



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

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Αξιολόγηση της επίδρασης χαλκούχων σκευασμάτων στον μεταβολισμό  
του φυτού της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)  
με εφαρμογή μεταβολομικής**

**Αλέξανδρος-Ιάσων Σ. Μπάστας**

Επιβλέπων καθηγητής:

Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2022**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιολόγηση της επίδρασης χαλκούχων σκευασμάτων στον μεταβολισμό του φυτού της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) με εφαρμογή μεταβολομικής

Evaluation of the effect of copper formulations on the metabolism of cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) with the application of metabolomics

**Αλέξανδρος-Ιάσων Σ. Μπάστας**

Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Α. Αλιφέρης, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δημήτριος Μπιλάλης, Καθηγητής ΓΠΑ

Φωτεινή Φλουρή, Λέκτορας ΓΠΑ

## **Αξιολόγηση της επίδρασης χαλκούχων σκευασμάτων στο μεταβολισμό του φυτού της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) με εφαρμογή μεταβολομικής**

*ΠΜΣ Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας*

### **Περίληψη**

Η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) αποτελεί μια καλλιέργεια με πολύ σημαντικές προοπτικές χάρη στις πολλές και διαφορετικές χρήσεις του φυτού οι οποίες είναι διαδεδομένες από τα αρχαία χρόνια. Συγκεκριμένα εδώ και πολλά χρόνια από το φυτό της κάνναβης παράγονται προϊόντα διατροφής, υφάσματα, δομικά υλικά, καλλυντικά καθώς και φάρμακα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η μελέτη της βιοδραστικότητας του φυτού χάρη στην περιεκτικότητά του σε κανναβινοειδή και τερπένια. Ωστόσο υπάρχει σημαντική έλλειψη γνώσης και μελέτης εξαιτίας της χρόνιας ποινικοποίησης του κάτι που επηρεάζει σημαντικά και την έρευνα πάνω στη φυτοπροστασία του φυτού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η χρήση ασφαλών προϊόντων φυτοπροστασίας είναι κρίσιμη ιδιαίτερα όταν πρόκειται για φαρμακευτική χρήση, καθώς δεν πρέπει να επιβαρύνονται οι ασθενείς με παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) ή μυκοτοξινών. Αυτοί οι προβληματισμοί σε συνδυασμό με την έλλειψη εγκεκριμένων Φ.Π. για την καλλιέργεια της κάνναβης στην χώρα μας καθώς και τους σύγχρονους προβληματισμούς του γεωργικού κλάδου καθιστούν απαραίτητη την έρευνα νέων πηγών βιοδραστικότητας με στόχο την παραγωγή ασφαλών προϊόντων υψηλής ποιότητας.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η χρήση επιλεγμένων χαλκούχων σκευασμάτων στο πλαίσιο της φυτοπροστασίας εξετάζοντας τη δράση τους με εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης.

**Επιστημονική περιοχή:** μεταβολισμός κάνναβης

**Λέξεις-κλειδιά:** Φυτοπροστασία κάνναβης, χαλκούχα σκευάσματα, μεταβολομική ανάλυση.

## **Evaluation of the effect of copper formulations on the metabolism of cannabis plant (*Cannabis sativa* L.) with the application of metabolomics**

*MsC Intergrated Plant Protection and Enviromental Management Systems  
Department of Crop Science  
Laboratory of Agricultural Pharmacology*

### **Abstract**

Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is a crop with very important prospects thanks to the many and different uses of the plant which are widespread since ancient times. Specifically, for many years the cannabis plant has been producing food products, fabrics, building materials, cosmetics and medicines. The study of the bioactivity of the plant has become particularly interesting due to its content of cannabinoids and terpenes. However, there is a significant lack of knowledge and study due to its chronic criminalization, which significantly affects research on plant protection. It is important to note that the use of safe plant protection products is critical, especially when it comes to medicinal use. These concerns in combination with the lack of approved plant protection products for the cultivation of cannabis in our country as well as the current concerns of the agricultural sector make it necessary to research new sources of bioactivity in order to produce safe high quality products. In the present study, the use of selected copper preparations in the context of plant protection was evaluated by examining their action by applying metabolic analysis

**Scientific area:** cannabis metabolism

**Keywords:** Cannabis plant protection, copper preparations, metabolic analysis.

## Περιεχόμενα

Συντομογραφίες .....	8
1. Εισαγωγή .....	9
1.1 Η κάνναβη ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	9
1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση κάνναβης.....	12
1.1.3 Βοτανικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά κάνναβης.....	13
1.1.4 Προϊόντα και χρήσεις κάνναβης .....	18
1.1.5 Οικονομική σημασία καλλιέργειας της κάνναβης σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο .....	22
1.2. Βιοδραστικές ουσίες κάνναβης .....	25
1.2.1 Φυτοκανναβινοειδή .....	26
1.2.2 Τερπενοειδή.....	32
1.3 Καλλιέργεια κάνναβης ( <i>Cannabis sativa</i> L.) .....	34
Υπαίθρια καλλιέργεια κάνναβης .....	35
Θερμοκηπιακή καλλιέργεια κάνναβης .....	36
1.3.1 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις κάνναβης .....	36
1.4 Ασθένειες και εχθροί της κάνναβης.....	37
1.4.1 Παθογόνα και ασθένειες της κάνναβης.....	37
1.4.2. Εχθροί της κάνναβης.....	39
1.5 Φυτοπροστασία: σύγχρονα προβλήματα και προκλήσεις.....	41
1.5.1 Τα χαλκούχα σκευάσματα ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) .....	42
1.7.1 Εγκεκριμένα σκευάσματα στο εξωτερικό και στην Ελλάδα .....	52
1.7.2.Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) και μυκοτοξίνες.....	54
1.8 Η έννοια της μεταβολομικής ανάλυσης.....	56
1.8.1. Αναλυτικά όργανα για την εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης .....	58
1.8.2 Βιοπληροφορική επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής .....	59
1.8.3. Εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης στο κλάδο της φυτοπροστασίας ....	60
1.8.4 Εφαρμογή μεταβολομικής στην κάνναβη ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	60
2. Σκοπός της μελέτης.....	62
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	63
3.1 Χημικά και αντιδραστήρια.....	63
3.2 Εφαρμογή χαλκούχων σκευασμάτων .....	63
3.3.Καλλιέργεια φυταρίων κάνναβης ( <i>Cannabis sativa</i> L.) και συνθήκες ανάπτυξης.....	65
3.4. Πειραματικός σχεδιασμός.....	68
3.5. Μεταβολομική ανάλυση: Δειγματοληψία και εκχύλιση δειγμάτων για ανάλυση GC/EI/MS.....	70
3.6. Ρυθμίσεις GC/EI/MS για μεταβολομική ανάλυση .....	73
3.7. Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση .....	74

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	76
4.1 Η χρήση υποστρώματος τύρφης:.....	76
4.2. Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο μεταβολομικής GC/EI/MS.....	78
4.3. Επίδραση των χαλκούχων σκευασμάτων στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά φυταρίων κάνναβη ( <i>C. sativa</i> L.).....	78
4.4. Ο μεταβολισμός των φυταρίων κάνναβης ( <i>C. sativa</i> L.) .....	79
5. Συμπεράσματα .....	102
6. Βιβλιογραφία .....	103

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή ολοκληρώθηκε στο πλαίσιο της μελέτης του φυτού της κάνναβης από την ομάδα του εργαστηρίου της Γεωργικής Φαρμακολογίας του ΓΠΑ. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον επιβλέπων καθηγητή αλλά και κύριο καθοδηγητή της όλης προσπάθειας, κύριο Αλιφέρη Κωνσταντίνο, ο οποίος από την πρώτη στιγμή καταφέρνει να κερδίσει το ενδιαφέρον του κάθε σπουδαστή μέσω των νέων πεδίων έρευνας που προτείνει στον καθένα. Ευχαριστώ θερμά την Κα Φλουρή καθώς και τον Κ. Μπιλάλη, μέλη της τριμελούς επιτροπής για το χρόνο τους και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης θερμές ευχαριστίες αξίζουν όλοι οι εργαστηριακοί μου συνεργάτες για την άψογη συνεργατική σχέση που υπήρχε μεταξύ μας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτωρ κ. Καλαμπόκη Ιωάννη και τους συναδέλφους μου κ. Κολαϊνή Στέφανο και την κ. Μεταξά Αικατερίνη. Επίσης ευχαριστώ θερμά τον Χρήστο Κερεζούδη, Γιώργο Μητρονίκα αλλά και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας που ήταν πάντα πρόθυμοι να βοηθήσουν καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου αλλά κυρίως την Κα Ιωάννα Κάρδαρη για την συμβολή της όλης προσπάθειας που μου προσέφεραν με κάθε δυνατό μέσο.

## **Συντομογραφίες**

**CBD:** Cannabidiol-Κανναβιδιόλη

**CBN:** Cannabinol-Κανναβινόλη

**THC:** Tetrahydrocannabinol-Τετραϋδροκανναβινόλη

**GC:** Gas Chromatography-Αέρια Χρωματογραφία

**Φ.Π.:** Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

**δ.ο.:** δραστική ουσία



# Εισαγωγή

## 1.1 Η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.)

Η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) (**Εικόνα 1.**) αποτελεί ένα φυτικό είδος που καλλιεργείται εδώ και χιλιάδες χρόνια. Παλαιότερα, η χρήση της αφορούσε στην αξιοποίηση των ινών του στελέχους, των χημικών ιδιοτήτων της ρητίνης που παράγει και δευτερευόντως των βρώσιμων σπερμάτων (Chandra, Lata et al. 2017).

Ανάλογα με τη χρήση του φυτού, ο εκάστοτε καλλιεργητής επέλεγε και καλλιεργούσε τα φυτά που κατά την κρίση του εκπλήρωναν στο μέγιστο το σκοπό της καλλιέργειας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μεταβληθούν τα μορφολογικά και χημικά χαρακτηριστικά των ιστών σε σχέση με τα πρωταρχικά φυτά, ενώ σε αυτό συνέβαλε και η φύση μέσω της σταυροεπικονίασης. Τα παραπάνω αποτελούν τους κύριους λόγους επικράτησης αντικρουόμενων απόψεων για την ταξινόμηση της κάνναβης, διαφορετικές ταξινομικές προσεγγίσεις μελετώνται ακόμη και σήμερα (Hazekamp, Tejkalová et al. 2016, Piomelli, Russo et al. 2016).

Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) αποτελεί ένα είδος, το οποίο διακρίνεται σε δύο υποείδη βάσει της περιεκτικότητας των φυτών σε  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (THC) (φυτά με υψηλή και με χαμηλή περιεκτικότητα σε THC), ανεξαρτήτως αν αυτά προήλθαν από τυχαίες διασταυρώσεις στη φύση ή εάν στην εξέλιξη τους συνέβαλε ο ανθρώπινος παράγοντας (Chandra, Lata et al. 2017).



**Εικόνα 1.** Φυτάρια κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) ηλικίας 17 ημερών (αριστερά) και 3 ημερών (δεξιά) της ποικιλίας Futura 75.

### 1.1.1 Ιστορική αναδρομή εξάπλωσης της καλλιέργειας

Η κάνναβη θεωρείται, ευρέως, αυτόχθον είδος της Δυτικής και Κεντρικής Ασίας ενώ άλλες πηγές τοποθετούν την προέλευσή της στη Βόρεια Κασπία, τη Σιβηρία, την Κίνα, τα Ιμαλάια ή την Κεντρική περιοχή της Ασίας στους πρόποδες των Ιμαλαίων (Piomelli, Russo et al. 2016). Κατά τα προϊστορικά χρόνια, είναι πιθανό να πραγματοποιήθηκε φυσική εξάπλωση του φυτού σε όλες τις παραπάνω περιοχές της Ασίας, κάτι που υποστηρίζεται από το γεγονός ότι άγρια στελέχη των φυτών εντοπίζονται στην ευρύτερη περιφέρεια της Ασιατικής Ηπείρου. Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής τόπος καταγωγής της κάνναβης δεν μπορεί να προσδιοριστεί με γνώμονα την παρούσα κατανομή των άγριων στελεχών, καθώς τα φυτά έχουν εξαπλωθεί και έχουν υποστεί τροποποιήσεις από τον άνθρωπο για χιλιετίες (Clarke and Merlin 2013).

Η περίοδος κατά την οποία ο άνθρωπος ξεκίνησε να ασχολείται με την καλλιέργεια των φυτών για την εξυπηρέτηση των αναγκών του, χρονολογείται περίπου το 13.000 π.Χ. Από τα χιλιάδες είδη φυτών που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος, μόνο μερικά εξ αυτών αποτέλεσαν καλλιεργήσιμα είδη, τα οποία αποτέλεσαν και τα θεμέλια της ανάπτυξης του ανθρώπινου πολιτισμού. Σε αυτά συγκαταλέγεται και το φυτό της κάνναβης. Αρχαιολόγοι έχουν ανακαλύψει πήλινα αγγεία τα οποία χρονολογούνται περίπου στο 10.000 π.Χ. Αυτό, ωστόσο, δεν μπορεί να αποτελέσει αποδεικτικό στοιχείο καλλιέργειας της κάνναβης, καθώς η συλλογή των ινών μπορεί να προήλθε από φυτά τα οποία φύονταν ελεύθερα στη φύση. Γενικά, επικρατεί η άποψη πως η κάνναβη καλλιεργείται τα τελευταία 6.000 χρόνια, όπως και πολλά άλλα βασικά φυτά (Chandra, Lata et al. 2017).

Η χρήση της κάνναβης στη χώρα μας είναι γνωστή από την αρχαία Ελλάδα, ήδη από τα μέσα του 5<sup>ου</sup> αιώνα π.Χ. όπως αναφέρει και ο αρχαίος ιστορικός Ηρόδοτος, χρησιμοποιούσαν το φυτό ως πρώτη ύλη για την παρασκευή σχοινιών, караβόπανων, υφασμάτων, αλλά και για θεραπευτικούς και ψυχαγωγικούς σκοπούς. Οι τεχνικές καλλιέργειας και επεξεργασίας των ινών φαίνεται να προήλθαν από την Ανατολή (Ελένη Τσαλίκη 2018).

Η καλλιέργεια της βιομηχανικής κάνναβης για εμπορικούς σκοπούς ξεκίνησε από την σύσταση του Νεοελληνικού κράτους, με πρωτοστάτες τους νομούς της Αργολίδας και της Αρκαδίας. Η Ελλάδα μαζί με την Αίγυπτο και την Τουρκία κατείχαν σημαντική θέση στις εξαγωγές του φυτού. Στην Τρίπολη, εφημερίδα της εποχής αναφέρει ότι η παραγωγή στη Μαντίνεια ανερχόταν περίπου στους 6,5 τόνους το

έτος 1904. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας της κάνναβης όμως διεκόπη, καθώς η συνθήκη των Βερσαλλιών (1919) περιλάμβανε ως όρο τη κατάργηση της καλλιέργειας και της εμπορίας κάνναβης λόγω εθισμού και επιβλαβών επιπτώσεων στην υγεία. Ακολουθώντας τα υπόλοιπα Ευρωπαϊκά κράτη, η Ελλάδα, με το νομοθετικό διάταγμα της 7/11/1925, θέσπισε την απαγόρευση της εμπορίας κάνναβης για δέκα χρόνια, με σκοπό την διάθεση των αποθεμάτων έως την εξάντληση τους, τη μείωση του εργατικού δυναμικού στα κανναβουργεία και την αντικατάσταση της καλλιέργειας με άλλες. Το έτος 1932, το ελληνικό κράτος απαγόρευσε την καλλιέργεια και την κατοχή της ινδικής κάνναβης. Μετά την δικτατορία του Μεταξά επιβλήθηκαν σκληρά μέτρα με σκοπό την οριστική απαγόρευση της καλλιέργειας και της εμπορίας ινδικής κάνναβης (Μητσιάς 2015).

Κατά την καλλιέργεια του φυτού της κάνναβης, η συνεχής επιλογή του μητρικού υλικού ανάλογα με τον προορισμό και τη χρήση του τελικού προϊόντος, καθώς και τις συνθήκες των ανθρώπων, συνέβαλε στη δημιουργία αξιοσημείωτων διαφοροποιήσεων μεταξύ των φυτών του *Cannabis sativa* L.. την Ευρωπαϊκή χερσόνησο και στη Βόρεια Ασία, η καλλιέργεια της κάνναβης προοριζόταν κυρίως για την παραγωγή ινών και σε μερικές περιπτώσεις για τα βρώσιμα σπέρματα ή τα έλαια τους. Αντιθέτως στη Νότια Ασία και Αφρική τα προϊόντα της καλλιέργειας προορίζονταν περισσότερο για φαρμακευτικούς, ψυχαγωγικούς και πνευματικούς σκοπούς, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις, προορίζονταν για τις μη τοξικές τους ιδιότητες. Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω, στις βόρειες περιοχές αναπτύχθηκαν φυτά με χαρακτηριστικά που ευνοούσαν την παραγωγή ινών, ενώ αντίστοιχα, στα φυτά των νότιων περιοχών μεγιστοποιήθηκαν τα χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. (Hazekamp, Tejkaloná et al. 2016, Piomelli, Russo et al. 2016)

Σαφέστατα, λόγω των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, και κατ'επέκταση των διαφορετικών ωρών ημέρας και νύχτας, παρατηρούνται διαφορές στις ανάγκες των φυτών όσον αφορά την φωτοπερίοδο. Επίσης, τα φυτά που αναπτύσσονταν στις βόρειες περιοχές εξέλιξαν την άνθισή τους με αποτέλεσμα να ωριμάζουν νωρίς, ώστε να προσαρμόζονται στη βραχύτερη βλαστική περίοδο αυτών των περιοχών (Chandra, Lata et al. 2017).

### 1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης ανήκει στην οικογένεια *Cannabaceae*, στο γένος *Cannabis*, ενώ κοινώς, αναγνωρίζεται το είδος *Cannabis sativa* L. Θεωρείται ότι στο είδος αυτό υπάγονται δύο υποείδη, τα *C. sativa* subsp. *sativa* και *C. sativa* subsp. *indica* (McPartland and research 2018). Η δημοσίευση του Linnaeus (*Species Plantarum*) το 1753 (Linnaeus 1799) θεωρείται το σημείο εκκίνησης της βοτανικής ονοματολογίας, επομένως η λατινική ονομασία *C. sativa* έχει προτεραιότητα. Τριάντα δύο χρόνια αργότερα, ο Lamarck (de Lamarck 1786) εισήγαγε το είδος *C. indica* για φυτά κάνναβης με προέλευση από την Ινδία, τη Νοτιοανατολική Ασία και τη Νότια Αφρική. Η περιγραφή του Lamarck για το *C. indica* διέφερε από την περιγραφή του για το *C. sativa* σε 8 «πολύ διακριτούς» μορφολογικούς χαρακτήρες στους μίσχους, διακλαδώσεις, φυλλάρια και άνθη. Ο Lamarck περιέγραψε, επίσης τις χημειοταξινομικές διαφορές των δύο ειδών, παρατηρώντας ότι το *C. indica* παρήγαγε μια έντονη μυρωδιά και ήταν ψυχοδραστικό. Αργότερα, προτάθηκε η άποψη ότι η κάνναβη αποτελεί ένα πολυτυπικό είδος και ότι το *indica* μπορεί να χαρακτηριστεί ως ποικιλία του *C. sativa* (Hillig and Mahlberg 2004, Clarke and Merlin 2013).

Το *C. sativa* και το *C. indica* μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη μορφολογία τους καθώς το πρώτο είναι ψηλότερο με ινώδες στέλεχος, ενώ το δεύτερο είναι κοντύτερο με ξυλώδη μίσχο, με βάση τη φυτοχημεία τους το *C. sativa* έχει αναλογία κανναβινοειδών [ $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (THC) > κανναβιδιόλη (CBD)], ενώ το *C. indica* έχει αναλογία [THC < CBD] και με βάση το αρχικό τους γεωγραφικό εύρος (το *C. sativa* στην Ευρώπη και το *C. indica* στην Ασία). Ο διαχωρισμός του *C. sativa* από το *C. indica* είναι το κύριο ζήτημα στην ταξινόμηση της κάνναβης, καθώς παραμένει το ερώτημα εάν τα παραπάνω αποτελούν διαφορετικά υποείδη (Small and Cronquist 1976) ή διαφορετικά είδη (Hillig and Mahlberg 2004, Clarke and Merlin 2013).

Επιπλέον, (Small and Cronquist 1976) δημιούργησαν μια επίσημη βοτανική ταξινόμηση για το *C. sativa*-η οποία περιλαμβάνει το διαχωρισμό του σε δύο υποείδη με βάση την περιεκτικότητα των αποξηραμένων θηλυκών ανθέων σε THC (με 0,3% THC ως σημείο διαχωρισμού) και το διαχωρισμό των υποειδών σε δύο ποικιλίες, με βάση το βαθμό εξημέρωσης. Συγκεκριμένα:

- *C. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa* (χαμηλό ποσοστό THC, με χαρακτηριστικά εξημέρωσης)

- *C. sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea* (χαμηλό ποσοστό THC, με χαρακτηριστικά άγριου τύπου)
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica* (υψηλό ποσοστό THC, με χαρακτηριστικά εξημέρωσης)
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica* (υψηλό ποσοστό THC, με χαρακτηριστικά άγριου τύπου)

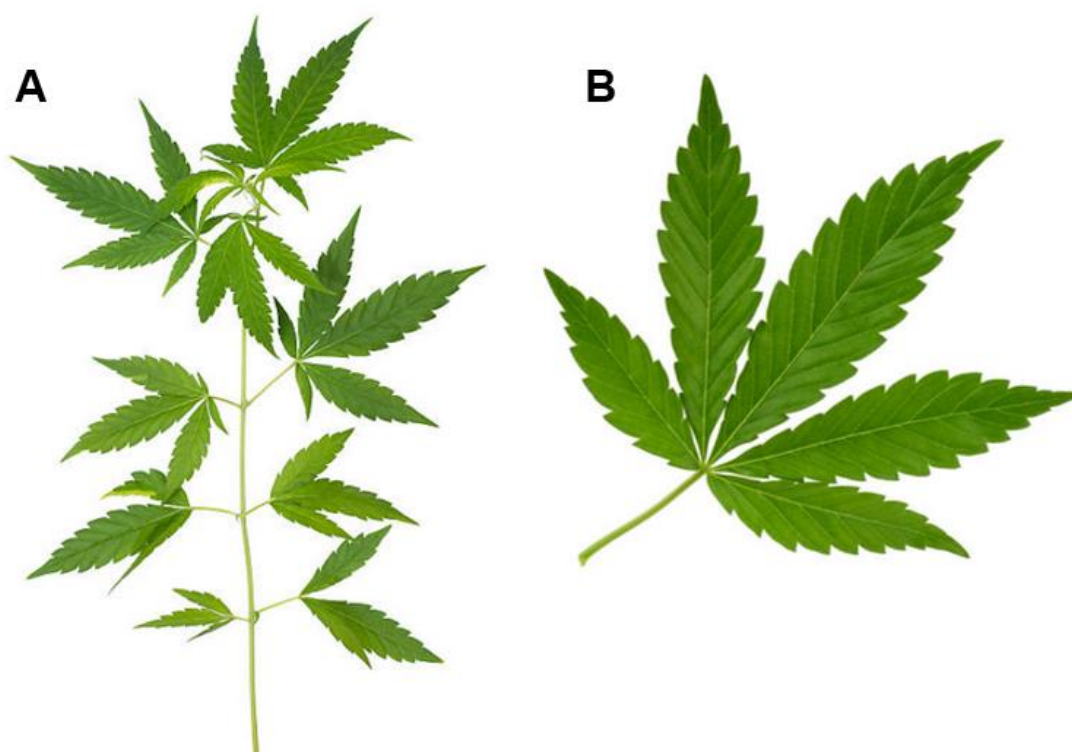
### 1.1.3 Βοτανικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά κάνναβης

Η κάνναβη καλλιεργείται εδώ και χιλιετίες για ποικίλες χρήσεις σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου. Η καλλιέργεια του φυτού για διαφορετικούς σκοπούς αλλά και σε διαφορετικές συνθήκες οδήγησε στην μεταβολή διαφόρων φυσιολογικών αλλά και βοτανικών χαρακτηριστικών του φυτού με αποτέλεσμα οι διάφορες ποικιλίες που διαμορφώνονταν σε βάθος χρόνου να διαφέρουν σημαντικά από τα αρχέγονα φυτά (Chandra, Lata et al. 2017). Το φυτό της κάνναβης είναι κατά κύριο λόγο δίοικο δηλαδή φέρει αρσενικά και θηλυκά άνθη σε ξεχωριστά φυτά. Ο ρόλος των αρσενικών φυτών είναι η επικονίαση των θηλυκών. Γενικά, τα αρσενικά φυτά αρχίζουν να ανθίζουν λίγο πριν από τα θηλυκά, παράγουν άφθονους ανθήρες που διαχωρίζονται ανοιχτά επιτρέποντας στα διερχόμενα ρεύματα αέρα να μεταφέρουν την απελευθερωμένη γύρη στα θηλυκά άνθη (Gorelick και Bernstein, 2017). Λίγο μετά την επικονίαση, τα αρσενικά φυτά μαραίνονται και πεθαίνουν, αφήνοντας στα θηλυκά μέγιστο χώρο, θρεπτικά συστατικά και νερό. Συχνά συναντάμε και μόνοικα φυτά κάνναβης ως προϊόν βελτίωσης κυρίως με στόχο την παραγωγή ινών, τα οποία φέρουν τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά άνθη στο ίδιο φυτό (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).

Ο κεντρικός βλαστός έχει όρθια ανάπτυξη με ύψος 0,2-6 μέτρα εξαρτώμενο πάντα από τη ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης. Τα αρσενικά φυτά έχουν χαρακτηριστική όρθια ανάπτυξη. Τα θηλυκά εμφανίζουν εύρωστη ανάπτυξη όπου σε προχωρημένο βλαστικό στάδιο των φυτών χαρακτηριστικό του φαρμακευτικού γονότυπου είναι η ιδιαίτερα ζωηρή ανάπτυξη (Chandra, Lata et al. 2017).

Τα φύλλα αποτελούνται από 3-13 φυλλάρια με το κεντρικό φυλλάριο να είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένο κατά μήκος. Το χρώμα τους συγκαταλέγεται στο εύρος του ανοιχτού με σκούρο πράσινο. Σε όλη την επιφάνεια των φύλλων φέρονται σκούρο πράσινα τριχίδια, αραιά ή πυκνά διατεταγμένα. Η διάταξη των φύλλων πάνω στους

βλαστούς είναι κατ'ένναλαγή ή αντίθετη ταξιφυλλία, διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία και το ύψος έκπτυξης των φύλλων. Η διάταξη της κατ'ένναλαγή ταξιφυλλίας συναντάται στα ανώτερα τμήματα των βλαστών. Οι μίσχοι των φύλλων φτάνουν το μήκος των 7cm, είναι κυλινδρικοί με χαρακτηριστική ελαφριά αυλάκωση στην ανώτερη πλευρά τους (Chandra, Lata et al. 2017). Σε νεαρά φυτά τα δύο πρώτα πραγματικά φύλλα δεν είναι σύνθετα, ωστόσο η έκπτυξη των επόμενων που ακολουθούν είναι σύνθετα με τρία φυλλάρια και των επόμενων με πέντε φυλλάρια (Jiang, Li et al. 2006) (**Εικόνα 2.**).



**Εικόνα 2.** Φύλλα σε αντίθετη διάταξη στο βλαστό του φυτού της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) (A), Φύλλο του φυτού κάνναβης (B) (Πηγή: <https://www.istockphoto.com/>).

Τα αρσενικά άνθη φέρονται σε ταξιανθίες του ενός άνθους ή σε σύμπλεγμα ανθέων. Ο κάλυκας αποτελείται από πέντε σέπαλα ωοειδή και επιμήκη (2-4cm) χρώματος κιτρινοπράσινου ή λευκοπράσινου. Το αρσενικό άνθος έχει πέντε στήμονες όπου ο κάθε ένας αποτελείται από ένα λεπτό νήμα και τον ανθήρα που διαθέτει πόρους, μέσω των οποίων γίνεται η απελευθέρωση των γυρεόκοκκων. Τα θηλυκά άνθη έχουν σκούρο πράσινο χρώμα εκφύονται κατά ζεύγη σε συμπαγείς κυματοειδείς ταξιανθίες που σχηματίζονται στις κορυφές των βλαστών. Ο ύπερος του κάθε άνθους φέρει τριχίδια και περιβάλλεται από μεμβρανώδες περιάνθιο και βράκτια φύλλα. Η ωοθήκη είναι υποφυής, έχει διπλό λεπτό στύλο και καταλήγει στο στίγμα. Τα βράκτια φύλλα είναι πράσινου χρώματος τραχεία με επικαλυπτόμενες άκρες, τα οποία πλαισιώνουν την ωοθήκη. Ο καρπός είναι αχαίνιο προερχόμενο από ένα καρπόφυλλο, σχήματος ελλειψοειδούς μήκους 4-6 mm και πλάτους 3-4 mm. Σε πρώιμο στάδιο το χρώμα του είναι πράσινο και καθώς ωριμάζει το χρώμα του γίνεται καφέ με γκρι. Εντός του καρπού περιέχεται ένα σπέρμα (Chandra, Lata et al. 2017) (**Εικόνα 3.**).



