles, M. S., Ray, H., & Gruber, M. Y. (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64(2), 367-383.
- Marroig, R. G., Loureiro, R. R., & Reis, R. P. (2016). The effect of *Ascophyllum nodosum* (Ochrophyta) extract powder on the epibiosis of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) commercially cultivated on floating rafts. *J Appl Phycol*, 28, 2471-2477.
- Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., & Prat, S. (2016). Gibberellins and plant vegetative growth. *Annu. Plant Rev*, 49, 285-322.
- Martynenko, A., Shotton, K., Astatkie, T., Petrash, G., Fowler, C., Neily, W., & Critchley, A. T. (2016). Thermal imaging of soybean response to drought stress: the effect of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract. *Springerplus*, 5(1), 1-14.
- Marx, D., Metzger, J., Pejchinovski, M., Gil, R. B., Frantzi, M., Latosinska, A., ... & Herget-Rosenthal, S. (2018, January). Proteomics and metabolomics for AKI diagnosis. In *Seminars in Nephrology* (Vol. 38, No. 1, pp. 63-87). WB Saunders.
- Mathesius, U. (2003). Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes—the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. In *Roots: The dynamic interface between plants and the earth* (pp. 105-119). Springer, Dordrecht.
-

- Matros, A., Peshev, D., Peukert, M., Mock, H. P., & Van den Ende, W. (2015). Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 82(5), 822-839.
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (2006). Peptide hormones in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 649-674.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561-564.
- Matsumoto, T., Yamamoto, W., & Hirane S, (1932). Physiology and parasitology of the fungi generally referred to as *Hypochnus sasakii Shirai*: differentiation of the strains by means of hyphal fusion and culture in differential media. *Journal of the Society of Tropical Agriculture* 4, 370–88.
- Matsuzaki, F., Shimizu, M., & Wariishi, H. (2008). Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2342-2350.
- Matthew, J., & Whisson, D. (1995). DNA probe specific to *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8. *Mycological Research*, 99(6), 745-750
- Mattner, S. W., Milinkovic, M., & Arioli, T. (2018). Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2943-2951.
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., & Mohanty, P. (2002). Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 525-532.
- Maurer, M., Henn, V., Dittrich, A., & Hofmann, A. (1990). Delta-9-tetrahydrocannabinol shows antispastic and analgesic effects in a single case double-blind trial. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 240(1), 1-4.
- Mauseth, J. D. (2006). Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, 98(5), 901-926.
- Maymon, M., Jerushalmi, S., & Freeman, S. (2020). First report of *Golovinomyces cichoracearum sensu lato* on *Cannabis sativa* in Israel. *New Disease Reports*, 42, 11-11.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., & Casquero, P. A. (2015). Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 685.
- McCormack, A. W., Woodhall, J. W., Back, M. A., & Peters, J. C. (2013). *Rhizoctonia solani* AG3-PT infecting maize stem bases and roots in the United Kingdom. *New Disease Reports*, 27, 22-22.
- McDonald, B. A., & McDermott, J. M. (1993). Population genetics of plant pathogenic fungi. *BioScience* 43, 311–9.
-

-
- McDougal, P. G., & Schmuff, N. R. (1985). Chemical synthesis of the trichothecenes. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 153-219.
- McPartland, J. M. (1983). Fungal pathogens of *Cannabis sativa* in Illinois. *Phytopathology* 72, 797
- McPartland, J. M. (1983). *Phomopsis ganjae* sp. nov. on *Cannabis sativa*. *Mycotaxon* 18(2), 527-530.
- McPartland, S. M. (1991). Common names for diseases of *Cannabis sativa* L. *Plant Dis.* 75, 226–227.
- McPartland, J. M. (1992). A review of *Cannabis* diseases. *J. Intern. Hemp. Assoc.* 3, 19–23.
- McPartland, J. M. (1995c). *Cannabis* pathogens X: *Phoma*, *Ascophyta* and *Didymella* species. *Mycologia* 86, 870-878.
- McPartland, J. M. (1995). *Cannabis* pathogens XI: *Septoria* spp. on *Cannabis sativa* sensu stricto. *Sydowia* 47(1), 44-53.
- McPartland, J. M., Clarke, R. C., & Watson, D. P. (2000). *Hemp diseases and pests: management and biological control: an advanced treatise*. CABI.
- McPartland, J. M., Clarke, R. C., Watson, D. P. (2017). *Hemp Diseases and Pests: Management and Biological Control—An Advanced Treatise*; CABI:Wallingford, UK, 2017; ISBN 9780851994543.
- McPartland, J. M., & Cubeta, M. A. (1997). New species, combinations, host associations and location records of fungi associated with hemp (*Cannabis sativa*). *Mycological Research*, 101(7), 853-857.
- McPartland, J. M., & Hillig, K. W. (2008). Differentiating powdery mildew from false powdery mildew. *Journal of Industrial Hemp*, 13(1), 78-87.
- McPartland, J. M. & Hughes, S. (1994). *Cannabis* pathogens VII: a new species, *Schiffnerula cannabis*. *Mycologia* 86, 867-869.
- McPartland, J. M., & McKernan, K. J. (2017). Contaminants of concern in cannabis: microbes, heavy metals and pesticides. In *Cannabis sativa* L. -*Botany and Biotechnology* (pp. 457-474). Springer, Cham.
- Mechoulam, R. (1970). Marihuana chemistry. *Science*, 168, 1159.
- Mechoulam, R. (1973). Marihuana. *Academic Press*, New York.
- Mechoulam, R., Ben-Zvi, Z., Yagnitinsky, B., & Shani, A. (1969). A new tetrahydrocannabinolic acid. *Tetrahedron Letters*, 10(28), 2339-2341.
- Mechoulam, R. & Gaoni, T. (1965). Hashish. II-. The isolation and structure of *Proc. Ciieni. Soc.*, p. 82. cannabinolic, cannabidiolic, and cannabigerolic acids. *Tetrahedron.*, 21, 122
-

- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1967). Recent advances in the chemistry of hashish. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products/Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles* (pp. 175-213). Springer, Vienna.
- Mechoulam, R. & Shvo, Y. (1963). Hashish-I. The Structure of Cannabidiol. *Tetrahedron.*, 19, 2073.
- Meehan-Atrash, J., Luo, W., & Strongin, R. M. (2017). Toxicant formation in dabbing: the terpene story. *ACS Omega*, 2(9), 6112-6117.
- Mehari, Z. H., Elad, Y., Rav-David, D., Graber, E. R., & Harel, Y. M. (2015). Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant and Soil*, 395(1), 31-44.
- Meier, C., & Mediavilla, V. (1998). Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *J. Int. Hemp Assoc*, 5(1), 16-20.
- Melhus, A., Seip, K. L., Seip, H. M., & Myklestad, S. (1978). A preliminary study of the use of benthic algae as biological indicators of heavy metal pollution in Sør fjorden, Norway. *Environ. Pollut.* 15 (2), 101107.
- Memedovich, K. A., Dowsett, L. E., Spackman, E., Noseworthy, T., & Clement, F. (2018). The adverse health effects and harms related to marijuana use: an overview review. *CMAJ Open*, 6(3), E339.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., van der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Meng, P. H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., ... & Bergounioux, C. (2009). Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in Arabidopsis. *PLoS One*, 4(10), e7364.
- Messina, F., Rosati, O., Curini, M., & Marcotullio, M. C. (2015). Cannabis and bioactive cannabinoids. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 45, pp. 17-57). Elsevier.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Algal extracts: Technology and advances. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 581-591
- Michell, R. H. (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 151-161.
- Midgley, D. J., Chambers, S. M., & Cairney, J. W. G. (2002). Spatial distribution of fungal endophyte genotypes in a *Woollsia pungens* (Ericaceae) root system. *Australian Journal of Botany*. 50 (5), 559
- Minguet, E. G., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2014). Gibberellin implication in plant growth and stress responses. In *Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications* (pp. 119-161). Springer, New York, NY.
-

-
- Miozzi, L., Vaira, A. M., Catoni, M., Fiorilli, V., Accotto, G. P., & Lanfranco, L. (2019). Arbuscular mycorrhizal symbiosis: plant friend or foe in the fight against viruses?. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1238.
- Misawa, T., Komatsu, T., & Tsuji, H. (2013). Damping-off of carrot caused by *Rhizoctonia solani* AG-1 I C. *Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan*, (64), 76-80.
- Misawa, T., & Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76(5), 310-319.
- Mishra, J., Fatima, T., & Arora, N. K. (2018). Role of secondary metabolites from plant growth-promoting rhizobacteria in combating salinity stress. In *Plant Microbiome: Stress Response* (pp. 127-163). Springer, Singapore.
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill Jr, A. H., Rothman, K. J., & Hendricks, K. A. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border. *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 237-241.
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017-2038.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R., & Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3(2), 87-103.
- Mohan, D., Sarswat, A., Ok, Y. S., & Pittman Jr, C. U. (2014). Organic and inorganic contaminants removal from water with biochar, a renewable, low cost and sustainable adsorbent—a critical review. *Bioresource Technology*, 160, 191-202.
- Mohiuddin, M. M., Mizubuti, G. B., Haroutounian, S., Smith, S. M., Rice, A. S., Campbell, F., & Gilron, I. (2020). Adherence to Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) guidelines for reporting safety outcomes in trials of medical cannabis and cannabis-based medicines for chronic noncancer pain: a systematic review. *The Clinical Journal of Pain*, 36(4), 302-319.
- Mojsak, P., Rey-Stolle, F., Parfieniuk, E., Kretowski, A., & Ciborowski, M. (2020). The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113617.
- Mole Jr, M. L., & Turner, C. E. (1974). Phytochemical screening of *Cannabis sativa* L. I: Constituents of an indian variant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(1), 154-156.
- Mole Jr, M. L., Turner, C. E. & Henry, J. T. (1974). Δ9-tetrahydrocannabinolic acid "B" from an Indian variant of *Cannabis sativa*. U.N. Secretariat Document ST/SOA/SER.S/48.
- Moliszewska, E., Nabrdalik, M., & Ziembik, Z. (2020). *Rhizoctonia solani* AG 11 is isolated for the first time from sugar beet in Poland. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1863-1870.
-

-
- Möller, M., & Smith, M. L. (1998). The significance of the mineral component of seaweed suspensions on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedling growth. *Journal of Plant Physiology*, 153(5-6), 658-663.
- Montealegre, J., Valderrama, L., Sánchez, S., Herrera, R., Besoain, X., & Pérez, L. M. (2010). Biological control of *Rhizoctonia solani* in tomatoes with *Trichoderma harzianum* mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(2), 1-2.
- Moore, J. P., Westall, K. L., Ravenscroft, N., Farrant, J. M., Lindsey, G. G., & Brandt, W. F. (2005). The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3, 4, 5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. *Biochemical Journal*, 385(1), 301-308.
- Moreira, R., Sineiro, J., Chenlo, F., Arufe, S., & Díaz-Varela, D. (2017). Aqueous extracts of *Ascophyllum nodosum* obtained by ultrasound-assisted extraction: effects of drying temperature of seaweed on the properties of extracts. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 3191-3200.
- Moreno, G. (2017). THCA and CBDA: More than simply inactive precursors. In Abstracts of Papers Of The American Chemical Society (Vol. 253). 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA: AMER CHEMICAL SOC.
- Moreno Barriga, F. M. (2016). Organic matter dynamics and soil aggregation in a technosol created with metalliferous mine residues, biochar and marble waste.
- Morgan, J., Wannemuehler, K. A., Marr, K. A., Hadley, S., Kontoyiannis, D. P., Walsh, T. J., & Warnock, D. W. (2005). Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Medical Mycology*, 43(Supplement_1), S49-S58.
- Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., & Shoyama, Y. (1997). nzymological evidence for cannabichromenic acid biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 60, 854–857.
- Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., & Shoyama, Y. (1998). Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 49, 1525–1529.
- Morita, A., Yanagisawa, O., Maeda, S., Takatsu, S., & Ikka, T. (2011). Tea plant (*Camellia sinensis* L.) roots secrete oxalic acid and caffeine into medium containing aluminum. *Soil Science and Plant Nutrition*, 57(6), 796-802.
- Morita, A., Yanagisawa, O., Takatsu, S., Maeda, S., & Hiradate, S. (2008). Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry*, 69(1), 147-153.
- Morton, O. (1994). Marine Algae of Northern Ireland. *Ulster Museum, Belfast. ISBN 978-0-900761-28-7.*
- Mubarik, S., Saeed, A., Athar, M. M., & Iqbal, D. M. (2016). Characterization and mechanism of the adsorptive removal of 2, 4, 6-trichlorophenol by biochar prepared from sugarcane baggase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 115-121.
-

-
- Muchembled, J., Sahraoui, A. L. H., Grandmougin-Ferjani, A., & Sancholle, M. (2006). Changes in lipid composition of *Blumeria graminis* f. sp. tritici conidia produced on wheat leaves treated with heptanoyl salicylic acid. *Phytochemistry*, 67(11), 1104-1109.
- Mudge, E. M., Brown, P. N., & Murch, S. J. (2019). The Terroir of Cannabis: terpene metabolomics as a tool to understand *Cannabis sativa* selections. *Planta Medica*, 85(09/10), 781-796.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2012). *Trichoderma* research in the genome era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51,105–129.
- Müller, J., Boller, T., & Wiemken, A. (1995). Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, 112(1), 1-9.
- Müller, J., Xie, Z. P., Staehelin, C., Mellor, R. B., Boller, T., & Wiemken, A. (1994). Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia Plantarum*, 90(1), 86-92.
- Müller-Vahl, K. R., Kolbe, H., Dengler R. (1997). Gilles de la Tourette syndrome. Effect of nicotine, alcohol and marijuana on clinical symptoms. *Der Nervenarzt* 68 (12): 985–9. PMID 9465342
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Murari, G., Puccini, A. M., Sanctis, R. D., & Lombardi, S. (1983). Influence of environmental conditions on tetrahydrocannabinol (Delta (9) TCH) in different cultivars on *Cannabis sativa* L. *Fitoterapia (Italy)*.
- Murgia, F., Muroli, A., Puligheddu, M., Polizzi, L., Barberini, L., Orofino, G., ... & Marrosu, F. (2017). Metabolomics as a tool for the characterization of drug-resistant epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 8, 459.
- Murillo-Rodriguez, E., Pandi-Perumal, S. R., & Monti, J. M. (Eds.). (2021). *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders. Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Murphy, A. M., Otto, B., Brearley, C. A., Carr, J. P., & Hanke, D. E. (2008). A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *The Plant Journal*, 56(4), 638-652.
- Murray, G. M., & Brennan, J. P. (2009). Estimating disease losses to the Australian wheat industry. *Aust. Plant Pathol.* 38, 558–570.
- Murray, G. M., & Brennan, J. P. (2010). Estimating disease losses to the Australian barley industry. *Aust. Plant Pathol.* 39, 85–96.
- Muyolo, N. G., Lipps, P. E., & Schmitthenner, A. F. (1993). Anastomosis grouping and variation in virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* associated with dry bean and soybean in Ohio and Zaire. *Phytopathology*, 83(4), 438-444.
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances*, 32(2), 429-448.
-

- Nair, K. R., & Ponnappa, K. M. (1974). Survey for Natural Enemies of *Cannabis sativa* and *Papaver somniferum*. *Common wealth Institute of Biological Control, India Station Report*, pp 39-40.
- Najar, G. R., Ganie, M. A., & Tahir, A. L. I. (2015). Biochar for sustainable soil health: a review of prospects and concerns. *Pedosphere*, 25(5), 639-653.
- Nakamura, A., Fujiwara, S., Matsumoto, I., & Abe, K. (2009). Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(12), 5480-5485.
- Nakata, P. A. (2012). Plant calcium oxalate crystal formation, function, and its impact on human health. *Frontiers in Biology*, 7(3), 254-266.
- Nam, M. H., Bang, E., Kwon, T. Y., Kim, Y., Kim, E. H., Cho, K., ... & Yoon, I. S. (2015). Metabolite profiling of diverse rice germplasm and identification of conserved metabolic markers of rice roots in response to long-term mild salinity stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21959-21974.
- Nandal, M., & Hooda, R. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria: A review article. *IJCR*, 12, 3863.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18-23.
- Nassar, A. F., Wu, T., Nassar, S. F., & Wisnewski, A. V. (2017). UPLC–MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research. *Drug Discovery Today*, 22(2), 463-470.
- Neate, S. M., & Warcup, J. H. (1985). Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Transactions of the British Mycological Society* 85, 615–20.
- Nelson, B., Helms, T., Christianson, T., & Kural, I. (1996). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* from soybean. *Plant Disease* 80,74–80.
- Nelson, S. K., & Steber, C. M. (2016). Gibberellin hormone signal perception: down-regulating DELLA repressors of plant growth and development. *Annu. Plant Rev*, 49, 153-188.
- Nephali, L., Moodley, V., Piater, L., Steenkamp, P., Buthelezi, N., Dubery, I., ... & Tugizimana, F. (2021). A metabolomic landscape of maize plants treated with a microbial biostimulant under well-watered and drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12, 977.
- Nguyen, T. T. N., Wallace, H. M., Xu, C. Y., Xu, Z., Farrar, M. B., Joseph, S., ... & Bai, S. H. (2017). Short-term effects of organo-mineral biochar and organic fertilisers on nitrogen cycling, plant photosynthesis, and nitrogen use efficiency. *Journal of Soils and Sediments*, 17(12), 2763-2774.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K., & Monte, E. (2014). *Trichoderma* genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Sci*. 228, 71–78.