**Εικόνα 3.** Θηλυκή ανθοταξία κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) κοντά στην ωρίμανση (A), θηλυκή ανθοταξία σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης (B), αρσενική ανθοταξία σε αρχικό στάδιο (Γ), σπόρος του φυτού της κάνναβης (Δ). Πηγή: <https://www.cannabisbusinesstimes.com/>.

Ένα χαρακτηριστικό του φυτού της κάνναβης αποτελεί η παρουσία τριχιδίων σχεδόν σε όλα τα εναέρια μέρη του. Οι δύο κύριοι τύποι τριχωμάτων που παρατηρούνται είναι τα αδενικά τριχώματα και τα μη-αδενικά. Τα αδενικά τριχώματα αποτελούν την πρωτογενή δομή για την σύνθεση και αποθήκευση των κανναβινοειδών. Τα φυτοκανναβινοειδή συσσωρεύονται στην εκκριτική κοιλότητα των αδενικών τριχωμάτων, τα οποία εμφανίζονται σε μεγάλο βαθμό στα θηλυκά άνθη και στα υπέργεια τμήματα των φυτών (Gorelick και Bernstein, 2017). Επίσης ανιχνεύονται σε μικρότερη περιεκτικότητα στους σπόρους, στις ρίζες ακόμη και στη γύρη. Η συγκέντρωση των κανναβινοειδών εξαρτάται από το τμήμα του προερχόμενου ιστού, την ηλικία την ποικιλία, τις συνθήκες ανάπτυξης, τον χρόνο συγκομιδής και τις συνθήκες αποθήκευσης. (Chandra, Lata et al. 2017).

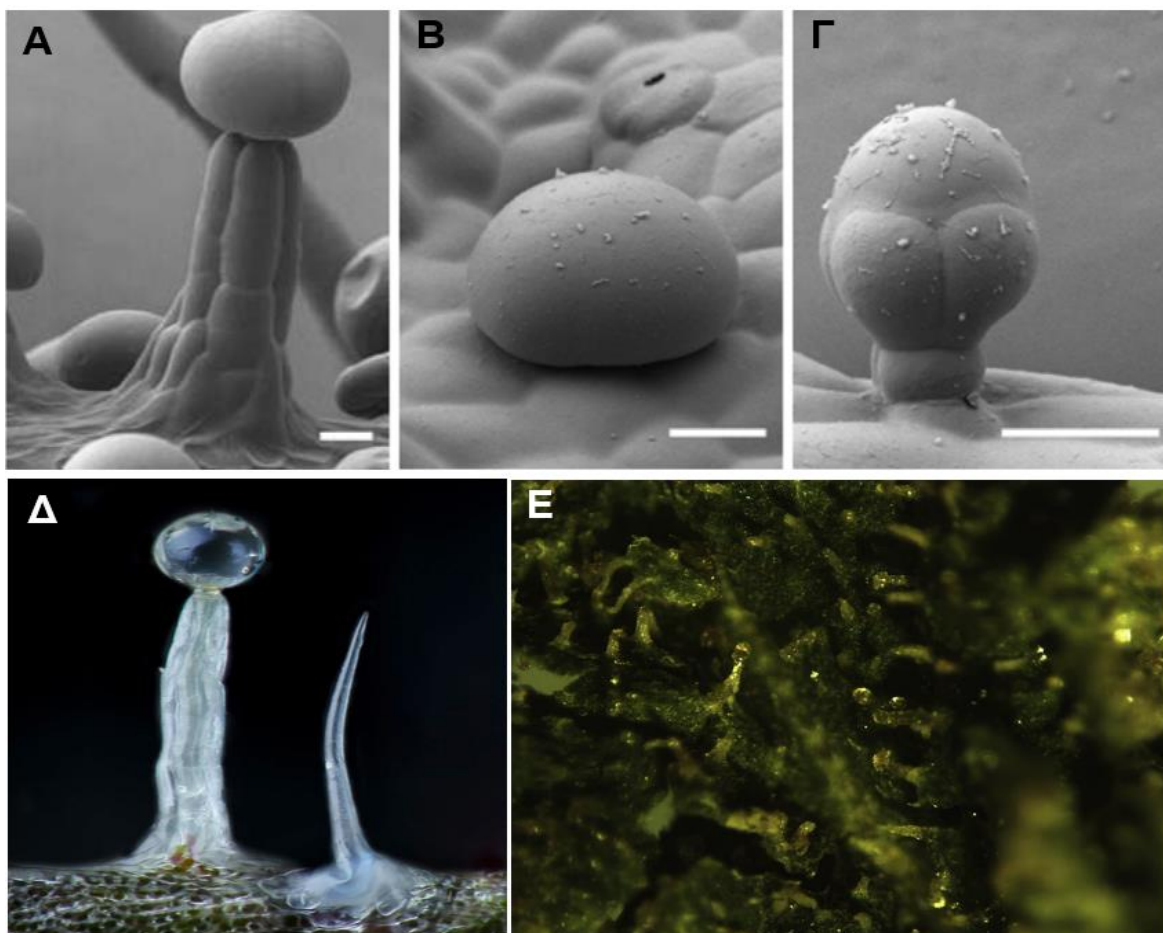
#### • Αδενικά τριχίδια

Υπάρχουν τρία είδη αδενικών τριχωμάτων στο φυτό της κάνναβης (**Εικόνα 4.**) τα οποία αναλύονται εκτενώς παρακάτω:

- i. **Τύπος αδενικού τριχώματος Capitata- stalked.** Ο συγκεκριμένος τύπος αδενικού τριχώματος φέρει μια μεγάλη σφαιρική κεφαλή διαμέτρου 50-70 μm, η οποία στηρίζεται σε ισχυρή πολυκύτταρη βάση διαμέτρου 100-200 μm. Στελέχη φυτών με υψηλή περιεκτικότητα σε THC εμφανίζονται με ακόμα μεγαλύτερη διάμετρο κεφαλής ως και 119 μm. Το μήκος του κάθε τριχώματος ποικίλει, ενώ ορισμένα εμφανίζονται και άμισχα. Το αδενικό τρίχωμα Capitata- stalked συναντάται στα βράκτια φύλλα των ανθέων και ιδιαίτερα σε φύλλα μεγαλύτερης ηλικίας (Hammond and Mahlberg 1977).
- ii. **Τύπος αδενικού τριχώματος Capitata-sessile.** Ο τύπος αυτός συναντάται σε νεανικό στάδιο των βρακτίων φύλλων των ανθέων, σε όλη την φυλλική επιφάνεια στους μίσχους των φύλλων και σε νεαρούς βλαστούς. Αποτελείται από κεφαλή διαμέτρου 30-50 μm και μικρού μήκους μίσχο, μονοκύτταρος κατ'ύψος και 2-4 κυττάρων πλάτους (Dayanandan and Kaufman 1976).
- iii. **Τύπος αδενικού τριχώματος Bulbous.** Πρόκειται για τον μικρότερο τύπο αδενικού τριχώματος που υπάρχει στο φυτό της κάνναβης. Ποικίλουν στο μέγεθος, συνήθως έχουν 10-20 μm διάμετρο και 15-30 μm ύψος. Η κεφαλή τους αποτελείται από 1-4 κύτταρα και ο μίσχος τους του από 1-2 (Hammond and Mahlberg 1973, Dayanandan and Kaufman 1976).



Ο πρώτος και ο δεύτερος τύπος αδενικών τριχωμάτων είναι παρόμοιος από όλες τις απόψεις με την διαφορά ότι ο πρώτος τύπος έχει μεγαλύτερο πολυκύτταρο μίσχο. Η κεφαλή και στους δύο τύπους αποτελείται από τρία κύτταρα προερχόμενα από την διαφοροποίηση επιδερμικών κυττάρων (Chandra, Lata et al. 2017).



**Εικόνα 4.** Αδενικά τριχίδια κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, capitate-stalked (A), capitate-sessile (B), bulbous (Γ) (Πηγή:<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/1365313x>), αδενικό τριχίδιο (αριστερά) και μη αδενικό (δεξιά) (Δ), αδενικά τριχίδια σε αποξηραμένο άνθος κάνναβης (Ε).

#### • Μη αδενικά τριχίδια

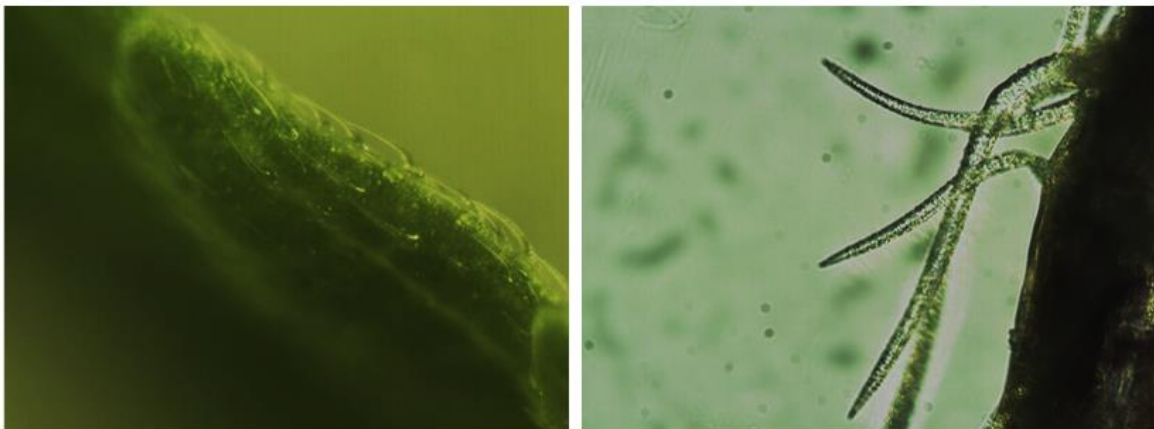
Πρόκειται για μονοκύτταρα τριχώματα τα οποία απαντώνται σε βλαστούς, φύλλα, μίσχους παράφυλλα, βράκτια φύλλα ανθέων και σε σέπαλα (**Εικόνα 5**). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- i. **Τρίχωμα μικρού μήκους και μεγάλο κυστίδιο.** Το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 50-125  $\mu\text{m}$  και η διάμετρος της βάσης μεταξύ 60-140  $\mu\text{m}$ . 15-20 επιδερμικά κύτταρα αποτελούν τη βάση του κάθε τριχώματος. Ο συγκεκριμένος τύπος τριχώματος απαντάται κυρίως στα φύλλα (Hillig and Mahlberg 2004, Clarke and Merlin 2013).

ii. **Τριχίδια μεγαλύτερου μήκους 250-370 μm** και λεπτότερα απαντώνται στις φυλλικές επιφάνειες, στους βλαστούς, στους μίσχους και στα σέπαλα.

Σε όλη την έκταση των τριχιδίων έχει αναφερθεί η ύπαρξη πυριτίου Si, ενώ στη διογκωμένη βάση των κυστιδωτών τριχιδίων περιέχεται ανθρακικό ασβέστιο (Dayanandan and Kaufman 1976). Τα κυστιδωτά τριχίδια που περιέχουν το ανθρακικό ασβέστιο απαντώνται κυρίως στα φύλλα, αλλά και σε βλαστούς και μίσχους (Chandra, Lata et al. 2017).

Τα αδενικά και μη αδενικά τριχώματα εμφανίζονται τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά φυτά της κάνναβης σε όλα τα βλαστικά στάδια, ωστόσο τα Capitate-stalked αδενικά τριχώματα συναντώνται μόνο στα βράκτια φύλλα των ανθέων των θηλυκών φυτών ενώ στα αρσενικά φυτά τα Capitate-stalked φέρονται κατά σειρές σε όλο το μήκος της εσωτερικής επιφάνειας των ανθέρων. Όσον αφορά τα αδενικά τριχώματα Bulbous και Capitate-sessile, αυτά φέρονται στα βλαστικά αλλά και στα αναπαραγωγικά τμήματα του φυτού (Hammond and Mahlberg 1973, Dayanandan and Kaufman 1976, Chandra, Lata et al. 2017).



**Εικόνα 5.** Μη αδενικά τριχίδια σε φύλλα κάνναβης (*Cannabis sativa* L.).

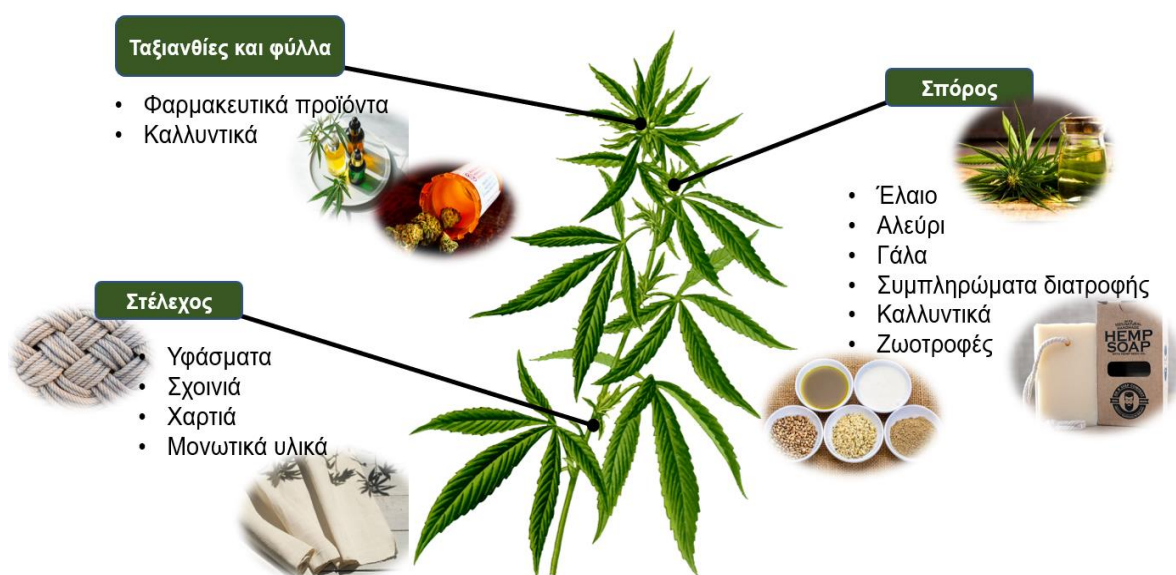
#### 1.1.4 Προϊόντα και χρήσεις κάνναβης

Στο παρελθόν οι ίνες του φυτού κυριαρχούσαν ως πρώτη ύλη σε αρκετά βασικά αγαθά (ένδυση, κατασκευή σχοινιών, караβόπανων, κ.α.), ενώ ευρέως γνωστή ήταν και η χρήση του για πνευματικούς αλλά και φαρμακευτικούς σκοπούς. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των συνθετικών υλικών αντικατέστησε τη χρήση των ινών του φυτού ως πρώτη ύλη σε πολλούς τομείς της σύγχρονης βιομηχανίας. Σημαντικό ρόλο στη σχεδόν πλήρη αντικατάσταση της κάνναβης κατά την παραγωγή βασικών αγαθών από συνθετικά υλικά αποτέλεσε και η απαγόρευση της καλλιέργειας αλλά και της

χρήσης του φυτού.

Τη σύγχρονη εποχή, η ανάγκη αναζήτησης νέων πρώτων υλών, οι οποίες είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον, στρέφεται προς υλικά και μεθόδους που υπήρξαν στη ζωή των ανθρώπων παλαιότερα. Η κάνναβη, λόγω των τεράστιων δυνατοτήτων των ινών της, δεν θα μπορούσε να παραμείνει εκτός της νέας αυτής τάσης. Η Ευρωπαϊκή Ένωση, από τις αρχές της δεκαετίας του '90, επιδοτεί νέες καλλιέργειες όπου ανάμεσα σε αυτές ήταν και η κλωστική κάνναβη, με ποικιλίες αρκετά παραγωγικές και χαμηλής περιεκτικότητας σε THC (Ελένη Τσαλίκη 2018).

Οι χρήσεις του στελέχους του φυτού είναι πολυάριθμες. Ειδικότερα, η άριστη ποιότητα των ινών αξιοποιείται για την κατασκευή υφαντουργικών προϊόντων, αλλά και βιοϋλικών και γεωυφασμάτων. Από την εντεριώνη των φυτών μπορούν να παραχθούν μονωτικά υλικά και υλικά δόμησης, βιομηχανικά προϊόντα, στρωμνή ζώων και χαρτοπολτός-χαρτί. Τα φύλλα και οι ταξιανθίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων, σε βιομηχανίες καλλυντικών αλλά και στην παραγωγή αγροχημικών. Το λάδι που προκύπτει από τους σπόρους χρησιμοποιείται σε τρόφιμα, καλλυντικά, βιομηχανικά έλαια και βερνίκια. Η χρήση ολόκληρου του καρπού γίνεται στις βιομηχανίες τροφίμων και στην παραγωγή ενέργειας (Ε. Τσαλίκη 2017). Στην **Εικόνα 6** απεικονίζονται οι διάφορες χρήσεις του φυτού.



**Εικόνα 6.** Χρήσεις του φυτού της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)

Αφού επιτευχθεί η απαραίτητη επεξεργασία των ινών και η μεταποίησή τους σε

ύφασμα, το παραγόμενο προϊόν έχει παρόμοια υφή με αυτή του βαμβακιού. Το παραγόμενο ύφασμα από κάνναβη δεν είναι επιρρεπές στη συρρίκνωση, είναι πολύ μαλακό και εξαιρετικά ανθεκτικό στη στίλβωση. Ορισμένες εκτιμήσεις δείχνουν ότι το ύφασμα κάνναβης είναι τρεις φορές ισχυρότερο από το βαμβακερό. Επιπλέον το ύφασμα της κάνναβης είναι ιδιαίτερα ελαφρύ διευκολύνοντας αποτελεσματικά τη διέλευση της υγρασίας από το δέρμα στην ατμόσφαιρα, γι 'αυτό είναι ιδανικό για ζεστά κλίματα. Ο συγκεκριμένος τύπος υφάσματος μπορεί επίσης να βαφεί εύκολα. Το ύφασμα δεν επιδέχεται καμία φθορά ακόμη και μετά από αρκετές πλύσεις. Δεδομένου ότι είναι εύκολο να παραχθεί το οργανικό ύφασμα κάνναβης με οικονομικά βιώσιμο τρόπο, αυτό το κλωστοϋφαντουργικό προϊόν είναι πρακτικά ιδανικό για ρουχισμό. Θεωρείται ότι το 70% της παγκόσμιας παραγωγής κλωστοϋφαντουργίας παράγεται στην Κίνα (Schaafsma 2009, Hodakel 2020)

Τη χρήση του φυτού της κάνναβης στην δόμηση ως στηρικτικό μέσο την συναντάμε από τα αρχαία χρόνια. Η ανάπτυξη νέων μεθόδων και τεχνολογιών είχε ως αποτέλεσμα την εύρεση νέων σύνθετων υλικών που βασίζονται στη κάνναβη. Η ασβεστοκάνναβη και η αργιλοκάνναβη αποτελούν κάποια από αυτά τα υλικά. Η ασβεστοκάνναβη αποτελεί σύνθετο βίο-υλικό που παράγεται από την εντεριώνη των στελεχών του φυτού. Η υψηλή περιεκτικότητα πυριτίου που περιέχει η εντεριώνη επιτρέπει την συνεργιστική δράση της με τον ασβέστη. Από την αποτελεσματική αυτή ιδιότητα των στελεχών προκύπτει ένα ελαφροβαρές μονωτικό υλικό, το οποίο αποτελεί ιδανική λύση για όλα τα κλίματα. Εκτός από το ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub> που απορροφά το φυτό κατά την ανάπτυξή του η ενανθράκωση του ασβέστη κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της ασβεστοκάνναβης ενισχύει το φαινόμενο αυτό καθώς ο ασβέστης μετατρέπεται ξανά σε ασβεστόλιθο, μία διεργασία η οποία μπορεί να διαρκέσει 100 χρόνια (Minoeco 2020). Εκτιμάται ότι το 4,5% των παγκόσμιων εκπομπών CO<sub>2</sub> εκλύονται από την καύση ορυκτών καυσίμων για την παραγωγή του μπετόν. Επίσης άλλα μειονεκτήματα της χρήσης του μπετόν είναι η εκπομπή τοξικών και ραδιενεργών ουσιών, η αυξημένη επιφανειακή απορροή υδάτων, η δημιουργία σκόνης και το φαινόμενο της αστικής θερμικής νησίδας. Στόχος πολλών εταιριών είναι να δημιουργήσουν κτίρια με χαμηλό αποτύπωμα CO<sub>2</sub> κατά την κατασκευή των υλικών καθώς και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας (Technology 2020).

Η Ασβεστοκάνναβη αποτελεί ένα από τα μη-τοξικά, ανανεώσιμα οικολογικά υλικά με αρνητικό δείκτη εκπομπής ρύπων, συμβάλλοντας σημαντικά στην ελάττωση του φαινομένου του θερμοκηπίου (Minoeco 2020). Η αργιλοκάνναβη είναι ένα νέο

θερμομονωτικό υλικό που αποτελείται από την εντεριώνη των στελεχών του φυτού της κάνναβης και από άργιλο. Χαρακτηριστικό της επιτυχίας του είναι η καθαρότητα και η ποιότητα του αργίλου αλλά και της εντεριώνης. Η άργιλος έχει μέγεθος μικρότερο από 0,0002 mm, είναι εύπλαστη και διογκώνεται όταν είναι υγρή. Αντιθέτως αφού στεγνώσει συρρικνώνεται και σκληραίνει (Minoeco 2020).

Το αλεύρι της κάνναβης παράγεται μετά το κοσκίνισμα και την άλεση του υλικού που προκύπτει από την σύνθλιψη των σπόρων για λάδι. Όλες οι διαδικασίες γίνονται σε θερμοκρασίες μικρότερες των 42 °C για την εξασφάλιση της ποιότητας των θρεπτικών συστατικών. Η πρωτεΐνη που περιέχει αγγίζει το 33% και δεν περιέχει γλουτένη. Το έλαιο της κάνναβης είναι και αυτό προϊόν ψυχρής έκθλιψης, πλούσιο σε πρωτεΐνες, περιέχει αρκετά από τα απαραίτητα αμινοξέα σε σημαντικές ποσότητες. Επίσης είναι μια πλούσια πηγή βασικών λιπαρών οξέων (EFAs) σημαντική για τη βέλτιστη λειτουργία του σώματος αλλά και είναι πλούσιο σε βιταμίνη E, ωμέγα 3, 6 και 9 (Carus and Sarmento 2016).

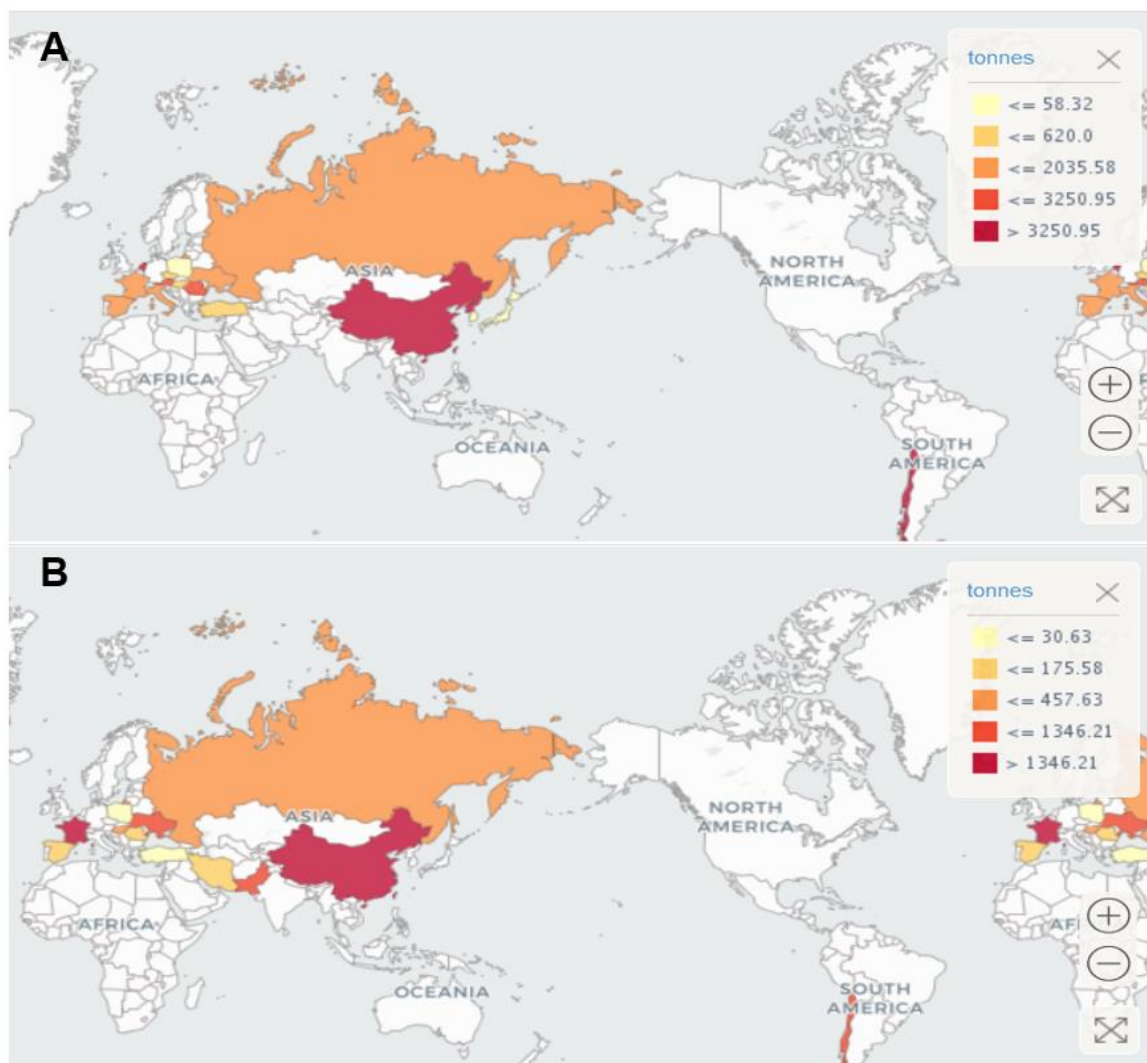
Η πρώτη επίσημη αναφορά της κάνναβης ως φάρμακο εμφανίστηκε στην Κίνα πριν από περίπου 5.000 χρόνια όταν προτάθηκε για χρήση κατά της ελονοσίας, της δυσκοιλιότητας, ρευματικών πόνων αλλά και ως χειρουργικό αναλγητικό σε συνδυασμό με κρασί (Mechoulam 1986). Υπάρχουν επακόλουθα αρχεία για τη χρήση του σε όλη την Ασία, τη Μέση Ανατολή, τη Νότια Αφρική και τη Νότια Αμερική.

Στοιχεία μετά από ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα κανναβινοειδή που περιέχει η κάνναβη ανακουφίζουν από τα συμπτώματα ορισμένων ασθενειών. Σε αυτές τις περιπτώσεις δίνονται ως συμπληρωματικές θεραπείες, χωρίς να χορηγούνται εξ ολοκλήρου ως αγωγή. Υπάρχουν και περιπτώσεις που χορηγούνται όχι ως συμπληρωματικές θεραπείες αλλά ως βασική αγωγή συνήθως αυτό πραγματοποιείται μετά από την αποτυχία της ανταπόκρισης ενός ασθενούς στις συμβατικές θεραπείες. Η κάνναβη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ναυτίας, για την τόνωση της όρεξης, ως μέσο αντιμετώπισης της νευρικής ανορεξίας, για την αντιμετώπιση νευροπαθητικών πόνων και της σπαστικότητας σε πολλαπλή σκλήρυνση, ως μέσο αντιμετώπισης χρόνιων πόνων (π.χ. νευροπαθητική πόνοι, αρθρικά, πόνοι σε πλάτη-ώμο, πονοκεφάλους), ως καταπραυντικό σε ασθενείς με καρκίνο αλλά και κατά της επιληψίας. Επίσης χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση: του μετατραυματικού στρες, για καταθλιπτικές διαταραχές, για την αντιμετώπιση διαταραχών ύπνου αλλά και κατά των φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου, όπως η νόσος του Crohn (Robson 2001).