-
- Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N., & Bandh, S. A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial Pathogenesis*, 82, 50-59.
- Niu, D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H. L., & Guo, J. H. (2011). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(5), 533-542.
- Norman, D. J., & Ali, S. (2013). Ornamental Ficus Diseases: Identification and Control in Commercial Greenhouse Operations. *EDIS*, 2013(8).
- Norman, D. J., & Ali, G. S. (2018). Pothos (*Epipremnum aureum*) Diseases: Identification and Control in Commercial Greenhouse Production: PP340, 7/2018. *EDIS*, 2018(4).
- Norrie, J., Branson, T., & Keathley, P. E. (2001, September). Marine plant extracts impact on grape yield and quality. In *International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants 594* (pp. 315-319).
- Norrie J., & Hiltz D. A. (1999). Seaweed Extract Research and Applications in Agriculture. Agro Food Industry Hi-tech.
- Noviello, C. (1957). Segnalazione di *Verticillium* sp. su *Cannabis sativa*. *Ricerche, Osserv. e Divulg. Fitopatol. per la Campania ed il Mezzogiorno* 13-14, 161-163.
- Nuutinen, T. (2018). Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 198-228.
- Nykter, M. (2006). Microbial quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) and Flax (*Linum usitatissimum* L.) From plants to thermal insulation. *Engineering*.
- Obata, Y., & Ishikawa, Y. (1966). Studies on the constituents of hemp plant (*Cannabis sativa* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(6), 619-620.
- Ogoshi, A. (1972). Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn with hyphal anastomosis. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 38, 117-22.
- Ogoshi A. (1975). Grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn and their perfect states. *Review of Plant Protection Research* 8, 93-103.
- Ogoshi A. (1984). Studies on the taxonomy of the genus *Rhizoctonia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50, 307-9.
- Ogoshi, A. (1987). Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology*. 25, 125-143.
- Ogoshi, A., Cook, R. J., & Bassett, E. N. (1990). *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80(9), 784-788.
-

-
- Oikawa, A., Nakamura, Y., Ogura, T., Kimura, A., Suzuki, H., Sakurai, N., ... & Ohta, D. (2006). Clarification of pathway-specific inhibition by Fourier transform ion cyclotron resonance/mass spectrometry-based metabolic phenotyping studies. *Plant Physiology*, 142(2), 398-413.
- Okada, T., Nakamura, Y., Kanaya, S., Takano, A., Malla, K. J., Nakane, T., ... & Sekita, S. (2009). Metabolome analysis of *Ephedra* plants with different contents of ephedrine alkaloids by using UPLC-Q-TOF-MS. *Planta Medica*, 75(12), 1356-1362.
- Okazaki, Y., & Saito, K. (2014). Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *The Plant Journal*, 79(4), 584-596.
- Okubara, P. A., Dickman, M. B., & Blechl, A. E., (2014a). Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Science* 228, 61–70.
- Okumura, N., Yoshida, H., Nishimura, Y., Kitagishi, Y., & Matsuda, S. (2012). Terpinolene, a component of herbal sage, downregulates AKT1 expression in K562 cells. *Oncology Letters*, 3(2), 321-324.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1-16.
- Olishevskaya, S., Nickzad, A., & Déziel, E. (2019). Bacillus and Paenibacillus secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1189-1215.
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., & Canellas, L. P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Sci.Hortic.* 183, 100–108.
- Oliveira, A. D., Urquiaga, S., Döbereiner, J., & Baldani, J. I. (2002). The effect of inoculating endophytic N 2-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 242(2), 205-215.
- Omidbakhshfard, M. A., Sujeeth, N., Gupta, S., Omranian, N., Guinan, K. J., Brotman, Y., ... & Gechev, T. S. (2020). A biostimulant obtained from the seaweed *Ascophyllum nodosum* protects *Arabidopsis thaliana* from severe oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 474.
- Ondrej, M. (1991). Vyskyt hub na stoncich konopi (*Cannabis sativa* L.). Len a Konopi (Sumperk, Czech Rep) 21, 51-57
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125.
- Orsák, M., Kotíková, Z., Hnilička, F., & Lachman, J. (2021). Effect of drought and waterlogging on saccharides and amino acids content in potato tubers. *Plant, Soil and Environment*, 67(7), 408-416.
- Orsi, R. B., Dilkin, P., Xavier, J. G., Aquino, S., Rocha, L. O., & Corrêa, B. (2009). Acute toxicity of a single gavage dose of fumonisin B1 in rabbits. *Chemico-Biological Interactions*, 179(2-3), 351-355.
-

- Ortiz-Castro, R., Contreras-Comejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 701-712.
- Osmond, C. B., & Laties, G. G. (1969). Compartmentation of malate in relation to ion absorption in beet. *Plant Physiology*, 44(1), 7-14.
- Ottersen, T., Aasen, A., El-Feraly, F. S., & Turner, C. E. (1976). X-ray structure of cannabispiran: A novel cannabis constituent. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (15), 580-581.
- Oudemans CAJA. (1920). *Enumeratio Systematica Fungorum II:945-947*. Comitum, The Hahue.
- Ozbay, N., & Newman, S. E. (2004). Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(4), 478-484.
- Pacher, P., & Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system?. *Progress in Lipid Research*, 50(2), 193-211.
- Pacula, R. L., & Smart, R. (2017). Medical marijuana and marijuana legalization. *Annual Review of Clinical Psychology*, 13, 397-419.
- Page, J. E., & Boubakir, Z. (2012). Aromatic prenyltransferase from Cannabis. U.S. Patent No. 2012/0144523 A1.
- Page, J. E., & Gagne, S. (2013). Genes and proteins for aromatic polyketide synthesis. U.S. Patent No. 2013/0067619 A1.
- Pagnani, G., Pellegrini, M., Galieni, A., D'Egidio, S., Matteucci, F., Ricci, A., ... & Del Gallo, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. *Industrial Crops and Products*, 123, 75-83.
- Pál, M., Tajti, J., Szalai, G., Peeva, V., Végh, B., & Janda, T. (2018). Interaction of polyamines, abscisic acid and proline under osmotic stress in the leaves of wheat plants. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.
- Palmer, J. K. (1956). Occurrence of D-glyceric acid in tobacco leaves. *Science*, 123(3193), 415-415.
- Pandya, N. D., & Desai, P. V. (2014). Screening and characterization of GA3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(5), 110-115.
- Panjehkeh, N., & Abkhoo, J. (2016). Influence of marine brown alga extract (Dalgin) on damping-off tolerance of tomato. *J. Mater. Environ. Sci*, 7, 2369-2374.
- Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., & Paplomatas, E. J. (2010). Insights into the role of ethylene perception in tomato resistance to vascular infection by *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology*, 59(1), 130-138.

Paradikovic, N., Vinkovic, T., Vrcek, I., & Tkalec, M. (2013). Natural biostimulants reduce the incidence of BER in sweet yellow pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Agricultural and Food Science*.

Parmeter J. R., Sherwood R. T., & Platt W. D. (1969). Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59, 1270–8.

Parmeter, J. R., & Whitney, H. S. (1970). Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: Parmeter J.R, ed. *Rhizoctonia solani*, Biology and Pathology. Berkeley, C.A, USA: *University of California Press*, 7–19.

Parmeter, J. R., Whitney, H. S., & Platt, W. D. (1967). Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57, 218–23.

Parrado, J., Bautista, J., Romero, E. J., García-Martínez, A. M., Friaza, V., & Tejada, M. (2008). Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer. *Bioresource Technology*, 99(7), 2312-2318.

Pascual, C. B., Raymundo, A. D., & Hyakumachi, M. (2000). Efficacy of hypovirulent binucleate *Rhizoctonia* sp. to control banded leaf and sheath blight in corn. *Journal of General Plant Pathology*, 66(1), 95-102.

Patel, S., Ahmed, S., & Eswari, J. S. (2015). Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1177-1193.

Patier, P., Potin, P., Rochas, C., Kloareg, B., Yvin, J. C., & Liénart, Y. (1995). Free or silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. *Plant Science*, 110(1), 27-35.

Patschk, K., Gottwald, R & Muller, R. (1997). Erste Ergebnisse phytopathologischer Beobachtungen im Hanfanbau im Land Brandenburg [First results of phytopathological observations in hemp cultivation in the state of Brandenburg]. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 49, 286-290.

Patsos, H. A., Hicks, D. J., Dobson, R. R., Greenhough, A., Woodman, N., Lane, J. D., Paraskeva, C. (2005). The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2. *Gut*, 54(12), 1741-1750.

Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220.

Paul, K., Sorrentino, M., Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., ... & Colla, G. (2019). A combined phenotypic and metabolomic approach for elucidating the biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate on tomato grown under limited water availability. *Frontiers in Plant Science*, 10, 493.

Pauling, L., Robinson, A. B., Teranishi, R., & Cary, P. (1971). Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(10), 2374-2376.

-
- Paulitz, T. C., Schroeder, K. L., & Schillinger, W. F. (2010). Soilborne pathogens of cereals in an irrigated cropping system: effects of tillage, residue management, and crop rotation. *Plant Dis.* 94, 61–68.
- Peana, A. T., Rubattu, P., Piga, G. G., Fumagalli, S., Boatto, G., Pippia, P., & De Montis, M. G. (2006). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. *Life Sciences*, 78(21), 2471-2474.
- Peč, J., Flores-Sanchez, I. J., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic analysis of elicited cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. by ¹H-NMR spectroscopy. *Biotechnology Letters*, 32(7), 935-941.
- Pecha, J., Fürst, T., Kolomazník, K., Friebrová, V., & Svoboda, P. (2012). Protein biostimulant foliar uptake modeling: the impact of climatic conditions. *AIChE Journal*, 58(7), 2010-2019.
- Peña, P. A., Steadman, J. R., Eskridge, K. M., & Urrea, C. A. (2013). Identification of sources of resistance to damping-off and early root/hypocotyl damage from *Rhizoctonia solani* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Protection*, 54, 92-99.
- Penha, R. O., Vandenberghe, L. P., Faulds, C., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2020). *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta*, 251(3), 1-15.
- Penton, C. R., Gupta, V. V. S. R., Tiedje, J. M., Neate, S. M., Ophel-Keller, K., Gillings, M., ... & Roget, D. K. (2014). Fungal community structure in disease suppressive soils assessed by 28S LSU gene sequencing. *PLoS One*, 9(4), e93893.
- Pépin, N., Punja, Z. K., & Joly, D. L. (2018). Occurrence of powdery mildew caused by *Golovinomyces cichoracearum sensu lato* on *Cannabis sativa* in Canada. *Plant Disease*, 102(12), 2644-2644.
- Pereira, C., Dias, M. I., Petropoulos, S. A., Plexida, S., Chrysargyris, A., Tzortzakis, N., ... & CFR Ferreira, I. (2019). The effects of biostimulants, biofertilizers and water-stress on nutritional value and chemical composition of two spinach genotypes (*Spinacia oleracea* L.). *Molecules*, 24(24), 4494.
- Perrone, G., & Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, 33-49.
- Pertwee, R. G. (1988). The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. *Pharmacol. Ther.* 36:189–261
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin". *British Journal of Pharmacology*. 153 (2): 199–215. doi: 10.1038/sj.bjp.0707442
- Peschel, W., & Politi, M. (2015). ¹H NMR and HPLC/DAD for *Cannabis sativa* L. chemotype distinction, extract profiling and specification. *Talanta*, 140, 150-165.
-

Petit, F., Jeantaud, B., Reibaud, M., Imperato, A., Dubroeuq, M. C. (1998). Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors". *Life Sciences*. 63 (1): PL1–6. doi:10.1016/S0024-3205(98)00238-0 (*Cannabis sativa* L.).

Petrosino, S., Vaia, M., Verde, R., Iuvone, T., & Di Marzo, V. (2018). Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a non-psychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* April 9, 2018, jpet.117.244368; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244368>

Petrusa, L. M., & Winicov, I. (1997). Proline status in salt-tolerant and salt-sensitive alfalfa cell lines and plants in response to NaCl. *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.

Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & Van Der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799

Pichette, A., Larouche, P. L., Lebrun, M., & Legault, J. (2006). Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(5), 371-373.

Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & VanWees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell Development and Biology*, 28, 489–52.

Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Vanwees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375.

Pietkiewicz, T. A. (1958): Mikroflora nasion konopi. Przegląd literatury. Pocz. Nauk rol., Ser. A 77(4), 577-590.

Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12,267–274.

Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F., MacDonald, A. M. C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* (1999), 78, 21–37.

Plenchette, C., Clermont-Dauphin, C., Meynard, J. M., & Fortin, J. A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.* 85, 31–40.

Ploetz, R. C., Mitchell, D. J., & Gallaher, R. N. (1985). Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* species from a reduced-tillage experiment multicropped to rye and soybean in Florida. *Phytopathology* 75, 833–9.

Podile, A. R., & Kishore, G. K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In *Plant-associated bacteria* (pp. 195-230). Springer, Dordrecht.

Politi, M., Peschel, W., Wilson, N., Zloh, M., Prieto, J. M., & Heinrich, M. (2008). Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semiquantitative data on 19-THC and 19-THC-acid. *Phytochemistry* 69, 562–570.

- Pollio, A. (2016). The name of Cannabis: a short guide for nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 234-238.
- Popescu, G. C., & Popescu, M. (2014). Effect of the brown alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Current Trends in Natural Sciences*, 3(6), 61-67.
- Postma, J., Clematis, F., Nijhuis, E. H., & Someus, E. (2013). Efficacy of four phosphate-mobilizing bacteria applied with an animal bone charcoal formulation in controlling *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* in tomato. *Biological Control*, 67(2), 284-291.
- Postma, J., & Schilder, M., T. (2015). Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in sugar beet by organic amendments. *Applied Soil Ecology* 94, 72–9
- Potel, F., Valadier, M. H., Ferrario-Méry, S., Grandjean, O., Morin, H., Gaufichon, L., ... & Suzuki, A. (2009). Assimilation of excess ammonium into amino acids and nitrogen translocation in *Arabidopsis thaliana*—roles of glutamate synthases and carbamoylphosphate synthetase in leaves. *The FEBS Journal*, 276(15), 4061-4076.
- Povero, G., Loreti, E., Pucciariello, C., Santaniello, A., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Kapetis, D., Zolezzi, F., Piaggese, A., & Perata, P. (2011). Transcript profiling of chitosan-treated *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Res.* 124, 619–629.
- Powles, T., Poole, R. T., Shamash, J., Chaplin, T., Propper, D., Joel, S., & Liu, W. M. (2005). Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood*, 105(3), 1214-1221.
- Prasad, R., & Shivay, Y. S. (2017). Oxalic acid/oxalates in plants: From self-defence to phytoremediation. *Current Science*, 1665-1667.
- Pratt, M., Stevens, A., Thuku, M., Butler, C., Skidmore, B., Wieland, L. S., ... & Hutton, B. (2019). Benefits and harms of medical cannabis: a scoping review of systematic reviews. *Systematic Reviews*, 8(1), 1-35.
- Preston, D. A., Dosedall, L. (1955). Minnesota Plant Diseases. USDA Special Publication No 8, *Horticultural Crops Research Branch*. 184 pp.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V. E., Tangonan, N. G., Pascual, C. B., Suga, H., Kageyama, K., & Hyakumachi, M. (2001). Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG-1-ID), causal agent of a necrotic leaf spot on Coffee. *Phytopathology* 91, 1054–61.
- Przybysz, A., Gawronska, H., & Gajc-wolska, J. (2014). Biological mode of action of anitrophenolates-based biostimulant: case study. *Front. Plant Sci.* 5, 1–15, Article 713.
- Puig-Castellví, F., Alfonso, I., & Tauler, R. (2017). Untargeted assignment and automatic integration of 1H NMR metabolomic datasets using a multivariate curve resolution approach. *Analytica Chimica Acta*, 964, 55-66.
- Pulimood, T. B., Corden, J. M., Bryden, C., Sharples, L., Nasser, S. M. (2007). Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007, 120, 610–617.
-

-
- Punja, Z. K. (2018). Flower and foliage-infecting pathogens of marijuana (*Cannabis sativa* L.) plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(4), 514-527.
- Punja, Z. K. (2021). Epidemiology of *Fusarium oxysporum* causing root and crown rot of cannabis (*Cannabis sativa* L., marijuana) plants in commercial greenhouse production. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(2), 216-235.
- 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
- Punja, Z. K., Ni, L., & Roberts, A. (2021). The *Fusarium solani* species complex infecting cannabis (*Cannabis sativa* L., marijuana) plants and a first report of *Fusarium (Cylindrocarpon) lichenicola* causing root and crown rot. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1-15.
- Punja, Z. K., Rodriguez, G. (2018). *Fusarium* and *Pythium* species infecting roots of hydroponically grown marijuana (*Cannabis sativa* L.) plants. *Can J Plant Pathol.* 40(4): 498–513.
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B. A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S. K., ... & Riyaz-UI-Hassan, S. (2013). Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*, 2(1), 1-14.
- Quaghebeur, K., Coosemans, J., Toppet, S., & Compennolle, F. (1994). Cannabiorci- and 8-chlorocannabiorcicromenic acid as fungal antagonists from *Cylindrocarpon olidum*. *Phytochemistry*, 37(1), 159-161.
- Quecine, M. C., Araujo, W. L., Marcon, J., Gai, C. S., Azevedo, J. D., & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2008). Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 486-491.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361.
- Raaijmakers, J. M., & Weller, D. (1998). Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucionl-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 144–152.
- Radwan, M. M., ElSohly, M. A., Slade, D., Ahmed, S. A., Khan, I. A., & Ross, S. A. (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of natural products*, 72(5), 906-911.
- Ragan, M. A., & Jensen, A. (1977). Quantitative studies on brown algal phenols. I. Estimation of absolute polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 30(2), 209-221.
-

-
- Raguso, R. A., & Pichersky, E. (1999). New Perspectives in Pollination Biology: Floral Fragrances. A day in the life of a linalool molecule: Chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: Linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biology*, 14(2), 95-120.
- Raj, T. S., Muthukumar, A., Renganathan, P., Kumar, R. S. R., & Ann, H. (2019). Biological control of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn using marine associated *Bacillus subtilis*. *Int Arch Appl Sci Technol*, 10, 148-153.
- Raldugin, V. A. (2004). Triterpenoids of fir and highly efficient plant growth regulator based on them. *Russ. Chem. J*, 48, 84-88.
- Ramette, A., Moëgne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2006). Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 369–381.
- Ramos-Molina, L. M., Chavarro-Mesa, E., Pereira, D. A. D. S., Silva-Herrera, M. D. R., & Ceresini, P. C. (2016). *Rhizoctonia solani* AG-1 IA infects both rice and signalgrass in the Colombian Llanos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 46(1), 65-71.
- Rangel, D. E., Alston, D. G., & Roberts, D. W. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112(11), 1355-1361.
- Rashad, Y., Aseel, D., Hammad, S., & Elkelish, A. (2020). Rhizophagus irregularis and *Rhizoctonia solani* differentially elicit systemic transcriptional expression of polyphenol biosynthetic pathways genes in sunflower. *Biomolecules*, 10(3), 379.
- Rathore, S. S., Chaudhary, D. R., Boricha, G. N., Ghosh, A., Bhatt, B. P., Zodape, S. T., & Patolia, J. S. (2009). Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, 75(2), 351-355.
- Ratti, N., Verma, H. N., & Gautam, S. P. (2010). Effect of Glomus species on physiology and biochemistry of *Catharanthus roseus*. *Indian Journal of Microbiology*, 50(3), 355-360.
- Rayirath, P., Benkel, B., Hodges, D. M., Allan-Wojtas, P., MacKinnon, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2009). Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230(1), 135-147.
- Rayorath, P., Jithesh, M. N., Farid, A., Khan, W., Palanisamy, R., Hankins, S. D., ... & Prithiviraj, B. (2008). Rapid bioassays to evaluate the plant growth promoting activity of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. using a model plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 423-429.
- Rayorath, P., Khan, W., Palanisamy, R., MacKinnon, S. L., Stefanova, R., Hankins, S. D., & Prithiviraj, B. (2008). Extracts of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* induce gibberellic acid (GA 3)-independent amylase activity in barley. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(4), 370-379.
-

-
- Razdan, K., Puttick, A. J., Zitko, B. A., & Handrick, G. . (1972). Hashish VI1: Conversion of (-)- Δ 1(6)-tetrahydrocannabinol to (-)- Δ 1(7)-tetrahydrocannabinol. Stability of (-)- Δ 1 and (-)- Δ 1(6)-tetrahydrocannabinols. *Experientia*, 28, 121–122.
- Razdan, R. K. (1973). Recent advances in the chemistry of cannabinoids. *Progr. Org. Chem.*, 8: 78.
- Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., ... & Mosca, E. (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor–ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacological Research*, 42(2), 177-181.
- Read, D. J., & Perez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance?. *New phytologist*, 157(3), 475-492.
- Reddy, B. P., Reddy, K. R. N., Rao, M. S., & Rao, K. S. (2008). Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against rice fungal pathogens. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(1), 178-182.
- Reichardt, E. I. (1925). *Ascochyta cannabina*. Bull. Station **Regionale** Protectrice des Plants a Leningrad 5: 46. 1925.
- Reignault, P. H., Cogan, A., Muchembled, J., Lounes-Hadj Saharaoui, A., Durand, R., & Sancholle, M. (2001). Trehalose induces resistance to powdery mildew in wheat. *New Phytologist*, 149(3), 519-529.
- Reigosa, M. J., & Pazos-Malvido, E. (2007). Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology*, 33(7), 1456-1466.
- Rejeb, K. B., Abdelly, C., & Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284.
- Ren, S. F., Bao, W. J., Li, F., Li, C. Y., Dong, W. H., Yang, G. H., & Duan, C. H. (2018). First Report of Damping-Off on Seedlings of Coffee Caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 HG I, AG-1 IB and Binucleate *Rhizoctonia* AG-A in China. *Plant Disease*, 102(8), 1658.
- Ren, H., & Gray, W. M. (2015). SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Molecular Plant*, 8(8), 1153-1164.
- Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., & Reignault, P. (2007). Ioduric acid, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry*, 68(8), 1156-1164.
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P. M., Van Der Does, H. C., & Cornelissen, B. J. C. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(1), 15-23.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., & Rich, P. J. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. In *Salinity: Environment-Plants-Molecules* (pp. 181-204). Springer, Dordrecht.
- Richter, H., & Schneider, R. (1953). Untersuchungen zur morphologischen und biologischen Differenzierung von *Rhizoctonia solani* K. *Phytopathologische Zeitschrift* 20, 167–226
-

- Rioux, R., Manmathan, H., Singh, P., de los Reyes, B., Jia, Y., & Tavantzis, S. (2011). Comparative analysis of putative pathogenesis-related gene expression in two *Rhizoctonia solani* pathosystems. *Current Genetics* 57, 391–408.
- Rizvi, S. S. A., & Yang, X. B. (1996). Fungi associated with soybean seedling disease in Iowa. *Plant Disease* 80, 57–60.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ibrahim, M., Zia-ur-Rehman, M., Abbas, T., & Ok, Y. S. (2016). Mechanisms of biochar-mediated alleviation of toxicity of trace elements in plants: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2230-2248.
- Rizzi, A., Roy, S., Bellenger, J. P., & Beauregard, P. B. (2019). Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(3), e02439-18.
- Robertson, M. M. (2000). Tourette syndrome, associated conditions and the complexities of treatment. *Brain*, 123(3), 425-462.
- Rock, E. M., & Parker, L. A. (2021). Constituents of *Cannabis Sativa*. In *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders* (pp. 1-13). Springer, Cham.
- Roco, A., & Pérez, L. M. (2001). In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(2), 1-2.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Rohleder, C., Müller, J. K., Lange, B., Leweke, F. M. (2016). Cannabidiol as a Potential New Type of an Antipsychotic. A Critical Review of the Evidence. *Front. Pharmacol.*, 2016, 7, 422.
- Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 513-524.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 675-709.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S185-S205.
- Romdhane, L., Awad, Y. M., Radhouane, L., Dal Cortivo, C., Barion, G., Panozzo, A., & Vamerali, T. (2019). Wood biochar produces different rates of root growth and transpiration in two maize hybrids (*Zea mays* L.) under drought stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 65(6), 846-866.
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chem. Rev.* 111, 5492–5505.
- Roosens, N. H., Thu, T. T., Iskandar, H. M., & Jacobs, M. (1998). Isolation of the ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 117(1), 263-271.
-

- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J., & Krueger, S. (2014). Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science*, 19(9), 564-569.
- Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L., Jackson, W. R., & Cavagnaro, T. R. (2014). A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy*, 124, 37-89.
- Rosewich, U. L., Pettway, R. E., McDonald, B. A., & Kistler, H. C. (1999). High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics and Biology* 28, 148–59.
- Rosier, A., Medeiros, F. H., & Bais, H. P. (2018). Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant and Soil*, 428(1), 35-55.
- Ross, S. A., & ElSohly, M. A. (1996). The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 49-51.
- Ross, S. A., Radwan, M. M., El-Alfy, A. T., Manly, S. P., Ahmed, S. A., Slade, D., & Cutler, S. (2010). 20th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society.
- Ross S. A., Slade D., Ahmed S. A., Radwan M. M. and ElSohly M. A. 2008. 18th Annual Symposium of the International Cannabinoid Research Society, Aviemore, 2008, p. P141
- Rothrock, C. S. (1996). Cotton diseases incited by *Rhizoctonia solani*. In *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 269-277). Springer, Dordrecht.
- Roychoudhury, A., Banerjee, A., & Lahiri, V. (2015). Metabolic and molecular-genetic regulation of proline signaling and its cross-talk with major effectors mediates abiotic stress tolerance in plants. *Turkish Journal of Botany*, 39(6), 887-910.
- Rudrabhatla, P., & Rajasekharan, R. (2002). Developmentally regulated dual-specificity kinase from peanut that is induced by abiotic stresses. *Plant Physiology*, 130(1), 380-390.
- Ruiz, L. P., & Mansfield, T. A. (1994). A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytologist*, 127(3), 473-481.
- Russo, E. B. (2008). Cannabinoids in the management of difficult to treat pain Ther Clin Risk Manag. 4(1): 245–259. doi: 10.2147/tcrm.s1928
- Russo E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1344-1364.
- Russo, E. B. (2013). Clinical Endocannabinoid Deficiency (CECD): Can this Concept Explain Therapeutic Benefits of Cannabis in Migraine, Fibromyalgia, Irritable Bowel Syndrome and other Treatment-Resistant Conditions? *Neuroendocrinology Letters* Nos. 1/2, Feb-Apr Vol.25
- Ryan, K. G., Swinny, E. E., Markham, K. R., & Winefield, C. (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, 59(1), 23-32.

-
- Ryberg, E., & Larsson, N. Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T & Greasley P. J. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(1092), 124.
- Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M. A., & Goksu, N. (2014). Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae*, 175, 1-8.
- Sadeghi, A., Hesani, A. R., Askari, H., Qomi, D. N., Farsi, M., & Hervas, E. M. (2009). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of sugar beet with native *Streptomyces* strains under field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 19(9), 985-991.
- Sadraei, H., Asghari, G., & Alipour, M. (2016). Anti-spasmodic assessment of hydroalcoholic extract and essential oil of aerial part of *Pycnocycla caespitosa* Boiss. & Hausskn on rat ileum contractions. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 33
- Saikia, R., Kumar, R., Arora, D. K., Gogoi, D. K., & Azad, P. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani*: Production of salicylic acid and peroxidases. *Folia Microbiologica*, 51(5), 375-380.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 431-449.
- Sakamoto, A., & Murata, N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 163-171.
- Saldajeno, M. G. B., & Hyakumachi, M. (2011). The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. *Annals of Applied Biology*, 159(1), 28-40.
- Samir, P., & Link, A. J. (2011). Analyzing the cryptome: uncovering secret sequences. *The AAPS journal*, 13(2), 152-158.
- Sandy, M., & Butler, A. (2009). Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chemical Reviews*, 109(10), 4580-4595.
- Sandyk, R., Awerbuch, G. (1988). Marijuana and Tourette's syndrome. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 8 (6): 444–5. doi:10.1097/00004714-198812000-00021. PMID 3235704.
- Santaniello, A., Giorgi, F. M., Di Tommaso, D., Di Tommaso, G., Piaggese, A., & Perata, P. (2012). Genomic approaches to unveil the physiological pathways activated in *Arabidopsis* treated with plant-derived raw extracts. In *1 World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009* (pp. 161-174).
- Santaniello, A., Scartazza, A., Gresta, F., Loreti, E., Biasone, A., Di Tommaso, D., ... & Perata, P. (2017). *Ascophyllum nodosum* seaweed extract alleviates drought stress in *Arabidopsis* by affecting photosynthetic performance and related gene expression. *Frontiers in plant science*, 8, 1362.
-

Santawy, F. (1964). Notes on the structure of cannabidiol compounds. *Acta Univ. Palacki Olomuc. Fac. Med.*, 35:5.

Santos, V. S. V., Silveira, E., & Pereira, B. B. (2018). Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 21(6-8), 382-399.

Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855-872.

Santunionea, G., Turia, E., Parisb, R., & Grassic, G. (2020). Production and use of co-composted biochar as soil amendment for *cannabis sativa* sp. Growth. In *28th European Biomass Conference and Exhibition, e-EUBCE 2020* (pp. 113-117). ETA-Florence Renewable Energies

Sarkar, A., Asaeda, T., Wang, Q., & Rashid, M. H. (2015). Arbuscular mycorrhizal influences on growth, nutrient uptake, and use efficiency of *Miscanthus sacchariflorus* growing on nutrient-deficient river bank soil. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 212, 46–54

Sato, S. (2021). Application of glyceric acid to bio-related functional materials and improvement of microbial production. *Journal of Oleo Science*, ess20307.

Savary, S., & Mew, T. W. (1996). Analyzing crop losses due to *Rhizoctonia solani*: rice sheath blight, a case study. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 237-245). Springer, Dordrecht.

Scavino, A. F., & Pedraza, R. O. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity* (pp. 265-285). Springer, Berlin, Heidelberg.

Schäfer, M., Brütting, C., Meza-Canales, I. D., Großkinsky, D. K., Vankova, R., Baldwin, I. T., & Meldau, S. (2015). The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4873-4884.

Schiavon, M., Ertani, A., & Nardi, S. (2008). Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11800-11808.

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J. Chem. Ecol.* 36, 662–669.

Schlatter, D., Fubuh, A., Xiao, K., Hernandez, D., Hobbie, S., & Kinkel, L. (2009). Resource amendments influence density and competitive phenotypes of *Streptomyces* in soil. *Microbial Ecology*, 57(3), 413-420.

Schlatter, D., Kinkel, L., Thomashow, L., Weller, D., & Paulitz, T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopathology* 107, 1284–97.

Schluttenhofer, C., Yuan, L. (2017). Challenges towards revitalizing hemp: a multifaceted crop. *Trends Plant Sci.* 22, 917–929.

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.
- Schoental, R., Joffe, A. Z., & Yagen, B. (1979). Cardiovascular lesions and various tumors found in rats given T-2 toxin, a trichothecene metabolite of *Fusarium*. *Cancer Research*, 39(6 Part 1), 2179-2189.
- Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2008). Friends and foes: Streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 11-19.
- Schubert, D., Kepchia, D., Liang, Z., Dargusch, R., Goldberg, J., & Maher, P. (2019). *Mol. Neurobiol.* 2019, 56, 7719.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Schütze, E., Ahmed, E., Voit, A., Klose, M., Greyer, M., Svatoš, A., ... & Kothe, E. (2015). Siderophore production by *Streptomyces*—stability and alteration of ferrihydroxamates in heavy metal-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19376-19383.
- Scott, M., Rani, M., Samsatly, J., Charron, J. B., & Jabaji, S. (2018). Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds. *Canadian Journal of Microbiology*, 64(10), 664-680.
- Seephonkai, P., Popescu, R., Zehl, M., Krupitza, G., Urban, E., & Kopp, B. (2011). Ferruginenes a– C from *Rhododendron ferrugineum* and their cytotoxic evaluation. *Journal of Natural Products*, 74(4), 712-717.
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V., & Eeckhaut, A. V. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, 11(24), 2297-2318.
- Seip, K. L. (1979). A mathematical model for the uptake of heavy metals in benthic algae. *Ecological Modelling*. 6 (3): 183–197. doi: 10.1016/0304-3800(79)90012-7.
- Sekhar, P. N., Amrutha, R. N., Sangam, S., Verma, D. P. S., & Kishor, P. K. (2007). Biochemical characterization, homology modeling and docking studies of ornithine δ-aminotransferase—an important enzyme in proline biosynthesis of plants. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26(4), 709-719.
- Semida, W. M., Beheiry, H. R., Sétamou, M., Simpson, C. R., Abd El-Mageed, T. A., Rady, M. M., & Nelson, S. D. (2019). Biochar implications for sustainable agriculture and environment: A review. *South African Journal of Botany*, 127, 333-347.
- Sensoy, S., Demir, S., Turkmen, O., Erdinc, C., & Burak, O. (2007). Responses of some different pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Sci. Hortic.* 113, 92–95
- Shabala, L., Mackay, A., Jacobsen, S., erik, Z., hou, D., & Shabala, S. (2012). Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Physiol. Plantarum*. 146, 26–38.
-

-
- Shafaghat, A., & Shafaghatlonbar, M. (2011). Antimicrobial activity and chemical constituents of the essential oils from flower, leaf and stem of *Gypsophila bicolor* from Iran. *Natural Product Communications*, 6(2), 1934578X1100600230.
- Shah, J., & Chaturvedi, R. (2009). Lipid signals in plant–pathogen interactions. *Annu. Plant Rev*, 34, 292-333.
- Shani, A., & Mechoulam, R. (1970). A new type of cannabinoid. Synthesis of cannabielsoic acid A by a novel photo-oxidative cyclisation. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (5), 273-274.
- Shankar, J., Nigam, S., Saxena, S., Madan, T., & Sarma, P. U. (2004). Identification and assignment of function to the genes of *Aspergillus fumigatus* expressed at 37 C. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(4), 428-432.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504.
- Shao, J., Li, S., Zhang, N., Cui, X., Zhou, X., Zhang, G., ... & Zhang, R. (2015). Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-13.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Sharma, H. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465-490.
- Sharma, S., Kumar, V., & Tripathi, R. B. (2017) Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *J Microbiol Biotechnol Res*, 1, 90–95.
- Sharma, C., M Al Kaabi, J., M Nurulain, S., N Goyal, S., Amjad Kamal, M., & Ojha, S. (2016). Polypharmacological properties and therapeutic potential of β -caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. *Current Pharmaceutical Design*, 22(21), 3237-3264.
- Sheen, J., Zhou, L., & Jang, J. C. (1999). Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(5), 410-418.
- Shekhar, S. H., Lyons, G., McRoberts, C., McCall, D., Carmichael, E., Andrews, F., & McCormack, R. (2012). Brown seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of seaweed species and biostimulant formulations by rapid instrumental methods. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1141-1157.
- Shen, Y., Chen, M., Sun, T., & Jia, J. (2015). Catalytic reforming of pyrolysis tar over metallic nickel nanoparticles embedded in pyrochar. *Fuel*, 159, 570-579.
- Sheng, P. P., Li, M., & Liu, R. J. (2011). Effects of agricultural practices on community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural ecosystem. *A rev.Chin. J. Appl. Ecol.* 22, 1639–1645.
-

-
- Sherwood, R. T. (1966). Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology*, 56, 279-286.
- Shi, L., Twary, S. N., Yoshioka, H., Gregerson, R. G., Miller, S. S., Samac, D. A., ... & Vance, C. P. (1997). Nitrogen assimilation in alfalfa: isolation and characterization of an asparagine synthetase gene showing enhanced expression in root nodules and dark-adapted leaves. *The Plant Cell*, 9(8), 1339-1356.
- Shim, T., Yoo, J., Ryu, C., Park, Y. K., & Jung, J. (2015). Effect of steam activation of biochar produced from a giant Miscanthus on copper sorption and toxicity. *Bioresource Technology*, 197, 85-90.
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F., (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21–43.
- Shoyama, Y., Fujita, T., Yamauchi, T., & Nishioka, I. (1968). Cannabichromenic acid, a genuine substance of cannabichromene. *Chem Pharm Bull*, 16: 1157.
- Shoyama, T., Hirano, H., Makino (nee Tomita), H., Umekita, S., & Nishioka, I. (1977). Cannabis X. The isolation and structures of four new propyl cannabinoid acids, tetrahydrocannabivarinic acid, cannabidivarinic acid, cannabichromevarinic acid and cannabigerovarinic acid from Thai Cannabis: "Meao Variant ." *Chem Pharm Bull.*, 25:2306.
- Shoyama, Y., Hirano, H., Oda, M., Somehara, T., & Nishioka, I. (1975). Cannabichromevarin and cannabigerovarin, two new propyl homologs of cannabichromene and cannabigerol. *Chem Pharm Bull.*, 23: 1894.
- Shoyama, Y., Kuboe, K., Nishioka, I., & Yamauchi, T. (1972). Cannabidiol monomethyl ether. A new neutral cannabinoid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 20(9), 2072-2072.
- Shoyama, Y., Oku, R., Yamauchi, T., & Nishioka, I. (1972). Cannabis. VI. Cannabicyclic acid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 20(9), 1927-1930.
- Shoyama, Y., Tamada, T., Kurihara, K., Takeuchi, A., Taura, F., Arai, S., Blaber, M., Shoyama, Y., Morimoto, S., & Kuroki, . (2012). Structure and function of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase, the enzyme controlling the psychoactivity of *Cannabis sativa*. *Journal of Molecular Biology*, 423, 96–105.
- Shoyama, T., Yagi, M., Nishioka, I., & Taniauchi, T. (1975). Biosynthesis of cannabinoid acids. *Phytochemistry*: 14: 2189.
- Shoyama Y., Yamauchi, T., & Nishioka, I. (1970). Cannabis V-. Cannabigerolic acid monomethyl ether and cannabinolic acid. *Chem Pharm Bull.*, 18: 1327.
- Shukla, P. S., Borza, T., Critchley, A. T., Hiltz, D., Norrie, J., & Prithviraj, B. (2018). *Ascophyllum nodosum* extract mitigates salinity stress in *Arabidopsis thaliana* by modulating the expression of miRNA involved in stress tolerance and nutrient acquisition. *PLoS One*, 13(10), e0206221.
- Shukla, D. D., Pathak, V. N. (1967). A new species of *Ascophyta* on *Cannabis sativa* L. *Sydowia* 21:277-278
-

- Shukla, P. S., Shotton, K., Norman, E., Neily, W., Critchley, A. T., & Prithviraj, B. (2018). Seaweed extract improve drought tolerance of soybean by regulating stress-response genes. *AoB Plants*, 10(1), plx051.
- Siddiqui, Z. A., Akhtar, M. S., & Futai, K. (2008). *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, Berlin/Heidelberg
- Sieciechowicz, K. A., Joy, K. W., & Ireland, R. J. (1988). The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27(3), 663-671.
- Signorelli, S., Dans, P. D., Coitiño, E. L., Borsani, O., & Monza, J. (2015). Connecting proline and γ -aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. *PLoS One*, 10(3), e0115349.
- Silva, A. C. R. D., Lopes, P. M., Azevedo, M. M. B. D., Costa, D. C. M., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Silva, E., Perez da Graça, J., Porto, C., Martin do Prado, R., Nunes, E., Corrêa Marcelino-Guimarães, F., ... & Jorge Pilau, E. (2021). Untargeted Metabolomics Analysis by UHPLC-MS/MS of Soybean Plant in a Compatible Response to *Phakopsora Pachyrhizi* Infection. *Metabolites*, 11(3), 179.
- Silva, R. O., Sousa, F. B. M., Damasceno, S. R., Carvalho, N. S., Silva, V. G., Oliveira, F. R. M., ... & Medeiros, J. V. R. (2014). Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28(4), 455-464.
- Simard, S. W., Beiler, K. J., Bingham, M. A., Deslippe, J. R., Philip, L. J., & Teste, F. P. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol. Rev.*26, 39–60
- Simay, E. I. 1989. Outbreak of *Rhizoctonia solani* Kühn on Oat/Avena sativa L./in Hungary. *Cereal Research Communications*, 233-235.
- Singer, H. S. (2005). Tourette's syndrome: from behaviour to biology. *The Lancet Neurology*, 4(3), 149-159.
- Singh, B. K. (1999). Biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine. p. 227–247. BK Singh (ed.) Plant amino acids. Marcel Dekker, New York. *Biosynthesis of valine, leucine, and isoleucine*. p. 227–247. In BK Singh (ed.) *Plant Amino Acids*. Marcel Dekker, New York.
- Singh, B. K., & Shaner, D. L. (1995). Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *The Plant Cell*, 7(7), 935.
- Singh, V., Louis, J., Ayre, B. G., Reese, J. C., & Shah, J. (2011). TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-dependent trehalose metabolism promotes Arabidopsis thaliana defense against the phloem-feeding insect *Myzus persicae*. *The Plant Journal*, 67(1), 94-104.
- Singh, G., Marimuthu, P., de Heluani, C. S., & Catalan, C. A. (2006). Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 174-181.
-