### 1.1.5 Οικονομική σημασία καλλιέργειας της κάνναβης σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο

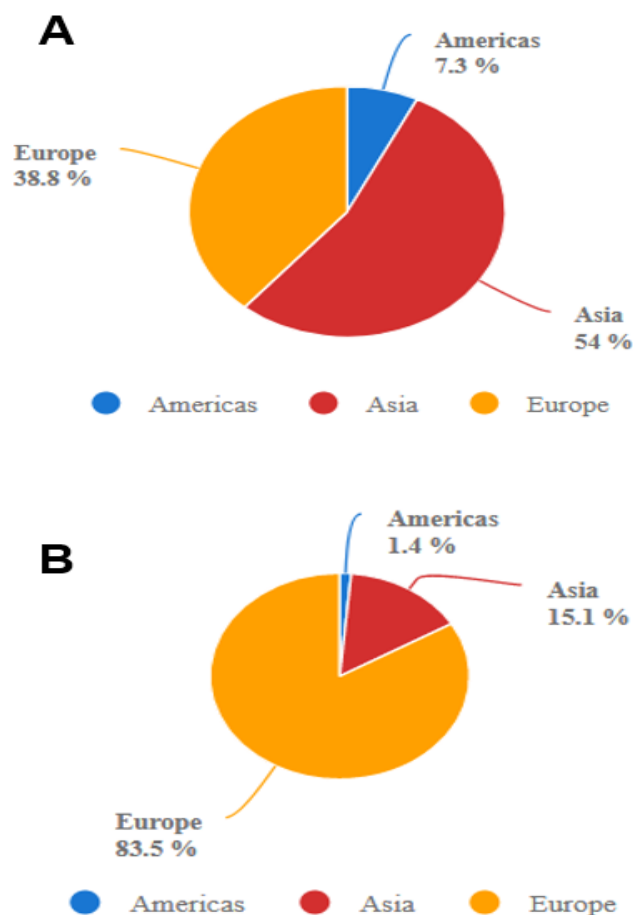
Στην Ελλάδα η καλλιέργεια της κάνναβης μέχρι πρόσφατα ήταν παράνομη. Σύμφωνα με κοινή υπουργική απόφαση (ΚΥΑ 1750/39224/31-3-2016) που δημοσιεύτηκε στον ΦΕΚ αρ. 929B/6-4-2016, η Ελλάδα εντάσσεται στις χώρες όπου η καλλιέργεια της κλωστικής κάνναβης είναι νόμιμη. Βασική προϋπόθεση για την καλλιέργεια μιας ποικιλίας κλωστικής κάνναβης είναι η περιεκτικότητα του φυτού σε THC να είναι μικρότερη του 0,2% και να είναι εγγεγραμμένες στον Κοινοτικό Κατάλογο. Πρόσφατα ψηφίστηκε νομοθετικό πλαίσιο και για την καλλιέργεια κάνναβης με περιεκτικότητα σε THC μεγαλύτερη του 0,2% όπου σύμφωνα με την ΚΥΑ 51483/700/Φ.15 που δημοσιεύτηκε στο ΦΕΚ Β' 1692/15.05.18 αναγράφονται όροι και προϋποθέσεις για την καλλιέργεια και επεξεργασία της φαρμακευτικής κάνναβης (<http://www.minagric.gr/index.php/el/>).

Η καλλιέργεια της κάνναβης παγκοσμίως έχει μεγάλη οικονομική αξία χάρης στις πολλές χρήσεις της αλλά και στα διάφορα προϊόντα που παράγονται από αυτή. Σύμφωνα με τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη παραγωγή σε ίνα κάνναβης είχε η Κίνα με μ.ο. 25948.05 τόνους και η Ολλανδία με 7922.63 τόνους τα έτη 2000-2018, ενώ τη μεγαλύτερη παραγωγή σπόρου τα αντίστοιχα έτη φαίνεται να είχαν η Κίνα με μ.ο. 22143.79 τόνους και η Γαλλία με 73447.21 τόνους (*Εικόνα 7*).



**Εικόνα 7** Παγκόσμια παραγωγή ίνας κάνναβης τα έτη 2000-2018 (A). Παγκόσμια παραγωγή σπόρου κάνναβης τα έτη 2000-2018 (B). (Πηγή: FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/>).

Σύμφωνα με την κατανομή της παραγωγής ίνας τα έτη 2008 έως 2018 φαίνεται ότι η Ασία κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό παραγωγής (54%), ενώ ακολουθεί η Ευρώπη (38,8%) και η Αμερική (7,3%). Τα αντίστοιχα έτη όσον αφορά την κατανομή της παραγωγής σπόρου η Ευρώπη φαίνεται να κατείχε το μεγαλύτερο ποσοστό με 83,5% ενώ το μικρότερο φαίνεται να έχει η Αμερική με μόλις 1,4% (**Εικόνα 8.**).



**Εικόνα 8** Κατανομή παραγωγής ίνας κάνναβης τα έτη 2008-2018 (A). Κατανομή παραγωγής σπόρου κάνναβης τα έτη 2008-2018 (B). (FAOSTAT), <http://www.fao.org/faostat/en/>)

Σύμφωνα με την Canadian hemp trade alliance-CHTA (<http://www.hemptrade.ca/>) στον Καναδά η καλλιέργεια της κάνναβης νομιμοποιήθηκε για ερευνητικούς σκοπούς το 1994, και για εμπορικούς το 1998. Σήμερα η κάνναβη αποτελεί ένα προϊόν ιδιαίτερα σημαντικό το οποίο επιβεβαιώνεται από την συνεχώς αυξανόμενη ζήτησή του. Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα για τον Ιούλιο του 2020 στον Καναδά πωλήθηκαν συνολικά, 8.622.543 συσκευασμένες μονάδες κάνναβης για ιατρικούς και μη σκοπούς. Οι πωλήσεις ξηρής κάνναβης αντιπροσωπεύουν το 73% των συνολικών πωλήσεων, με 6.272.755 συσκευασμένες μονάδες, τα εκχυλίσματα κάνναβης αντιπροσωπεύουν το 14% των συνολικών πωλήσεων, με 1.223.252 συσκευασμένες μονάδες ενώ τέλος η βρώσιμη κάνναβη αντιπροσωπεύει το 13% των συνολικών πωλήσεων, με 1.113.054 συσκευασμένες μονάδες (<https://www.canada.ca/en.html>).



## 1.2. Βιοδραστικές ουσίες κάνναβης

Με τον όρο «πρωτογενής μεταβολισμός» χαρακτηρίζεται η μεταβολική δραστηριότητα κατά την οποία συντίθενται τα απαραίτητα συστατικά τα οποία συγκροτούν τη θεμελιώδη δομή και διαμορφώνουν τον τρόπο λειτουργίας των φυτικών κυττάρων. Μέσω του δευτερογενή μεταβολισμού παράγεται ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός μεταβολικών προϊόντων από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Η παραγωγή αυτών των βιομορίων γίνεται σε ορισμένα στάδια ανάπτυξης του φυτού και μόνο σε επιμέρους ιστούς. Τα μεταβολικά προϊόντα προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού και συντίθενται μέσω βιοχημικών οδών που στο σύνολο τους συνθέτουν τον δευτερογενή μεταβολισμό. Ο δευτερογενής μεταβολισμός αποτελεί μια συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών η οποία συνδέεται στενά με τον μηχανισμό δημιουργίας εξειδικευμένων κυττάρων, αλλά και με την ύπαρξη και λειτουργία θεμελιωδών αμυντικών μηχανισμών αναγκαίων για την επιβίωση των φυτικών ειδών. Τα ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το είδος των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν κατά κανόνα την «ταυτότητα» κάθε φυτικού είδους, ή ακόμη και της ποικιλίας (B ΓΑΛΑΤΗΣ 2003) .

Μερικές από τις βασικότερες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών είναι οι:

### i. Ομάδα φαινολικών ουσιών.

Σε αυτήν την ομάδα περιλαμβάνονται οι μεταβολίτες οι οποίοι διαθέτουν τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο ( $C_6$ ), με ένα ή περισσότερα υδροξύλια στο μόριο τους και η σύνθεση τους γίνεται μέσω των βιοσυνθετικών οδών του σικιμικού ή/ και του μηλονικού οξέος. Μεγάλος αριθμός παραγώγων προκύπτει μετά από αντιδράσεις συμπύκνωσης, προσθήκης ή πολυμερισμού του βασικού αρωματικού δακτυλίου .

### ii. Ομάδα τερπενίων

Καλούνται επίσης τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή. Πρόκειται για κατηγορία λιπιδίων όπου ο βασικός σκελετός τους διαμορφώνεται με ένα μόριο υδρογόνου και πέντε άτομα άνθρακα. Η σύνθεση τους γίνεται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού με πρόδρομο μόριο το ακετυλο-συνένζυμο Α.

### iii. Ομάδα αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών

Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα αζωτούχων δευτερογενών μεταβολιτών.

Εμπεριέχονται ενώσεις οι οποίες προέρχονται κυρίως από αμινοξέα (B ΓΑΛΑΤΗΣ 2003).

Η κάνναβη και τα προϊόντα της είναι πλούσια σε πολλές χημικές ενώσεις όπως είναι τα κανναβινοειδή, τα τερπένια, τα αμινοξέα, οι υδατάνθρακες, τα λιπαρά οξέα κ.α. (Brenneisen 2007). Ορισμένα ανήκουν στον πρωτογενή μεταβολισμό π.χ. αμινοξέα, λιπαρά οξέα και στεροειδή, ενώ τα κανναβινοειδή, τα φλαβονοειδή, τα στιλβενοειδή, τα τερπενοειδή, οι λιγνάνες και τα αλκαλοειδή αντιπροσωπεύουν δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων εξαρτώνται από τον τύπο ιστού, την ηλικία, την ποικιλία, τις συνθήκες ανάπτυξης (θρέψη, υγρασία και επίπεδα φωτός), το χρόνο συγκομιδής και τις συνθήκες αποθήκευσης (KUSHIMA, SHOYAMA et al. 1980, Ross, ElSohly et al. 1996, Keller, Leupin et al. 2001).

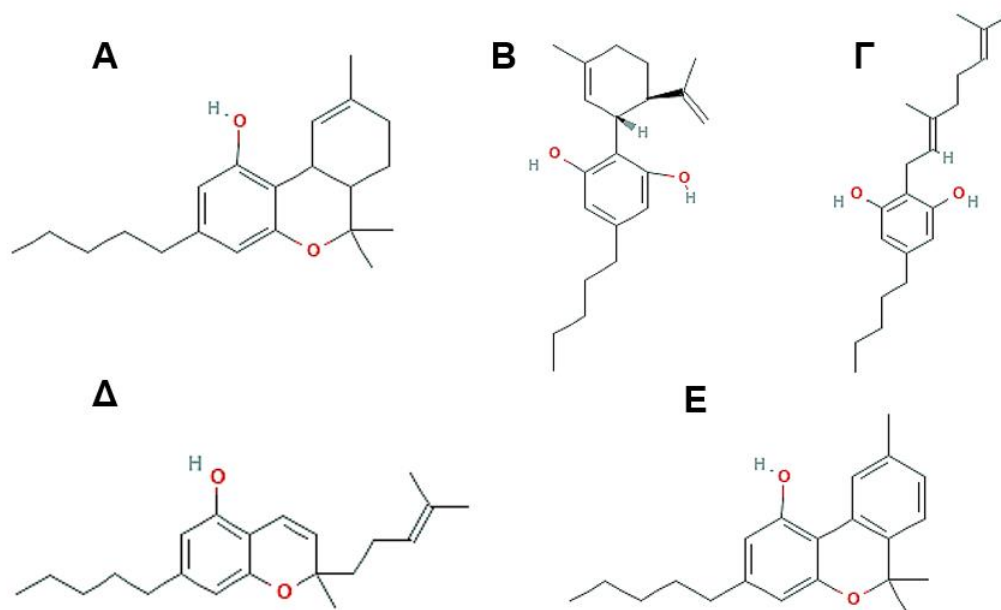
Το φυτό της κάνναβης θεωρείται ότι έχει ιδιαίτερα περίπλοκη χημική δομή λόγω του τεράστιου αριθμού των συστατικών της και της πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ τους τα οποία αντιπροσωπεύουν σχεδόν όλες τις χημικές τάξεις. Η πιο γνωστή και κατηγορία συστατικών της κάνναβης είναι τα C<sub>21</sub> τερπενοφαινολικά κανναβινοειδή, με την Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC) να είναι το πιο ψυχοδραστικό συστατικό (Mechoulam and Gaoni 1967). Η ανάπτυξη συνθετικών κανναβινοειδών και η χημική ανακάλυψη διαφορετικών ενδογενών κανναβινοειδών υποδοχέων (ενδοκανναβινοειδή) οδήγησαν στη χρήση του όρου «φυτοκανναβινοειδή» για την περιγραφή αυτών των ενώσεων (Pate 2001). Ο συνολικός αριθμός των φυσικών ενώσεων που αναγνωρίστηκαν στο είδος *C. sativa* L. το 1980 ήταν 423 (Turner, Elsohly et al. 1980) και το 1995 ήταν 483 (Ross and ElSohly 1995).

### 1.2.1 Φυτοκανναβινοειδή

Τα φυτοκανναβινοειδή αντιπροσωπεύουν την ομάδα των C<sub>21</sub> ή C<sub>22</sub> (για τις καρβοξυλωμένες μορφές) πρόδρομων τερφαινολικών ενώσεων που συντίθενται στην κάνναβη (**Εικόνα 9**). Ακόμη έχουν αναφερθεί σε φυτά του γένους *Radula* και *Helichrysum*, αλλά οι γνώσεις των περιερχόμενων κανναβινοειδών σε φυτά εκτός της κάνναβης είναι περιορισμένες (Chandra, Lata et al. 2017).

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 120 κανναβινοειδή από το φυτό της κάνναβης, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε 10 βασικού δομικούς τύπους: Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη-Δ<sup>9</sup>-trans-tetrahydrocannabinol (Δ<sup>9</sup>-THC), Δ<sup>8</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη-Δ<sup>8</sup>-trans-tetrahydrocannabinol (Δ<sup>8</sup>-THC), κανναβιγερόλη

cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), κανναβιδιόλη-cannabidiol (CBD), κανναβινοδιόλη-cannabinodiol (CBND), κανναβιλοσεΐνη-cannabielsoin (CBE), cannabicyclol (CBL), κανναβινόλη-cannabinol (CBN), κανναβιτριόλη cannabitriol (CBT), ενώ στη κατηγορία “διάφορα” κατατάσσονται ενώσεις που δεν υπάγονται σε κάποια από τις κύριες κατηγορίες που προαναφέρθηκαν (EiSohly, Radwan et al. 2017) (**Εικόνα 10**).

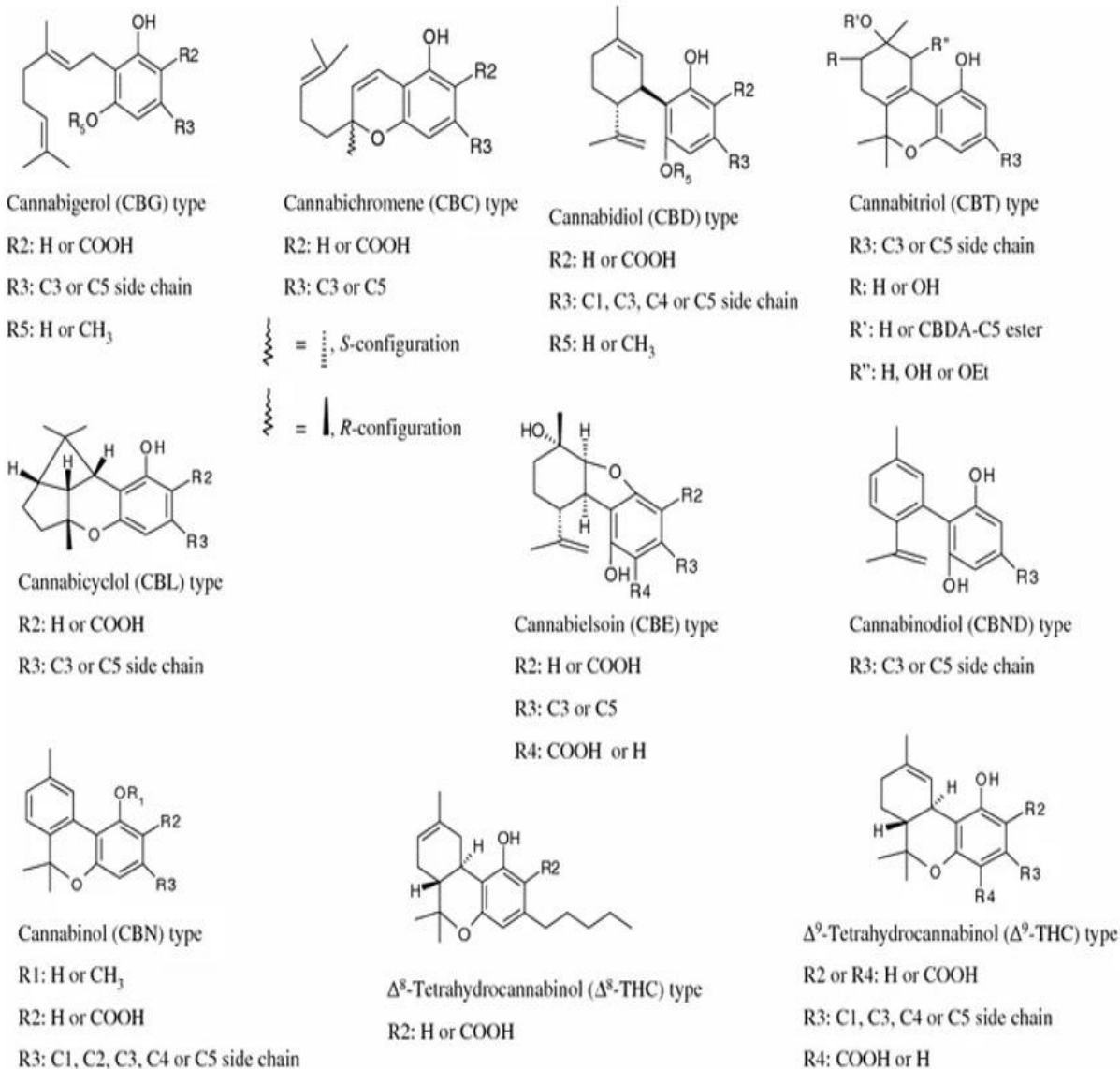


**Εικόνα 9.** Δομές επιλεγμένων κανναβινοειδών. THC-tetrahydrocannabinol (A), CBD-cannabidiol (B), Cannabigerol-CBG (Γ), CBC-cannabichromene (Δ), CBN-cannabinol (E) (Πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ι ουδέτερες ενώσεις σχηματίζονται έπειτα από αποκαρβοξυλίωση των ασταθών αντίστοιχων οξέων. Αν και η αποκαρβοξυλίωση εντοπίζεται σε ζωντανό φυτό έχει βρεθεί ότι αυξάνεται κατά την αποθήκευση και μετά τη συγκομιδή ειδικά σε αυξημένες θερμοκρασίες. Και οι δύο μορφές μεταβολίζονται περαιτέρω σε δευτερεύοντα προϊόντα από τις επιδράσεις της θερμοκρασίας και του φωτός (Lewis and Turner 1978) και αυτοοξειδωσης (Razdan, Puttick et al. 1972). Το τετραϋδροκανναβινολικό οξύ-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) αποτελεί το κυριότερο κανναβινοειδές που απαντάται στα φυτά της φαρμακευτικής κάνναβης, ενώ το κανναβιδολικό οξύ-cannabidiolic acid (CBDA) κυριαρχεί στα φυτά της βιομηχανικής. Το κανναβιχρωμένο οξύ-cannabichromenic acid (CBCA) κανναβινοειδές απαντάται σε νεαρά φυτά κάνναβης ενώ μειώνεται καθώς το φυτό

ωριμάζει. Τα φυτοκανναβινοειδή οξέα είναι μη ενζυματικώς αποκαρβοξυλιωμένα στις αντίστοιχες ουδέτερες μορφές τους, τα οποία εντοπίζονται τόσο εντός του φυτού αλλά και σε μεγάλο βαθμό κατά τη θέρμανση μετά τη συγκομιδή (Andre, Hausman et al. 2016). Οι πιο διαδεδομένες ενώσεις της κάνναβης θεωρούνται τα Δ<sup>9</sup>-THC acid, CBD acid και CBN acid, ενώ ακολουθούν τα CBG acid, CBC acid και CBND acid (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).

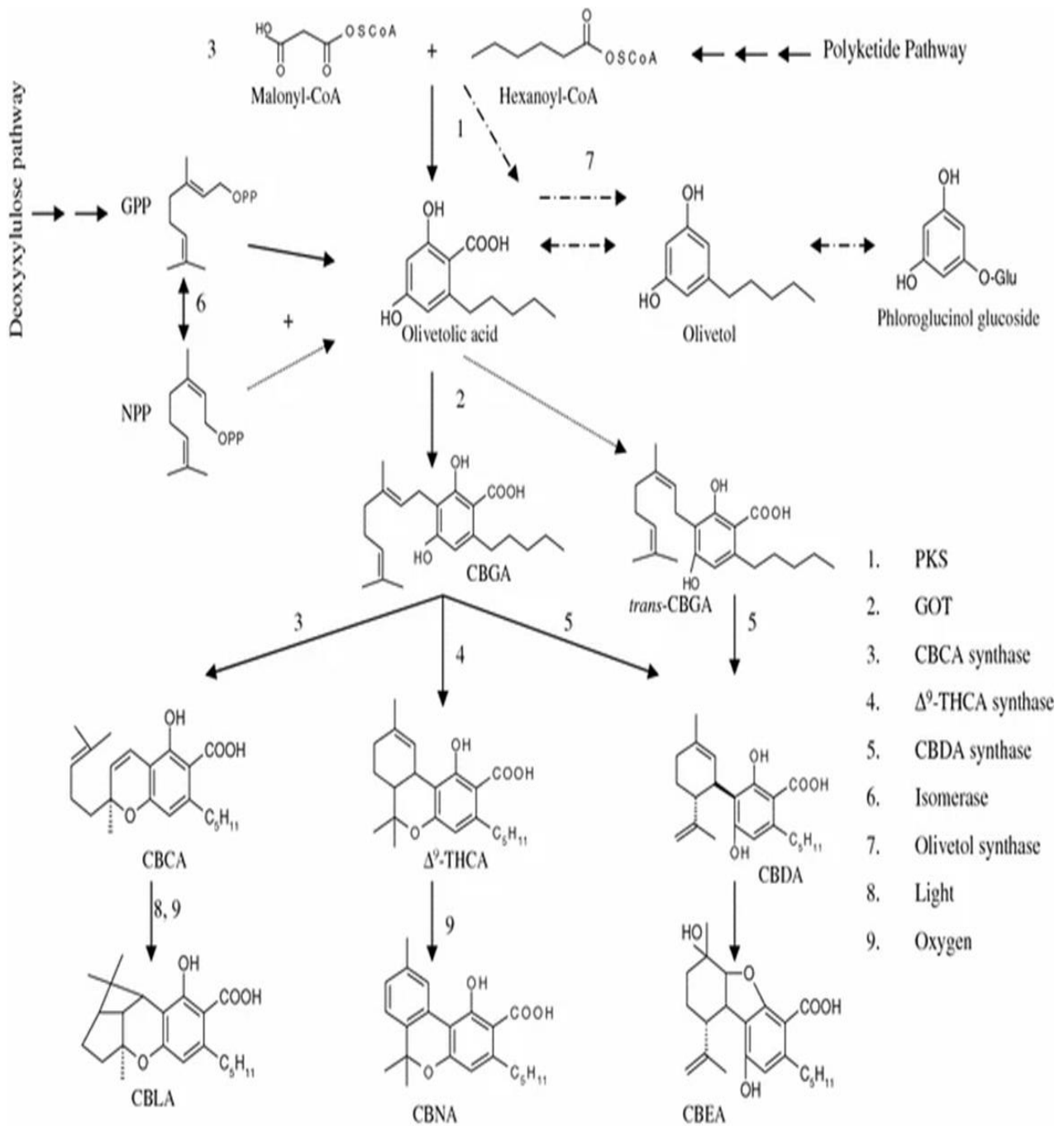
Τα κανναβινοειδή εκτός από τις ψυχοδραστικές ιδιότητες οι οποίες είναι γνωστές εδώ και χρόνια εμφανίζουν και μια σειρά από πολύ σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα κλινικές μελέτες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει ότι τα κανναβινοειδή μπορούν να έχουν ανιεπιληπτικές, ανοσοκατασταλτικές (Ameri 1999), αντιεμετικές ιδιότητες, να διεγείρουν την όρεξη (Mechoulam and Ben-Shabat 1999), αντινεοπλασματικές (Carchman, Harris et al. 1976), αντιμικροβιακές (Eisohly, Turner et al. 1982), αντιφλεγμονώδεις (Formukong, Evans et al. 1988), νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έχει βρεθεί επιπλέον ότι μπορούν να επιδράσουν θετικά σε διάφορες ψυχιατρικές διαταραχές όπως είναι η κατάθλιψη, το άγχος και οι διαταραχές του ύπνου (Grotenhermen and Russo 2002). Αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στην φύση αυτών των ενώσεων να επιδρούν στους υποδοχείς κανναβινοειδών CB1 και CB2 που ανταγωνίζονται τα ενδοκανναβινοειδή, μια οικογένεια υποδοχέων πρόσδεσης κανναβινοειδών που συμμετέχουν στη διαμόρφωση της νευροσωματικής δραστηριότητας (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).



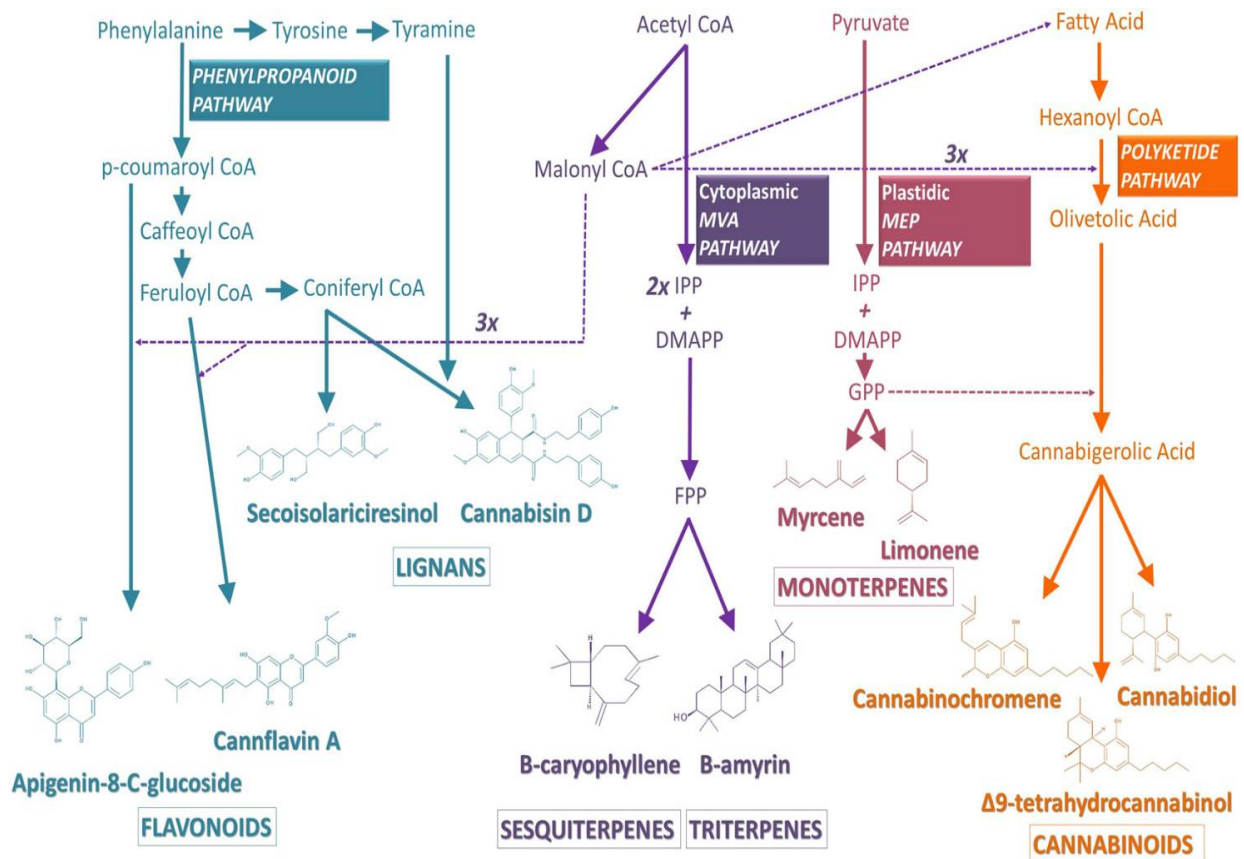
**Εικόνα 10.** Οι δέκα βασικοί δομικοί τύποι κανναβινοειδών στα οποία ταξινομούνται τα κανναβινοειδή που έχουν ως τώρα απομονωθεί (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).