- Sirikantaramas, S. T. S., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (2007). Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8, 237–243.
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., & Taura, F. (2004). The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 39767–39774.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In C. P. Kubicek, & G. E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (Vol. 1, pp. 139-191). Taylor & Francis.
- Skadhauge, B., Thomsen, K. K., & Von Wettstein, D. (1997). The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas*, 126(2), 147-160.
- Smarods, J. (1936). *Ex herbarium, fungi Lativici, Riga Latvia*.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., & Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), 273-278.
- Smiley, R. W., & Uddin, W. (1993). Influence of soil temperature on *Rhizoctonia* root rot (*R. solani* AG-8 and *R. oryzae*) of winter wheat. *Phytopathology*, 83(7), 777-785.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Smith, R. M. (1997). Identification of butyl cannabinoids in marijuana. *Journal of Forensic Science*, 42(4), 610-618.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. APS press.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia Species*. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Sobral, M. V., Xavier, A. L., Lima, T. C., & de Sousa, D. P. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Sohi, H. S., & Nayar, S. K. (1971). New records of fungi from Himachal Pradesh-III. *Research Bulletin of Punjab University* 22:243-245.
- Solomon, P. S., Waters, O. D., & Oliver, R. P. (2007). Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, 15(6), 257-262.
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., & Halkier, B. A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends in Plant Science*, 15(5), 283-290.
- Song, J., Zhang, H., Duan, C., & Cui, X. (2018). Exogenous application of succinic acid enhances tolerance of *Larix olgensis* seedling to lead stress. *Journal of Forestry Research*, 29(6), 1497-1505.
- Sorensen, J. N., Larsen, J., & Jakobsen, I. (2008). Pre-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases early nutrient concentration and growth of field-grown leeks under high productivity conditions. *Plant Soil* 307, 135–147.
-

- Souri, M. K., & Hatamian, M. (2019). Aminochelates in plant nutrition: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 42(1), 67-78.
- Souza, M. C., Siani, A. C., Ramos, M. F. S., Menezes-de-Lima Jr, O., & Henriques, M. G. M. O. (2003). Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two *Asteraceae* species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(8), 582-586.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448.
- Spinelli, F., Fiori, G., Noferini, M., Sprocati, M., & Costa, G. (2010). A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 263-269.
- Spokas, K. A., Novak, J. M., Stewart, C. E., Cantrell, K. B., Uchimiya, M., DuSaire, M. G., & Ro, K. S. (2011). Qualitative analysis of volatile organic compounds on biochar. *Chemosphere*, 85(5), 869-882.
- Srivastava, A. C., Ramos-Parra, P. A., Bedair, M., Robledo-Hernández, A. L., Tang, Y., Sumner, L. W., ... & Blancaflor, E. B. (2011). The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155(3), 1237-1251.
- Stadnik, M. J., & Freitas, M. B. D. (2014). Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, 39(2), 111-118.
- Stevens-Johnk, J., Jones, R. K., Shew, H. D., & Carling, D. E. (1993). Characterization and populations of *Rhizoctonia solani* AG-3 from Potato and Tobacco. *Phytopathology* 83, 854–8.
- Sticher, O. (2008). Natural product isolation. *Natural Product Reports*, 25(3), 517-554.
- Stirk, W. A., & Van Staden, J. (1996). Comparison of cytokinin-and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 8(6), 503-508.
- Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K. (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, 27(11), 799-809.
- Stretton H. M., Flentje N. T., & McKenzie A. R. (1967). Homothallism in *Thanatephorus cucumeris*. *Australian Journal of Biological Sciences* 20, 113–20.
- Strizhov, N., Abraham, E., Ökrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., ... & Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 12(3), 557-569.
- Subramanian, S., Sangha, J. S., Gray, B. A., Singh, R. P., Hiltz, D., Critchley, A. T., & Prithivraj, B. (2011). Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 131(2), 237-248.
- Sun, J. (2007). D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3), 259.
-

-
- Sunesson, A. L., Vaes, W., Nilsson, C., Blomquist, G., Andersson, B., & Carlson, R. (1995). Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2911-2918.
- Sweetingham, M. W. (1996). Integrated control of *Rhizoctonia* species. In: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijkstra G, eds. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 549-58.
- Sylvestre, D. L., Clements, B. J., & Malibu, Y. (2006). Cannabis use improves retention and virological outcomes in patients treated for hepatitis C. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(10), 1057-1063.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Szembel, S. J. (1927). A new species of rust on hemp. *Commentarii Instituti Astrachanensis and Defensionem Plantarum* 5(6): 59-60.
- Tagele, S. B., Lee, H. G., Kim, S. W., & Lee, Y. S. (2019). Phenazine and 1-undecene producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain KNU17Pc1 for growth promotion and disease suppression in Korean maize cultivars.
- Tai, F. L. (1936). Notes on Chinese fungi VII. *Chinese Botanical Society Bulletin* 2(2):45-66.
- Taiz, L. (2013). Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(3), 167-181.
- Takahashi, M., Arakaki, M., Yonamine, K., Hashimoto, F., Takara, K., & Wada, K. (2018). Influence of fruit ripening on color, organic acid contents, capsaicinoids, aroma compounds, and antioxidant capacity of shimatogarashi (*Capsicum frutescens*). *Journal of Oleo Science*, 67(1), 113-123.
- Takahashi, H., Kai, K., Shinbo, Y., Tanaka, K., Ohta, D., Oshima, T., ... & Kanaya, S. (2008). Metabolomics approach for determining growth-specific metabolites based on Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(8), 2769-2782.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., ... & Sakakibara, H. (2004). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), 1053-1062.
- Takeo, E., Sasano, R., Shimma, S., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2017). Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography–mass-spectrometry-based metabolomics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(6), 700-706.
- Talele, P., Sahu, S., & Mishra, A. K. (2018). Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles comprised of glycerol monostearate and bile salts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 517-525.
-

- Tao, Y., Chen, X., Cai, H., Li, W., Cai, B., Chai, C., ... & Hu, L. (2017). Untargeted serum metabolomics reveals Fu-Zhu-Jiang-Tang tablet and its optimal combination improve an impaired glucose and lipid metabolism in type II diabetic rats. *Journal of Chromatography B*, 1040, 222-232.
- Tashkin, D. P. (2005). Smoked marijuana as a cause of lung injury. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 63(2).
- Tashkin, D. P. (2013). Effects of marijuana smoking on the lung. *Annals of the American Thoracic Society*, 10(3), 239-247.
- Tashkin, D. P., Shapiro, B. J., Lee, Y. E., & Harper, C. E. (1975). Effects of smoked marijuana in experimentally induced asthma. *American Review of Respiratory Disease*, 112(3), 377-386.
- Taura, F., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (1995b). First direct evidence for the mechanism of Δ 1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 9766–9767
- Taura, F., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (1996). Purification and characterization of cannabidiolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 17411–17416.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007a). Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 1649–1663.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007b). Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, 581, 2929–2934.
- Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2009). Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Letters*, 583, 2061–2066.
- Tawaraya, K., Honda, S., Cheng, W., Chuba, M., Okazaki, Y., Saito, K., ... & Wagatsuma, T. (2018). Ancient rice cultivar extensively replaces phospholipids with non-phosphorus glycolipid under phosphorus deficiency. *Physiologia Plantarum*, 163(3), 297-305.
- Taylor, G. J. (1991). Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr. Top Plant Biochem. Physiol.*, 10, 57-93.
- Taylor, N. S., Weber, R. J., Southam, A. D., Payne, T. G., Hrydziuszko, O., Arvanitis, T. N., & Viant, M. R. (2009). A new approach to toxicity testing in *Daphnia magna*: application of high throughput FT-ICR mass spectrometry metabolomics. *Metabolomics*, 5(1), 44-58.
- Tedersoo, L. (2017). Global biogeography and invasions of ectomycorrhizal plants: past, present and future. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*, 469-531.
- Tegeder, M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(3), 315-321.
-

- Tejada, M., Benítez, C., Gómez, I., & Parrado, J. (2011b). Use of biostimulants on soil restoration: Effects on soil biochemical properties and microbial community. *Applied Soil Ecology*, *49*, 11-17.
- Tejada, M., Benítez, C., & Parrado, J. (2011a). Application of biostimulants in benzo (a) pyrene polluted soils: short-time effects on soil biochemical properties. *Applied Soil Ecology*, *50*, 21-26.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P., & Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(6), 2331-2339.
- Thanos, P. K., Dimitrakakis, E. S., Rice, O., Gifford, A., & Volkow, N. D. (2005). Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *Behavioural Brain Research*, *164*(2), 206-213.
- Thomas, M., Chauhan, D., Patel, J., & Panchal, T. (2013). Analysis of biostimulants made by fermentation of *Sargassum tenerimum* seaweed. *Int. J. Curr. Trop. Res*, *2*, 405-407.
- Thompson, G. R., III, Tuscano, J. M., Dennis, M., Singapuri, A., Libertini, S., Gaudino, R., et al. (2017). A microbiome assessment of medical marijuana. *Clin. Microbiol. Infect.* *23* (4), 269–270.
- Tian, J. S., Peng, G. J., Wu, Y. F., Zhou, J. J., Xiang, H., Gao, X. X., ... & Du, G. H. (2016). A GC–MS urinary quantitative metabolomics analysis in depressed patients treated with TCM formula of Xiaoyaosan. *Journal of Chromatography B*, *1026*, 227-235.
- Tibubos, K. R., Hurtado, A. Q., & Critchley, A. T. (2017). Direct formation of axes in new plantlets of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty, as influenced by the use of AMPEP K+, spindle inhibitors, and plant growth hormones. *Journal of Applied Phycology*, *29*(5), 2345-2349.
- Ting, I. P. (1981). Towards a model for malate accumulation in plant tissues. *Plant Science Letters*, *21*(3), 215-221.
- Toda, T., & Hyakumachi, M. (2006). Heterokaryon formation in *Thanatephorus cucumeris* anastomosis group 2-2 IV. *Mycologia* *98*, 726–36.
- Toivari, M. H., Ruohonen, L., Miasnikov, A. N., Richard, P., & Penttilä, M. (2007). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for conversion of D-glucose to xylitol and other five-carbon sugars and sugar alcohols. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(17), 5471-5476.
- Torre, L. A., Battaglia, V., & Caradonia, F. (2013). Legal aspects of the use of plant strengtheners (biostimulants) in Europe. *Bulg. J. Agric. Sci*, *19*(6), 1183-1189.
- Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., ... & Zitouni, A. (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*, *105*, 234-239.

- Transhel, V., Gutner, L. & Khokhryakov, M. (1933). A list of fungi found on new cultivated textile plants. Moscow Inst. Nov. Lubian. Syria, *Trudy* 4: 127-140.
- Traon, D., Amat, L., Zotz, F., & du Jardin, P. (2014). *A Legal Framework for Plant Biostimulants and Agronomic Fertiliser Additives in the EU-Report to the European Commission, DG Enterprise & Industry* (No. Contract n° 255/PP/ENT/IMA/13/1112420).
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147-157.
- Trotuş, E., & Naie, M. (2008). Data on the knowledge of injurious organisms in hemp crops from the Central Moldavia.
- Trouvelot, S., Héloir, M. C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., ... & Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in Plant Science*, 5, 592.
- Trovato, M., Funck, D., Forlani, G., Okumoto, S., & Amir, R. (2021). Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Trygg, J., & Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 16(3), 119-128.
- Tsolakidou, M. D., Stringlis, I. A., Fanega-Sleziak, N., Papageorgiou, S., Tsalakou, A., & Pantelides, I. S. (2019). Rhizosphere-enriched microbes as a pool to design synthetic communities for reproducible beneficial outputs. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(10), 138.
- Tsrör, L. (2010). Biology, epidemiology and management of *Rhizoctonia solani* on potato. *Journal of Phytopathology*, 158(10), 649-658.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., ... & Arita, M. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12(6), 523-526.
- Tugizimana, F., Piater, L., & Dubery, I. (2013). Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. *South African Journal of Science*, 109(5-6), 01-11.
- Turan, M., & Köse, C. (2004). Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 54(4), 213-220.
- Turner, C. E., Elsohly, M. A., & Boeren, E. G. (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, 43(2), 169-234.
- Turner, C. E., Hadley, K. I. T. & Davis, K. H. Jr. (1973b). Constituents of *Cannabis sativa* L. V. Stability- of an analytical sample extracted with chloroform. *Acta Pharm Jucoslav.*, 23: 89.
- Turner, C. E., Hadley, K., & Fetterman, P. S. (1973a). Constituents of *cannabis sativa* L. VI: Propyl homologs in samples of known geographical origin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(10), 1739-1741.
- Turner, C. E., Hadley, K. W., Fetterman, P. S., Doorenbos, N. J., Quimby, M. W., & Waller, C. (1973c). Constituents of *Cannabis sativa* L. IV: Stability of cannabinoids in stored plant material. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(10), 1601-1605.
-

-
- Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., Whalley, B. J. (2017). Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. In Kinghorn, A. Douglas; *Falk, Heinz; Gibbons, Simon; Kobayashi, Jun'ichi* (eds.). *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 103. Springer International Publishing. pp. 61–101. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9
- Tyc, O., de Jager, V. C., van den Berg, M., Gerards, S., Janssens, T. K., Zaagman, N., ... & Garbeva, P. (2017). Exploring bacterial interspecific interactions for discovery of novel antimicrobial compounds. *Microbial Biotechnology*, 10(4), 910-925.
- U.S. EPA (2012). Summary Report: Global Anthropogenic Non-CO₂ Greenhouse Gas Emissions: 1990-2030. Washington, DC: EPA.
- Udoh, M., Santiago, M., Devenish, S., McGregor, I. S., & Connor, M. (2019). Cannabichromene is a cannabinoid CB₂ receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*, 176(23), 4537-4547.
- Ueno, Y. (1980). Trichothecene mycotoxins mycology, chemistry, and toxicology. In *Advances in Nutritional Research* (pp. 301-353). Springer, Boston, MA.
- Ugolini, L., Cinti, S., Righetti, L., Stefan, A., Matteo, R., D'Avino, L., & Lazzeri, L. (2015). Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Industrial Crops and Products*, 75, 15-23.
- Uzma, F., Mohan, C. D., Hashem, A., Konappa, N. M., Rangappa, S., Kamath, P. V., ... & Abd_Allah, E. F. (2018). Endophytic fungi—alternative sources of cytotoxic compounds: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 309.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., ... & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356.
- Vadhan, N. P., Corcoran, C. M., Bedi, G., Keilp, J. G., & Haney, M. (2017). Acute effects of smoked marijuana in marijuana smokers at clinical high-risk for psychosis: A preliminary study. *Psychiatry Research*, 257, 372-374.
- Valluru, R., & Van den Ende, W. (2011). Myo-inositol and beyond—emerging networks under stress. *Plant Science*, 181(4), 387-400.
- Val-Moraes, S., P. (2015). Suppressiveness in different soils for *Rhizoctonia solani*. In: Meghvansi MK, Varma A, eds. *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management*. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, 175–84.
- van der Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205(4), 1406-1423.
- van der Heijden, M. G. A., Van Der Streitwolf-engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I. R. (2004). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytol.* 172, 739–752.
-

- Van der Werf, H. (1994). *Crop physiology of fibre hemp (Cannabis sativa L.)*. Wageningen University and Research.
- Van Dijck, P., Mascorro-Gallardo, J. O., De Bus, M., Royackers, K., Iturriaga, G., & Thevelein, J. M. (2002). Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochemical Journal*, 366(1), 63-71.
- Van Donselaar, E. G., Dorresteyn, B., Popov-Čeleketić, D., Van de Wetering, W. J., Verrips, T. C., Boekhout, T., & Müller, W. H. (2018). Extremely thin layer plastification for focused-ion beam scanning electron microscopy: an improved method to study cell surfaces and organelles of cultured cells. *Journal of Microscopy*, 270(3), 359-373.
- Van Emden, H. F., Ball, S. L., & Rao, M. R. (1988). Pest, disease and weed problems in pea, lentil, faba bean and chickpea. In *World Crops: Cool Season Food Legumes* (pp. 519-534). Springer, Dordrecht.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), 453-483.
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1-12.
- Vanderplank J. E. (1968). *Disease Resistance in Plants*. New York, NY, USA: Academic Press.
- Vassilief, A. A. (1933). (Wilt of cultivated bast-yielding plants under central Asian conditions), pp. 22-24. *Diseases and Pests of Newly Cultivated Fibre Plants. Institute of New Bast Raw Materials, Moscow.*
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35(4), 753-759.
- Verbruggen, N., Hua, X. J., May, M., & Van Montagu, M. (1996). Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8787-8791.
- Verma, R. J. (2004). Aflatoxin cause DNA damage. *International Journal of Human Genetics*, 4(4), 231-236.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valero, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 1-20.
- Verma, R. S., Padalia, R. C., Verma, S. K., Chauhan, A., & Darokar, M. P. (2014). The essential oil of 'bhang' (*Cannabis sativa* L.) for non-narcotic applications. *Current Science*, 645-650.
- Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*, 51(5), 550-556.
-

-
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., & Goormachtig, S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8).
- Viegas, A. P. (1961). *Indices de Fungos da America do Sul. Secao de Fitopathologia*. Campinas, Brazil. 921 pp.
- Vijayanand, N., Ramya, S. S., & Rathinavel, S. (2014). Potential of liquid extracts of *Sargassum wightii* on growth, biochemical and yield parameters of cluster bean plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(2), 150-155.
- Vilgalys R., & Cubeta M. A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology* 32, 135–55.
- Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Åkesson, M., Smedsgaard, J., & Nielsen, J. (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry Reviews*, 24(5), 613-646.
- Vinaixa, M., Schymanski, E. L., Neumann, S., Navarro, M., Salek, R. M., & Yanes, O. (2016). Mass spectral databases for LC/MS-and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 78, 23-35.
- Vinale, F., Nigro, M., Sivasithamparam, K., Flematti, G., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., ... & Lorito, M. (2013). Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, 347(2), 123-129.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 1-10.
- Vollner, L., Bieniek, D. & Korte, F. (1969). Haschisch XX. Cannabidivarin, ein neuer Haschisch-inhaltsstoff. *Tetrahedron Letters*, 3: 145.
- Von Spulak, F., Claussen, U., Fehlhaber, H. W., & Korte, F. (1968). Haschisch—XIX: Cannabidiol carbons äure-tetrahydrocannabitol-ester, ein neuer haschisch-inhaltsstoff. *Tetrahedron*, 24(15), 5379-5383.
- Voss, K. A., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W., Herbert, R. A., Walters, D. B., & Norred, W. P. (1995). Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B1 in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 24(1), 102-110.
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K. R., & Formanek, P. (2011). Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant Soil* 342, 31–4.
- Vree, T. B., Breimer, D. D., Van Ginneken, C. A. M., & Van Rossum, J. M. (1972a). Identification of cannabicyclol with a pentyl or propyl side-chain by means of combined as chromatography—mass spectrometry.
- Vree, T. B., Breimer, D. D., Van Ginneken, C. A. M., & Van Rossum, J. M. (1972b). Identification in Hashish of Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol Analogues with Methyl Side-Chain. *J. Pharm. Phnrmacol.*, 24: 7.
- Waditee, R., Bhuiyan, N. H., Hirata, E., Hibino, T., Tanaka, Y., Shikata, M., & Takabe, T. (2007). Metabolic engineering for betaine accumulation in microbes and plants. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 34185-34193.
-

Walker, R., & Christian Larsen, J. (2005). Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants*, 22(s1), 6-9.

Wall, M. E., & Perez-Reyes, M. (1981). The metabolism of delta 9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in man. *J. Clin. Pharmacol.*, 1981, 21(Suppl): p. 178s-189s.

Wallon, T., Sauvageau, A., & Heyden, H. V. D. (2021). Detection and Quantification of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia solani* AG1-IB Causing the Bottom Rot of Lettuce in Tissues and Soils by Multiplex qPCR. *Plants*, 10(1), 57.

Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., & Prithiviraj, B. (2013a). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* Following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32,324–339.

Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., & Prithiviraj, B. (2013b). Erratum to: regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *J. Plant Growth Regul.* 32,340–341.

Wally, O. S., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., ... & Prithiviraj, B. (2013). Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 324-339.

Wang, Y. (2008). Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on in vitro ruminal digestion of mixed forage or barley grain. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 375–395.

Wang, X., Harrington, P. D. B., & Baugh, S. F. (2018). Effect of preprocessing high-resolution mass spectra on the pattern recognition of Cannabis, hemp, and liquor. *Talanta*, 180, 229-238.

Wang, Y. H., & Irving, H. R. (2011). Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signaling & Behavior*, 6(4), 494-500.

Wang, Z., Liu, J. Q., Xu, J. D., Zhu, H., Kong, M., Zhang, G. H., ... & Li, S. L. (2017). UPLC/ESI-QTOF-MS-based metabolomics survey on the toxicity of triptolide and detoxication of licorice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(6), 474-480.

Wang, F. C., & Marangoni, A. G. (2015). Internal and external factors affecting the stability of glycerol monostearate structured emulsions. *RSC Advances*, 5(113), 93108-93116.

Wang, F. C., Peyronel, F., & Marangoni, A. G. (2016). Phase diagram of glycerol monostearate and sodium stearyl lactylate. *Crystal Growth & Design*, 16(1), 297-306.

Wang, G. L., Que, F., Xu, Z. S., Wang, F., & Xiong, A. S. (2015). Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1-12.

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176.

-
- Warcup, J. H., & Talbot, P. H. B. (1966). Perfect states of some rhizoctonias. *Transactions of the British Mycological Society* 49, 427–35.
- Wargent, E. T., Zaibi, M. S., Silvestri, C., Hislop D. C., Stocker, C. J, Stott C. G., Guy, G. W., Duncan, M., Di Marzo, V., Cawthorne M. A. (2013). The cannabinoid D9-tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutr Diabetes* 2013, 3:e68
- Warnock, D. D., Lehmann, J., Kuyper, T. W., & Rillig, M. C. (2007). Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. *Plant and Soil*, 300(1), 9-20.
- Wasaki, J., Yonetani, R., Kuroda, S., Shinano, T., Yazaki, J., Fujii, F., ... & Osaki, M. (2003). Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell & Environment*, 26(9), 1515-1523.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- Wasternack, C. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development—applied aspects. *Biotechnology Advances*, 32(1), 31-39.
- Wasternack, C., & Feussner, I. (2018). The oxylipin pathways: biochemistry and function. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 363-386.
- Watanabe, B., & Matsuda, A. (1966). Studies on the grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn pathogenic to upland crops. *Bull Appl Exp.* 7, 1–131.
- Waterhouse, R. N., Smyth, A. J., Massonneau, A., Prosser, I. M., & Clarkson, D. T. (1996). Molecular cloning and characterisation of asparagine synthetase from *Lotus japonicus*: dynamics of asparagine synthesis in N-sufficient conditions. *Plant Molecular Biology*, 30(5), 883-897.
- Webb, M. A., Cavaletto, J. M., Carpita, N. C., Lopez, L. E., & Arnott, H. J. (1995). The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *The Plant Journal*, 7(4), 633-648.
- Webster, G., Jain, V., Davey, M. R., Gough, C., Vasse, J., Denarié, J., & Cocking, E. C. (1998). The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant, Cell & Environment*, 21(4), 373-383.
- Weinhold, A. R., & Bowman, T. (1974). Repression of virulence in *Rhizoctonia solani* by glucose and 3-O-methyl glucose. *Phytopathology*.
- Weinhold, A. R., & Motta, J. (1973). Initial host responses in cotton to infection by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 63(1), 157-162.
- Weinhold, A. R., & Sinclair, J. B. (1996). *Rhizoctonia solani*: Penetration, colonization, and host response. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control* (pp. 163-174). Springer, Dordrecht.
- Weitzman, J. K. P. (1987). Krebs citric acid cycle: half a century and still turning. In *Biochem. Soc. Symp* (Vol. 54, pp. 1-198).
-

-
- Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309–348.
- Wenderoth, M., Garganese, F., Schmidt-Heydt, M., Soukup, S. T., Ippolito, A., Sanzani, S. M., & Fischer, R. (2019). Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection. *Molecular Microbiology*, 112(1), 131-146.
- Werner, E., Croixmarie, V., Umbdenstock, T., Ezan, E., Chaminade, P., Tabet, J. C., & Junot, C. (2008). Mass spectrometry-based metabolomics: accelerating the characterization of discriminating signals by combining statistical correlations and ultrahigh resolution. *Analytical Chemistry*, 80(13), 4918-4932.
- Weston-Green, K. (2019). in *Recent Advances in Cannabinoid Research* (Eds W. J. Costain, R. B. Laprairie) 2019, pp. 83–100 (IntechOpen:London).
- Weydt, P., Hong, S., Witting, A., Möller, T., Stella, N., & Kliot, M. (2005). Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2005. 6(3):182-4.
- Whapham, C. A., Blunden, G., Jenkins, T., & Hankins, S. D. (1993). Significance of betaines in the increased chlorophyll content of plants treated with seaweed extract. *Journal of Applied Phycology*, 5(2), 231-234.
- Whitney, H. S., & Parmeter, J. R. (1963). Synthesis of heterokaryons in *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Canadian Journal of Botany* 41, 879–86.
- Wiemken, A. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(3), 209-217.
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., ... & Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1), 115-122.
- Wilkinson, J. D., & Williamson, E. M. (2007). Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *Journal of Dermatological Science*, 45(2), 87-92.
- Williams, M. D., Zhang, X., Park, J. J., Siems, W. F., Gang, D. R., Resar, L. M., ... & Hill, H. H. (2015). Characterizing metabolic changes in human colorectal cancer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(16), 4581-4595.
- Winkelmann, G. (2017). A search for glomuferrin: A potential siderophore of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Glomus*. *Biometals*, 30(4), 559-564.
- Wolfender, J.-L., Rudaz, S., Choi, Y. H. & Kim, H. K. (2013). Plant metabolomics: From holistic data to relevant biomarkers. *Curr. Med. Chem.*20, 1056–1090 (2013).
- Woo, S. M., & Kim, S. D. (2007). Confirmation of Non-Siderophore Antifungal Substance and Cellulase from *Bacillus lichemiformis* K11 Containing Antagonistic Ability and Plant Growth Promoting Activity. *Journal of Life Science*, 17(7), 983-989.
-

-
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., ... & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1).
- Wood, T. B., Spivey, W. N., & Easterfield, T. H. (1896). XL.—Charas. The resin of Indian hemp. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 69, 539-546.
- Worrall, J. J. (1997). Somatic incompatibility in *Basidiomycetes*. *Mycologia* 89, 24–36.
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(5), 560-567.
- Wu, N., Wang, W., Yi, M., Cheng, S., & Wang, D. (2018). Study of the metabolomics characteristics of patients with metabolic syndrome based on liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. In *Annales D'endocrinologie* (Vol. 79, No. 1, pp. 37-44). Elsevier Masson.
- Wu, M., Yan, Y., Wang, Y., Mao, Q., Fu, Y., Peng, X., ... & Ahammed, G. J. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi for vegetable (VT) enhance resistance to *Rhizoctonia solani* in watermelon by alleviating oxidative stress. *Biological Control*, 152, 104433.
- Wu, Y. J., Ji, H., and Tang, C. M. (2018). Study on the invasion of *Arabidopsis thaliana* and induced defense responses by *Verticillium dahliae*. *J. Nucl. Agric. Sci.* 32, 681–689.
- Wu, T. C., Tashkin, D. P., Djaheb, B., & Rose, J. E. (1988). Pulmonary hazards of smoking marijuana as compared with tobacco. *New Engl J Med.* 1988, 347-351.
- Xia, H., Riaz, M., Zhang, M., Liu, B., El-Desouki, Z., & Jiang, C. (2020). Biochar increases nitrogen use efficiency of maize by relieving aluminum toxicity and improving soil quality in acidic soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110531.
- Xu, C., & Leskovar, D. I. (2015). Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 183, 39-47.
- Xu, Y. J., Wang, C., Ho, W. E., & Ong, C. N. (2014). Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 37-48.
- Xue, X., Liu, A., & Hua, X. (2009). Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. *BMB Reports*, 42(1), 28-34.
- Yabur, R., Bashan, Y., & Hernández-Carmona, G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 43-53.
- Yadav, R. L., Dhaka, R. S., & Fageria, M. S. (2000). Effect of GA3, NAA and succinic acid on growth and yield of cabbage cv. golden acre. *Haryana Journal of Horticultural Sciences*, 29(3/4), 269-270.
-

-
- Yadav, R. S., Panwar, J., Meena, H. N., Thirumalaisamy, P. P., & Meena, R. L. (2015). Developing disease-suppressive soil through agronomic management. In *Organic Amendments and Soil Suppressiveness in Plant Disease Management* (pp. 61-94). Springer, Cham.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., & Yakhin, I. A. (2012). Changes in cytokinin, auxin, and abscisic acid contents in wheat seedlings treated with the growth regulator Stifun. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(3), 398-405.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., & Yakhin, I. A. (2016). Biostimulants in agrotechnologies: problems, solutions, outlook. *Agrochemical Herald*, 1, 15-21.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 2049.
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., Gareeva, G. B., Markelova, E. M., Kabirov, R. R., et al. (2013). Ecological evaluation of plant growth regulator stifun with the use of a multi-component test system. *Agrokhimiya* 3, 65–71.
- Yamaguchi, Y., & Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 351-357.
- Yamamoto, H., Kimata, J., Senda, M., & Inoue, K. (1997). Dimethylallyl diphosphate: Kaempferol 8-dimethylallyl transferase in *Epimedium diphyllum* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 44, 23–28.
- Yamaguchi, T., Kubota, T., Watanabe, S., & Yamamoto, T. (2004). Activation of brain prostanoid EP3 receptors via arachidonic acid cascade during behavioral suppression induced by Δ^8 -tetrahydrocannabinol. *Journal of Neurochemistry*, 88(1), 148-154.
- Yamamoto, I., Gohda, H., Narimatsu, S., Watanabe, K., & Yoshimura, H. (1991). Cannabielsoin as a new metabolite of cannabidiol in mammals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 40(3), 541-546.
- Yamamoto, H., Senda, M., & Inoue, K. (2000). Flavanone 8-dimethylallyltransferase in *Sophora flavescens* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 54, 649–655.
- Yamaoka, Y., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y., Saito, K., Nishijima, M., ... & Nishida, I. (2011). PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 67(4), 648-661.
- Yamauchi, T., Shoyama, Y., Aramaki, H., Azuma, T., & Nishioka, I. (1967). Tetrahydrocannabinolic acid, a genuine substance of tetrahydrocannabinol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 15(7), 1075-1076.
- Yamauchi, T., Shoyama, T., Matsuo, M., & Nishioka, I. (1968). Cannabigerol monomethylether, a new component of hemp. *Chem Pharm Bull.*, 16: 1161.
- Yan, H. X., Liu, L., Li, L., Zhang, P. P., Liang, W. H., & Zhao, H. T. (2016). Research progress on agriculture of plant growth promoting rhizobacteria. *Heilongjiang Agric. Sci*, 6, 148-151.
-

-
- Yang, X. B. (2015). Rhizoctonia damping-off and root rot. In: Hartman G.L, Sinclair J.B, Rupe J.C, eds. *Compendium of Soybean Diseases. American Phytopathological Society (APS) Press*, 80–2.
- Yang, C. Y., Ho, Y. C., Pang, J. C., Huang, S. S., & Tschen, J. S. M. (2009). Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. *Bioresource Technology*, 100(3), 1454-1458.
- Yang, H. A., Sivasithamparam, K., Barton, J. E., & O'Brien, P. A. (1995). Characterization of cereal bare patch isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA analysis. *Plant Pathology* 44, 811–8.
- Yang, H. A., Tommerup, I. C., Sivasithamparam, K., & O'Brien, P. A. (1992). Heterokaryon formation with homokaryons derived from protoplasts of *Rhizoctonia solani* anastomosis group eight. *Experimental Mycology* 16, 268–78.
- Ye, S. F., Zhou, Y. H., Sun, Y., Zou, L. Y., & Yu, J. Q. (2006). Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt. *Environmental and Experimental Botany*, 56(3), 255-262.
- Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061-1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I. (2000). Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(11), 863-873.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 15(9), 422-433.
- Yin, C., Hulbert, S. H., Schroeder, K. L., Mavrodi, O., Mavrodi, D., Dhingra, A., ... & Paulitz, T. C. (2013). Role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7428-7438.
- Yin, H., Zhao, X. M., & Du, Y. G. (2010). Oligochitosan: a plant diseases vaccine—are view. *Carbohydr. Polym.* 82, 1–8.
- Yoshikawa, M., Hirai, N., Wakabayashi, K., Sugizaki, H., & Iwamura, H. (1993). Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizospheric *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(12), 1150-1154.
- You, Y. H., Yoon, H., Kang, S. M., Shin, J. H., Choo, Y. S., Lee, I. J., ... & Kim, J. G. (2012). Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1549-1556.
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145.
- Yu, C., Claybrook, D. L., & Huang, A. H. (1983). Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1), 180-187.
-

- Yu, O. Y., Raichle, B., & Sink, S. (2013). Impact of biochar on the water holding capacity of loamy sand soil. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(1), 1-9.
- Yu, J., Sun, Y., Zhang, Y., Ding, J., Xia, X., Xiao, C., ... & Zhou, Y. (2009). Selective trans-cinnamic acid uptake impairs [Ca²⁺] cyt homeostasis and growth in *Cucumis sativus* L. *Journal of Chemical Ecology*, 35(12), 1471-1477.
- Yu, J., Zhao, Y., & Li, Y. (2014). Utilization of corn cob biochar in a direct carbon fuel cell. *Journal of Power Sources*, 270, 312-317.
- Yuan, Y., & Macquarrie, D. (2015). Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 129, 101-107.
- Yuan, J. H., & Xu, R. K. (2011). The amelioration effects of low temperature biochar generated from nine crop residues on an acidic Ultisol. *Soil Use and Management*, 27(1), 110-115.
- Zager, J. J., Lange, I., Srividya, N., Smith, A., & Lange, B. M. (2019). Gene networks underlying cannabinoid and terpenoid accumulation in cannabis. *Plant Physiology*, 180(4), 1877-1897.
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M. B., Gill, R. A., ... & Ahmad, R. (2015). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 310-317.
- Zaidi, A., Ahmad, E., Khan, M. S., Saif, S., & Rizvi, A. (2015). Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. *Scientia Horticulturae*, 193, 231-239.
- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zali, A. G., & Ehsanzadeh, P. (2018). Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Industrial Crops and Products*, 111, 133-140.
- Zeier, J. (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment*, 36(12), 2085-2103.
- Zelenay, A. (1960). Fungi of the genus *Fusarium* occurring on seeds and seedlings of hemp and their pathogenicity. *Prace nauk. Inst. Ochr. Rosl., Pozan* 2(2):248-249.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., ... & Iturriaga, G. (1999). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast tps1 mutant. *Plant Physiology*, 119(4), 1473-1482.
- Zhang, X., Ervin, E. H., & Schmidt, R. E. (2003). Seaweed extract humic acid, and propiconazole improve tall fescue sod heat tolerance and post transplant quality. *HortScience* 38, 440-443
-

-
- Zhang, X., Ervin, E. H., & Schmidt, R. E. (2003). Plant growth regulators can enhance the recovery of Kentucky bluegrass sod from heat injury. *Crop Science*, 43(3), 952-956.
- Zhang, X., Huang, Y., Harvey, P. R., Ren, Y., Zhang, G., Zhou, H., & Yang, H. (2012). Enhancing plant disease suppression by Burkholderia vietnamiensis through chromosomal integration of *Bacillus subtilis* chitinase gene chi113. *Biotechnology Letters*, 34(2), 287-293.
- Zhang, Z., Li, Q., Li, Z., Staswick, P. E., Wang, M., Zhu, Y., & He, Z. (2007). Dual regulation role of GH3. 5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant physiology*, 145(2), 450-464.
- Zhang, L. P., Mehta, S. K., Liu, Z. P., & Yang, Z. M. (2008). Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 49(3), 411-419.
- Zhang, X., & Schmidt, R. E. (2000). Hormone-containing products impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop Sci.* 40, 1344–1349.
- Zhang, Q., Stummer, B. E., Guo, Q., Zhang, W., Zhang, X., Zhang, L., & Harvey, P. R. (2021). Quantification of *Pseudomonas protegens* fd6 and bacillus subtilis ncd-2 in soil and the wheat rhizosphere and suppression of root pathogenic *Rhizoctonia solani* Ag-8. *Biological Control*, 154, 104504.
- Zhang, Q. X., Zhang, Y., Shan, H. H., Tong, Y. H., Chen, X. J., & Liu, F. Q. (2017). Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(32), 25000-25009.
- Zhao, G., Ablett, G. R., Anderson, T. R., Rajcan, I., & Schaafsma, A. W. (2005a). Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* associated with soybean root and hypocotyl rot in Ontario and resistance of accession PI 442031 to different anastomosis groups. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 108–117.
- Zhao, G., Ablett, G. R., Anderson, T. R., Rajcan, I., & Schaafsma, A. W. (2005b). Inheritance and genetic mapping of resistance to *rhizoctonia* root and hypocotyl rot in soybean. *Crop Science* 45, 1441–7.
- Zhao, R., Chen, D., & Wu, H. (2017). Effects of Pu-erh ripened tea on hyperuricemic mice studied by serum metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 1068, 149-156.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.
- Zhao, P., Inoue, K., Kouno, I., & Yamamoto, H. (2003). Characterization of leachianone G 2"-dimethylallyltransferase, a novel prenyl side-chain elongation enzyme for the formation of the lavandulyl group of sophoraflavanone G in *Sophora flavescens* Ait. cell suspension cultures. *Plant Physiology*, 133, 1306–1313.
- Zhao, Q., Ran, W., Wang, H., Li, X., Shen, Q., Shen, S., & Xu, Y. (2013). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in muskmelon with *Bacillus subtilis* Y-IV. *BioControl*, 58(2), 283-292.
- Zhao, L., Wang, Y., & Kong, S. (2020). Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. *International Microbiology*, 23(4), 501-509.
-

- Zhen, Y. Z., Xu, Y. M., Liu, G. T., Miao, J., Xing, Y. D., Zheng, Q. L., *et al.* (1991). Mutagenicity of *Alternaria alternata* and *Penicillium cyclopium* isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer—Linxian, China. *IARC Scientific Publications*, (105), 253–257.
- Zhou, H., Dong, B., Zhang, X., Liang, Y., Hao, J. J., & Wang, L. H. (2015.) First Report of *Rhizoctonia solani* AG4-HG-III Infecting Buckwheat in China. *Plant Disease*, 99(8), 1187-1187.
- Zhou, Y., Ge, S., Jin, L., Yao, K., Wang, Y., Wu, X., ... & Yu, J. (2019). A novel CO₂-responsive systemic signaling pathway controlling plant mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 224(1), 106-116.
- Ziosi, V., Zandoli, R., Di Nardo, A., Biondi, S., Antognoni, F., & Calandriello, F. (2012). Biological activity of different botanical extracts as evaluated by means of an array of in vitro and in vivo bioassays. *Acta Hort.* 1009, 61–66.
- Zouari, M., Hassena, A. B., Trabelsi, L., Rouina, B. B., Decou, R., & Labrousse, P. (2019). Exogenous proline-mediated abiotic stress tolerance in plants: Possible mechanisms. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 99-121). Springer, Cham.
- Zuluaga, M. Y. A., Milani, K. M. L., Miras-Moreno, M. B., Lucini, L., Valentinuzzi, F., Mimmo, T., ... & de Oliveira, A. L. M. (2021). The adaptive metabolomic profile and functional activity of tomato rhizosphere are revealed upon PGPB inoculation under saline stress. *Environmental and Experimental Botany*, 189, 104552.
- Zurier, R. B., & Burstein, S. H. (2016). Cannabinoids, inflammation, and fibrosis. *The FASEB Journal*, 30(11), 3682-3689.
- Zwart, D. C., & Kim, S. H. (2012). Biochar amendment increases resistance to stem lesions caused by *Phytophthora* spp. in tree seedlings. *HortScience*, 47(12), 1736-1740.

Ελληνική

Άρθρο 155H παρ. 10 του άρθρου 2Α του ν. 4139/2013 (Α' 74), όπως προστέθηκε με την παρ. 2 του άρθρου 58 του ν. 4554/2018 αναριθμείται και αντικαθίσταται ως εξής: «11. Η έγκριση για τους σκοπούς της παραγράφου 1 χορηγείται σε περιοχές, στις οποίες επιτρέπονται οι μεταποιητικές και συναφείς δραστηριότητες των άρθρων 17- 40 του ν. 3982/2011 (Α' 143), στις περιοχές των παραγράφων 2 έως και 5 του άρθρου 17 του ν. 3325/2005 (Α' 68) ή σε περιοχές, στις οποίες επιτρέπονται γεωργικές δραστηριότητες και εκμεταλλεύσεις, καθώς και στη γη υψηλής παραγωγικότητας, υπό τους όρους που ορίζονται στην κοινή υπουργική απόφαση, που εκδίδεται, κατ' επίκληση της παραγράφου 4».

Άρθρο 2Α του ν. 4139/2013 (Α' 74) προστίθεται παρ. 10 ως εξής: «10. Η έγκριση για τους σκοπούς της παραγράφου 1 χορηγείται σε περιοχές θεσμοθετημένων υποδοχέων παραγωγικών δραστηριοτήτων και σε περιοχές στις οποίες επιτρέπονται οι μεταποιητικές ή γεωργικές δραστηριότητες και εκμεταλλεύσεις.»

Γιαννακοπούλου, Α. (2005). Μελέτη του μύκητα *Rhizoctonia solani*, De candolle στην γαρυφαλιά. Πτυχιακή εργασία. Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό ίδρυμα (Τ.Ε.Ι.).

Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Φυτολογίας. (1983). *Εκδοτική Αθηνών*, σελ. 128-129

Λεξικόν Φυτολογικόν Γεωαδίου, *Εκδοτικός Οίκος Δαμιανός*, σελ 460.

Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, Παύλος Δρανδάκης, Τόμος 13ος, 2η έκδοση, σελ 698

«*ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 4139 Νόμος περί εξαρτησιογόνων ουσιών και άλλες διατάξεις - Στις παραπάνω ουσίες δεν περιλαμβάνονται τα ακατέργαστα συγκομιζόμενα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια ποικιλιών κάνναβης του είδους *Cannabis Sativa L* χαμηλής περιεκτικότητας σε τετραϋδροκανναβινόλη (THC) και συγκεκριμένα μέχρι 0,2%, σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες διατάξεις της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης*». Αρχαιοθετήθηκε από το πρωτότυπο στις 14 Ιανουαρίου 2016. [Ανακτήθηκε στις 9 Οκτωβρίου 2015.](#)

Παντελίδης Ι. (2009). Φυτοπαθολογική και μοριακή διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των φυτών κατά των παθογόνων των αδρομυκώσεων. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2009.

Τζάμος, Ε. Κ. (2007). Φυτοπαθολογία. Κεφάλαιο 10: σελίδα 399. Β' έκδοση. *Εκδόσεις Σταμούλη*.

Τσαλίκη, Ε., Καλύβας, Α., (Ιούλιος-Αύγουστος-Σεπτέμβριος 2017). «*Βιομηχανική κάνναβη μια νέα καλλιέργεια στην Ελλάδα*». ΔΗΜΗΤΡΑ

Διαδικτυακή

Agraval, M. (2018). Inlifehealthcare. <https://www.inlifehealthcare.com/14-incredible-benefits-of-chitosan-the-weight-loss-supplement/>. (Accessed September 2021)

Alamy. Science History Images. Alamy Stock Photo. <https://www.alamy.com/stock-photo-bacillus-sp-bacteria-lm-134944421.html>. (Accessed September 2021)

Alchimia. <https://www.alchimiaweb.com/blogen/alternaria-cannabis-crop/>. (Accessed March 2022)

Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "tricarboxylic acid cycle". Encyclopedia Britannica, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/tricarboxylic-acid-cycle>. (Accessed 18 February 2022).

Cannabis DPR. California cannabis cultivation. https://www.cdpr.ca.gov/docs/cannabis/cannot_use_pesticide.pdf

«*Cannabis sativa information from NPGS/GRIN*». www.ars-grin.gov. Αρχαιοθετήθηκε από το πρωτότυπο στις 5 Ιανουαρίου 2009. [Ανακτήθηκε στις 13 Ιουλίου 2008](#)

Center for Medical Cannabis Research. 2012, UC San Diego Health System University of California. <http://health.ucsd.edu/news/releases/Pages/2012-05-14-smoked-cannabis-reduces-symptoms-of-multiple-sclerosis.aspx>. (Accessed 29 March 2020)

Ceresini, P. "Rhizoctonia Solani." Rhizoctonia Solani. NC State University. Web. 04 November 2011 <<http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Rhizoctonia>. (Accessed March 2022)

Department of Pesticide Regulation (DPR). www.cdpr.ca.gov/cannabis. (Accessed April 2020)

du Jardin, P., (2012). The Science of Plant Biostimulants—A bibliographic analysis. Adhoc Study Report to the European Commission DG ENTR. 2012; http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/fertilizers/final_report_bio_2012en.pdf (Accessed March 2020)

EISohly, A., M. (2007). Marijuana and the Cannabinoids. Humana Press. σελ. 8. ISBN 1-58829-456-0. ([Accessed May 2021](#)).

EMBL-EBI-training. <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/what-is/> (Accessed March 2021)

Fao.org. Seaweed Products paragraph 41 <http://www.fao.org/3/ac860e/ac860e02.htm> (Accessed September 2021)

Faix, B. (2017). Adaptation of plants to low-oxygen stress. Disseratation, LMU Munchen: Faculty of Biology. University Library. Electrnic Theses. DOI: 10.5282/EDOC.21907. URN: urn:nbn:de:vbv:19-219077. <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/21907/>. (Accessed, January 2022)

FRAC code list: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2020-finalb16c2b2c512362eb9a1eff00004acf5d.pdf?sfvrsn=54f499a_2. (Accesed March 2021)

George, H. (2019). Gardener's path. <https://gardenerspath.com/how-to/organic/trichoderma/>. (Accessed September 2021)

Gruenwald, J. (2018). Vitafoodsinsights. <https://www.vitafoodsinsights.com/regulation/future-health-claims-botanicals-eu>. (Accessed September 2021)

Heacox L. 2018. <https://www.croplife.com/special-reports/biologicals/biostimulants-gaining-ground/>. (Accessed September 2021).

Health Jade Team. <https://healthjade.net/fulvic-acid-reviews/>. (Accessed September 2021)

Indiamart. > Fertilizers and soil additives. > Fertilizer. > Micronitrient Fertilizers. <https://www.indiamart.com/proddetail/hydrolyzed-proteins-micronutrient-fertilizers-1160215662.html>. (Accessed September 2021)

Indiamart. > Fertilizers and soil additives. >Organic Fertilizers and Manure. > Seaweed Extract Fertilizers. <https://www.indiamart.com/proddetail/seaweed-extract-liquid-powder-3737382230.html>. (Accessed September 2021)

Indiamart. > Fertilizers and soil additives. >Organic Fertilizers and Manure. > Seaweed Extract Fertilizers. Seaweed Extract *Ascophyllum nosodum* for agriculture. <https://www.indiamart.com/proddetail/seaweed-extract-ascophyllum-nodosum-11374533873.html> (Accessed September 2021)

International Biochar Initiative. <http://www.biochar-international.org/biochar>. (Accessed September 2021)

Kappacarrageenansuppliers. Health Benefits of Carrageenan Nutrition for Digestion. <https://www.kappacarrageenansuppliers.com/2017/09/health-benefits-of-carrageenan.html>. (Accessed September 2021)

Kunkel, D. (2018). Fineartamerica. <https://fineartamerica.com/featured/bacillus-sp-forming-a-biofilm-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>. (Accessed September 2021)

Kunkel, D. Science Photo Library. Pseudomonas putida. <https://www.sciencephoto.com/media/798805/view>. (Accessed September 2021)

Marauko, D. Study. <https://study.com/academy/lesson/what-are-inorganic-compounds-definition-characteristics-examples.html>. (Accessed September 2021)

METACYC database, Pathway: L-threonine Biosynthesis. <https://metacyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=HOMOSER-THRESYN-PWY>. (Accessed February 2022)

Nature (Magazine), 2005-04-04. Cannabis compound benefits blood vessels. <https://www.nature.com/articles/news050404-7>. (Accessed April 2020)

Nextnode Bioscience. Plant Growth Biostimulant. <http://www.nextnodebioscience.com/AminoAcidBasedBiostimulant.aspx>. (Accessed September 2021)

Priusextract. <http://gr.priusextract.com/herbal-extract/anti-tumor-anti-cancer-herbal-extract/kelp-extract-laminarin.html>. (Accessed September 2021)

Plant Pathology. Wageningen University, Holland. <https://www.wur.nl/en/show/Role-of-Beneficial-Bacteria-in-Disease-Suppressive-soils.htm>. (Accessed September 2021)

Puracy. Glyceryl stearate. <https://puracy.com/blogs/ingredients/glyceryl-stearate>. (Accessed February 2022)

Scharf, D. Science Photo Library. Streptomyces sp. <https://www.sciencephoto.com/media/13158/view>. (Accessed September 2021)

Slideshare. 2018. Using Cover Crops to Develop Disease Suppressive Soil. <https://www.slideshare.net/AdvancingEcoAgricult/using-cover-crops-to-develop-disease-suppressive-soil>. (Accessed October-2021)

Weissinger, S. (2012). Alamy. <https://www.alamy.com/stock-photo-seaweed-on-the-beach-ascophyllum-nodosum-with-one-prominent-bubble-100436749.html>. (Accessed September 2021)

Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_stutzeri (Accessed September 2021)

Wyant, K. (2020). Progressive crop. <https://progressivecrop.com/2020/07/making-sense-of-biostimulants-for-improving-your-soil/>. (Accessed September 2021)

Schuster, J. (2022). Focus on Plants Problems. Chlorosis. University of Illinois Extension. <https://web.extension.illinois.edu/focus/index.cfm?problem=chlorosis>. (Accessed January 2022)

University of Hertfordshire. Pesticide Properties Database (PPDB). 2021. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1354.htm>. (Accessed, October-2021)

<https://www.alchimiaweb.com/blogen/alternaria-cannabis-crop/> (Accessed 24/08/2021)

Zhang, X., & Schmit, R. E. (1994). Ground Magazine. <http://grounds-mag.com> (Accessed, February 2021)

<https://cannabismagazine.com> (Accessed 24/08/2021)

<https://www.cannaconnection.com/blog/18418-can-you-smoke-weed-ordinary-tobacco-pipe> (Accessed August/2021)

<https://www.dummies.com/health/how-to-grow-marijuana-from-seed>. (Accessed 18/08/2021)

<https://edition.cnn.com/2014/03/07/health/gallery/uses-for-medical-marijuana/index.html> (Accessed 18/08/2021)

<https://www.indiamart.com/proddetail/seaweed-extract-ascophyllum-nodosum-11374533873.html>. (Accessed September 2021)

<https://www.slideshare.net/HealthyHempLifestyle/the-many-uses-of-hemp-and-the-food-and-products-it-provides-get-more-from-hemp-newscucc>. (Accessed 18/08/2021)

<https://stemhaverhill.com/about-the-plants>. (Accessed March 2022)

Δαουτόπουλος, Γ., Α.
https://daoutop.gr/%CE%B1%CE%B5%CE%B9%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%B9%CE%BA%CE%AE-%CE%B3%CE%B5%CF%89%CF%81%CE%B3%CE%AF%CE%B1/blog-post_22/. (Accessed September 2021)

Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) Νο 396/2005 περί ανωτάτων επιτρεπόμενων υπολειμμάτων στα τρόφιμα. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0062&from=en>. (Accessed October 2021)

Υπηρεσία δημόσιας υγείας των Η.Π.Α. Preludiance, (2014). Έγκριση μελέτης για την ιατρική φαρμακευτική κάναβη στις Η.Π.Α. <https://preludiance.blogspot.com/2014/03/iatriki-marijuana-egkrisi-meletis MAPS.html>. (Accessed September 2021)

Υπουργικό διάταγμα αριθμού 18534/2009 των ιταλικών αρμόδιων αρχών, περί προαιρετικής στέρησης αριθμού άδειας διάθεσης των προϊόντων βιοδιεγερτών στην αγορά. «Η κατάλληλη χρήση να μην επιφέρει επιβλαβή δράση στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία και να περιλαμβάνονται στο κεφάλαιο I του Υ.Δ. 18534/2009». https://biostimulants.weebly.com/uploads/8/0/0/3/8003583/annex_i_md_18354_2009.pdf

Υπουργικό διάταγμα αριθμού 75/2010 των ιταλικών αρμόδιων αρχών, περί προαιρετικής στέρησης αριθμού άδειας διάθεσης των προϊόντων βιοδιεγερτών στην αγορά. «Τα προϊόντα βιοδιεγερτών μπορούν να καταγραφούν χωρίς έγκριση, μόνο αν εισάγονται στην αγορά με την χρήση ονομάτων αυστηρώς σχετιζόμενα με το συστατικό και δεν αποτελούν μίγμα», όπως επισημαίνεται στο κεφάλαιο 6 του Υ.Δ. 75/2010. <https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/tris/en/search/?trisaction=search.detail&year=2016&num=97>

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2016. <http://www.minagric.gr/greek/data/MONCUT-46SC-tr20-lhxh-60531.pdf>. (Accessed October-2021)

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2021.
<https://1click.minagric.gr/oneClickUI/firmFytoPro.zul>. (Accessed, October-2021)

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2016.
http://www.minagric.gr/syspest/syspest_Detail.aspx?kod_farmak=60306. (Accessed March-2021)

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2020.
http://www.minagric.gr/syspest/syspest_Detail.aspx?kod_farmak=60531. (Accessed March-2021)

Παραρτήματα

Παράρτημα 1: Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

Abs(Dif)-HSD					Level	Mean
	L-Alanine_CS-A	L-Alanine_CS-C	L-Alanine_CS-B	L-Alanine_CS-E		
L-Alanine_CS-A	-0,00047	-0,00038	-0,00015	-0,00011	L-Alanine_CS-A	A 0,00088
L-Alanine_CS-C	-0,00038	-0,00051	-0,00028	-0,00023	L-Alanine_CS-C	A 0,000771
L-Alanine_CS-B	-0,00015	-0,00028	-0,00051	-0,00047	L-Alanine_CS-B	A 0,000535
L-Alanine_CS-E	-0,00011	-0,00023	-0,00047	-0,00051	L-Alanine_CS-E	A 0,000492
	L-Proline_CS-A	L-Proline_CS-B	L-Proline_CS-E	L-Proline_CS-C	Level	Mean
L-Proline_CS-A	-0,00037	-0,00004	-0,00003	0,00064	L-Proline_CS-A	A 0,001089
L-Proline_CS-B	-0,00004	-0,0004	-0,00039	0,00028	L-Proline_CS-B	A 0,000742
L-Proline_CS-E	-0,00003	-0,00039	-0,0004	0,00027	L-Proline_CS-E	A 0,000736
L-Proline_CS-C	0,00064	0,00028	0,00027	-0,0004	L-Proline_CS-C	B 6,17E-05
	L-Serine 2_CS-E	L-Serine 2_CS-A	L-Serine 2_CS-B	L-Serine 2_CS-C	Level	Mean
L-Serine 2_CS-E	-0,00044	-0,00015	0,00021	0,0003	L-Serine 2_CS-E	A 0,000967
L-Serine 2_CS-A	-0,00015	-0,00041	-0,00004	0,00004	L-Serine 2_CS-A	A B 0,000695
L-Serine 2_CS-B	0,00021	-0,00004	-0,00044	-0,00036	L-Serine 2_CS-B	B C 0,000314
L-Serine 2_CS-C	0,0003	0,00004	-0,00036	-0,00044	L-Serine 2_CS-C	C 0,00023
	L-Aspartic acid_CS-E	L-Aspartic acid_CS-A	L-Aspartic acid_CS-B	L-Aspartic acid_CS-C	Level	Mean
L-Aspartic acid_CS-E	-0,00053	0,00006	0,00004	0,00026	L-Aspartic acid_CS-E	A 0,001813
L-Aspartic acid_CS-A	0,00006	-0,00049	-0,0005	-0,00029	L-Aspartic acid_CS-A	B 0,001244
L-Aspartic acid_CS-B	0,00004	-0,0005	-0,00053	-0,00032	L-Aspartic acid_CS-B	B 0,001236
L-Aspartic acid_CS-C	0,00026	-0,00029	-0,00032	-0,00053	L-Aspartic acid_CS-C	B 0,001024

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

	Abs(Dif)-HSD				Level	Mean	
L-Isoleucine_CS-E	-0,00067	0,00117	0,00142	0,0015	L-Isoleucine_CS-E	A	0,003251
L-Isoleucine_CS-C	0,00117	-0,00067	-0,00043	-0,00035	L-Isoleucine_CS-C	B	0,001405
L-Isoleucine_CS-B	0,00142	-0,00043	-0,00067	-0,0006	L-Isoleucine_CS-B	B	0,001157
L-Isoleucine_CS-A	0,0015	-0,00035	-0,0006	-0,00062	L-Isoleucine_CS-A	B	0,001103
	L-Valine_CS-C	L-Valine_CS-E	L-Valine_CS-B	L-Valine_CS-A	Level	Mean	
L-Valine_CS-C	-0,00062	-0,00047	0,00003	0,0001	L-Valine_CS-C	A	0,00247
L-Valine_CS-E	-0,00047	-0,00062	-0,00011	-0,00004	L-Valine_CS-E	A B	0,002322
L-Valine_CS-B	0,00003	-0,00011	-0,00062	-0,00055	L-Valine_CS-B	B	0,001815
L-Valine_CS-A	0,0001	-0,00004	-0,00055	-0,00057	L-Valine_CS-A	B	0,001767
	L-Serine_1_CS-C	L-Serine_1_CS-A	L-Serine_1_CS-E	L-Serine_1_CS-B	Level	Mean	
L-Serine_1_CS-C	-0,00001	-0,00001	-0,00001	0	L-Serine_1_CS-C	A	2,46E-05
L-Serine_1_CS-A	-0,00001	-0,00001	-0,00001	0	L-Serine_1_CS-A	A	2,43E-05
L-Serine_1_CS-E	-0,00001	-0,00001	-0,00001	-0,00001	L-Serine_1_CS-E	A	1,98E-05
L-Serine_1_CS-B	0	0	-0,00001	-0,00001	L-Serine_1_CS-B	A	1,04E-05
	L-Glutamine_CS-B	L-Glutamine_CS-A	L-Glutamine_CS-C	L-Glutamine_CS-E	Level	Mean	
L-Glutamine_CS-B	-0,01016	0,01855	0,02259	0,02708	L-Glutamine_CS-B	A	0,079688
L-Glutamine_CS-A	0,01855	-0,00941	-0,00538	-0,00089	L-Glutamine_CS-A	B	0,051349
L-Glutamine_CS-C	0,02259	-0,00538	-0,01016	-0,00567	L-Glutamine_CS-C	B	0,046938
L-Glutamine_CS-E	0,02708	-0,00089	-0,00567	-0,01016	L-Glutamine_CS-E	B	0,04245