### 1.2.1.1 Βιοσύνθεση Φυτοκανναβινοειδών

Διάφορες ιστοχημικές (Andre and Vercauysse 1976), ανοσοχημικές (Kim and Mahlberg 1997) και χημικές μελέτες (Lanyon, Turner et al. 1981) έχουν επιβεβαιώσει η βιοσύνθεση των κανναβινοειδών λαμβάνει χώρα στα αδενικά τριχίδια, αν και έχουν επίσης εντοπιστεί σε μίσχο, γύρη, σπόρους και ρίζες με ανοσοπροσδιορισμούς (Tanaka and Shoyama 1999) και χημική ανάλυση (Ross, Mehmedic et al. 2000). Τα φυτοκανναβινοειδή είναι τερπενοφαινολικές ενώσεις οι οποίες χημικώς σχετίζονται με τα τερπένια. Η δομή του δακτυλίου τους προέρχεται από ένα πυροφωσφορικό γερανύλιο ( $C_{10}$  μονοτερπένιο) (ElSohly, Radwan et al. 2017). Οι πρόδρομες ενώσεις που οδηγούν στη βιοσύνθεση των κανναβινοειδών προέρχονται από δύο διακριτές βιοσυνθετικές οδούς, το μονοπάτι των πολυκετιδίων (polyketide pathway) (Shoyama, Yagi et al. 1975) και το μονοπάτι φωσφορικής δεοξυξυλουλόζης/φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (deoxyxylulose phosphate/methyl-erythritol phosphate-DOXP/MEP) (Fellermeier, Eisenreich et al. 2001) (**Εικόνα 11**). Από το μονοπάτι των πολυκετιδίων βιοσυντίθεται ολιβιτολικό οξύ (olivetolic acid), ενώ από το μονοπάτι DOXP/MEP προκύπτει το διφωσφορικό γερανύλιο (GPP). Και τα δύο συμπυκνώνονται από τη διφωσφορική πρενυλάση γερανυλίου: ολιβιτολικό γερανυλοτρανσφεράση (prenylase geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase-GOT) (Fellermeier and Zenk 1998) για να σχηματίσουν κανναβιγερολικό οξύ (cannabigerolic acid-CBGA), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση για τρεις οξυδοκυκλάσες: συνθάση κανναβιδιολικού οξέος (Cannabidiolic acid synthase) (Taura, Morimoto et al. 1996),  $\Delta^9$ - συνθάση τετρα-ϋδρο-κανναβινολικού οξέος ( $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinolic acid synthase) (Taura, Morimoto et al. 1995) και συνθάση κανναβιχρωμένου οξέος (Cannabichromenic acid synthase) (Morimoto, Komatsu et al. 1997), σχηματίζοντας κανναβιδιολικό οξύ (CBDA),  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ ( $\Delta^9$ -THCA) και κανναβιχρωμικό οξύ (CBCA), αντίστοιχα (Morimoto 1999) (**Εικόνα 12**).



**Εικόνα 11.** Γενική επισκόπηση της βιοσύνθεσης κανναβινοειδών και πιθανών οδών. Διακρίνονται τα δύο μονοπάτια (polyketide pathway και deoxyxylulose pathway) που οδηγούν στη βιοσύνθεση των φυτοκανναβινοειδών (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).



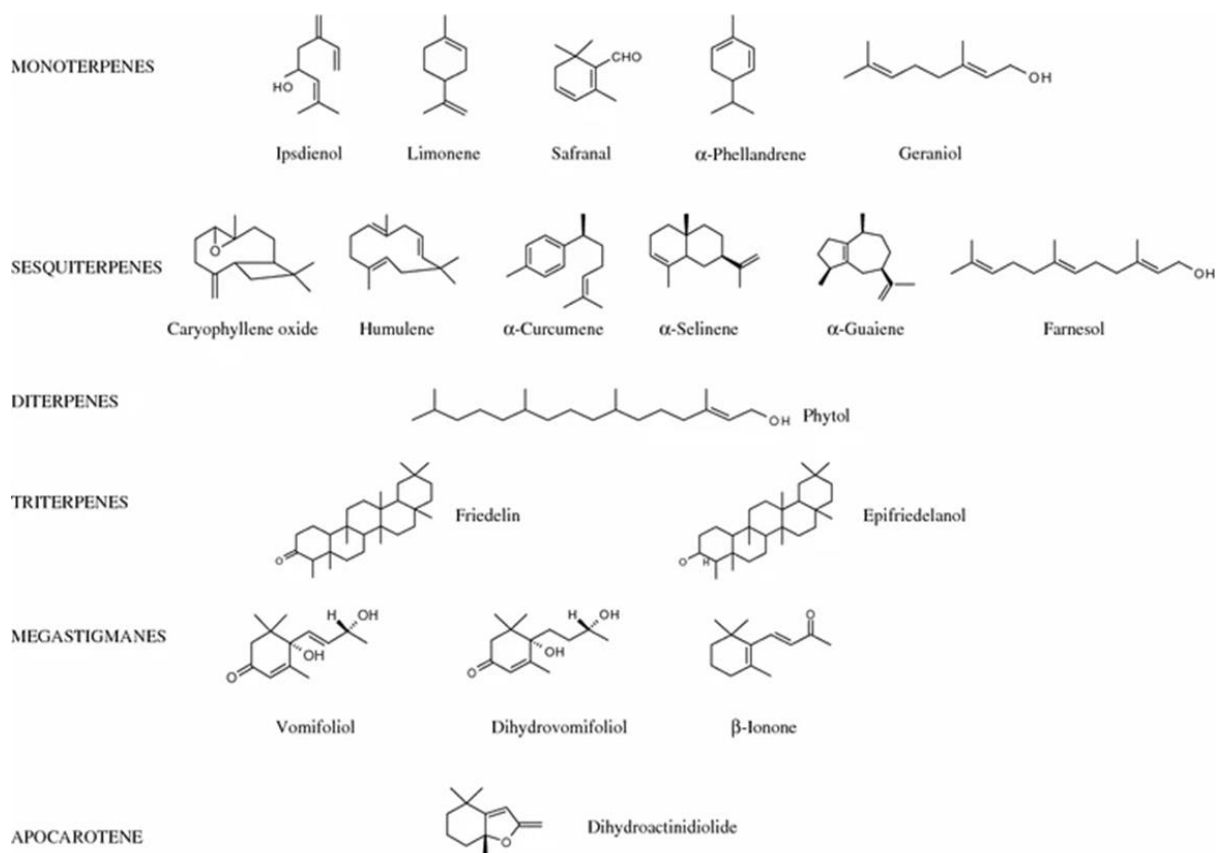
**Εικόνα 12.** Σχηματική απεικόνιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού που οδηγεί σε δευτερογενείς μεταβολίτες της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)(Benvenuto, Misra et al. 2016).

### 1.2.2 Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή ή τα ισοπρενοειδή είναι μια άλλη από τις κύριες ομάδες φυτικών μεταβολιτών. Η ισοπρενοειδής οδός παράγει τόσο πρωτογενείς όσο και δευτερογενείς μεταβολίτες (McGarvey and Croteau 1995). Στον πρωτογενή μεταβολισμό τα τερπενοειδή λειτουργούν ως φυτοορμόνες (γιβερελλικό οξύ, αμπισσικό οξύ και κυτοκίνες), σταθεροποιητές μεμβράνης (στερόλες), εμπλέκονται επίσης στην αναπνοή (ουβικινόνες) αλλά και στη φωτοσύνθεση (χλωροφύλλες και πλαστοκινόνες). Στον δευτερογενή μεταβολισμό συμμετέχουν σε μηχανισμούς αλληλεπίδρασης και άμυνας των φυτών (φυτοαλεξίνες). Στην κάνναβη έχουν αναγνωρισθεί 120 τερπένια (EISOhly and Slade 2005). 61 μονοτερπένια, 52 σεσκιτερπενοειδή, 2 τριτερπένια, 1 διτερπένιο και 4 τερπενοειδή παράγωγα1 (**Εικόνα 13**). Τα τερπένια είναι υπεύθυνα για τη γεύση των διαφορετικών ποικιλιών κάνναβης η οποία συχνά καθορίζει και την προτίμηση του καταναλωτή. Έχει παρατηρηθεί ότι η απόδοση των τερπενίων και το άρωμα του άνθους ποικίλλουν



ανάλογα με τον βαθμό ωριμότητας των θηλυκών ανθέων (Mediavilla and Steinemann 1997), ενώ έχει προταθεί ότι η σύνθεση τερπενίου στο αιθέριο έλαιο της κάνναβης θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για τη χημειοταξονομική ανάλυση της κάνναβης (Hillig and ecology 2004). Επιπλέον έχουν ανιχνευθεί διάφορες φαρμακολογικές επιδράσεις για ορισμένα τερπένια της κάνναβης οι οποίες θεωρείται ότι αποδίδονται στη συνεργιστική τους δράση με τα κανναβινοειδή. (Burstein and LT 1975, McPartland and Mediavilla 2002). Τα τερπένια έχουν ανιχνευθεί και απομονωθεί από το αιθέριο έλαιο του άνθους (Ross and ElSohly 1996), από ρίζες (Slatkin, Doorenbos et al. 1971) και φύλλα (Bercht, Samrah et al. 1976); ωστόσο τα αδενικά τριχίδια αποτελούν τον κύριο τόπο που εντοπίζονται (Malingre, Hendriks et al. 1975). Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών γίνεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού εστέρα (mevalonate-MVA), η οποία λαμβάνει χώρα στο κυτοσόλιο, ή από την οδό της πλαστιδιακής δεοξυξυλουλόζης / φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης (plastidial deoxyxylulose phosphate/methyl-erythritol phosphate -DOXP / MEP) (Flores-Sanchez and Verpoorte 2008).



**Εικόνα 13.** Παραδείγματα επιλεγμένων απομονωμένων τερπενοειδών από την κάνναβη (*Cannabis sativa* L.).

### 1.3 Καλλιέργεια κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)

Η κάνναβη μπορεί να καλλιεργηθεί τόσο σε εξωτερικές όσο και σε εσωτερικές συνθήκες. Όσον αφορά τη βιομηχανική κάνναβη η καλλιέργεια της γίνεται συνήθως σε εξωτερικές συνθήκες, ενώ της φαρμακευτικής προτιμάται να γίνεται σε θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις όπου οι συνθήκες είναι περισσότερο ελεγχόμενες (**Εικόνα 14.**).



**Εικόνα 14.** Υπαίθρια καλλιέργεια βιομηχανικής κάνναβης (**A**), θερμοκηπιακή καλλιέργεια φαρμακευτικής κάνναβης (**B**).

## Υπαίθρια καλλιέργεια κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης ευδοκίμει σε διάφορους τύπους εδάφους αλλά είναι ευαίσθητο σε βαριά και κορεσμένα εδάφη ενώ επίσης πρέπει να αποφεύγεται η σπορά σε εδάφη με  $pH < 6,0$ . Στην χώρα μας η σπορά της κάνναβης πραγματοποιείται συνήθως από τα μέσα Μαρτίου και μετά, όταν η θερμοκρασία του εδάφους είναι  $12-14^{\circ}C$  και όχι χαμηλότερη από  $6-8^{\circ}C$  (Amaducci, Scordia et al. 2015). Όταν η παραγωγή προορίζεται για παραγωγή ίνας η κάνναβη πρέπει να σπαρθεί όσον το δυνατόν νωρίτερα ώστε να έχουμε το μεγαλύτερο δυνατό μήκος και την υψηλότερη απόδοση. Η κλωστική κάνναβη είναι πολύ ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία, για αυτό το λόγο και οι ποικιλίες που δημιουργούνται στοχεύουν σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα κριτήρια επιλογής της κατάλληλης ποικιλίας είναι οι κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής που θα καλλιεργηθεί αλλά και τη χρήση του τελικού προϊόντος. Κατά την επιλογή μια ποικιλίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η χώρα προέλευσης της καθώς για παράδειγμα η καλλιέργεια μιας ποικιλίας από Βόρεια περιοχή της Ευρώπης σε Μεσογειακή χώρα θα είχε σαν αποτέλεσμα την πρόωμη άνθιση (Angelini, Tavarini et al. 2016), συνεπώς συνήθως προτιμώνται όψιμες ποικιλίες στη Νότια Ευρώπη.

Η λίπανση που συστήνεται είναι συνήθως 80-100 kg αζώτου, 100 kg  $P_2O_5$  και 150 kg  $K_2O$  ανά εκτάριο καλλιέργειας (Piotrowski and Carus 2011) ωστόσο πάντα συστήνεται να λαμβάνεται υπόψιν η εδαφολογική κατάσταση του εκάστοτε αγροτεμαχίου. Κατά τη σπορά, συνήθως όταν η καλλιέργεια στοχεύει στην παραγωγή ίνας χρησιμοποιούνται 5 Kg/στρ σε βάθος 2 cm, σε απόσταση γραμμών 14-16 εκ. Με πυκνή φύτευση στην περίπτωση παραγωγής ινών επιτυγχάνουμε τη δημιουργία μονοστέλεχων φυτών, ενώ όταν στοχεύουμε στη παραγωγή σπόρου χρησιμοποιούνται 3Kg/στρ με αποστάσεις γραμμών σποράς περίπου στα 50 εκ. (Amaducci, Scordia et al. 2015). Οι απαιτήσεις του φυτού σε νερό εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες όπως είναι το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, το μέγεθος του, η θερμοκρασία, η υγρασία, η περιοχή στην οποία καλλιεργείται κ.α., θεωρείται όμως γενικά ότι είναι μια καλλιέργεια απαιτητική σε νερό (Kinghorn, Falk et al. 2017). Η συγκομιδή της παραγωγής όταν πρόκειται για χώρες όπως είναι η Ελλάδα γίνεται συνήθως 100 ημέρες μετά τη σπορά όταν πρόκειται για παραγωγή ίνας και 150 ημέρες μετά για παραγωγή σπόρου (Amaducci, Scordia et al. 2015).

## Θερμοκηπιακή καλλιέργεια κάνναβης

Η θερμοκηπιακή καλλιέργεια της κάνναβης υπερτερεί σε σχέση με την υπαίθρια καθώς μας επιτρέπει τον πλήρη έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης του φυτού (φωτισμός, θερμοκρασία, υγρασία, συγκέντρωση CO<sub>2</sub>, αερισμός και φωτοπερίοδος) και κατά συνέπεια του κύκλου ζωής του. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει καλύτερος έλεγχος και διαχείριση της ποιότητας αλλά και ποσότητας της παραγωγής το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά την καλλιέργεια φαρμακευτικής κάνναβης καθώς είναι απαραίτητη η εξασφάλιση ποιοτικών προϊόντων. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης ο έλεγχος της φωτοπεριόδου καθώς διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της βλάστησης και ανθοφορίας του φυτού (Kinghorn, Falk et al. 2017).

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει ως ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης θεωρούνται οι 25° έως 30°C. Για τον φωτισμό χρησιμοποιούνται συνήθως λαμπτήρες φθορισμού, λαμπτήρες μεταλλικών αλογονιδίων, νατρίου υψηλής πίεσης και λαμπτήρες LED. Η φωτοπερίοδος που προτείνεται είναι 18 ώρες φωτός και 6 ώρες σκοτάδι για το βλαστικό στάδιο ενώ κατά το στάδιο της ανθοφορίας απαιτούνται 12 ώρες φωτός (Chandra, Lata et al. 2008).

### 1.3.1 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις κάνναβης

Η κάνναβη είναι ένα θερμοφιλο φυτό με υψηλές απαιτήσεις σε ηλιακή ακτινοβολία. Είναι γενικά ένα φυτό που προσαρμόζεται εύκολα σε διάφορες εδαφοκλιματικές συνθήκες ωστόσο παρουσιάζει ευαισθησία σε ακραίες θερμοκρασίες καθώς επίσης και σε εδάφη με υψηλή κατακράτηση νερού. Ευδοκίμει κυρίως σε εδάφη αμμώδη και αργιλώδη που χαρακτηρίζονται από καλή αποστράγγιση και επάρκεια θρεπτικών συστατικών. Παρόλο που σαν φυτό προσαρμόζεται εύκολα σε μη ευνοϊκές συνθήκες αυτό δεν σημαίνει ότι δεν υπάρχουν αρνητικές επιπτώσεις στη ποιότητα και ποσότητα της παραγωγής είτε σε βιομάζα είτε σε σπόρο. Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη για παράδειγμα σε άγονα και φτωχά εδάφη έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανάπτυξη φυλλικής επιφάνειας και την πρώιμη παραγωγή σπόρων ή στη περίπτωση εδάφους που συγκρατεί περιττή υγρασία αυξάνεται η πιθανότητα ανάπτυξης μυκήτων, ενώ τέλος η καλλιέργεια σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα το φυτό να είναι ευαίσθητο στη μάρανση λόγω του υψηλού ποσοστού διαπνοής (Clarke and Merlin 2013) .

## 1.4 Ασθένειες και εχθροί της κάνναβης

Η κάνναβη θεωρείται γενικά μια καλλιέργεια που δεν παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία σε εχθρούς και ασθένειες. Ωστόσο σε διάφορες περιπτώσεις δημιουργούνται προβλήματα από έντομα, ακάρεα, ιούς, μύκητες, αρθρόποδα, πουλιά κ.α. τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

### 1.4.1 Παθογόνα και ασθένειες της κάνναβης

Όσον αφορά τις μυκητολογικές ασθένειες της κάνναβης έχουν αναφερθεί περισσότερα από 88 γένη μυκήτων που την προσβάλλουν. Από τους πιο σημαντικούς θεωρείται ο μύκητας *Botrytis cinerea* (teleomorfe *Botryotinia fuckeliana*) που προκαλεί φαιά σήψη και δημιουργεί σοβαρά προβλήματα κυρίως σε εύκρατες περιοχές με υψηλή υγρασία και σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (Quarles, McPartland 1996). Στη βιομηχανική κάνναβη ο μύκητας προσβάλλει τα στελέχη, προκαλώντας χλωρώσεις στα στελέχη κατά τα αρχικά στάδια εκδήλωσης της ασθένειας, το μυκήλιο παρουσιάζει συνήθως χρώμα γκρι-καφέ το οποίο φέρει πάνω του μάζες κονιδίων οι οποίες αποτελούν τις καρποφορίες του μύκητα. Τα απελευθερωμένα ένζυμα του μύκητα διασπούν τα κυτταρικά τοιχώματα με αποτέλεσμα τα στελέχη να καταρρέουν. Στη φαρμακευτική κάνναβη συχνότερες προσβολές υφίστανται οι θηλυκές ταξιανθίες, στα οποία παρατηρείται αρχικά περιφερειακή χλώρωση στα σέπαλα, στη συνέχεια μάρανση και σύντομα το άνθος περιβάλλεται από μυκήλιο χρώματος γκρι ενώ τέλος ακολουθεί η σήψη των ιστών (McPartland 1996).

Συχνές προσβολές μπορούν να υπάρξουν και από τον μύκητα *Podosphaera* (= *Sphaerotheca*) *macularis*. Χαρακτηριστικό της ασθένειας είναι οι ελαιώδεις κηλίδες καθώς και σε προχωρημένο στάδιο της ασθένειας οι λευκές εξανθήσεις (Cranshaw and Broberg 2015). Ο μύκητας *Sclerotinia sclerotiorum* προκαλεί και αυτός σημαντικά προβλήματα κατά την καλλιέργεια της κάνναβης. Τα προβλήματα ξεκινούν με υδαρείς αλλοιώσεις στις οποίες υπάρχει σκούρος μεταχρωματισμός, όπου στα σημεία αυτά δημιουργείται αργότερα λευκό μυκήλιο. Σε προχωρημένες προσβολές ακολουθεί μάρανση και κατάρρευση του φυτού (McPartland 1996).

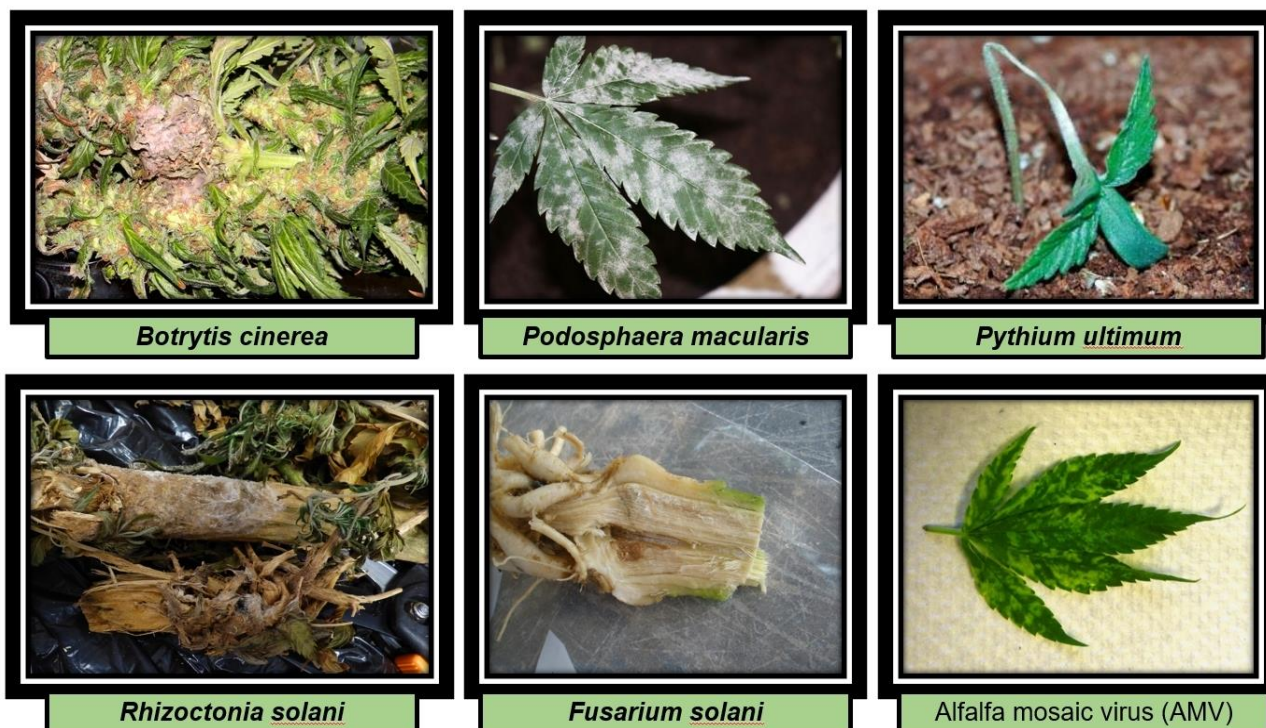
Προβλήματα με τήξεις και κατάρρευση νεαρών φυταρίων ή νέκρωση σπόρων πριν την ανάδυση αυτών εκ του εδάφους, έχουμε από τον Ωομύκητα *Pythium*

(κυρίως από τα είδη *P. Aphanidermatum* και *P. Ultimum*). Επιπλέον παρόμοια προβλήματα μπορεί να έχουμε και από τους μύκητες *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, και μερικών ειδών του γένους *Fusarium* όπως: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. sulphurem*, *F. avenaceum*, *F. Graminearum* (McPartland 1996).

Δύο είδη του γένους *Septoria* δημιουργούν κίτρινες κηλίδες στα ελάσματα των φύλλων, ενώ καφέ κηλίδες δημιουργούνται από ορισμένα γένη των μυκήτων *Phoma* και *Ascochyta*, παρόλο την συχνή εμφάνιση σπανίως νεκρώνονται τα φυτά από τους συγκεκριμένους μύκητες. Αρνητικά επηρεάζονται ωστόσο το ύψος της παραγωγής αλλά και η ποιότητά της. Σε βιομηχανικές ποικιλίες της κάνναβης συχνά εμφανίζεται η ασθένεια του περονοσπόρου, λόγω δύο ειδών του γένους *Pseudoperonospora*. Επίσης ελαιώδεις κηλίδες δημιουργούνται από ορισμένα είδη των *Pseudocercospora* και *Cercospora*. Σε φαρμακευτική κάνναβη θερμοκηπιακής εγκατάστασης έχουν αναφερθεί προσβολές από τον μύκητα *Trichothecium roseum*. Μύκητες που εμφανίζονται σε μικρότερο βαθμό αποτελούν οι *Alternaria*, *Stemphylium*, *Colletotrichum* που προκαλούν ανθρακώσεις και ο *Phomopsis ganjae* που προκαλεί την εμφάνιση λευκών κηλίδων στα ελάσματα των φύλλων (McPartland 1996).

Σε στελέχη των φυτών έχουμε επίσης προσβολές από διάφορα είδη των μυκήτων: *Trichothecium*, *Phoma*, *Stemphylium*, *Colletotrichum*, και *Phomopsis*, ενώ σημαντικές προσβολές έχουμε από το γένος του μύκητα *Fusarium*, σε ψυχρότερα κλίματα έχουμε προσβολές από τα είδη *F. Graminearum* και *F. Avenaceum* ενώ σε θερμότερα από τα είδη *F. Sulphureum* και *F. Sambucinum* (McPartland 1996). Προσβολές στις ρίζες δημιουργούν οι μύκητες: *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* και *Sclerotium rolfsii* οι οποίοι προκαλούν σήψη των ριζών και τελικά νέκρωση των φυτών και κατά συνέπεια σημαντικές απώλειες στην παραγωγή (McPartland 1996).

Τέλος όσον αφορά τους ιούς που μας απασχολούν στην καλλιέργεια της κάνναβης οι σημαντικότεροι θεωρούνται οι: HSV, HMV, CMV, TMV, ArMV και AMV (McPartland 1996) (**Εικόνα 15.**).



**Εικόνα 15.** Μερικά από τα σημαντικότερα παθογόνα της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) (Πηγή:<https://allcropsolutions.com/disease-testing/hemp-and-hop-diseases>)

#### 1.4.2. Εχθροί της κάνναβης

Τα έντομα και τα ακάρεα τα οποία προσβάλλουν την κάνναβη κυμαίνονται στα 272 είδη ωστόσο από αυτά ελάχιστα επιφέρουν σοβαρή οικονομική ζημιά (McPartland 1996). Δύο από τους σημαντικότερους εχθρούς αποτελούν οι προνύμφες των *Ostrinia nubilalis* και *Grapholita deliœana*. Ιδιαίτερα στην βιομηχανική κάνναβη η σοβαρότητα της προσβολής είναι ακόμη πιο έντονη, καθώς οι προνύμφες διατρυπούν τα στελέχη των φυτών με άμεση συνέπεια την καταστροφή αυτών. Στην φαρμακευτική κάνναβη μπορεί να μην υπάρχει άμεση αρνητική επίδραση στο ίδιο το καλλιεργούμενο προϊόν, ειδικά όταν πρόκειται για μικρής έκτασης ζημιά, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις από το βάρος των ανθέων μπορεί να προκληθεί το σπάσιμο ή η κατάρρευση των στελεχών.

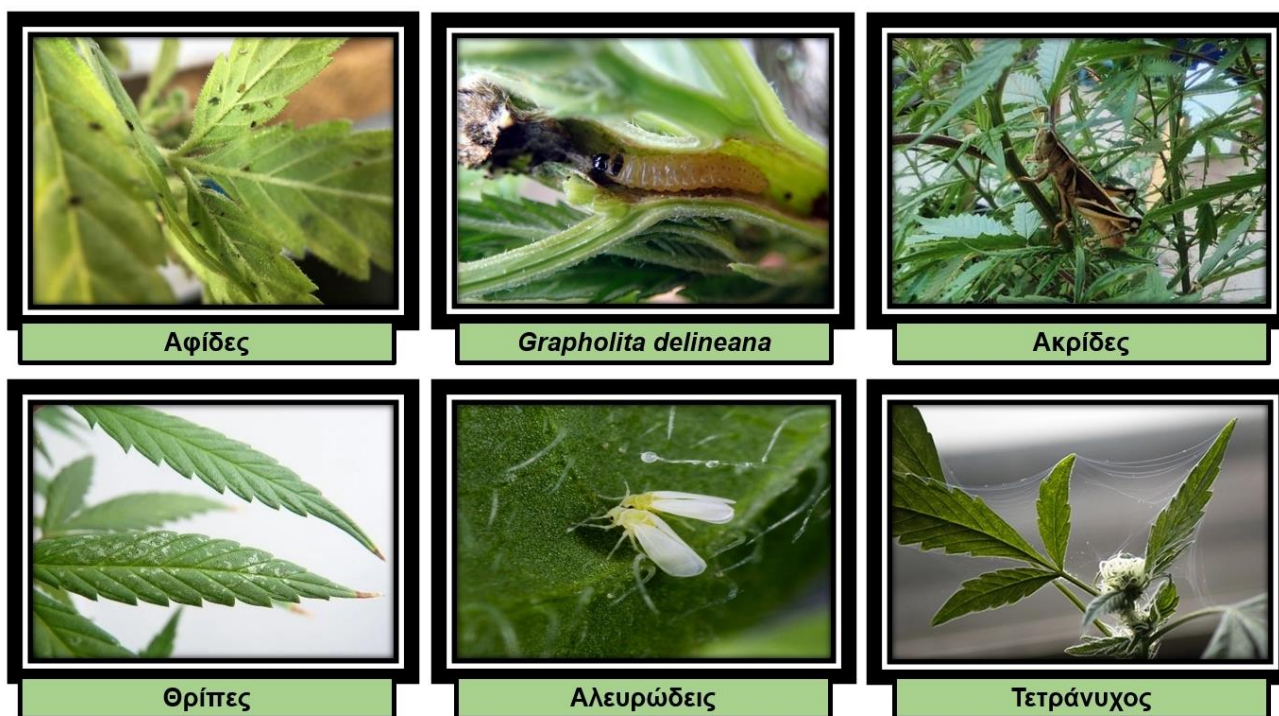
Ζημιές μικρότερης οικονομικής σημασίας δημιουργούν μερικές από τις προνύμφες των ειδών *Cossus Cours*, *Zeuzera multistrigata*, *Papaipema nebris*, *P. cataphracta* και *Endoclyta excrescens*. Επιπλέον προνύμφες που προκαλούν ζημιές σε φύλλα,

σπόρους και ανθικές καταβολές χωρίς να προκαλούν ιδιαίτερη οικονομική ζημιά είναι: *Mamestra brassicae*, *Autographa gamma*, *Melanchra persicariae*, *Spilosoma obliqua*, *Arctia caja* και *Loxostege sticticalis*. Εξαιρέση αποτελεί οι προνύμφες των ειδών *Heliothis armigera* και *Heliothis virescens* οι οποίες προκαλούν σοβαρά προβλήματα στις ανθικές καταβολές χωρίς να προσβάλλουν τα στελέχη (McPartland 1996).

Προνύμφες άλλων εντόμων που εισέρχονται στα στελέχη των φυτών αποτελούν τα είδη: *Phyllotreta nemorum*, *Mordellistena micans*, *M. parvula*, *Thyestes gebleri*, *Ceutorhynchus rapae*, *Rhinocerus pericarpus* και *Melanogromyza urticivora*. Μερικές προνύμφες εντόμων όπως είναι η προνύμφη του σκαθαριού *Phyllotreta nemorum* αλλά και οι προνύμφες των εντόμων *Liriomyza strigata*, *L. eupatorii*, *L. cannabis*, *Phytomyza horticola* και *Agromyza reptans* δημιουργούν στοές σε φύλλα και σε ρίζες. Επίσης ζημιές σε ρίζες προκαλούν και τα είδη: *Psylliodes attenuata*, *Popillia japonica*, *Melolontha hippocastani* και *M. Melolontha* (McPartland 1996).

Ζημιές παρουσιάζονται και από έντομα με μυζητικού τύπου στοματικά μόρια όπως είναι οι αφίδες (*Phorodon cannabis*, *Phorodon cannabis*, *Myzus persicae*, *Aphis fabae*), οι αλευρώδεις (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii*), οι θρίπες (*Heliothrips haemorrhoidalis*, *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *Oxythrips cannabensis*) κ.α. (όπως *Zygina pallidifrons* και *Pseudococcus longispinus*) καθώς και από ακρίδες. Τέλος, σημαντικές ζημιές από ακάρεα προκαλούνται από τα είδη του τετράνουχου *Tetranychus urticae* και *T. Cinnabarinus*, ενώ λιγότερο σημαντικές από τα είδη *T. urticae* και *T. Cinnabarinus*. Το είδος *T. urticae* εμφανίζεται σε ψυχρότερα κλίματα ενώ το *T. Cinnabarinus* σε τροπικά (McPartland 1996) (**Εικόνα 16.**).





**Εικόνα 16.** Μερικοί από τους σημαντικότερους εχθρούς της καλλιέργειας της κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) (Πηγή: <https://allcropsolutions.com/disease-testing/hemp-and-hop-diseases>)

## 1.5 Φυτοπροστασία: σύγχρονα προβλήματα και προκλήσεις

Τα πρώτα συνθετικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.) έγιναν διαθέσιμα κατά τη δεκαετία του 1940, αποφέροντας μεγάλα οφέλη στην αύξηση της παραγωγής του γεωργικού κλάδου, ωστόσο στις αρχές της δεκαετίας του 1960 ξεκίνησαν οι πρώτες ανησυχίες για τις δυσμενείς επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία (Carson 1962). Από τα τέλη της δεκαετίας του 1970 υπήρξε σημαντικό ενδιαφέρον για «ολοκληρωμένα» αροτραία γεωργικά συστήματα, τα οποία προσπαθούν να μειώσουν τις εισροές όπως λιπάσματα, ορυκτά καύσιμα και Φ.Π. (Holland, Frampton et al. 1994). Οι επιπτώσεις στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία της σύγχρονης γεωργίας είναι ευρύτατες και καλά τεκμηριωμένες. Συγκεκριμένα τα σοβαρότερα θέματα που απασχολούν στη σύγχρονη εποχή περιλαμβάνουν (1) την ρύπανση που προκαλούν τα διάφορα Φ.Π. στο νερό αλλά και οι αρνητικές τους επιπτώσεις στην πανίδα και την ανθρώπινη υγεία, (2) την ρύπανση που προκαλούν τα λιπάσματα στο νερό αλλά και τις αρνητικές τους επιπτώσεις στη θαλάσσια ζωή, (3) τη διάβρωση και υποβάθμιση του εδάφους καθώς και την απορροή στα υπόγεια ύδατα, (4) τις επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου εξαιτίας της παρουσίας υπολειμμάτων Φ.Π. και τέλος (5) τις αρνητικές

επιπτώσεις στην ατμόσφαιρα κυρίως εξαιτίας του μεθανίου, οξειδίου του αζώτου και της αμμωνίας που παράγονται από την κτηνοτροφία και τα λιπάσματα. Μια σημαντική πρόκληση, λοιπόν τόσο για τις βιομηχανικές όσο και για τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι να βρουν τρόπους για να διατηρήσουν και να βελτιώσουν τη γεωργική παραγωγή, ενώ ταυτόχρονα στοχεύουν στην μείωση και την εξάλειψη των επιβλαβών επιπτώσεων, βελτιώνοντας έτσι τη συνολική βιωσιμότητα του αγροτικού τομέα και της οικονομίας (Pretty, Brett et al. 2001).

Η κακή διαχείριση του αγροτικού τομέα ευθύνεται επίσης για φαινόμενα όπως είναι η κλιματική αλλαγή, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η ερημοποίηση, η αλατοποίηση του εδάφους με αποτέλεσμα να θεωρείται ακατάλληλο για γεωργική χρήση καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μια σειρά από δ.ο. που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της φυτοπροστασίας (Hamuda and Patkó 2010).

Λαμβάνοντας υπόψιν όσα προαναφέρθηκαν είναι ιδιαίτερα σημαντικό να στραφεί ο γεωργικός κλάδος προς τη χρήση εναλλακτικών πηγών φυτοπροστασίας, να δίνεται βάση στην αειφορική χρήση των φυσικών πόρων, να προστατεύονται και να αξιοποιούνται οι φυσικοί εχθροί και να προτιμάται η χρήση ήπιων χημικών σκευασμάτων ή βιολογικών.

### **1.5.1 Τα χαλκούχα σκευάσματα ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.)**

Ο χαλκός αποτελεί ένα στοιχείο το οποίο θεωρείται ασφαλές για τον άνθρωπο και απαραίτητο για την ανθρώπινη υγεία. Θεωρείται ότι το ενήλικο σώμα περιέχει μεταξύ 1,4 και 2,1 mg χαλκού ανά kg σωματικού βάρους και ότι ένας άνθρωπος τρώει και πίνει περίπου 1 mg χαλκού κάθε μέρα (Borkow and Gabbay 2005). Ο χαλκός αποτελεί επίσης απαραίτητο στοιχείο και για την ζωή των φυτών καθώς συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ως συστατικό ενζύμων, όπως είναι η κυτοχρωμική οξειδάση (στην αναπνοή) και η πλαστοκυανίνη (στη φωτοσύνθεση) (B ΓΑΛΑΤΗΣ 2003). Τα ιόντα Cu ενεργούν ως συμπαραγοντες σε πολλά ένζυμα όπως η δισμουτάση υπεροξειδίου Cu / Zn (SOD), η οξειδάση του κυτοχρώματος c, η αμινοοξειδάση, η λακκάση, η πλαστοκυανίνη και η πολυφαινολο-οξειδάση. Σε κυτταρικό επίπεδο, ο Cu διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της μεταγραφής, της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και της κινητοποίησης σιδήρου (Yruela 2005).

Σύμφωνα με μελέτες έχει βρεθεί ότι οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν ιδιαίτερα

αυξημένη ευαισθησία στο χαλκό και στο πλαίσιο αυτό έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την εξήγηση της τοξικότητας του χαλκού σε αυτούς (Borkow and Gabbay 2005). Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στη χρήση του χαλκού από παλαιότερα έως τη σύγχρονη εποχή για την καταπολέμηση διαφόρων μικροοργανισμών στο γεωργικό τομέα και όχι μόνο. Η βακτηριοστατική επίδραση του χαλκού παρατηρήθηκε από τον Dr. Phyllis J. Kuhn και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε μέχρι τη σημερινή εποχή με διάφορες δοκιμές και πειράματα. Αναλυτικότερα έχει αξιολογηθεί η χρήση του σε σκευή φαγητού, επιφάνειες επικαλυμμένες με χαλκό, βαφές που περιλαμβάνουν χαλκό κ.α. όπου διαπιστώθηκε ότι μειωνόταν σημαντικά ο βακτηριακός πληθυσμός παρουσία χαλκού. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν εξετάσει την πιθανή χρήση του σε υφάσματα (π.χ. σε εξοπλισμό υφασμάτων που προορίζονται για νοσοκομειακή χρήση) καθώς και σε φίλτρα νερού (Borkow and Gabbay 2005).

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές του χαλκού αποτελεί η ευρέως γνωστή χρήση του στο γεωργικό κλάδο. Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις στο γεωργικό κλάδο ήταν αυτή του βορδιγάλειου πολτού, το οποίο αναλύεται εκτενέστερα στη συνέχεια. Το χαλκούχο αυτό σκεύασμα που χρησιμοποιείται ευρέως και στις μέρες είναι ιδιαίτερα σημαντικό Φ.Π. καθώς μυκητοτοξικής ενέργειας όπως σε πολλά είδη των γενών *Peronospora*, *Phytophthora*, *Plasmopara*, *Septoria*, *Monilia*, *Exoascus*, *Venturia*, *Coryneum*, *Colletotrichum*, *Glomerella*, *Gnomonia*, *Cycloconium*, *Cladosporium*, *Cercospora* και σκωριάσεις που οφείλονται στα είδη των γενών *Uromyces*, *Gymnosporangium*, *Puccinia* και σήψεις των ριζών οι οποίες οφείλονται στα είδη των γενών *Pythium*, *Verticillium* και *Sclerotinia*. Εξαίρεση αποτελεί η ασθενής ως γνωστών επίδραση του βορδιγάλειου πολτού και των χαλκούχων ενώσεων γενικότερα, στους μύκητες που ανήκουν τα ωΐδια (Borkow and Gabbay 2005).

Παρότι ο βορδιγάλειος πολτός είναι αποτελεσματικός εντούτοις η χρήση του σε αρκετές περιπτώσεις περιορίστηκε λόγω των μειονεκτημάτων που εμφάνισε. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι ο πολτός δρα ανασταλτικά στην αύξηση αρκετών φυτών (π.χ. σολανώδη). Η περιεχόμενη άσβεστος του πολτού θεωρείται εν μέρει υπεύθυνη για αυτές τις ανεπιθύμητες επιδράσεις. Για την αντιμετώπιση αυτού δημιουργήθηκαν διάφορες παραλλαγές με την προσθήκη άλλων ανόργανων στοιχείων εκτός της άσβεστου αλλά και με άλλες ανόργανες ενώσεις χαλκού. Μερικές από αυτές είναι ο βουργούνδιος πολτός (Burgundy mixture) όπου σε αντίθεση με τον βορδιγάλειο

πολλά η εξουδετέρωση του χαλκού γίνεται με σόδα ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Ο οξυχλωριούχος χαλκός [ $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{CuCl}_2$ ], το υποοξείδιο του χαλκού ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), το υδροοξείδιο του χαλκού [ $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ], ο τριβασικός χαλκός και ο εναμμώνιος θειικός χαλκός αποτελούν ενώσεις που μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χαλκού στο ψεκαστικό υγρό χωρίς να υπάρχει κίνδυνος φυτοτοξικότητας, ενώ για την διαλυτοποίησή τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεταλλικά δοχεία χωρίς τον κίνδυνο κάποιας αντίδρασης (Ζιώγας 2010). Ο οξυχλωριούχος χαλκός είναι πιθανώς το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο χαλκού. Μελέτες αναφέρουν την αποτελεσματικότητα του ενάντια παθογόνων μυκήτων, όπως *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium semitectum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Stemphylium radicinum*, *Hirschmanniella oryzae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Gharieb, Ali et al. 2004).

#### 1.5.1.1 Ιστορική αναδρομή χρήσης του χαλκού

Τα μεταλλικά ιόντα, είτε μόνα τους είτε σε σύμπλοκα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση υγρών, στερεών και ιστών εδώ και αιώνες (Dollwet 1985). Η χρήση του χαλκού είναι γνωστή από την αρχαιότητα καθώς οι αρχαίοι Έλληνες στην εποχή του Υποκράτη (400 π.Χ.) ήταν οι πρώτοι που ανακάλυψαν την απολυμαντική ιδιότητα του χαλκού. Στην Ινδία το νερό που λαμβάνεται από τον ποταμό Γάγγη αποθηκεύεται σε σκεύη χαλκού λόγω των αντιρρυπαντικών και βακτηριοστατικών ιδιοτήτων του χαλκού. Οι πρώτοι Φοίνικες επίσης συνήθιζαν να καρφώνουν λωρίδες χαλκού στα κύπη των πλοίων για να εμποδίσουν την ρύπανση, καθώς τα καθαρότερα σκάφη είναι ταχύτερα και πιο ευέλικτα. Μέχρι τον 18ο αιώνα, ο χαλκός είχε τεθεί σε ευρεία κλινική χρήση στον Δυτικό κόσμο για τη θεραπεία ψυχικών διαταραχών και παθήσεων των πνευμόνων. Οι πρώτοι Αμερικανοί πρωτοπόροι που ταξίδευαν δυτικά σε ολόκληρη την ήπειρο έβαζαν ασημένια και χάλκινα νομίσματα σε μεγάλα ξύλινα βαρέλια για να παρέχουν ασφαλές πόσιμο νερό για το μακρύ ταξίδι τους. Στον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, οι Ιάπωνες στρατιώτες έβαζαν κομμάτια χαλκού στα μπουκάλια νερού τους για να αποτρέψουν την δυσεντερία. Ο θειικός χαλκός θεωρείται πολύτιμος από ορισμένους κατοίκους της Αφρικής και της Ασίας καθώς χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πληγών και δερματικών παθήσεων. Η NASA επίσης σχεδίασε ένα σύστημα αποστείρωσης του νερού βασισμένο σε ιονισμό χαλκού-αργύρου για τις πτήσεις της στο Apollo (Borkow and Gabbay 2005).

Όσον αφορά τον γεωργικό κλάδο η πρώτη καταγεγραμμένη χρήση του χαλκού στη γεωργία ήταν το 1761, όταν ανακαλύφθηκε ότι ο εμποτισμός των σπόρων σε ασθενές διάλυμα θειικού χαλκού ανέστειλαν την ανάπτυξη μυκήτων στους σπόρους. Μέσα σε μερικές δεκαετίες, η πρακτική αυτή έγινε τόσο γνωστή και αποτελεσματική που σήμερα οι μολύνσεις των σπόρων από μύκητες είναι σπάνιες και δεν έχουν μεγάλη οικονομική σημασία. Η μεγαλύτερη ανακάλυψη για τη χρήση αλάτων χαλκού ως μυκητοκτόνα ήρθε αναμφίβολα στη δεκαετία του 1880 με την ανάπτυξη μιας σύνθεσης υδροξειδίου του ασβεστίου-χαλκού από τον Γάλλο επιστήμονα Millardet. Συγκεκριμένα απέδειξε ότι ο ψεκασμός σταφυλιών και αμπέλων με ένα μείγμα θειικού χαλκού, υδροξειδίου του ασβεστίου και νερού ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός για την προστασία από τον περονόσπορο. Σύμφωνα με ιστορικά στοιχεία μερικοί παραγωγοί στη περιοχή του Bordeaux, με σκοπό να αποτρέψουν τους περαστικούς να κλέψουν σταφύλια από τα αμπέλια τους, ψέκαζαν κατά μήκος των δρόμων τα πρέμνα με μείγμα θειικού χαλκού και άσβεστου. Σ' αυτά τα πρέμνα παρατήρησε ο Millardet ότι η προσβολή από τον περονόσπορο (*Plasmopara viticola*) ήταν σημαντικά μικρότερη. Το μείγμα αυτό ονομάστηκε βορδιγάλειος πολτός ο οποίος αποτελεί κλασσικό χαλκούχο σκευάσματα και ακρογωνιαίο λίθο της γεωργικής φαρμακολογίας. Δύο χρόνια αργότερα έγινε η ανακάλυψη του βουργούνδιου πολτού όπου ο Masson ελλείψει υδροξειδίου του ασβεστίου χρησιμοποίησε για την παρασκευή βορδιγάλειου πολτού ανθρακικό νάτριο. Ο πολτός αυτός πλεονεκτεί έναντι του βορδιγάλειου γιατί είναι περισσότερο ομοιογενείς, παρουσιάζει όμως το μειονέκτημα να είναι φυτοτοξικός και να έχει αρκετά μειωμένη προσκολλητικότητα. Ύστερα από αρκετές δοκιμές με μίγματα βορδιγάλειου και βουργούνδιου πολτού ενάντια σε διάφορες μυκητολογικές ασθένειες των φυτών σύντομα διαπιστώθηκε ότι πολλές ασθένειες των φυτών θα μπορούσαν να προληφθούν με μικρές ποσότητες χαλκού εφαρμόζοντας τον την κατάλληλη στιγμή και με τον σωστό τρόπο. Από τότε μέχρι και σήμερα τα μυκητοκτόνα χαλκού έχουν καταστεί απαραίτητα και πολλές χιλιάδες τόνοι χρησιμοποιούνται ετησίως σε όλο τον κόσμο για την πρόληψη φυτικών ασθενειών (Borkow and Gabbay 2005).

#### **1.5.1.2 Σύγχρονη χρήση του χαλκού ως φυτοπροστατευτικό προϊόν**

Ο σύγχρονος φυτοπροστατευτικός κλάδος βασίζεται ιδιαίτερα στη χρήση χαλκούχων σκευασμάτων για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών. Η εφαρμογή του χαλκού

παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα όπως είναι το μεγάλο φάσμα δράσης που έχει, η αποτελεσματικότητά του, η εφαρμογή του και στη βιολογική γεωργία ή όταν δεν είναι επιθυμητή η χρήση συμβατικού μυκητοκτόνου, η ασφάλεια του όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία σε σχέση με άλλα μυκητοκτόνα καθώς και η δυνατότητα εφαρμογής σε σπόρους εκτός από φυτά. Σε περιπτώσεις που μας απασχολεί κάποια βακτηριολογική ασθένεια είναι επίσης ιδιαίτερα χρήσιμος καθώς υπάρχει σημαντική έλλειψη Φ.Π. κατά των βακτηρίων τόσο στη βιολογική όσο και στη συμβατική γεωργία. Επιπλέον, θεωρείται ότι στη περίπτωση του χαλκού εμφανίζονται λιγότερα προβλήματα εμφάνισης ανθεκτικότητας σε σχέση με άλλα σκευάσματα (Lamichhane, Osdaghi et al. 2018).

Η χρήση του χαλκού ωστόσο εκτός από τα πολλά πλεονεκτήματα που προσφέρει ως εργαλείο φυτοπροστασίας παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα η αλόγιστη χρήση του στο γεωργικό τομέα πολλές φορές έχει οδηγήσει σε συσσώρευση του σε μεγάλες ποσότητες στο έδαφος με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η σύσταση του αλλά και να βλάπτονται σημαντικοί μικροοργανισμοί της πανίδας του εδάφους όπως διάφοροι μύκητες και βακτήρια αλλά και οργανισμοί όπως ακάρεα, νηματώδεις, πρωτόζωα, αράχνες, έντομα και γαιοσκώληκες. Οι οργανισμοί αυτοί διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στο έδαφος καθώς συμμετέχουν σε δραστηριότητες όπως είναι η αποικοδόμηση υπολειμμάτων Φ.Π., ο εμπλουτισμός του εδάφους με θρεπτικά στοιχεία αλλά και η βελτίωση της δομής και της σταθερότητας του (Kent and Triplett 2002). Μια άλλη ανησυχία που υπάρχει σχετικά με τη χρήση του είναι οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου λόγω παρουσίας υπολειμμάτων στα τρόφιμα. Οι κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης επιβάλλουν μέγιστα επίπεδα υπολειμμάτων χαλκού 5 mg/ g φρέσκιας μάζας εσωτερικά ή στην επιφάνεια των τροφίμων.

Επιπλέον έχει βρεθεί ότι είναι ιδιαίτερα τοξικός για διάφορους οργανισμούς μη-στόχους αλλά και για τους υδρόβιους οργανισμούς. Η χρήση του χαλκού στην σύγχρονη γεωργία είναι γενικά ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα ιδιαίτερα στη βιολογική, μάλιστα ορισμένοι υποστηρίζουν ότι στο μέλλον ίσως και να απαγορευτεί η χρήση του. Αποτελεί ωστόσο αναμφίβολα ένα βασικό εργαλείο της φυτοπροστασίας, λαμβάνοντας ωστόσο υπόψιν τα πιθανά αρνητικά αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται ορθή χρήση ώστε τυχόν αρνητικές επιδράσεις του. Σημαντικό είναι επίσης να γίνονται έρευνες πάνω στη πιθανή χρήση μικρότερης δοσολογίας χαλκού ή στην βελτιστοποίηση των μεθόδων που εφαρμόζεται μειώνοντας έτσι τις

αρνητικές του επιπτώσεις στο περιβάλλον (Lamichhane, Osdaghi et al. 2018).

### 1.5 Μηχανισμός δράσης χαλκούχων σκευασμάτων

Τα χαλκούχα σκευάσματα δρουν με περισσότερους από έναν μηχανισμούς, εντούτοις οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι απόλυτα γνωστοί ή δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Βαρέα μέταλλα όπως είναι ο χαλκός είναι απαραίτητα σε ορισμένες ενζυμικές αντιδράσεις του βιολογικού κύκλου των μυκήτων, σε περίπτωση όμως υπέρβασης των απαραίτητων ποσοτήτων αυτά καθίστανται τοξικά για τους μύκητες. Τοξικότητα μπορεί γενικά να προκύψει από μετουσίωση (denaturation) πρωτεϊνών μετά από αντίδραση του κατιόντος με σουλφυδριλικές και άλλες ομάδες. Ένας άλλος πιθανός τρόπος δράσης φαίνεται να είναι η παρεμβολή στο σύστημα του πυροσταφυλικού οξέος. Άλλες θεωρίες υποστηρίζουν ότι ο χαλκός επενεργεί στην κυτταρική μεμβράνη, προκαλώντας μεταβολές στην περατότητα και σε φυσικούς χαρακτήρες της οι οποίοι είναι αναγκαίοι για την ρύθμιση της ανάπτυξης του κυτάρου (Ζιώγας 2010). Μια άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι δρα μέσω της εισόδου ιόντων χαλκού στο εσωτερικό του κυτάρου, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζονται ορισμένα ένζυμα του αναπνευστικού κύκλου (λόγω αντίδρασής τους με σουλφυδριλικές ομάδες) και του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Μία τέτοια αδρανοποίηση μπορεί να συμβεί με την επίδραση του κατιόντος σε μία ομάδα αντίδρασης των ενζυματικών πρωτεϊνών, ή με τον σχηματισμό μεταλλικών δεσμών, ή ακόμα με την αντικατάσταση της ουσίας η οποία είναι απαραίτητη για την σύνθεση των ενζύμων. Συνοπτικά η τοξικότητα του χαλκού στους μικροοργανισμούς θεωρείται ότι οφείλεται κυρίως σε μετατόπιση βασικών μετάλλων από τις φυσικές τους θέσεις δέσμευσης, σε παρεμβολές που προκαλούνται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και την ωσμωτική ισορροπία αλλά και σε μεταβολές στη δομή νουκλεϊκών οξέων, μεμβρανών και πρωτεϊνών. Παρόλο που οι περισσότεροι οργανισμοί εμφανίζουν μηχανισμούς αντίστασης σε περίσσεια χαλκού, γενικά η έκθεση των περισσότερων μικροοργανισμών σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτού του στοιχείου έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη στα κυτταρικά συστατικά τους (Borkow and Gabbay 2005).

Όσον αφορά τη δράση του βορδιγάλειου πολτού φαίνεται ότι σχηματίζει ένα ζελατινώδες ίζημα υδροξειδίου του χαλκού, σταθεροποιημένο με προσροφημένο θειικό ασβέστιο. Αυτό το ίζημα αποτίθεται στην επιφάνεια του φυτού, ο δε χαλκός είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου σε αδιάλυτη μορφή. Τα σπόρια των ευαίσθητων μυκήτων,

καθώς βλαστάνουν, εκκρίνουν μηλικό οξύ και αμινοξέα, έτσι μεταβάλλουν το pH με αποτέλεσμα ένα μέρος του χαλκού ο οποίος παρέμενε αδιάλυτος, να διαλυτοποιείται δρώντας τοξικά για τον ευαίσθητο μύκητα. Αντίθετα οι μη ευαίσθητοι μύκητες δεν έχουν την ικανότητα διαλυτοποίησης του μετάλλου αυτού. Ακόμη οι εκκρίσεις των φυτών, οι βροχές αλλά και η πρωινή δροσιά που περιέχει CO<sub>2</sub> διαλυτοποιούν τον χαλκό (Ζιώγας 2010).

Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι διάφορες οργανομεταλλικές ενώσεις μπορούν να βελτιώσουν την εκλεκτική τοξικότητα αλλά και την δραστηριότητα του χαλκού. Αυτό οφείλεται στην διευκόλυνση που παρέχει το οργανικό μέρος του μορίου στο μεταλλικό ιόν. Στις οργανομεταλλικές ενώσεις το μεταλλικό ιόν είναι ενωμένο με τουλάχιστον ένα άτομο άνθρακα μιας οργανικής ομάδας. Σε ορισμένες περιπτώσεις η εφαρμογή ενός μεταλλικού ιόντος το οποίο δεν περιέχεται σε κάποια οργανική ένωση (όπως στην περίπτωση του κασσίτερου Sn) δεν παρέχει κάποια βιοκτόνο δράση ενώ η απόκτηση της βιοκτόνου δράσης γίνεται μόνο όταν αυτό συμπεριληφθεί σε οργανικές ενώσεις. Παραδείγματα οργανομεταλλικών ενώσεων χαλκού τα οποία όπως προαναφέραμε βελτιώνουν τις μυκητοκτόνες ιδιότητες, είναι ο οξυκινολινικός χαλκός (oxine-copper) και το copper octanoate. Ο οξυκινολινικός χαλκός προέρχεται από την ένωση ενός ατόμου χαλκού με δύο μόρια 8-υδροξυκινολίνη. Χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό πληγών αλλά και για την καταπολέμηση μυκήτων όπως: *Septoria*, *Botrytis*, *Altenaria*, *Cercospora*, *Phoma*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Pythium*, για την εξέλκωση των βραχιόνων των μηλοειδών (*Nectria galligena*) αλλά και κατά των βακτηριώσεων όπως του *Pseudomonas syringae*, στα πυρηνόκαρπα, στα μηλοειδή και στα εσπεριδοειδή. Το copper octanoate χρησιμοποιείται ενάντια αρκετών φυτοπαθογόνων μυκήτων όπως περονόσπορων (*Plasmopara*, *Peronospora*, *Bremia*, *Phytophthora*), ωιδίων (*Erysiphe*, *Sphaerotheca*, *Uncinula*, *Micosphaera*), σκωριάσεων (*Phragmidium*, *Puccinia*, *Uromyces*), *Altenaria*, *Colletotrichum*, *Drechslera*, *Septoria*, *Taphrina*, *Rhizoctonia*, αλλά και για την αντιμετώπιση ορισμένων βακτηρίων όπως *Xanthomonas*, *Pseudomonas* και *Erwinia* (Ζιώγας 2010)

## 1.6 Χαλκός και φυτοτοξικότητα

Ο χαλκός Cu<sup>2+</sup> σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1 μM δρα ως ένας ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας στην μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την φωτοσύνθεση. Ο



χαλκός θεωρείται ένα από τα πιο διαδεδομένα και τοξικά βαρέα μέταλλα. Μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των φυτών, να προκαλέσει αποικοδόμηση της χλωροφύλλης αλλά και να παρεμποδίσει τη δραστηριότητα του φωτοσυστήματος II της χλωροφύλλης (Babu, Marder et al. 2001). Ακόμη η τοξικότητα του χαλκού οφείλεται στην ικανότητα του να καθιζάνει πρωτεΐνες, γεγονός που προκαλεί την πήξη του κυτταροπλάσματος. Ο χαλκός αντιδρά με τις σουλφυδρυλικές ομάδες οξέων και άλλων ενώσεων (Gharieb, Ali et al. 2004).