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

Abs(Dif)-HSD					Level	Mean
Pyroglutamate_CS-C	-0,01274	-0,01238	-0,00963	0,00637	Pyroglutamate_CS-C A	0,039843
Pyroglutamate_CS-E	-0,01238	-0,01274	-0,00999	0,00601	Pyroglutamate_CS-E A	0,039483
Pyroglutamate_CS-B	-0,00963	-0,00999	-0,01274	0,00326	Pyroglutamate_CS-B A	0,036732
Pyroglutamate_CS-A	0,00637	0,00601	0,00326	-0,0118	Pyroglutamate_CS-A B	0,021197
L-Asparagine_CS-E	-0,00291	-0,00239	0,00372	0,00444	L-Asparagine_CS-E A	0,009493
L-Asparagine_CS-C	-0,00239	-0,00291	0,0032	0,00392	L-Asparagine_CS-C A	0,008977
L-Asparagine_CS-B	0,00372	0,0032	-0,00291	-0,00219	L-Asparagine_CS-B B	0,002862
L-Asparagine_CS-A	0,00444	0,00392	-0,00219	-0,00269	L-Asparagine_CS-A B	0,002251
L-Threonine_CS-E	-0,00124	-0,00022	0,00096	0,00296	L-Threonine_CS-E A	0,006943
L-Threonine_CS-A	-0,00022	-0,00115	0,00003	0,00203	L-Threonine_CS-A A	0,005972
L-Threonine_CS-C	0,00096	0,00003	-0,00124	0,00076	L-Threonine_CS-C B	0,004745
L-Threonine_CS-B	0,00296	0,00203	0,00076	-0,00124	L-Threonine_CS-B C	0,002746
Glycine_CS-C	-0,0003	-0,00016	-0,00003	0,00001	Glycine_CS-C A	0,00067
Glycine_CS-A	-0,00016	-0,00028	-0,00015	-0,00011	Glycine_CS-A A B	0,000544
Glycine_CS-E	-0,00003	-0,00015	-0,0003	-0,00026	Glycine_CS-E A B	0,000399
Glycine_CS-B	0,00001	-0,00011	-0,00026	-0,0003	Glycine_CS-B B	0,000362

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

Abs(Dif)-HSD					Level	Mean
L-Threonine_CS-E	-0,00124	-0,00022	0,00096	0,00296	L-Threonine_CS-E A	0,006943
L-Threonine_CS-A	-0,00022	-0,00115	0,00003	0,00203	L-Threonine_CS-A A	0,005972
L-Threonine_CS-C	0,00096	0,00003	-0,00124	0,00076	L-Threonine_CS-C B	0,004745
L-Threonine_CS-B	0,00296	0,00203	0,00076	-0,00124	L-Threonine_CS-B C	0,002746
L-Leucine1_CS-E					Level	Mean
L-Leucine1_CS-E	-0,00034	-0,00019	-0,00017	-0,00004	L-Leucine1_CS-E A	0,000859
L-Leucine1_CS-A	-0,00019	-0,00032	-0,00029	-0,00017	L-Leucine1_CS-A A	0,000718
L-Leucine1_CS-B	-0,00017	-0,00029	-0,00034	-0,00022	L-Leucine1_CS-B A	0,00068
L-Leucine1_CS-C	-0,00004	-0,00017	-0,00022	-0,00034	L-Leucine1_CS-C A	0,000559
L-Leucine2_CS-A					Level	Mean
L-Leucine2_CS-A	-0,00019	-0,00016	-0,00007	-0,00005	L-Leucine_CS-A A	0,000211
L-Leucine2_CS-E	-0,00016	-0,0002	-0,0001	-0,00009	L-Leucine_CS-E A	0,000179
L-Leucine2_CS-B	-0,00007	-0,0001	-0,0002	-0,00018	L-Leucine_CS-B A	8,19E-05
L-Leucine2_CS-C	-0,00005	-0,00009	-0,00018	-0,0002	L-Leucine_CS-C A	6,27E-05
a-Linolenate_CS-A					Level	Mean
a-Linolenate_CS-A	-0,00125	-0,001	0,00032	0,00048	a-Linolenic acid_CS-A A	0,006235
a-Linolenate_CS-E	-0,001	-0,00135	-0,00002	0,00014	a-Linolenic acid_CS-E A B	0,005936
a-Linolenate_CS-C	0,00032	-0,00002	-0,00135	-0,00119	a-Linolenic acid_CS-C B C	0,004612
a-Linolenate_CS-B	0,00048	0,00014	-0,00119	-0,00135	a-Linolenic acid_CS-B C	0,004451

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekoprop 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

	Monopalmitin_CS-E	Monopalmitin_CS-A	Monopalmitin_CS-B	Monopalmitin_CS-C	Level		Mean
Monopalmitin_CS-E	-0,00765	-0,00396	-0,00092	0,00103	Monopalmitin_CS-E	A	0,038342
Monopalmitin_CS-A	-0,00396	-0,00708	-0,00405	-0,00211	Monopalmitin_CS-A	A B	0,034933
Monopalmitin_CS-B	-0,00092	-0,00405	-0,00765	-0,00571	Monopalmitin_CS-B	A B	0,03161
Monopalmitin_CS-C	0,00103	-0,00211	-0,00571	-0,00765	Monopalmitin_CS-C	B	0,029664
	Oxalic acid_CS-B	Oxalic acid_CS-A	Oxalic acid_CS-E	Oxalic acid_CS-C	Level		Mean
Oxalic acid_CS-B	-0,00069	0,00019	0,00066	0,00067	Oxalic acid_CS-B	A	0,003092
Oxalic acid_CS-A	0,00019	-0,00064	-0,00017	-0,00016	Oxalic acid_CS-A	B	0,002239
Oxalic acid_CS-E	0,00066	-0,00017	-0,00069	-0,00068	Oxalic acid_CS-E	B	0,001743
Oxalic acid_CS-C	0,00067	-0,00016	-0,00068	-0,00069	Oxalic acid_CS-C	B	0,00173
	Succinic acid_CS-B	Succinic acid_CS-C	Succinic acid_CS-A	Succinic acid_CS-E	Level		Mean
Succinic acid_CS-B	-0,00552	0,01333	0,01383	0,01435	Succinic acid_CS-B	A	0,022043
Succinic acid_CS-C	0,01333	-0,00552	-0,00502	-0,0045	Succinic acid_CS-C	B	0,003186
Succinic acid_CS-A	0,01383	-0,00502	-0,00511	-0,0046	Succinic acid_CS-A	B	0,002886
Succinic acid_CS-E	0,01435	-0,0045	-0,0046	-0,00552	Succinic acid_CS-E	B	0,002168
	Glyceric acid_CS-B	Glyceric acid_CS-A	Glyceric acid_CS-E	Glyceric acid_CS-C	Level		Mean
Glyceric acid_CS-B	-0,00371	-0,00041	0,00549	0,0055	Glyceric acid_CS-B	A	0,011928
Glyceric acid_CS-A	-0,00041	-0,00344	0,00245	0,00246	Glyceric acid_CS-A	A	0,008757
Glyceric acid_CS-E	0,00549	0,00245	-0,00371	-0,00371	Glyceric acid_CS-E	B	0,002725
Glyceric acid_CS-C	0,0055	0,00246	-0,00371	-0,00371	Glyceric acid_CS-C	B	0,002717

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

Abs(Dif)-HSD							
	Malic acid_CS-B	Malic acid_CS-A	Malic acid_CS-C	Malic acid_CS-E	Level		Mean
Malic acid_CS-B	-0,01401	0,05653	0,05837	0,06495	Malic acid_CS-B	A	0,085514
Malic acid_CS-A	0,05653	-0,01297	-0,01114	-0,00457	Malic acid_CS-A	B	0,015485
Malic acid_CS-C	0,05837	-0,01114	-0,01401	-0,00743	Malic acid_CS-C	B	0,013126
Malic acid_CS-E	0,06495	-0,00457	-0,00743	-0,01401	Malic acid_CS-E	B	0,006547
	Cinnamic acid_CS-A	Cinnamic acid_CS-C	Cinnamic acid_CS-E	Cinnamic acid_CS-B	Level		Mean
Cinnamic acid_CS-A	-0,00007	-0,00006	-0,00002	0,00002	Cinnamic acid_CS-A	A	0,000174
Cinnamic acid_CS-C	-0,00006	-0,00008	-0,00004	0,00001	Cinnamic acid_CS-C	A	0,000157
Cinnamic acid_CS-E	-0,00002	-0,00004	-0,00008	-0,00003	Cinnamic acid_CS-E	A B	0,000118
Cinnamic acid_CS-B	0,00002	0,00001	-0,00003	-0,00008	Cinnamic acid_CS-B	B	7,58E-05
	Cannabidiol_CS-E	Cannabidiol_CS-C	Cannabidiol_CS-A	Cannabidiol_CS-B	Level		Mean
Cannabidiol_CS-E	-0,00016	-0,00016	-0,00013	-0,00003	Cannabidiol_CS-E	A	0,000344
Cannabidiol_CS-C	-0,00016	-0,00016	-0,00014	-0,00003	Cannabidiol_CS-C	A	0,00034
Cannabidiol_CS-A	-0,00013	-0,00014	-0,00015	-0,00004	Cannabidiol_CS-A	A	0,000323
Cannabidiol_CS-B	-0,00003	-0,00003	-0,00004	-0,00016	Cannabidiol_CS-B	A	0,00021
	Cannabinol_CS-C	Cannabinol_CS-E	Cannabinol_CS-A	Cannabinol_CS-B	Level		Mean
Cannabinol_CS-C	-0,01217	-0,01102	-0,00778	-0,00076	Cannabinol_CS-C	A	0,026869
Cannabinol_CS-E	-0,01102	-0,01217	-0,00894	-0,00191	Cannabinol_CS-E	A	0,025714
Cannabinol_CS-A	-0,00778	-0,00894	-0,01127	-0,00426	Cannabinol_CS-A	A	0,022924
Cannabinol_CS-B	-0,00076	-0,00191	-0,00426	-0,01217	Cannabinol_CS-B	A	0,015457

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

Abs(Dif)-HSD					Level	Mean	
	Galactopyranoside_CS-A	Galactopyranoside_CS-E	Galactopyranoside_CS-B	Galactopyranoside_CS-C			
Galactopyranoside_CS-A	-0,00718	-0,0054	0,01677	0,02574	Galactopyranoside_CS-A	A	0,059559
Galactopyranoside_CS-E	-0,0054	-0,00775	0,01441	0,02338	Galactopyranoside_CS-E	A	0,057487
Galactopyranoside_CS-B	0,01677	0,01441	-0,00775	0,00122	Galactopyranoside_CS-B	B	0,035322
Galactopyranoside_CS-C	0,02574	0,02338	0,00122	-0,00775	Galactopyranoside_CS-C	C	0,026352
Abs(Dif)-HSD					Level	Mean	
	a,a-Trehalose_CS-E	a,a-Trehalose_CS-B	a,a-Trehalose_CS-C	a,a-Trehalose_CS-A			
a,a-Trehalose_CS-E	-0,03126	0,01692	0,05732	0,16086	a,a-Trehalose_CS-E	A	0,260542
a,a-Trehalose_CS-B	0,01692	-0,03126	0,00915	0,11268	a,a-Trehalose_CS-B	B	0,212365
a,a-Trehalose_CS-C	0,05732	0,00915	-0,03126	0,07227	a,a-Trehalose_CS-C	C	0,171956
a,a-Trehalose_CS-A	0,16086	0,11268	0,07227	-0,02894	a,a-Trehalose_CS-A	D	0,069559
Abs(Dif)-HSD					Level	Mean	
	Myo-inositol_CS-C	Myo-inositol_CS-A	Myo-inositol_CS-B	Myo-inositol_CS-E			
Myo-inositol_CS-C	-0,00248	0,00248	0,00663	0,00771	Myo-inositol_CS-C	A	0,014511
Myo-inositol_CS-A	0,00248	-0,0023	0,00184	0,00292	Myo-inositol_CS-A	B	0,009636
Myo-inositol_CS-B	0,00663	0,00184	-0,00248	-0,0014	Myo-inositol_CS-B	C	0,005402
Myo-inositol_CS-E	0,00771	0,00292	-0,0014	-0,00248	Myo-inositol_CS-E	C	0,004323
Abs(Dif)-HSD					Level	Mean	
	a-Glyceryl stearate_CS-E	a-Glyceryl stearate_CS-A	a-Glyceryl stearate_CS-B	a-Glyceryl stearate_CS-C			
a-Glyceryl stearate_CS-E	-0,00229	-0,00176	-0,00059	0,00046	a-Glyceryl stearate_CS-E	A	0,011858
a-Glyceryl stearate_CS-A	-0,00176	-0,00212	-0,00095	0,00009	a-Glyceryl stearate_CS-A	A	0,011407
a-Glyceryl stearate_CS-B	-0,00059	-0,00095	-0,00229	-0,00125	a-Glyceryl stearate_CS-B	A B	0,010152
a-Glyceryl stearate_CS-C	0,00046	0,00009	-0,00125	-0,00229	a-Glyceryl stearate_CS-C	B	0,009109

Παράρτημα 1 (συνέχεια): Στατιστικά δεδομένα της επεξεργασίας των δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS μέσω του λογισμικού JUMP. Οι επεμβάσεις CS-C μάρτυρας, CS-A Acadian, CS-E Ekorpor 4G, CS-B Biochar. «Abs (Dif)-HSD» η τυπική αποκλιση, «Mean» ο μέσος όρος των τιμών από το matrix της ανάλυσης. Η συσχέτιση των τιμών έγινε με τα γράμματα A,B,C και D.

	Abs(Dif)-HSD				Level	Mean	
	Phosphate_CS-C	Phosphate_CS-B	Phosphate_CS-E	Phosphate_CS-A			
Phosphate_CS-C	-0,00148	0,00009	0,0011	0,00339	Phosphate_CS-C	A	0,009019
Phosphate_CS-B	0,00009	-0,00148	-0,00047	0,00183	Phosphate_CS-B	B	0,007454
Phosphate_CS-E	0,0011	-0,00047	-0,00148	0,00081	Phosphate_CS-E	B	0,006442
Phosphate_CS-A	0,00339	0,00183	0,00081	-0,00137	Phosphate_CS-A	C	0,004204

Παράρτημα 2: Συγκεντρωτικός πίνακας με όλους τους μεταβολίτες της κάναβης (*Cannabis Sativa* L.) που ανιχνεύθηκαν από την ανάλυση GC/ΕΙ/MS.

Retention Time	Retention Time f	Quant mass	Metabolite	Metabolite	Metabolite derivative	Synonym(s)	KEGGID	ColmMetabolomeD	PubChem	CAS Reg	Biosynth	Abbrevi	Monoiso	Average	MolecularFormula
6,77	5,77	171		Carbodiimide, bis(trimethylsilyl)-											
7,49	6,49	147		Ethylene gly	Ethylene glycol (2TM	Ethylene gly	C00180	n/a	4575	7381-30-8	map0082	map0082	62,0368	62,0678	C2H8O2
7,96	6,96	89		RT 7.96	RT 7.96	RT 7.96									
8,00	8,00	162		Pyridine											
9,65	8,65	174		Propanoic acid, 2-(methoxyimino)-, trimethylsilyl ester											
10,01	9,01	117		L-Lactic ac	L-Lactic acid (2TMS)	(S)-Lactate;	C00186	n/a	107689	79-33-4	metabolite	map0001	90,032	90,078	C3H8O3
10,38	9,38	73	+	2-Methyl-4-pentenoic acid, trimethylsilyl ester											
10,47	9,47	177		Acetic acid	Acetic acid (2TMS)	Acetate; Ace	C00033	n/a	3335	3581-77-4	map0001	map0001	60,021	60,052	C2H4O2
10,68	9,68	72		L-Valine	L-Valine (1TMS)	2-Amino-3-m	C00183	A122001	6287	72-18-4	map0028	map0028	117,08	117,15	C5H11NO2
11,32	10,32	147		L-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester											
11,59	10,59	146		hydroxylamine											
11,74	10,74	171		RT 11.74	RT 11.74	RT 11.74									
12,16	11,16	162		Pyridine											
12,35	11,35	147		Oxalic acid	Oxalic acid (2TMS)	Oxalate; Etha	C00209	A113002	971	18294-04-7	map00625	map00625	89,9963	90,0349	C2H2O4
12,42	11,42	142		2-Pyrrolidinone, 1-(trimethylsilyl)-											
12,67	11,67	152		RT 12.67	RT 12.67	RT 12.67									
12,86	11,86	86		L-Leucine	L-Leucine (1TMS)	L-Leucine;	C00123	A129002	3423	61-90-5	map00280	map00280	131,0948	131,1729	C8H13NO2
13,38	12,38	70		L-Proline	L-Proline (1TMS)	2-Pyrrolidin	C00148	A132003	145742	147-85-3	map00330	map00330	115,0633	115,1305	C5H9NO2
13,46	12,46	86		L-Isoleucin	L-Isoleucine (1TMS)	2-Amino-3-m	C00407	A119002	6306	73-32-5	map00280	map00280	131,0948	131,1729	C8H13NO2
14,49	13,49	147	+	Malonic acid, bis(trimethylsilyl) ester											
14,84	13,84	144		L-Valine	L-Valine (2TMS)	2-Amino-3-m	C00183	A122001	6287	72-18-4	map00280	map00280	117,0790	117,1463	C5H11NO2
15,16	14,16	211		Ethyl phos	Ethyl phosphoric aci	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
15,45	14,45	73	+	Arabino-Hexos-2-ulose, 3,4,5,6-tetrakis-O-(trimethylsilyl)-, bis(dimethyl acetal)											
15,67	14,67	73	+	β-Alanine	β-Alanine (3TMS)	beta-Alanine	C00099	A144001	239	107-95-9	map00240	map00240	89,0477	89,0932	C3H7NO2
15,98	14,98	116	+	L-Serine	L-Serine (2TMS)	L-2-Amino-3	C00065	A138001	5951	56-45-1	map00260	map00260	105,0426	105,0926	C3H7NO3
16,27	15,27	174		Ethanolami	Ethanolamine (3TMS)	Aminoethan	C00189	A128002	3489	141-43-5	map00564	map00564	61,0528	61,0831	C2H7NO
16,50	15,50	158		L-Leucine	L-Leucine (2TMS)	L-Leucine;	C00123	A129002	3423	61-90-5	nthesis ma	map00280	131,0948	131,1729	C8H13NO2
16,61	15,61	299		Phosphate	Phosphate (1TMS)	Orthophosp	C00009	A129001	3311	0497-05-2	Two-ox	map0018	97,977	97,995	H3PO4
16,69	15,69	147		Glycerol	Glycerol (3TMS)	Glycerin; 1,	C00116	A129003	753	56-81-5	map00040	map0004	92,0473	92,0938	C3H8O3
16,80	15,80	180		3-Pyridinecarboxylic acid, trimethylsilyl ester											
17,08	16,08	73		L-Threonin	L-Threonine (2TMS)	2-Amino-3-h	C00188	A132001	6288	72-19-5	map00260	map00260	119,0582	119,1192	C4H9NO3
17,28	16,28	117	+	Butane, 1,2,3-tris(trimethylsiloxy)-											
17,41	16,41	174		Glycine	Glycine (3TMS)	Aminoacetic	C00037	A133001	750	56-40-8	map0023	map0023	75,0320	75,0666	C2H5NO2
17,58	16,58	147		Succinic ac	Succinic acid (2TMS)	Succinate; 6	C00042	A134001	1110	110-15-6	map0002	map0002	#####	#####	C4H8O4
18,12	17,12	184		RT 18.12	RT 18.12	RT 18.12									

Παράρτημα 2 (συνέχεια): Συγκεντρωτικός πίνακας με όλους τους μεταβολίτες της κάναβης (*Cannabis Sativa* L.) που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση GC/EI/MS.