Μεγάλη σημασία στη φυτοτοξικότητα του χαλκού δίνεται λόγω του ολοένα αυξανόμενου προβλήματος της ρύπανσης εξαιτίας βαρέων μετάλλων αλλά και της εφαρμογής των αλάτων χαλκού ως γεωργικά ζιζανιοκτόνα (Mohanty, Vass et al. 1989). Σε εδάφη με ρύπους βαρέων μετάλλων χρησιμοποιούνται φυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να δεσμεύουν ενεργά τα βαρέα μέταλλα. Τα φυτά αυτά ονομάζονται υπερσυσσωρευτές και χρησιμοποιούνται κατά της ρύπανσης του εδάφους με την μέθοδο της φυτοθεραπείας (Arru, Rognoni et al. 2004).

Όσον αφορά την φυτοτοξικότητα του βορδιγάλειου πολτού, ακόμα και όταν είναι αλκαλικός ή έχει μικρή περιεκτικότητα σε χαλκό, βλάπτει την βλάστηση πολλών φυτών. Ζημιές από τον βορδιγάλειο πολτό παρατηρούνται στους οπωρώνες, το αμπέλι, την τομάτα και την πατάτα. Συνήθως εμφανίζονται με την μορφή εγκαυμάτων, φυλλοπτώσεων, καρποπτώσεων και περιορισμού της βλάστησης και της παραγωγής. Επίσης η παρασκευή του βορδιγάλειου πολτού πρέπει να γίνεται λίγο πριν από την χρησιμοποίησή του. Παραμονή του πολτού αυξάνει τον κίνδυνο φυτοτοξικότητας (Ζιώγας 2010).

Ο χαλκός εμφανίζει σχετικά χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά, αντίθετα τα φυτά είναι πιο ευαίσθητα καθώς εμφανίζουν μεταβολικές διαταραχές και αναστολή της ανάπτυξης τους. Η μειωμένη κινητικότητα του χαλκού στο έδαφος αλλά και η ισχυρή δέσμευση του από ανόργανα κolloειδή, αποτελούν κατά κάποιο τρόπο εμπόδιο στην τοξικότητα του χαλκού στο έδαφος, ωστόσο σε υδατικά οικοσυστήματα τα φυτά εκτίθενται άμεσα στις βλαβερές επιδράσεις του με αποτέλεσμα τα φύκια και ορισμένα είδη ανώτερων υδρόβιων φυτών να εκτίθενται πιο εύκολα στη τοξικότητα του (Fernandes and Henriques 1991). Σε φυτά της κάνναβης σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε πανεπιστήμιο της Ιταλίας, παρατηρήθηκε συσσώρευση χαλκού σε επιδερμικά κύτταρα των άνω φύλλων, σε ανθικές καταβολές αλλά και στα υπόλοιπα επιδερμικά κύτταρα (Arru, Rognoni et al. 2004). Σε άλλη έρευνα πανεπιστημίου της Ιταλίας αποδείχθηκε ότι η *C. sativa* L. είναι

ένας ανεκτικός οργανισμός που έχει εξελίξει μηχανισμούς που του επιτρέπουν να αντιμετωπίσει την υψηλή συγκέντρωση μετάλλων καδμίου και νικελίου (Cd και Ni) στο έδαφος καθώς επίσης το φυτό μπορεί να ανεχθεί εν μέρει την συσσώρευση χαλκού (Bona, Marsano et al. 2007).

Η κατανομή του χαλκού στο έδαφος επηρεάζεται από κλιματολογικούς, γεωλογικούς και άλλους παράγοντες. Εκτός από τις γεωλογικές πηγές και τη βιομηχανική ρύπανση, άλλες ανθρωπογενείς πηγές που σχετίζονται με τις γεωργικές πρακτικές, για παράδειγμα, η επαναλαμβανόμενη χρήση Cu που περιέχεται σε αγροχημικά, μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα Cu στα εδάφη. Η τοξική συγκέντρωση Cu στο έδαφος μπορεί να προκαλέσει ανισορροπία θρεπτικών συστατικών μέσω δέσμευσης με οργανική ύλη, μέταλλα αργίλου και ενυδατωμένα οξείδια σιδήρου (Fe), αλουμινίου (Al) και μαγγανίου (Mn), τα οποία επηρεάζουν την παραγωγικότητα του φυτού. Η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων όπως είναι ο χαλκός στο έδαφος, μειώνει σημαντικά την παραγωγικότητα των φυτών και τις αποδόσεις των καλλιεργειών (Rizwan, Ali et al. 2016) ενώ απειλεί την ανθρώπινη υγεία καθώς εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα (Ma, Yamaji et al. 2008). Οι Thounaojam et al. (2012) ανέφεραν ότι η μείωση της βιομάζας των φυτών είναι μια κοινή απόκριση σε φυτά που εκτίθενται σε περίσσεια Cu. Η πρόσληψη χαλκού από τα φυτά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH, καθώς η φυτοδιαθεσιμότητα του Cu αυξάνεται με τη μείωση του pH. Καθώς αυξάνεται το pH, τόσο η συνολική διαλυτή Cu όσο και η  $Cu^{2+}$  δραστηριότητα μειώνεται (Tye, Young et al. 2004). Ωστόσο, τα επίπεδα οργανικής ύλης, ο Zn, το N και ο P στο έδαφος, οι πλημμύρες καθώς και η περιορισμένη ανάπτυξη των ριζών μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη διαθεσιμότητα Cu στα φυτά. Η κύρια τοξική επίδραση του Cu εντοπίζεται στη ρίζα σε σύγκριση με το βλαστό καθώς τείνει να συσσωρεύεται στον ριζικό ιστό με μικρή μετατόπιση στον βλαστό (Marschner 1995). Επομένως, η συγκέντρωση στα παραπάνω εδάφη μπορεί να είναι ένας κακός δείκτης της κατάστασης του φυτού. Η τοξικότητα του χαλκού στο γρασίδι της Ρόδου (*Chloris gayana*) έβλαψε τις ρίζες των φυτών, με συμπτώματα που κυμαίνονται από τη διάσπαση της επιδερμίδας της ρίζας και τη μείωση του πολλαπλασιασμού των τριχών των ριζών, έως τη σοβαρή παραμόρφωση της δομής της ρίζας (Sheldon and Menzies 2004). Η περίσσεια του Cu είναι τοξική καθώς οι οξειδοαναγωγικές του ιδιότητες χρησιμοποιούνται από πρωτεΐνες που δεσμεύουν Cu, καθώς τα ελεύθερα ιόντα μπορούν άμεσα να προκαλέσουν παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). Η καταπόνηση λόγω υψηλών επιπέδων Cu

ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά σήματα που οδηγούν σε κυτταρική βλάβη (Liu, Wang et al. 2018). Η παραγωγή ROS είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των φυτών που εκτίθενται σε περίσσεια Cu, για παράδειγμα, στο ρύζι και τον αραβόσιτο (Gaetke and Chow 2003, Tie, Tang et al. 2012, Mostofa and Fujita 2013).

### **1.6.1 Εφαρμογή χαλκού στη βιολογική γεωργία**

Οι κανονισμοί που διέπουν τη βιολογική γεωργία επιτρέπουν τη χρήση χαλκού ως μέσω αντιμετώπισης των μυκήτων και βακτηρίων. Σύμφωνα με τον εκτελεστικό κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης αριθ. 354/2014, η χρήση του χαλκού περιορίζεται μόνο ως βακτηριοκτόνο και μυκητοκτόνο μέχρι 6 χιλιόγραμμα χαλκού ανά εκτάριο ετησίως. Στην περίπτωση των πολυετών καλλιέργειών, μπορεί να γίνει χρήση άνω του θεσπισμένου ορίου των 6 χιλιογραμμάρων χαλκού ανά εκτάριο από τα κράτη μέλη μόνο υπό τον όρο ότι δεν υπήρξε υπέρβαση της χρησιμοποιούμενης ποσότητα χαλκού των τελευταίων 5 ετών (4 έτη συν το έτος που διανύουμε) άνω των 6 χιλιογραμμάρων χαλκού ανά εκτάριο.

Κατά την εφαρμογή των χαλκούχων σκευασμάτων θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα περιορισμού των κινδύνων για την προστασία των υδάτων και των οργανισμών μη στόχων, όπως η δημιουργία ζωνών ανάσχεσης. Οι ενώσεις χαλκού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιολογική γεωργία είναι: υδροξείδιο του χαλκού, οξυχλωριούχος χαλκός, οξείδιο του χαλκού, βορδιγάλειος πολτός και βασικός θειικός χαλκός (Πηγή:<https://eur-lex.europa.eu/homepage.html>).

Σε ορισμένες χώρες η χρήση του χαλκού στην βιολογική γεωργία είναι απαγορευμένη ή επιτρέπεται σε πολύ μικρές ποσότητες εξαιτίας της τοξικότητας του σε οργανισμούς μη στόχους και της σημαντικής τοξικότητας που παρατηρείται στους υδρόβιους οργανισμούς αλλά και της ανησυχίας για πιθανές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία (Lamichhane, Osdaghi et al. 2018).

## **1.7 Φυτοπροστασία της κάνναβης**

Το γεγονός ότι στην Ελλάδα η νομοθεσία για την καλλιέργεια της κάνναβης ψηφίστηκε σχετικά πρόσφατα σχετίζεται με σοβαρή έλλειψη γνώσης και έρευνας πάνω στη φυτοπροστασία της. Συγκεκριμένα στη χώρα μας δεν υπάρχουν εγκεκριμένα Φ.Π. για την καλλιέργεια της κάνναβης κάτι το οποίο καθιστά δύσκολη

την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών. Στις Η.Π.Α. και στον Καναδά υπάρχει αντίστοιχο πρόβλημα καθώς υπάρχει και εκεί έλλειψη εγκεκριμένων Φ.Π. για την καλλιέργεια της κάνναβης, ωστόσο έχουν δημοσιευτεί ορισμένοι κατάλογοι που αναφέρονται σε συγκεκριμένες δ.ο. οι οποίες κατ' εξαίρεση μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Στη λίστα αυτή περιλαμβάνονται κυρίως φυτικά σκευάσματα, αιθέρια έλαια ή δ.ο. που θεωρείται ότι έχουν πολύ μικρή τοξικότητα. Η καλλιέργεια της κάνναβης επομένως είτε στο εξωτερικό είτε στη χώρα μας αντιμετωπίζει σοβαρές προκλήσεις καθώς υπάρχει ανάγκη για παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών προϊόντων αλλά ταυτόχρονα υπάρχει σημαντική έλλειψη ή περιορισμός στα Φ.Π. που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η έρευνα και η μελέτη πάνω σε σκευάσματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια χωρίς να τίθεται σε κίνδυνο η υγεία του καταναλωτή αλλά και η ανακάλυψη νέων πηγών βιοδραστικότητας σε αυτά τα πλαίσια.

Ιδιαίτερα στη περίπτωση της φαρμακευτικής κάνναβης είναι ακόμη πιο σημαντικό τα προϊόντα να είναι ασφαλή καθώς οι περισσότεροι καταναλωτές είναι ασθενείς με ήδη επιβαρυσμένη υγεία. Τα προϊόντα αυτά επομένως δεν πρέπει να περιέχουν υπολείμματα Φ.Π. ή να είναι προσβεβλημένα, ιδιαίτερα στη περίπτωση των μυκητολογικών ασθενειών όπου το προϊόν υποβαθμίζεται σημαντικά από την παρουσία μυκοτοξινών όπως είναι οι αφλατοξίνες (Chandra, Lata et al. 2017). Επιπροσθέτως, πολλές φορές τα προϊόντα της κάνναβης καπνίζονται ή ατμίζονται όπου σε αυτή την περίπτωση η παρουσία υπολείμματος ενός Φ.Π. μπορεί να βλάψει ακόμα περισσότερο τον καταναλωτή λόγω σχηματισμού ακόμη πιο τοξικών ουσιών λόγω θέρμανσης (Lorenz, Bahadir et al. 1987).

### **1.7.1 Εγκεκριμένα σκευάσματα στο εξωτερικό και στην Ελλάδα**

Αυτή τη στιγμή στην Ευρώπη και στις Η.Π.Α. δεν υπάρχουν εγκεκριμένα σκευάσματα για την χρήση στην καλλιέργεια της κάνναβης. Στον Καναδά ορισμένα σκευάσματα έχουν έγκριση ενώ στις Η.Π.Α. διατίθεται κατάλογος με προϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατ' εξαίρεση. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται ορισμένα από τα εγκεκριμένα σκευάσματα στον Καναδά (Canada Gov,2019) και στην Καλιφόρνια (California DPR, 2020). Τα προϊόντα αυτά αποτελούν κυρίως βιολογικά σκευάσματα τα οποία μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι λιγότερο αποτελεσματικά αλλά θεωρούνται πιο ασφαλή ή είναι σκευάσματα με ετικέτες οι οποίες αναφέρονται σε

μεγάλο εύρος καλλιεργειών και έτσι μπορούν υπό ορισμένες περιπτώσεις να χρησιμοποιηθούν και στην κάνναβη (Stone and Pharmacology 2014).

Στη χώρα μας ως τώρα δεν αναγράφονται εγκεκριμένα σκευάσματα για την καλλιέργεια της κάνναβης στην ιστοσελίδα του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό τόσο στο εξωτερικό όσο και στη χώρα μας να γίνει έρευνα πάνω σε ασφαλή Φ.Π. που θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια της κάνναβης καθώς πρακτικά υπάρχει μεγάλη δυσκολία στην παραγωγή ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων χωρίς να υπάρχει δυνατότητα εφαρμογής Φ.Π.

**Πίνακας 1.** Εγκεκριμένα εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και ακαρεοκτόνα στον Καναδά για την καλλιέργεια της κάνναβης (Πηγή: <https://www.canada.ca/en/health-canada.html>, <https://www.cdpr.ca.gov/docs/cannabis/questions.htm>).

<b>Δραστική Ουσία</b>	<b>Κατηγορία</b>	<b>Χώρα</b>
Θείο	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
Κιτρικό, Γαλακτικό οξύ	Βακτηριοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
Σκόνη σκόρδου, Έλαιο σκόρδου	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
Διπτανθρακικό κάλιο	Μυκητοκτόνο	Καναδάς
<i>Gliocladium catenulatum</i> Strain J1446	Μυκητοκτόνο	Καναδάς
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai strain KRL-AG2	Μυκητοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
<i>Beauveria bassiana</i> strain ANT-03	Μυκοεντομοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kurstaki, strain EVB113-19	Εντομοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
<i>Beauveria bassiana</i> strain GHA	Εντομοκτόνο	Καναδάς
Έλαιο Κανόλας	Ακαρεοκτόνο, Εντομοκτόνο. Μυκητοκτόνο	Καναδάς
Άλατα καλίου λιπαρών οξέων	Εντομοκτόνο	Καναδάς, Η.Π.Α.
Ορυκτέλαιο	Εντομοκτόνο. Μυκητοκτόνο	Καναδάς
Αζαδιραχτίνη	Εντομοκτόνο	Η.Π.Α.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain D747	Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α.
<i>Bacillus subtilis</i> QSTa1	Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α.
<i>Bacillus thuringiensis</i> a4 subsp. kurstaki	Εντομοκτόνο	Η.Π.Α.
<i>Bacillus thuringiensis</i> a4 subsp. israelensis	Εντομοκτόνο	Η.Π.Α.
<i>Burkholderia</i> spp. strain A396a	Εντομοκτόνο	Η.Π.Α.

Καψαϊκίνη	Εντομοαπωθητικό	Η.Π.Α.
Καστορέλαιο	Απωθητικό Τρωκτικών	Η.Π.Α
Λάδι κανέλας	Εντομοκτόνο, Κοχλιοκτόνο	Η.Π.Α
Γαρυφαλέλαιο	Βακτηριοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Καλαμποκέλαιο	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Βαμβακέλαιο	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Γερανιόλη	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο.Απωθητικό Τρωκτικών	Η.Π.Α
<i>Glitocladium virens</i>	Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Φωσφορικός σίδηρος	Κοχλιοκτόνο	Η.Π.Α
<i>Isaria fumosorosea</i>	Εντομοκτόνο	Η.Π.Α
Πυριτικό Κάλιο	Ακαρεοκτόνο, Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Σορβικό Κάλιο	Εντομ.-Μυκητ.-Ακαρ.	Η.Π.Α
Αρπακτικοί νηματώδης	Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Λάδι Δεντρολίβανου	Βακτηριοκτόνο, Εντομοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Σησαμέλαιο	Ακαρεοκτόνο, Εντομοκτόνο	Η.Π.Α
Χλωριούχο Νάτριο	Εντομοκτόνο-Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Λάδι Σόγιας	Ακαρεοκτόνο, Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α
Εκχύλισμα <i>Reynoutria sachalinensis</i>	Μυκητοκτόνο	Η.Π.Α

### 1.7.2.Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.) και μυκοτοξίνες

Η Ευρωπαϊκή Ένωση ορίζει ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων Φ.Π. για κάθε προϊόν (MRLs-Maximum Residue Levels) με σκοπό την προστασία της υγείας των καταναλωτών. Συγκεκριμένα για την κάνναβη η Ε.Ε. έχει ορίσει MRLs μόνο για τους σπόρους βιομηχανικής κάνναβης τα οποία είναι διαθέσιμα στην Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης) [https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety\\_el](https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_el)). Δεν υπάρχει ωστόσο κανονισμός για τον καθορισμό των MRLs για αποξηραμένα άνθη κάνναβης τα οποία πολλές φορές χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς. Στις Η.Π.Α. υπάρχουν επίσης αντίστοιχα MRLs για τα γεωργικά προϊόντα τα οποία ορίζονται από την υπηρεσία EPA. (Jordan, Asanuma et al. 2018). Όσον αφορά τον Καναδά και τις Η.Π.Α. υπάρχει και εκεί έλλειψη καταχωρημένων MRLs για τα προϊόντα κάνναβης αλλά έχουν ωστόσο ορισθεί ορισμένα “action levels” τα οποία είναι αντίστοιχα των MRLs. Στο εξωτερικό ο

Καναδάς και η Καλιφόρνια θεωρείται ότι διαθέτουν τον πληρέστερο κατάλογο με καθορισμένα MRLs (Macherone, Jordan et al. 2018).

Στην αποτελεσματική και σωστή ανάλυση υπολειμμάτων Φ.Π. βρίσκουν εφαρμογή σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι όπως είναι η χρήση μια διπλής πλατφόρμας MS/MS όπου θα χρησιμοποιείται GC/MS/MS και LC/MS/MS. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την αξιολόγηση δειγμάτων με υψηλή ευαισθησία και απόδοση. Εφαρμόζοντας τέτοιες μεθόδους συγκεκριμένα στην καλλιέργεια της κάνναβης αντιμετωπίζουμε ωστόσο σημαντικές προκλήσεις λόγω της περίπλοκης χημικής δομής της και της υψηλής συγκέντρωσης κανναβινοειδών και τερπενίων σε σχέση με τα επίπεδα των Φ.Π. που μπορεί να υπάρχουν (Jordan, Asanuma et al. 2018).

Μια άλλη σημαντική ανησυχία που υπάρχει εκτός από την παρουσία Φ.Π. στα προϊόντα της κάνναβης αποτελεί η προσβολή από μύκητες ή βακτήρια προσυλλεκτικά αλλά κυρίως μετασυλλεκτικά. (McPartland 1994). Αυτοί οι οργανισμοί είναι κυρίως σαπροφυτικοί, με τους μύκητες να αποτελούν την κύρια αιτία μόλυνσης των αποθηκευμένων προϊόντων. Η ανάπτυξη τέτοιων μυκήτων έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται μυκοτοξίνες οι οποίες είναι ηπατοτοξικές, νεφροτοξικές και καρκινογόνες. Οι ωχρατοξίνες, η κιτρινίνη και η πατουλίνη παράγονται από είδη του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* ενώ η παξιλλίνη παράγεται από τον μύκητα *Penicillium raxilli*. Οι πιο κοινές μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι οποίες είναι δηλητηριώδεις και καρκινογόνες και παράγονται κυρίως από μύκητες του γένους *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) (Chandra, Lata et al. 2017). Η νομοθεσία στην Ευρώπη, αλλά και στις Η.Π.Α. και τον Καναδά ορίζει και σε αυτή την περίπτωση ανώτατα επιτρεπτά όρια με σκοπό να διασφαλίζεται η ασφάλεια των προϊόντων ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παθογόνα, όπως το είδος *Escherichia coli* πρέπει να απουσιάζει παντελώς από το προϊόν. Για την Ευρώπη οι πληροφορίες αυτές είναι διαθέσιμες στην ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical\\_safety/contaminants/catalogue/mycotoxins\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/mycotoxins_en).

## 1.8 Η έννοια της μεταβολομικής ανάλυσης

Η ταχεία αναπτυσσόμενη επιστήμη της μεταβολομικής ανάλυσης συνδυάζει στρατηγικές για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση κυτταρικών μεταβολιτών χρησιμοποιώντας εξελιγμένες αναλυτικές τεχνολογίες και εφαρμόζοντας στατιστικές μεθόδους ή παραλλαγή αυτών για την εξαγωγή πληροφοριών και την ερμηνεία των δεδομένων (Roessner and Bowne 2009) (**Εικόνα 17.**). Οι μεταβολίτες θεωρούνται τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διεργασιών, ως εκ τούτου, η μεταβολομική ανάλυση θεωρείται ότι παρέχει μια άμεση και λειτουργική ανάγνωση της κατάστασης ενός οργανισμού. Αν η γενωμική και πρωτεομική μπορούν να μας δώσουν πληροφορίες για το τι μπορεί να συμβεί, η μεταβολομική μας δίνει απαντήσεις στο τι συνέβη (Arnon and Stout 1939).

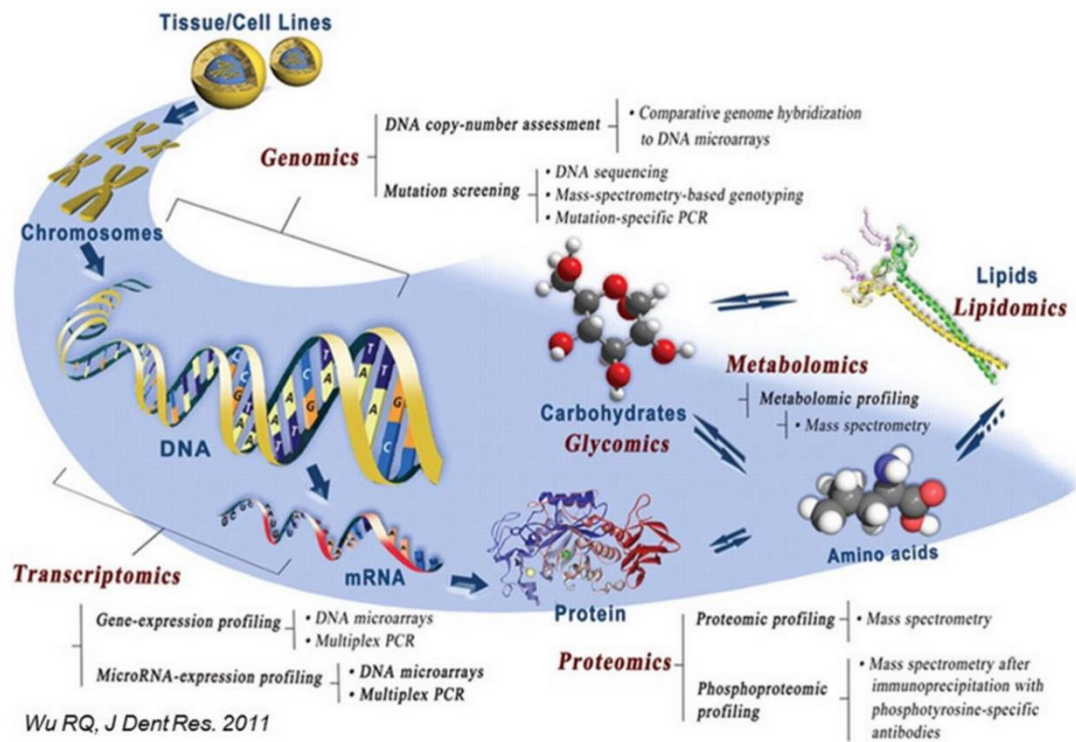
Οι μεταβολομικές προσεγγίσεις κατά τις αρχές ανάπτυξης και βελτιστοποίησης των μεθοδολογιών που χρησιμοποιούν εφαρμόστηκαν σε φυτά και μικροοργανισμούς. Σήμερα οι μεταβολομικές προσεγγίσεις έχουν εφαρμογή σχεδόν σε όλα τα πεδία της επιστημονικής έρευνας (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011). Η μεταβολομική ανάλυση παρέχει δεδομένα που γεφυρώνουν τον γονότυπο με τον φαινότυπο (Aliferis and Jabaji 2011). Η μεταβολομική ανάλυση μέσω της ταυτόχρονης καταγραφής μεταβολιτών και κατ' επέκταση των μεταβολικών δικτύων στα οποία εμπλέκονται μας επιτρέπει την ανίχνευση αλλαγών στο μεταβολικό προφίλ του οργανισμού κατά την έκθεσή του σε διάφορους παράγοντες και την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσήμαντων (biomarkers) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η μεταβολομική έχει συνεισφέρει και στον κλάδο της υγείας προσφέροντας εργαλεία διάγνωσης ασθενειών ή παρακολούθησης της επιτυχίας παρεμβάσεων. Με βάση μελέτες έρευνας που έχουν πραγματοποιηθεί, η μεταβολομική μπορεί να προσφέρει νέους βιοδείκτες για την αξιολόγηση της ανθρώπινης υγείας και με την πάροδο του χρόνου να εξελιχθεί ένας κατάλογος διαγνωστικών δεικτών, ο οποίος μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση δοκιμών υψηλής τάξης (Dettmer, Aronov et al. 2007).

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι οι οποίες εφαρμόζονται για την ανάλυση των μεταβολιτών σε διάφορους οργανισμούς, όμως λόγω της τεράστιας ποικιλομορφίας των χημικών δομών και των μεγάλων διαφορών μεταξύ τους δεν υπάρχει ενιαία



διαθέσιμη πλατφόρμα για την ανάλυση ολόκληρου του μεταβολώματος (Roessner and Beckles 2009). Η ανάπτυξη νέων εναλλακτικών μεθόδων προσέγγισης καθίσταται αναγκαία για την εξαγωγή, ανίχνευση, ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση, όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών (Villas-Bôas, Roessner et al.).



**Εικόνα 17.** Ομικές επιστήμες.

### 1.8.1. Αναλυτικά όργανα για την εφαρμογή της μεταβολομικής ανάλυσης

Η μεταβολομική αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο μελέτης των βιολογικών συστημάτων το οποίο απαιτεί (εκτός των χημικών αναλύσεων και τη μελέτη των παραγόμενων δεδομένων ) τον κατάλληλο πειραματικό σχεδιασμό, την ορθή εκτέλεση αυτών αλλά και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου αποτελεί ένα από τα βασικά βήματα ανάλυσης δειγμάτων. Η επιλογή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η χημική σύνθεση των δειγμάτων, ο σκοπός του πειράματος και η διαθεσιμότητα των αναλυτικών οργάνων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) χρησιμοποιείται ευρύτατα στις μεταβολομικές αναλύσεις. Οι περιορισμένοι χειρισμοί κατά την προετοιμασία των δειγμάτων αλλά και η μεγάλη επαναληψιμότητα (reproducibility) αποτελούν τους βασικούς λόγους επιλογής αυτής της μεθόδου. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου ωστόσο αποτελούν το υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης των αναλυτικών οργάνων για την ανίχνευση σε συχνότητα άνω των 500 MHz, η έλλειψη αυτοματοποίησης της μεθόδου αναγνώρισης και εντοπισμού των μεταβολιτών από τις σχετικές βάσεις δεδομένων, αλλά και το μικρό όριο ανίχνευσης με NMR ανιχνευτή (1-5  $\mu$ M)(Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η πλέον διαδεδομένη για μεταβολομικές αναλύσεις λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της και της ύπαρξης διαθέσιμων μεταβολικών βιβλιοθηκών (πχ NIST, MassBank) είναι η ανίχνευση μεταβολιτών με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) συνδυασμένη με αέρια (Gas Chromatography, GC) ή υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC). Η ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blank samples) (τα οποία δέχονται την ίδια επεξεργασία με το ίδιο πρωτόκολλο με τα βιολογικά δείγματα) καθίσταται απαραίτητη καθώς έτσι γίνεται η διάκριση των μεταβολικών χαρακτηριστικών που προέρχονται από το βιολογικό δείγμα και αυτών που ενδεχομένως μπορεί να προέρχονται από τη ρύπανση του μηχανήματος ή του δείγματος, τη μη καθαρότητα των διαλυτών, τη στήλη και τη χρήση χημικών αντιδραστηρίων. Ακόμη η χρήση προηγμένων ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής πτήσης ιόντων (Time of Flight, TOF) σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή MS στον αέριο χρωματογράφο και ο ανιχνευτής υγρής χρωματογραφίας, έχουν βελτιώσει την

ευαισθησία των μεταβολικών αναλύσεων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί αρκετά αναλυτικά όργανα για τη μεταβολομική ανάλυση, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αλλά και η φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS), αποτελούν τα δύο πλέον χρησιμοποιούμενα όργανα στις μεταβολομικές αναλύσεις (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

### 1.8.2 Βιοπληροφορική επεξεργασία δεδομένων μεταβολομικής

Τα δεδομένα που προκύπτουν μετά την πραγματοποίηση των απαραίτητων διεργασιών της μεταβολομικής, αναλύονται χρησιμοποιώντας στατιστικά προγράμματα που πραγματοποιούν την ανάλυση τεράστιων όγκων δεδομένων (Wishart 2016). Ο απώτερος στόχος της εξαγωγής δεδομένων είναι η μετατροπή των δεδομένων του μεταβολικού αποτυπώματος-metabolic fingerprinting σε τυποποιημένη και ομοιόμορφη μορφή. Αυτό περιλαμβάνει διάφορα στάδια όπως ην προεπεξεργασία των δεδομένων για τη μείωση του θορύβου, την ευθυγράμμιση των χρωματογραφημάτων, την μελέτη των χρωματογραφικών κορυφών κ.α.. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλά εργαλεία λογισμικού για την εξαγωγή δεδομένων και την ανάλυση δεδομένων (Dettmer, Aronov et al. 2007).

Η εφαρμογή της πολυπαραγοντικής ανάλυσης στα πλαίσια της επεξεργασίας των δεδομένων γίνεται μέσω της μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS), τα μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης περιγράφουν τη γραμμική σχέση μεταξύ των προγνωστικών μεταβλητών  $X$  και των μεταβλητών  $Y$  (Wiklund, Johansson et al. 2008). Οι κρυφές μεταβλητές που συμβάλλουν στο διαχωρισμό και την ομαδοποίηση των δειγμάτων εμφανίζονται μετά από μια περιστροφή της προβολής η οποία επιτυγχάνεται με την μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων-διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA)(Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011). Η OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA) αποτελεί επέκταση της PLS-DA, η οποία αναγνωρίζει και αφαιρεί τη διακύμανση των μεταβλητών  $X$ , η οποία είναι κάθετη προς τις προγνωστικές μεταβλητές  $Y$ . Από την ανάλυση προκύπτουν τρεις παράμετροι, ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2X$  και  $R^2Y$  και η προγνωστική ικανότητα  $Q^2$ , των οποίων οι τιμές πλησιάζουν τη μονάδα όσο αυξάνεται η αξιοπιστία του μοντέλου (Wiklund, Johansson et al. 2008).

### 1.8.3. Εφαρμογή μεταβολομικής ανάλυσης στο κλάδο της φυτοπροστασίας

Η άμεση σχέση των μεταβολιτών με τον φαινότυπο ενός οργανισμού, παρέχει στη μεταβολομική ανάλυση ευρύ πεδίο εφαρμογών συμπεριλαμβανομένων των φαινοτύπων των γενετικών τροποποιημένων φυτών και ιδιαίτερα στον έλεγχο ισοδυναμίας, στον προσδιορισμό του γονιδίου αλλά και σε μελέτες φυτών που έχουν υποστεί βιοτικό ή αβιοτικό στρες (Roessner and Bowne 2009). Το περιβάλλον ανάπτυξης του φυτού δρα αθροιστικά ή συνδυαστικά με τον γονότυπο ( $P=G+E$ ), το φυτό λαμβάνοντας αυτά τα ερεθίσματα επηρεάζεται προσαρμόζοντας τις φυσιολογικές του λειτουργίες και το μεταβολισμό του ώστε να επέλθει μια νέα κατάσταση ομοιόστασης γνωστή και ως προσαρμογή (Mittler, Schuurink et al. 2006, Suzuki and Mittler 2006).

Η εφαρμογή της μεταβολομικής τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων Φ.Π. τα οποία είναι πιο ασφαλή για το περιβάλλον, για τους καταναλωτές αλλά και πιο αποτελεσματικά (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011). Τα φυτοπροστατευτικά θα πρέπει να είναι εκλεκτικής τοξικότητας δηλαδή μετά την εφαρμογή τους να δρουν τοξικά για τον οργανισμό στόχο και να μην βλάπτουν το φυτό. Η μεταβολομική έχει συμβάλλει στην έρευνα κατά την ανάπτυξη νέων Φ.Π., καθώς μελετώντας τον μεταβολισμό ενός φυτού μετά από μια εφαρμογή μπορούμε να διακρίνουμε κατά πόσο αυτό είναι εκλεκτικής τοξικότητας. Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί και στο κομμάτι της έρευνας που αφορά τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ (metabolic profiling) μετά από εφαρμογή ζιζανιοκτόνων. Η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων μπορεί να γίνει μέσω της μελέτης του μεταβολισμού και τυχόν αλλαγών που μπορεί να προκύψουν εξάγοντας έτσι συμπεράσματα για το αν ένα Φ.Π. είναι τοξικό για το καλλιεργούμενο φυτό και δεν αποτελεί παράγοντα καταπόνησης, μέσω του πρωτεύοντα ή άλλων δευτερογενών μηχανισμών δράσης του (Aranibar, Singh et al. 2001).

### 1.8.4 Εφαρμογή μεταβολομικής στην κάνναβη (*Cannabis sativa* L.)

Η μεταβολομική ανάλυση βρίσκει εφαρμογή και στην καλλιέργεια της κάνναβης καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση των διαφορετικών ποικιλιών της (Erkelens and Hazekamp 2014), για τον ποιοτικό έλεγχο των παραγόμενων

προϊόντων της (Hazekamp, Tejkaloná et al. 2016), για την μελέτη της χημικής της ποικιλομορφίας καθώς και για την καλύτερη κατανόηση των πολύπλοκων βιοδραστικών ουσιών της. Όπως έχει ήδη αναφερθεί μερικές από τις σημαντικότερες ενώσεις της κάνναβης αποτελούν τα κανναβινοειδή και τα τερπένια, τα οποία με σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης όπως είναι η μεταβολομική μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και να μελετηθούν εκτενέστερα (Hazekamp, Tejkaloná et al. 2016). Μπορεί να συνεισφέρει στη μελέτη του προφίλ των κανναβινοειδών και τερπενοειδών καθώς και σε τυχόν αλλαγές στα επίπεδά τους ύστερα από γονοτυπικές αλλαγές ή σε περίπτωση κάποιες επέμβασης (π.χ. εφαρμογή λιπασμάτων, Φ.Π., βιοδιεγερτών κ.α.). Τέλος η μεταβολομική μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην χημειοταξινόμηση ποικιλιών της κάνναβης με βάση το προφίλ των κανναβινοειδών και τερπενοειδών το οποίο είναι σημαντικό για την έρευνα αλλά και τον ποιοτικό έλεγχο (Aliferis and Bernard-Perron 2020).

Η εφαρμογή προηγμένων βιοαναλυτικών εργαλείων είναι σημαντική επίσης για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των προϊόντων κάνναβης αλλά και για την ανάπτυξη καινοτόμων και ασφαλών προϊόντων. Η μεταβολομική αποτελεί ένα ιδανικό εργαλείο για την έρευνα και την ανάπτυξη της κάνναβης χάρη στην ευελιξία και τις δυνατότητες που παρέχει για την ανάλυση (deconvolution) πολύπλοκου μεταβολώματος (Aliferis and Bernard-Perron 2020).

## 2. Σκοπός της μελέτης

Η απαγόρευση καλλιέργειας της κάνναβης δεν επέτρεψε την ανάπτυξη φυτοπροστατευτικών μέσων του φυτού. Ο νόμος περί της καλλιέργειας του βρίσκεται ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο μη προβλέποντας τα χημικά μέσα αντιμετώπισης εχθρών και ασθενειών του φυτού. Οι απαραίτητες εγκρίσεις των φυτοπροστατευτικών είναι μια χρονοβόρα και πολυδάπανη διαδικασία.

Άλλα κράτη που καλούνται να αντιμετωπίσουν το ίδιο πρόβλημα, το αντιμετωπίζουν με την χρήση των ελάχιστα τοξικών χημικών μέσων. Ο χαλκός χρησιμοποιείται κατά κόρον στη βιολογική γεωργία, η χρήση του χαλκού σε καλλιέργειες κάνναβης μπορεί να αποτελέσει τη λύση ενάντια ορισμένων ασθενειών. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην αλληλεπίδραση που μπορεί να υπάρξει στον μεταβολισμό και στην περιεκτικότητα των κανναβινοειδών φυτών κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) μετά την εφαρμογή συγκεκριμένων σκευασμάτων χαλκού.

## 3. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.1 Χημικά και αντιδραστήρια

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε μίγμα μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα 50:50 v/v (GC/MS grade, καθαρότητας 99.9%, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε πυριδίνη (99.8%), methoxylamine hydrochloride (MeOX) (98% β/β), N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich). Τα αναλυτικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την απόλυτη ταυτοποίηση των μεταβολιτών ήταν επίσης της εταιρίας Sigma-Aldrich. Τέλος, για το ξέπλυμα του εργαστηριακού εξοπλισμού (πορσελάνινων γουδιών, λαβίδων κ.α.) κατά το χειρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ακετόνη (GC/MS grade, 99.9%).

### 3.2 Εφαρμογή χαλκούχων σκευασμάτων

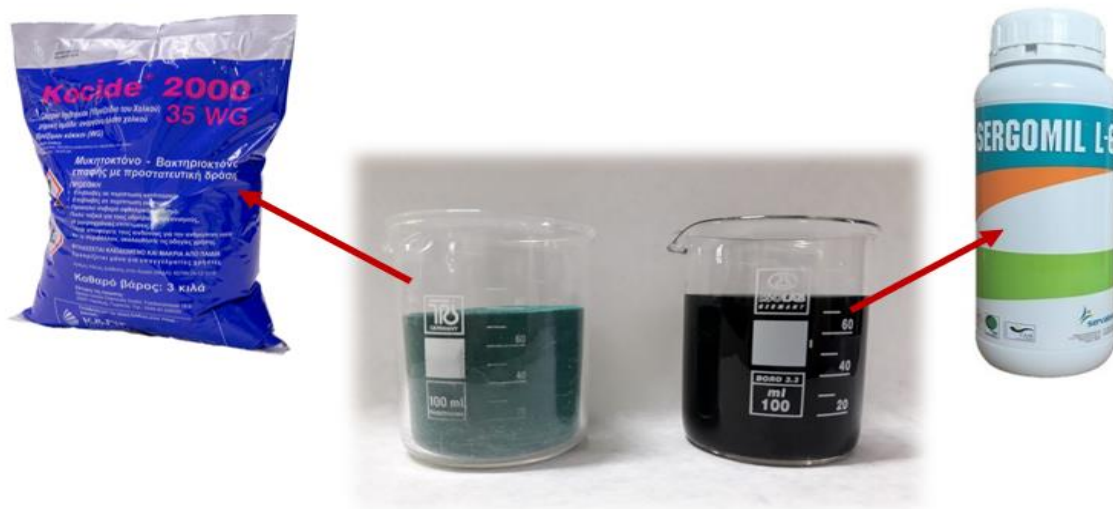
Στη παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν τα χαλκούχα σκευάσματα KOCIDE 2000 35 WG και SERGOMIL L-60 ECO τα οποία ήταν ευγενική χορηγία των εταιριών K&N ΕΥΘΥΜΙΑΔΗ Α.Β.Ε.Ε. και ΕΛΛΑΓΡΕΤ Α.Β.Ε.Ε αντίστοιχα. Το σκεύασμα KOCIDE διατίθεται σε μορφή βρέξιμων κόκκων (WG), περιέχει ως δ.ο. Υδροξείδιο Χαλκού-Μεταλλικός Χαλκός 35% και θεωρείται ότι δρα ως μυκητοκτόνο-βακτηριοκτόνο επαφής. Έχει έγκριση για διάφορες κηπευτικές και δενδροκομικές καλλιέργειες καθώς εφαρμόζεται για την καταπολέμηση ανθρακώσεων, βακτηριώσεων, περονόσπορου, εξελκώσεων, γλοιοσπορίου, κυκλοκόνιου, φαιάς σήψης κ.α. Το Kocide 2000 35WG χάρη στη διαμόρφωση των κόκκων του σε σχήμα αστεριού εξασφαλίζει μεγαλύτερη επιφάνεια και περισσότερο «βιοδιαθέσιμο» χαλκό για υψηλότερη αποτελεσματικότητα και προστασία. Η προστατευτική του δράση οφείλεται στην μυκητοκτόνο και βακτηριοκτόνο δράση του χαλκού ο οποίος επιδρά στις πρωτεΐνες καταστρέφοντας έτσι τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη λειτουργία των κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της βλάστησης των σπορίων των μυκήτων και βακτηρίων ενώ τα ιόντα χαλκού μπορεί

να θανατώσουν το παθογόνο που βρίσκεται στην επιφάνεια του φυτού.

Το σκεύασμα SERGOMIL περιέχει υδατοδιαλυτό χαλκό 5,5% β/β. Συγκεκριμένα αποτελείται από σταθερό μοριακό σύμπλεγμα υπό την μορφή λιγνoσουλφονικού χαλκού, με διασυστηματική δράση και απορρόφηση από τις ρίζες και τα φύλλα. Εφαρμόζεται μέσω άρδευσης ή διαφυλλικά κυρίως σε περιπτώσεις τροφοπενιών χαλκού αλλά και για την προστασία από αντίξοες κλιματολογικές συνθήκες, υπό την προϋπόθεση ότι έχει προηγουμένως διασφαλισθεί η μη ευαισθησία της καλλιέργειας σε χαλκούχα προϊόντα, ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση φυτοτοξικότητας. Το προϊόν αυτό επίσης είναι κατάλληλο για χρήση και στη βιολογική γεωργία. Στον **Πίνακα 3** και στην **Εικόνα 18** παρουσιάζονται τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας 3.** Τα εμπορικά σκευάσματα που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη με τις δ.ο. που περιέχουν και τις εταιρείες που τα παράγουν αντίστοιχα.

ΕΜΠΟΡΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΕΤΑΙΡΙΑ
KOCIDE 2000 35WG	ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΟ ΧΑΛΚΟΥ-ΜΕΤΑΛ. ΧΑΛΚΟΣ 35%	K&N ΕΥΘΥΜΙΑΔΗ Α.Β.Ε.Ε.
SERGOMIL L-60 ECO	ΧΑΛΚΟΣ (Cu), ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΣ 5,5 % β/β	SERVALESA



**Εικόνα 18.** Τα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν: Kocide 2000 35WG και SERGOMIL L-60 ECO



Η δοσολογία για τα σκευάσματα αυτά υπολογίσθηκε σύμφωνα με τη συνιστώμενη δόση που αναγραφόταν στην ετικέτα τους (**Πίνακας 4.**). Η δοσολογία υπολογίσθηκε για να καλύψει τις ανάγκες επιφάνειας 1m<sup>2</sup>. Συγκεκριμένα τα φυτάρια τοποθετήθηκαν στο δάπεδο σε προσημειωμένη επιφάνεια 1m<sup>2</sup> σε αποστάσεις 30 εκ. μεταξύ των γραμμών και 3 εκ. επί της γραμμής, προσομοιάζοντας ότι βρίσκονται στον αγρό με τις αντίστοιχες αποστάσεις φύτευσης, όπου μετά από υπολογισμούς προκύπτει ότι αντιστοιχούν 110.000 φυτάρια/στρέμμα. Για την παρασκευή του ψεκαστικού διαλύματος, ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της ετικέτας κάθε σκευάσματος οι οποίες είναι 150-300 κ.εκ./100 λίτρα νερό (150-300 κ.εκ./στρέμμα). για το σκεύασμα SERGOMIL και 155-340 γρ./100 λίτρα νερό για το σκεύασμα KOCIDE. Σύμφωνα με τις συνιστώμενες δοσολογίες της ετικέτας και με την παραδοχή ότι για την κάλυψη ενός στρέμματος απαιτούνται 100L ψεκαστικού υγρού, ο τελικός όγκος του ψεκαστικού διαλύματος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε πλήρης διαβροχή του φυλλώματος ήταν 100ml. Συγκεκριμένα, στην επιφάνεια 1m<sup>2</sup> αντιστοιχούν 0,01 gr/100mL για το SERGOMIL και 1mL/100mL για το KOCIDE.

**Πίνακας 4.** Τα χαλκούχα σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια του πειράματος, οι δ.ο. που περιέχουν, η δοσολογία που χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με τη συνιστώμενη δόση της ετικέτας και ο όγκος ψεκαστικού υγρού (mL) που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη της επιφάνειας στην οποία τοποθετήθηκαν τα φυτά.

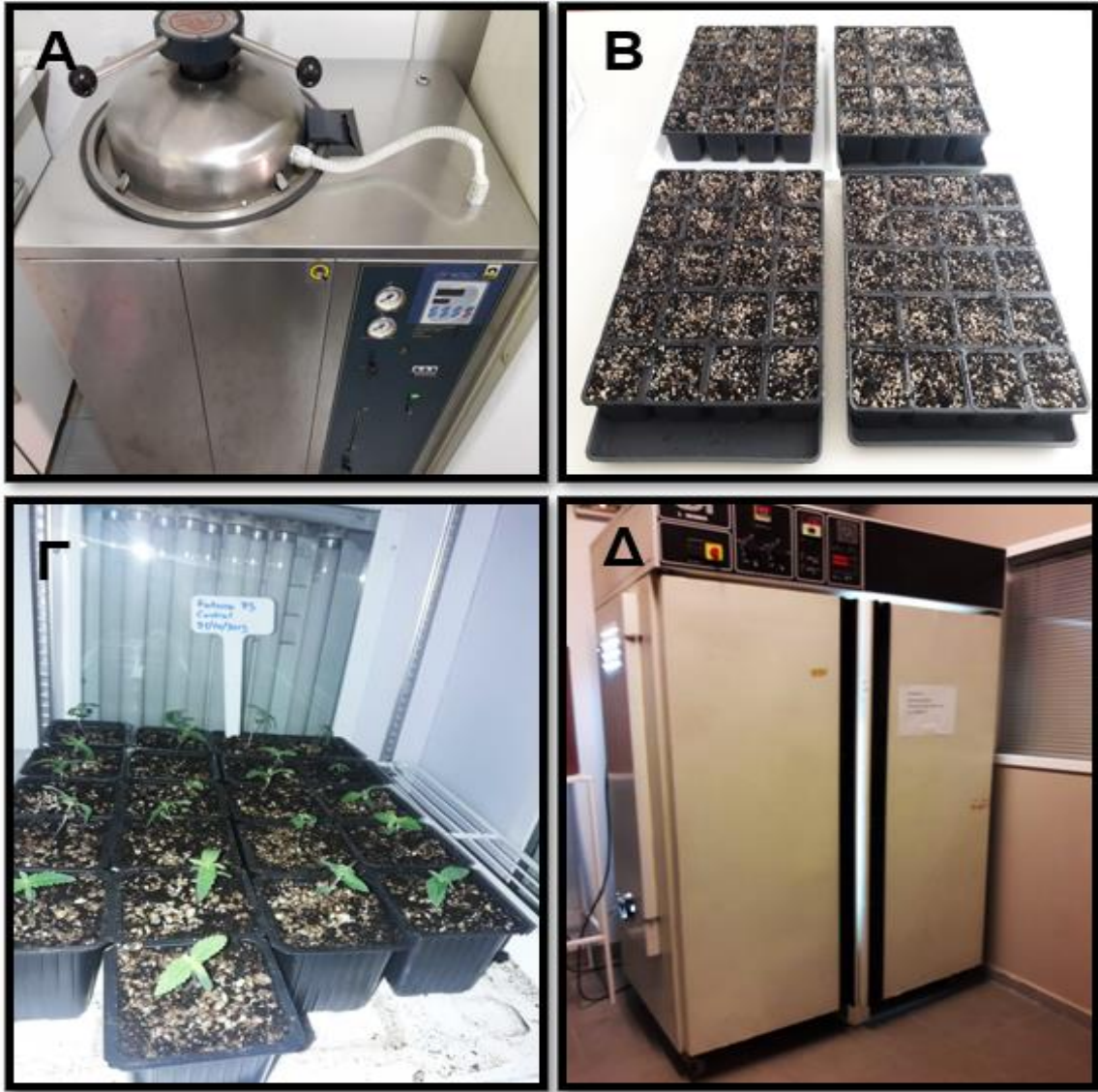
ΧΑΛΚΟΥΧΟ ΣΚΕΥΑΣΜΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	ΟΓΚΟΣ ΨΕΚΑΣΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ (mL)
KOCIDE 2000 35WG	ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΟ ΧΑΛΚΟΥ-ΜΕΤΑΛ. ΧΑΛΚΟΣ 35%	150 cm <sup>3</sup> /στρέμμα	100
SERGOMIL L-60 ECO	ΧΑΛΚΟΣ (Cu), ΥΔΑΤΟΔΙΑΛΥΤΟΣ 5,5 % β/β	155 γρ./100 λίτρα νερό	100

### 3.3. Καλλιέργεια φυταρίων κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) και συνθήκες ανάπτυξης

Για τη μελέτη της επίδρασης των σκευασμάτων χαλκού στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία των φυτών κάνναβης, επιλέχθηκε η ποικιλία της βιομηχανικής κάνναβης FUTURA 75 (*C. sativa* L. var *futura* 75) η οποία πληροί τις βασικές προϋποθέσεις για την χρήση της ως οργανισμός μοντέλο σε «ομικές» μεθόδους αλλά και τους νομικούς κανόνες που διέπουν την καλλιέργεια του φυτού της κάνναβης. Τα φυτάρια

που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από σπόρους ενώ για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αποστειρωμένο μίγμα τύρφης-περλίτη σε αναλογία 3:2 (ο/ο). Συγκεκριμένα για την αποστείρωση του υποστρώματος, το μίγμα τοποθετήθηκε σε ειδικές σακούλες με σκοπό να τοποθετηθεί στον αποστειρωτή. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 αποστειρώσεις όπου μεσολαβούσε διάστημα 24 ωρών ανάμεσα σε κάθε αποστείρωση. Η κάθε αποστείρωση έγινε στους 121°C και είχε διάρκεια 60 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε δίσκους σποράς που περιείχαν 20 ατομικές θέσεις φύτευσης διαστάσεων 7x7x6 εκ., στους οποίους είχε προηγηθεί απολύμανση με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου). Σε κάθε ατομική θέση τοποθετήθηκαν 23 γρ. ξηρής μάζας τύρφης-περλίτη. Ακολούθησε σπορά σε βάθος 1 εκ. ενώ κατόπιν πραγματοποιήθηκε άρδευση των φυτών με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Το pH του νερού που γινόταν η άρδευση των φυτών ρυθμιζόταν στο 6 με χρήση υδροχλωρίου και υδροξειδίου του νατρίου, αφού είχε προηγηθεί η αποστείρωσή του σε αποστειρωτή στους 121°C για 20 λεπτά.

Γενικότερα κατά την διεξαγωγή ενός πειράματος σκοπός μας είναι να μειώσουμε στο ελάχιστο δυνατό την παραλλακτικότητα. Ειδικά σε πειράματα μεταβολομικής ανάλυσης η μείωση της παραλλακτικότητας μεταξύ των μεμονωμένων ατόμων του πληθυσμού είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπερασμάτων (Fukusaki & Kobayasi, 2005). Γι' αυτό το σκοπό τα φυτά τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να έχουν ομοιόμορφη ανάπτυξη και να μην καταγραφούν μεταβολικές διαφορές, οι οποίες δεν θα οφείλονταν στις επεμβάσεις που πραγματοποιούνταν (**Εικόνα 19**). Για την ανάπτυξη των φυτών αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης,  $T=25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH}=70\pm 2\%$  και φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι (Suman Chandra, Hemant Lata, Ikhlas A. Khan and Mahmoud A. ElSohly, 2017), όπου και εφαρμόστηκαν. Τα φυτά αρδεύονταν κάθε τρεις ημέρες με 30 mL κάθε φορά τις πρώτες 10 ημέρες ανάπτυξης των φυτών, ενώ για τις επόμενες 10 ημέρες αρδεύονταν με 40 mL ανά τρεις ημέρες. Η άρδευση γινόταν με τη χρήση ογκομετρικού σωλήνα ώστε σε κάθε φυτό να χορηγείται ακριβώς η ίδια ποσότητα νερού με σκοπό την εξασφάλιση της ομοιόμορφης ανάπτυξής τους.



**Εικόνα 19.** Αποστειρωτής εργαστηρίου στον οποίο γινόταν η αποστείρωση του υποστρώματος και του νερού άρδευσης (Α), δίσκοι σποράς (Β), ανάπτυξη φυτών κάνναβης στο εσωτερικό του θαλάμου (Γ), επωαστικός θάλαμος σταθερών συνθηκών στον οποίο αναπτύχθηκαν τα φυτάρια κάνναβης καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος (Δ).

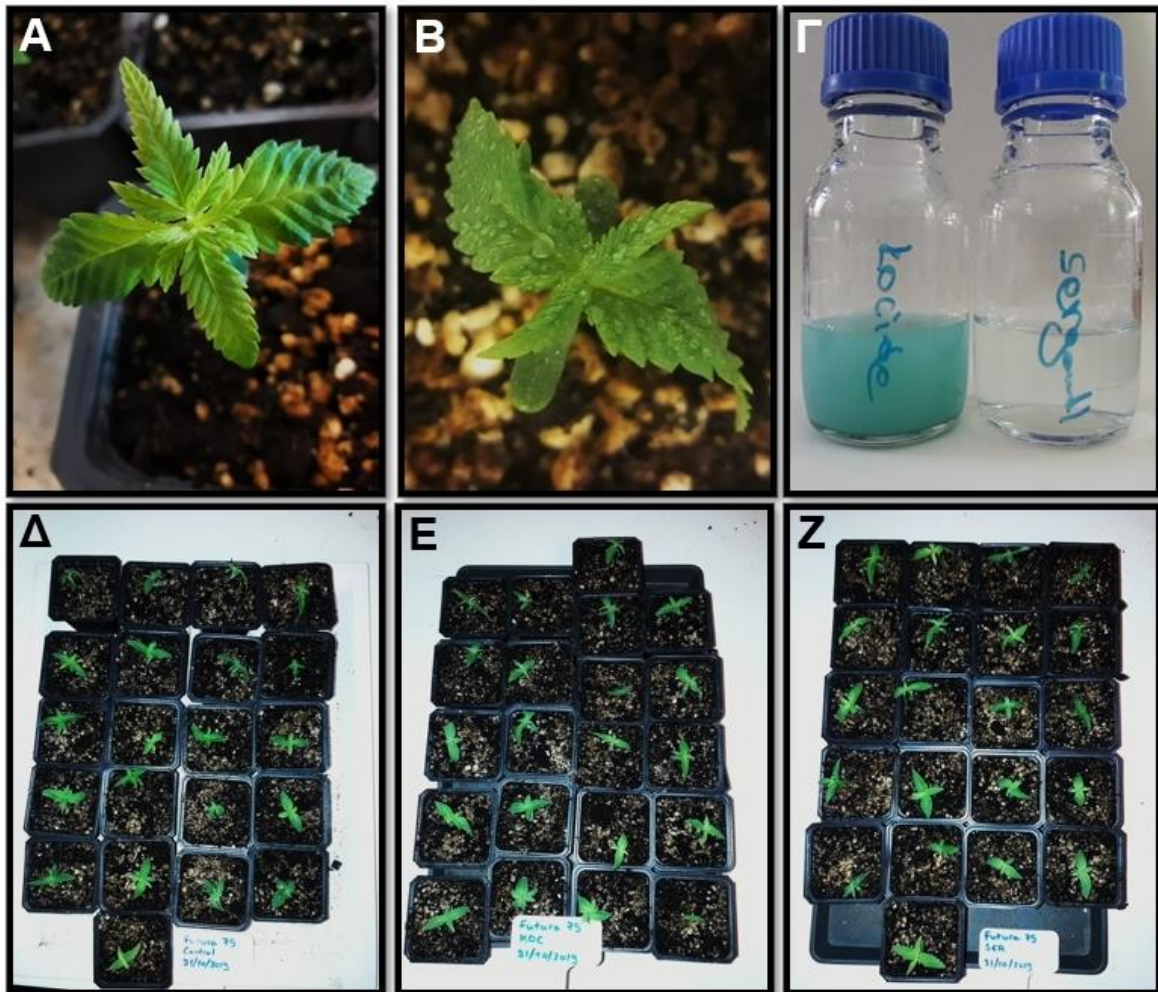
### 3.4. Πειραματικός σχεδιασμός

Αρχικά πραγματοποιήθηκε φύτευση 80 σπόρων από τους οποίους κατόπιν επιλέχθηκαν 63 ομοιόμορφα και εύρωστα φυτά τα οποία αναπτύσσονταν το κάθε ένα σε ατομικό γλαστρίδιο (**Εικόνα 20.**). Για τις επεμβάσεις χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 63 φυτάρια. Τα φυτά ομαδοποιήθηκαν ανά επέμβαση με 21 φυτά ανά επέμβαση και συνολικά τρεις επεμβάσεις. Συγκεκριμένα 21 φυτά ψεκάστηκαν με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό τα οποία αποτέλεσαν και τον μάρτυρα, 21 με το σκεύασμα KOCIDE και 21 με το σκεύασμα SERGOMIL.