18,27	17,27	147		Glyceric ac	D-Glycerate; Glycera	C00258	A135003	439194	473-81-4	map0003	map0003	#####	#####	C3H8O4	Carboxylic acids
18,48	17,48	245		Maleic acid, bis(trimethylsilyl) ester											
18,70	17,70	213		RT 18.70	RT 18.70	RT 18.70									
18,84	17,84	188		L-Asparagin	L-Asparagine (3TMS)	2-Aminosucc	C00152	A168001	6267	70-47-3	map00250	map00250	132,0535	132,1179	C4H8N2O3
19,06	18,06	204		L-Serine	L-Serine (3TMS)	L-2-Amino-3-	C00085	A138001	5951	56-45-1	map00026	map00026	#####	#####	C3H7NO3
19,27	18,27	247		2(3H)-Furanone, dihydro-3,4-bis(trimethylsilyloxy)-, trans-											
19,32	18,32	213		RT 19.32	RT 19.32	RT 19.32									
19,37	18,37	234		Malic acid, O-(trimethylsilyl)-, bis(trimethylsilyl)ester											
19,44	18,44	240		RT 19.44	RT 19.44	RT 19.44									
19,79	18,79	218		L-Threonin	L-Threonine (2TMS)	2-Amino-3-h	C00188	A132001	6288	72-19-5	map00026	map00026	119,06	119,12	C4H9NO3
20,09	19,09	147	+	3-Trimethylsilyloxy(trimethylsilyloxy)caproate											
20,44	19,44	103	+	Butanoic acid, 2,4-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester											
20,53	19,53	160		L-Aspartic	L-Aspartic acid (2TMS)	L-Aspartate;	C00049	R000386	5960	56-84-8	map00022	map00022	#####	#####	C4H7NO4
20,64	19,64	174		β-Alanine	β-Alanine (3TMS)	beta-Alanine;	C00099	A144001	239	107-95-9	map00240	map00240	89,0477	89,0932	C3H7NO2
20,70	19,70	156		RT 20.70	RT 20.70	RT 20.70									
21,92	20,92	232		Aspartic ac	Aspartic acid (3TMS)	L-Aspartate;	C00049	A152002	3351	56-84-8	map00220	map00220	133,0360	133,1027	C4H7NO4
22,06	21,06	103		4-Ketoglucose, bis(O-methylxime), tetrakis(trimethylsilyl)											
22,21	21,21	84		2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid, trimethylsilyl ester											
22,34	21,34	103		RT 22.34 (C	RT 22.34 (Carbohydr	RT 22.34 (Carbohydrate)									Carbohydrates
22,38	21,38	73		Malic acid	Malic acid (3TMS)	(S)-Malate; L-	C00149	A149001	222856	97-87-6	thesis of all	map00020	134,0215	134,0874	C4H6O5
22,86	21,86	217		RT 22.86	RT 22.86	RT 22.86									
22,91	21,91	244		Succinic anhydride, O,O'-bis(trimethylsilyl)-											
22,96	21,96	176		L-Methionine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester											
23,00	22,00	156		Pyroglutan	Pyroglutamic acid (2	Pidolic acid	C01879	A153002	7405	98-79-3	map00048	map00048	#####	#####	C5H7NO3
23,05	22,05	217		RT 23.05	RT 23.05	RT 23.05									
23,14	22,14	218		Aspartic ac	Aspartic acid (3TMS)	L-Aspartate;	C00049	A152002	5960	56-84-8	map00220	map00220	133,0375	133,1027	C4H7NO4
23,22	22,22	174		Glycine, N,N-bis(trimethylsilyl)-, trimethylsilyl ester											
23,36	22,36	199		RT 23.36	RT 23.36	RT 23.36									
23,46	22,46	263		RT 23.46	RT 23.46	RT 23.46									
23,82	22,82	232		RT 23.82	RT 23.82	RT 23.82									
23,92	22,92	292		Threonic ac	Threonic acid (4TMS)	(2R,3S)-2,3,4-	C01620	A156001	5460407	7306-96-9	ite and all	map0005	136,04	136,1	C4H8O5
24,08	23,08	219		Propanoic	Propanoic acid (3TM	Propanoate	C00163	n/a	1032	8166-00-	map00064	map00064	74,0368	74,0785	C3H6O2
24,33	23,33	292		Threonic ac	Threonic acid (4TMS)	Threonate; L-	C01620	A156001	5460407	7306-96-9	map00053	map00053	136,0372	136,1033	C4H8O5
24,44	23,44	186		Pentanedioic acid, 2-(methoxyimino)-, bis(trimethylsilyl) ester											
24,81	23,81	73		RT 24.81 (C	RT 24.81 (Carbohydr	RT 24.81 (Carbohydrate)									Carbohydrates
25,09	24,09	249		RT 25.09	RT 25.09	RT 25.09									

Παράρτημα 2 (συνέχεια): Συγκεντρωτικός πίνακας με όλους τους μεταβολίτες της κάναβης (*Cannabis Sativa* L.) που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση GC/EI/MS.

25,25	24,25	73		L-Asparagi	L-Asparagine (3TMS)	2-Aminosucc	C00152	A168001	6287	70-47-3	map00250	map00250	132,0535	132,1179	D4H8N2O3
25,46	24,46	246		L-Glutamin	L-Glutamine (3TMS)	L-2-Aminoglu	C00064	A178001	5961	56-85-9	map00220	map00220	146,0691	146,1445	D5H10N2O3
25,54	24,54	200		RT 25.54	RT 25.54	RT 25.54									
25,71	24,71	328		RT 25.71	RT 25.71	RT 25.71									
25,96	24,96	333		RT 25.96	RT 25.96	RT 25.96									
26,22	25,22	73		2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone, tris(trimethylsilyl)-											
26,42	25,42	266		Benzoic acid, 2-[(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester											
26,62	25,62	231		L-Asparagi	L-Asparagine (3TMS)	2-Aminosucc	C00152	A168001	6287	70-47-3	map00250	map00250	132,0535	132,1179	D4H8N2O3
26,69	25,69	244		3-Indoleacetic acid, N-(tert-butylidimethylsilyl)-, tert-butylidimethylsilyl ester											
26,92	25,92	244		RT 26.92	RT 26.92	RT 26.92									
27,06	26,06	173		RT 27.06	RT 27.06	RT 27.06									
27,11	26,11	103		RT 27.11 (C	RT 27.11 (Carbohydr	RT 27.11 (Carbohydrate)									Carbohydrates
27,27	26,27	275		RT 27.27	RT 27.27										
27,29	26,29	206		RT 27.29 (A	RT 27.29 (Amino acid	RT 27.29 (Amino acid)									Amino acids
27,49	26,49	307		Xylitol	Xylitol (5TMS)	Xylitol	C00379	A171001	6912	87-99-0	map00040	map00040	152,0685	152,1458	C5H12O5
27,94	26,94	174		RT 27.94 (A	RT 27.94 (Amine)	RT 27.94 (Amine)									Amines
28,14	27,14	217		Ribitol											
28,33	27,33	217		RT 28.33	RT 28.33	RT 28.33									
28,48	27,48	394		RT 28.48	RT 28.48	RT 28.48									
28,72	27,72	292		RT 28.72 (C	RT 28.72 (Carbohydr	RT 28.72 (Carbohydrate)									Carbohydrates
28,79	27,79	156	+	L-Glutamin	L-Glutamine (3TMS)	L-2-Aminoglu	C00064	A178001	5961	56-85-9	map00220	map00220	146,0691	146,1445	D5H10N2O3
28,84	27,84	357		Glycerol-3-	Glycerol-3-phosphat	DL-Glycerol	C00093	A177002	754	57-03-4	map00056	map00056	#####	#####	C3H9O6P
29,02	28,02	292		RT 29.02 (C	RT 29.02 (Carbohydr	RT 29.02 (Carbohydrate)									Carbohydrates
29,13	28,13	299		Phosphoric acid, 2-[bis(trimethylsilyl)amino]ethyl bis(trimethylsilyl) ester											
29,19	28,19	292		RT 29.19 (C	RT 29.19 (Carbohydr	RT 29.19 (Carbohydrate)									Carbohydrates
29,36	28,36	296		RT 29.36	RT 29.36	RT 29.36									
29,80	28,80	266		Benzoic acid, 2-[(trimethylsilyl)amino]-, trimethylsilyl ester											
30,00	29,00	73		RT 30.00 (C	RT 30.00 (Carbohydr	RT 30.00 (Carbohydrate)									Carbohydrates
30,06	29,06	285		Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester											
30,30	29,30	217		RT 30.30 (C	RT 30.30 (Carbohydr	RT 30.30 (Carbohydrate)									Carbohydrates
30,50	29,50	173		RT 30.50 (C	RT 30.50 (Carboxylic	RT 30.50 (Carboxylic acid)									Carboxylic acids
30,59	29,59	264		Adenin	Adenine (2TMS)	9H-purin-6-az	C00147	A188005	3447	73-24-5	map00230	map00230	135,0545	135,1267	C5H5N5
30,77	29,77	273		RT 30.77	RT 30.77	RT 30.77									
30,82	29,82	188		L-Asparagi	L-Asparagine (4TMS)	2-Aminosucc	C00152	A168001	6287	70-47-3	map00250	map00250	132,0535	132,1179	D4H8N2O3
30,98	29,98	345		RT 30.98	RT 30.98	RT 30.98									
31,03	30,03	260		Myo-Inosit	Myo-Inositol (8TMS)	D-myo-Inositol	C00137	A209002	892	87-89-8	map00052	map00052	180,0634	180,1559	C8H12O6

Παράρτημα 2 (συνέχεια): Συγκεντρωτικός πίνακας με όλους τους μεταβολίτες της κάναβης (*Cannabis Sativa* L.) που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση GC/EI/MS.

31.29	30.29	73	D-Fructose	D-Fructose (1MEOX, 5	Levulose; Fr	C00095	A187002	439163	57-48-7	map0005	map0005	#####	#####	C6H12O6
31.30	30.30	103	RT 31.30	RT 31.30	RT 31.30									
31.51	30.51	307	D-Fructose	D-Fructose (1MEOX, 5	Levulose; Fr	C00095	A188004	439163	57-48-7	map00051	map00051	180,0634	180,1559	C6H12O6
31.61	30.61	331	RT 31.61 (C	RT 31.61 (Carbohydr	RT 31.61 (Carbohydrate)									Carbohydrates
31.66	30.66	318	RT 31.66 (C	RT 31.66 (Carbohydr	RT 31.66 (Carbohydrate)									Carbohydrates
31.81	30.81	73	D-Glucose	D-Glucose (5TMS)	Grape suga	C00031	A191001	5793	50-99-7	map0001	map0001	#####	#####	C6H12O6
31.97	30.97	249	Cinnamic acid, p-(trimethylsiloxy)-, trimethylsilyl ester											
32.14	31.14	319	D-Glucose	D-Glucose (5TMS)	Grape suga	C00031	A191001	5793	50-99-7	map0001	map0001	#####	#####	C6H12O6
32.48	31.48	204	RT 32.48 (C	RT 32.48 (Carbohydr	RT 32.48 (Carbohydrate)									Carbohydrates
32.53	31.53	277	RT 32.53	RT 32.53	RT 32.53									
32.82	31.82	381	RT 32.82	RT 32.82	RT 32.82									
32.87	31.87	318	Scyllitol	Scyllitol (6TMS)	S	C08153	A170028	8409	488-59-5	map00056	map00056	#####	#####	C6H12O6
33.39	32.39	204	RT 33.39 (C	RT 33.39 (Carbohydr	RT 33.39 (Carbohydrate)									Carbohydrates
33.51	32.51	311	cis-9-Hexadecenoic acid, trimethylsilyl ester											
33.64	32.64	217	Myo-inositol	Myo-inositol (6TMS)	D-myo-Inos	C00137	A209002	892	87-89-8	map0005	map0005	#####	#####	C6H12O6
33.74	32.74	292	D-Gluconic	D-Gluconic acid (6TMS	D-Gluconate	C00257	A196001	10690	528-95-4	map00030	map00030	198,0583	198,1553	C6H12O7
33.81	32.81	297	RT 33.81 (C	RT 33.81 (Carboxylic	RT 33.81 (Carboxylic acid)									Carboxylic acids
33.91	32.91	313	Palmitic ac	Palmitic acid (1TMS)	Hexadecano	C00249	A205001	985	57-10-3	map0006	map0006	#####	#####	C16H32O2
34.33	33.33	204	RT 34.33	RT 34.33	RT 34.33									
34.52	33.52	73	trans-Traumatic acid, bis(trimethylsilyl) ester											
34.88	33.88	79	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-											
35.10	34.10	204	RT 35.10 (C	RT 35.10 (Carbohydr	RT 35.10 (Carbohydrate)									Carbohydrates
35.38	34.38	305	Myo-inositol	Myo-inositol (6TMS)	D-myo-Inosi	C00137	A209002	892	87-89-8	map00052	map00052	180,0634	180,1559	C6H12O6
35.57	34.57	355	RT 35.57	RT 35.57	RT 35.57									
35.78	34.78	396	RT 35.78	RT 35.78	RT 35.78									
35.90	34.90	319	RT 35.90 (C	RT 35.90 (Carbohydr	RT 35.90 (Carbohydrate)									Carbohydrates
36.31	35.31	143	Phytol	Phytol (1TMS)	2-Hexadecyl	C01389	A217006	5366244	150-86-7	R05618 R	R05618 R	296,3079	296,5310	C20H40O
36.40	35.40	319	RT 36.40 (C	RT 36.40 (Carbohydr	RT 36.40 (Carbohydrate)									Carbohydrates
36.90	35.90	337	Linoleic ac	Linoleic acid (1TMS)	Linoleate; (3	C01595	A221003	5280450	60-33-3	map00058	map00058	#####	#####	C18H32O2
37.04	36.04	75	α-Linolenic	α-Linolenic acid (1TMS	(9Z,12Z,15Z	C06427	A222003	5280934	463-40-1	map000592	map000592	278,2246	278,4296	C18H30O2
37.19	36.19	204	RT 37.19 (C	RT 37.19 (Carbohydr	RT 37.19 (C	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Carbohydrates
37.45	36.45	341	Stearic acid	Stearic acid (1TMS)	Octadecano	C01530	A225002	5281	57-11-4	map0006	map0006	#####	#####	C18H36O2
37.59	36.59	299	RT 37.59	RT 37.59	RT 37.59									
37.97	36.97	144	RT 37.97 (C	RT 37.97 (Carbohydr	RT 37.97 (Carbohydrate)									Carbohydrates
38.11	37.11	390	Cannabidiol	Cannabidiol	Cannabidiol	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
38.91	37.91	290	RT 38.11 (C	RT 38.11 (Carbohydr	RT 38.11 (Carbohydrate)									Carbohydrates

Παράρτημα 2 (συνέχεια): Συγκεντρωτικός πίνακας με όλους τους μεταβολίτες της κάναβης (*Cannabis Sativa* L.) που ανιχνεύτηκαν από την ανάλυση GC/EI/MS.

39,03	38,03	204		RT 39.03 (C	RT 39.03 (Carbohydr	RT 39.03 (Carbohydrate)												Carbohydrates
39,28	38,28	309		RT 39.28	RT 39.28	RT 39.28												
39,34	38,34	303		RT 39.34	RT 39.34	RT 39.34												
39,50	38,50	204		2-O-Glycerol	2-O-Glycerol- α -D-galac	2-O-Glycerol	n/a	n/a	91754128	534-68-9	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
40,23	39,23	343		1-Monomyr	1-Monomyr	1-Monomyr	n/a	n/a	79050	1188-73-4	n/a	n/a	#####	#####				C17H34O4
40,30	39,30	463		Oleamide	Oleamide (1TMS)	Oleoyl amide	C19670	A223003	5283387	301-02-0	n/a	n/a	281,2720	281,4840				C18H35NO
40,36	39,36	191		RT 40.36 (C	RT 40.36 (Carbohydr	RT 40.36 (Carbohydrate)												Carbohydrates
40,48	39,48	114		RT 40.48 (C	RT 40.48 (Carbohydr	RT 40.48 (Carbohydrate)												Carbohydrates
40,56	39,56	204		RT 40.56 (C	RT 40.56 (Carbohydr	RT 40.56 (Carbohydrate)												Carbohydrates
40,76	39,76	389		RT 40.76	RT 40.76	RT 40.76												
41,00	40,00	204		RT 41.00 (C	RT 41.00 (Carbohydr	RT 41.00 (Carbohydrate)												Carbohydrates
41,16	40,16	318	Myo-inositol	D-myo-Inos	D-myo-Inositol 1,3,5,	D-myo-Inos	C01284	n/a	439468	0298-95-	map0056	map0056	#####	#####				C17H32O5
41,20	40,20	121		RT 41.20 (C	RT 41.20 (Carbohydr	RT 41.20 (Carbohydrate)												Carbohydrates
41,62	40,62	253		RT 41.62 (C	RT 41.62 (Carbohydr	RT 41.62 (Carbohydrate)												Carbohydrates
41,88	40,88	387		RT 41.88	RT 41.88	RT 41.88												
42,52	41,52	491		Cannabinol	Cannabinoid (Canna	Cannabinol	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
42,65	41,65	391		RT 42.65	RT 42.65	RT 42.65												
42,81	41,81	204		2-Monopalmit	2-Monopalmitin (TMS)	2-Monopalmit	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	256,2402	256,4241				C16H32O2
43,00	42,00	342		RT 43.00	RT 43.00	RT 43.00												
43,20	42,20	328		RT 43.20	RT 43.20	RT 43.20												
43,38	42,38	371		Monopalmit	1-Monopalmitin (2TMS)	Monopalmitin	C00249	n/a	985	57-10-3	synthesis r	map00061	256,2402	256,4241				C16H32O2
43,44	42,44	381		RT 43.44	RT 43.44	RT 43.44												
43,66	42,66	204		RT 43.66 (C	RT 43.66 (Carbohydr	RT 43.66 (Carbohydrate)												Carbohydrates
44,17	43,17	351		RT 44.17 (C	RT 44.17 (Carbohydr	RT 44.17 (Carbohydrate)												Carbohydrates
44,22	43,22	178		RT 44.22	RT 44.22	RT 44.22												
44,34	43,34	236		Adenosine	Adenosine (4TMS)	Adenine nucl	C00212	A273001	60961	58-61-7	map00230	map00230	267,0968	267,2413				C10H13N5O4
44,40	43,40	171		RT 44.40	RT 44.40	RT 44.40												
44,97	43,97	419		RT 44.97	RT 44.97	RT 44.97												
45,15	44,15	381		α,α -Trehalo	α,α -Trehalose (8TMS)	α,α -Trehalo	C01083	A274002	521102	99-20-7	map00500	map00500	342,1162	342,2965				C12H22O11
45,47	44,47	259		RT 45.47 (C	RT 45.47 (Carbohydr	RT 45.47 (Carbohydrate)												Carbohydrates
46,41	45,41	399		α -Glyceryl	α -Glyceryl stearate (2	1-Monostear	n/a	n/a	24899	n/a	n/a	n/a	358,3083	358,5460				C21H42O4
46,69	45,69	381		RT 46.69 (C	RT 46.69 (Carbohydr	RT 46.69 (Carbohydrate)												Carbohydrates
47,11	46,11	381		RT 47.11	RT 47.11	RT 47.11												