Οι επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν σε φυτά ηλικίας 20 ημερών με ψεκαστήρα χειρός σε απόσταση 30 εκ. από τα φυτά, ο οποίος είχε ρυθμισθεί ώστε να παράγει μικρά σταγονίδια με στόχο την πλήρη διαβροχή του φυλλώματος των φυτών. Η εφαρμογή των επεμβάσεων πραγματοποιήθηκε σε χώρο που διαθέτει το Εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας στο οποίο οριοθετήθηκε η επιφάνεια του 1m<sup>2</sup> στο δάπεδο. Εντός αυτής τοποθετήθηκαν σε αποστάσεις προσομοίωσης συνθηκών αγρού τα φυτά της κάνναβης. Αξίζει να επισημανθεί ότι κατά την εφαρμογή των ψεκασμών, διαβρεχόταν όλη η επιφάνεια του 1 m<sup>2</sup> κατά την ίδια ποσότητα και τον ίδιο χρόνο σε κάθε τμήμα του (**Εικόνα 21.**).



**Εικόνα 20.** Ανάπτυξη φυτών κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) σε ατομικά γλαστρίδια.



**Εικόνα 21.** Αντιπροσωπευτικό φυτό κάνναβης ηλικίας 20 ημερών που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα (Α), πλήρης διαβροχή του φυλλώματος με σκοπό την αποτελεσματική εναπόθεση στο φυτό και πρόσληψη από αυτό (Β), τα χαλκούχα σκευάσματα με τα οποία ψεκάστηκαν τα φυτά (Γ), ομαδοποίηση φυτών κάνναβης για την πραγματοποίηση του ψεκασμού με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό-control (Δ), με το σκεύασμα Kocide (Ε) και με το σκεύασμα Sercogil (Ζ).

Από κάθε επέμβαση ανά τρία φυτά αποκόπτονταν τα δύο πλήρως αναπτυγμένα πραγματικά φύλλα. Η αποκοπή φύλλων ίδιας ηλικίας και από τη συγκεκριμένη θέση έγινε διότι είναι γνωστό ότι μεταξύ νεαρών και μεγαλύτερης ηλικίας φύλλων υπάρχουν μεγάλες μεταβολικές διαφορές (Corre & Breimer, 1979; Kim & Verpoorte, 2010). Τα φύλλα αποκόπτονταν μαζί με τον μίσχο με τη χρήση ψαλιδιού το οποίο απολυμνούνταν με ισοπροπανόλη (70%, v/v) σε κάθε αλλαγή επέμβασης και τοποθετείτο σε αλουμινόχαρτο με το διακριτικό αριθμό στην εξωτερική του πλευρά το οποίο περιγράφει την επέμβαση και την επανάληψη ενώ ακολουθούσε η βύθιση αυτών σε υγρό άζωτο N<sub>2</sub> ώστε να επιτευχθεί το στιγμιαίο πάγωμα του μεταβολισμού των φυτικών ιστών (quenching). Συνολικά μετά το πέρας της διαδικασίας είχαν

προκύψει εφτά επαναλήψεις σε κάθε επέμβαση. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε να μην τραυματιστούν οι αποκομμένοι ιστοί καθώς και στην ελαχιστοποίηση του χρόνου που μεσολαβούσε από την κοπή αυτών ως την βύθισή τους στο υγρό άζωτο. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύχθηκε η οποιαδήποτε μεταβολική αλλαγή η οποία μπορεί να οφείλεται σε ενζυματική αποδόμηση και οξειδωση των φυτών. Η οποιαδήποτε μεταβολική αλλαγή που προέκυπτε θα συντελούσε σε παραλλακτικότητα οφειλόμενης σε μή τυχαία αίτια προκαλώντας σύγχυση στην ανάλυση των αποτελεσμάτων (Kim & Verpoorte, 2009). Τέλος τα δείγματα μεταφέρθηκαν και αποθηκεύτηκαν στον υπερκαταψύκτη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.5. Μεταβολομική ανάλυση: Δειγματοληψία και εκχύλιση δειγμάτων για ανάλυση GC/EI/MS**

Η μελέτη των μεταβολιτών και της διακύμανσής τους ώστε να εξακριβωθεί κατά πόσο επιδρούν τα χαλκούχα σκευάσματα που εφαρμόσαμε στο μεταβολισμό του φυτού, απαιτεί μία σειρά διεργασιών βασισμένη σε διάφορα πρωτόκολλα. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, η διαδικασία μεταβολομικής ανάλυση με GC/EI/MS δίνεται στην **Εικόνα 22**.

Με τα στάδια της δειγματοληψίας και του στιγμιαίου παγώματος του μεταβολισμού (quenching) των φυτικών ιστών να έχουν προηγηθεί, ακολούθησε εκχύλιση του δείγματος, ξήρανση του εκχυλίσματος και παραγωγοποίηση με τελικό σκοπό την μεταβολομική ανάλυση με GC/EI/MS. Πιο αναλυτικά μετά από τη δειγματοληψία ακολούθησε η ζύγιση των δειγμάτων στα  $40 \text{ gr.} \pm 1$  σε ζυγαριά ακριβείας και η λειοτρίβισή τους σε πορσελάνινο γουδί με γουδοχέρι υπό την παρουσία υγρού αζώτου (**Εικόνα 23**). Με τη λειοτρίβηση επιτυγχάνεται η ομογενοποίηση κάθε δείγματος με την παράλληλη αύξηση της ειδικής επιφάνειας του και συνεπώς την αποτελεσματικότερη επαφή των φυτικών ιστών με τους διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν (Kim & Verpoorte, 2009). Η εκχυλιστική ικανότητα του δείγματος αυξάνεται (Kim and Verpoorte, 2009; Fukisaki & Kobayashi, 2005) και ταυτόχρονα λόγω της θραύσης των κυτταρικών τοιχωμάτων μειώνεται η ποσότητα ιζήματος και αδιάλυτων δομών στο φυτικό εκχύλισμα. Κατά την λειοτρίβηση τα δείγματα τοποθετούνται σε πορσελάνινο γουδί όπου με την χρήση του πορσελάνινο γουδοχεριού και με την παρουσία υγρού αζώτου πραγματοποιείται η διάσπαση των

ιστών. Η θραύση των κυτταρικών τοιχωμάτων γίνεται με την ταυτόχρονη άσκηση πίεσης και την διενέργεια αριστερόστροφων και δεξιόστροφων κινήσεων του γουδοχειριού. Τα δείγματα σε καμία περίπτωση δεν παρέμεναν σε θερμοκρασίες δωματίου ώστε να μην απωλέσουν την ψύξη τους και να υποστούν οξειδωτική αλλοίωση γι'αυτό τοποθετούνταν σε δοχείο με ξηρό πάγο κατά την μεταφορά τους από και προς τον υπερκαταψύκτη. Η απαλλαγή του εργαστηριακού εξοπλισμού από ξένες ουσίες ή μικροοργανισμούς είναι απαραίτητη γι' αυτό πριν από την χρήση οποιουδήποτε εξοπλισμού (γουδί, γουδοχέρι, λαβίδες κτλ), καθαρίζονταν με ακετόνη (99,5%, GC/MS grade) με ιδιαίτερη επιμέλεια.



**Εικόνα 22.** Ροή εργασιών που απαιτούνται με σκοπό τη μεταβολομική ανάλυση με GC/EI/MS. Δειγματοληψία, λειοτριβηση με υγρό άζωτο, προσθήκη buffer, μετάγγιση σε σωλήνες Eppendorf, τοποθέτηση σε υδατόλουτρο υπερήχων και στη συνέχεια στον ανακινητή, φιλτράρισμα, εξάτμιση δείγματος, προσθήκη MeOX και τοποθέτηση στο υδατόλουτρο, προσθήκη MSTFA και τοποθέτηση στο υδατόλουτρο, εισαγωγή σε inserters και στο GC/EI/MS.



**Εικόνα 23.** Πορεία εργασιών με σκοπό τη λειοτριβήση του δείγματος. Διακρίνουμε τη ζύγιση των δειγμάτων σε ζυγαριά ακριβείας, την προσθήκη υγρού αζώτου η οποία προκαλεί θραύση των κυτταρικών δομών, τη λειοτριβήση του δείγματος με αριστερόστροφες και δεξιόστροφες κινήσεις και τέλος το κονιορτοποιημένο δείγμα.

Μετά τη λειοτριβήση των δειγμάτων με υγρό άζωτο ακολούθησε η εκχύλιση τους με 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (50:50, ο/ο) και η μεταφορά των δειγμάτων σε Eppendorf. Ο ρόλος του οξικού αιθυλεστέρα είναι να ρυθμίζει το pH του εκχυλίσματος το οποίο πρέπει να παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διαδικασία (Kim, Verpoorte et al. 2010) ενώ η μεθανόλη αποτελεί το εκχυλιστικό μέσο. Ακολούθησε η τοποθέτηση των Eppendorf με τα εκχυλίσματα σε υδατόλουτρο υπερήχων (Branson 1210, Danbury, USA) για 20 λεπτά και στη συνέχεια ανάδευση σε οριζόντιο περιστροφικό αναδευτήρα (GFL 3006, Gesellschaft fur Labortechnik mbH, Burfwedel, Germany) για 1 ώρα στις 200 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων με φίλτρο 0.2  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθέτησή τους σε νέα Eppendorfs.

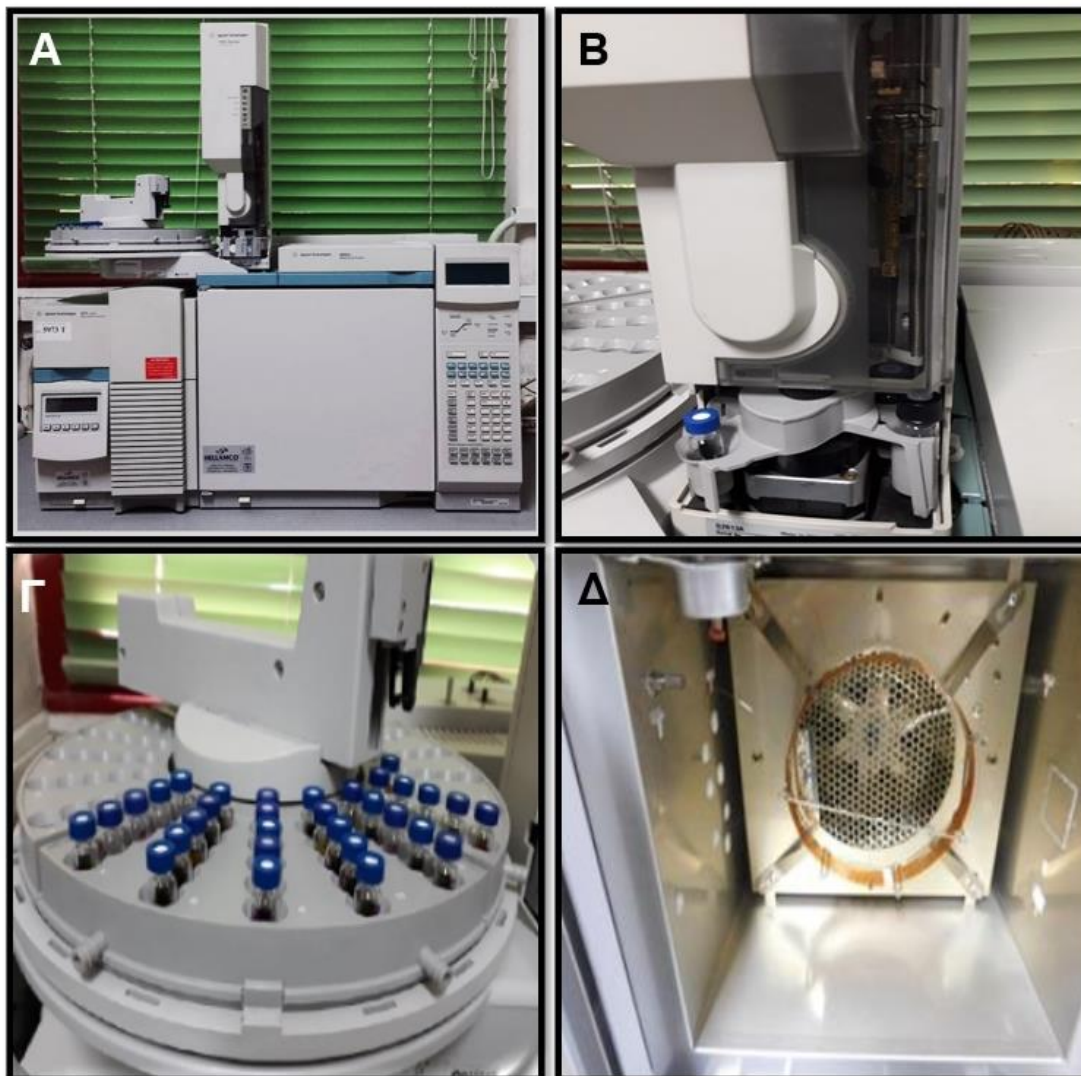
Αφού πραγματοποιήθηκε εξάτμιση των δειγμάτων με συσκευή εξάτμισης, τα δείγματα μας ήταν έτοιμα για παραγωγοποίηση. Η εξάτμιση αποτελεί καθοριστικό στάδιο για την ανάλυση στο GC/EI/MS αφού και η παραμικρή παρουσία νερού στα δείγματα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα αποτελέσματα μας. Η παραγωγοποίηση (derivatization) είναι πολύ σημαντικό στάδιο της μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση GC/MS, καθώς αυξάνει την πτητικότητα και τη θερμική σταθερότητα των μεταβολιτών του δείγματος. Συγκεκριμένα δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης κατηγοριών μεταβολιτών όπως αμινοξέων, οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων, υδατανθράκων και σακχαροαλκοολών οι οποίες περιέχουν μεταβολίτες που δεν είναι ιδιαίτερα πτητικοί (Kim & Verpoorte et al., 2009).. Στην παρούσα μελέτη η



παραγωγοποίηση έγινε με την προσθήκη 80  $\mu\text{L}$  MeOX σε κάθε erpendorf, και ακολούθησε η τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech, Gyeongji-do, Korea) για 2 ώρες με θερμοκρασία ύδατος 30°C. Το τελικό βήμα ήταν η προσθήκη 80  $\mu\text{L}$  MSTFA σε κάθε δείγμα και επανατοποθέτηση τους στο υδατόλουτρο αυτήν τη φορά στους 37°C για 1,5 ώρα. Ύστερα από αυτές τις διαδικασίες τα δείγματα μας ήταν έτοιμα για ανάλυση στο GC/EI/MS αφού τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (Macherey-Nagel, Duren, Germany) με micro inserters.

### 3.6. Ρυθμίσεις GC/EI/MS για μεταβολομική ανάλυση

Η ανάλυση του μεταβολισμού των φυτών κάνναβης στα οποία εφαρμόσαμε τα χαλκούχα σκευάσματα πραγματοποιήθηκε με την χρήση του αέριου χρωματογράφου Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) εφοδιασμένου με ανιχνευτή μάζας 5973 inert mass selective detector (MSD) και αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683. Η χρησιμοποιούμενη στήλη (HP-5MS, Agilent Technologies Inc.) είχε μήκος 30  $\mu\text{m}$ , διάμετρο 0.25 mm και πάχος υμενίου 0.25  $\mu\text{m}$ , αναλογία έκχυσης 5:1 και θερμοκρασία 230°C (**Εικόνα 24**). Κάθε δείγμα που τοποθετήθηκε σε autosampler vial αναλύθηκε συνολικά 1  $\mu\text{L}$  και ως φέρων αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με ρυθμό ροής 1 mL λεπτά<sup>-1</sup>. Η θερμοκρασία του κλιβάνου ρυθμίστηκε αρχικά στους 70°C και παρέμεινε σταθερή για 5 min ενώ έπειτα ακολούθησε αύξηση με ρυθμό 5°C min<sup>-1</sup> μέχρι να φθάσει τους 295°C, όπου διατηρήθηκε σταθερή για 2 λεπτά. Η φασματοσκόπηση πραγματοποιήθηκε με την χρήση θετικού ιονισμού ηλεκτρονίων στα 70eV και τα φάσματα πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-800 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο με αρχική καθυστέρηση 10 λεπτά. Η θερμοκρασία για την πηγή MS ρυθμίστηκε στους 230°C και για το τετράπολο στους 150°C. Με σκοπό να ανιχνεύσουμε πιθανή ρύπανση οφειλόμενη στον χειρισμό κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, στα αντιδραστήρια, στην στήλη ή το όργανο αναλύθηκαν κενά δείγματα (blanks).



**Εικόνα 24.** Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS εφοδιασμένος με ανιχνευτή μάζας 5973 inert (GC/EI/MS) (A), με αυτόματο δειγματολήπτη 7683 (B,Γ). Στήλη του αέριου χρωματογράφου (HP-5MS, Agilent Technologies Inc.) μήκους 30 μ., διαμέτρου 0.25 mm (Δ).

### 3.7. Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονταν, υπόκεινταν σε επεξεργασία για μεταβολομική ανάλυση με το λογισμικό MS DIAL (Tsugawa, Cajka et al. 2015). Το λογισμικό επιτρέπει την αυτοματοποίηση της προεπεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως ευθυγραμμίσεις, διόρθωση των γραμμών βάσης, συμπλήρωμα των κενών δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες ρυθμίσεις για την ανάλυση GC/EI/MS δεδομένων.

Η μήτρα (matrix) που προέκυψε από την ανάλυση με το MS DIAL, εξήχθη στο MS Excel® για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία. Συγκεκριμένα, με βάση την ανάλυση των χρωματογραφημάτων με το AMDIS, κορυφές οι οποίες αντιστοιχούσαν

σε ουσίες άσχετες με το αναλυόμενο βιολογικό υλικό μας και κορυφές με δεδομένα σε λιγότερο από το 50% των επαναλήψεων για κάθε επέμβαση, αφαιρούνταν από περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ενίσχυση της αξιοπιστίας και ακρίβειας της ανάλυσης. Μετά από αυτή την επεξεργασία, η μήτρα εξαγόταν στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umeå, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (multivariate analysis)(Aliferis and Jabaji 2010, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η ανίχνευση πιθανών ακραίων τιμών πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των βιοσημαντών της επίδρασης των δύο σκευασμάτων βιοδιεγερτών που εφαρμόσαμε στο μεταβολισμό *Cannabis sativa* L. ή Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA,  $P < 0.05$ )(Aliferis and Jabaji 2012). Επίσης, στα δεδομένα εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA)(Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides 2011).

Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών βασίστηκε στη χρήση Coefficient plots για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα για τα ζεύγη των επιλεγμένων συγκρίσεων, με διαστήματα εμπιστοσύνης που προέρχονταν από jack-knifing (95%) και S-plots (Wiklund, Johansson et al. 2008). Η απεικόνιση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων κάθε επεμβάσεως καθώς και των διαφορών που παρουσίαζαν σε σχέση με τον μάρτυρα έγινε με την χρήση ραβδογράμματος στο πρόγραμμα Excel 2013 (Microsoft). Κάθε ράβδος περιείχε την απεικόνιση της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου κάθε επέμβασης η οποία υπολογίσθηκε στο πρόγραμμα JMP ώστε να επιτυγχάνεται η εύκολη οπτική σύγκριση των μέσων όρων των επεμβάσεων σε σχέση με τον μάρτυρα. Η στατιστική ανάλυση της παραλλακτικότητας των μεταβολιτών στις επεμβάσεις σε σχέση με το μάρτυρα, πραγματοποιήθηκε για επιλεγμένους μεταβολίτες επίσης στο JMP.

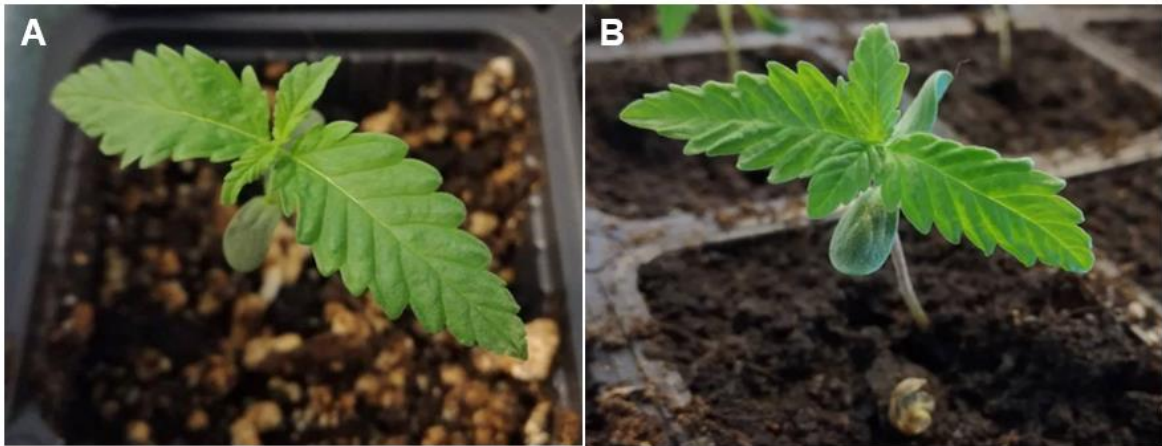
## 4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 4.1 Η χρήση υποστρώματος τύρφης:κοκοφοίνικα ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη των φυταρίων κάνναβης σε σχέση με το υπόστρωμα τύρφης:περλίτη

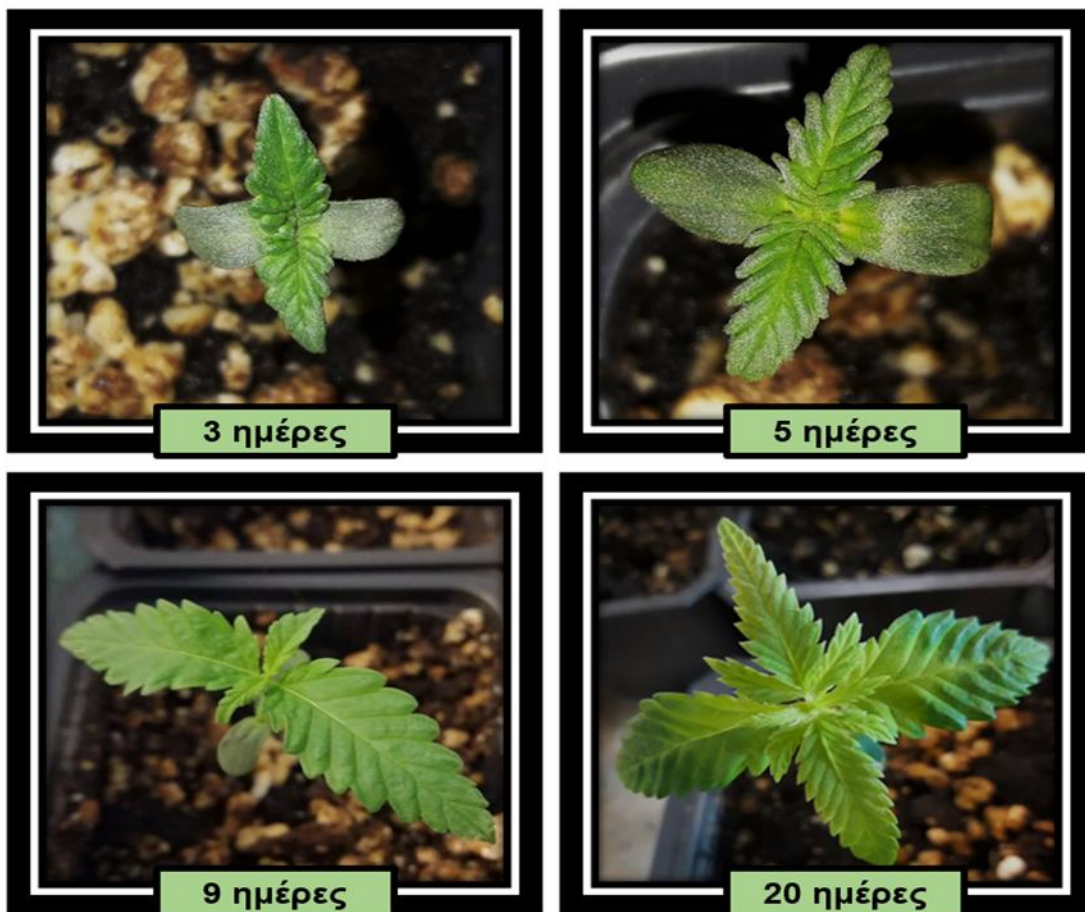
Με σκοπό να εξασφαλίσουμε την βέλτιστη ανάπτυξη των φυταρίων κάνναβης εφαρμόσαμε δοκιμαστικές σπορές εξετάζοντας δύο διαφορετικά υποστρώματα. Συγκεκριμένα μελετήσαμε την ανάπτυξη φυτών της ποικιλίας FUTURA 75 σε υπόστρωμα τύρφη:περλίτη 3:2 (ο/ο) και τύρφη:κοκοφοίνικα 5:1 (ο/ο). Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη σπορά στα δύο διαφορετικά υποστρώματα ενώ τα φυτά αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες. Σύμφωνα με τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις που πραγματοποιήθηκαν τα φυτά που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα τύρφη:κοκοφοίνικα 5:1 ήταν πιο εύρωστα και περισσότερο ανεπτυγμένα σε σχέση με εκείνα που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα τύρφη:περλίτη 3:2. Μια σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των δύο υποστρωμάτων ήταν η καλύτερη αποστράγγιση του υποστρώματος που περιείχε κοκοφοίνικα κάτι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς είναι γνωστό ότι η περίσσεια υγρασία στην καλλιέργεια της κάνναβης είναι ανεπιθύμητη. Στην **Εικόνα 25** παρουσιάζονται οι φαινοτυπικές διαφορές σε φυτάρια κάνναβης ηλικίας 7 ημερών, τα οποία καλλιεργήθηκαν στα δύο διαφορετικά υποστρώματα που προαναφέρθηκαν.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της χρήσης του κοκοφοίνικα ως υπόστρωμα σε μια καλλιέργεια αποτελούν η καλή απορροφητικότητα του, η ανθεκτικότητα του και το χαμηλό του κόστος (Ott, Riddell et al. 2018). Θεωρείται επίσης ότι η προσθήκη κοκοφοίνικα σε ένα υπόστρωμα βελτιώνει τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη δομή του (Boraiiah 1991). Αποτελεί επιπλέον ένα από τα ιδανικότερα υποστρώματα καθώς σύμφωνα με έρευνες βελτιώνει τον αερισμό γύρω από τη ριζόσφαιρα και την υδραυλική αγωγιμότητα ακόμη και των πιο βαρέων εδαφών αργίλου. Τέλος, διατηρεί επαρκώς την υγρασία ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από καλή αποστράγγιση. (Savithri and HAMEED 2007) και αυξάνει την διαθεσιμότητα οξυγόνου στο υπόστρωμα (Nagarajan, Manickam et al. 1985).

Στη παρούσα μελέτη ως υπόστρωμα χρησιμοποιήσαμε τύρφη:περλίτη σε αναλογία 3:2. Η καλλιέργεια των φυταρίων κάνναβης σε διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους παρουσιάζεται στην **Εικόνα 26**.



**Εικόνα 25.** Καλλιέργεια φυταρίων κάνναβης σε υπόστρωμα τύρφη:περλίτη 3:2 (ο/ο) (A) και τύρφη:κοκοφοίνικα 5:1 (ο/ο) (B). Διακρίνεται η διαφορά στην ανάπτυξη και την ευρωστία των φυτών.



**Εικόνα 26.** Διάφορα στάδια ανάπτυξης των φυτών κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) σε υπόστρωμα τύρφη:περλίτης 3:2 (ο/ο).

## **4.2. Το βιοαναλυτικό πρωτόκολλο μεταβολομικής GC/EI/MS που αναπτύχθηκε συντέλεσε στην καταγραφή σημαντικού τμήματος του μεταβολώματος των φύλλων κάνναβης**

Σκοπός της GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση ήταν η διερεύνηση ενδεχόμενων μετατροπών στον μεταβολισμό των φυτών κάνναβης μετά την επέμβαση επιλεγμένων σκευασμάτων χαλκού. Η ανάλυση του (deconvolution) του ενδο-μεταβολώματος ήταν επιτυχή με αποτέλεσμα την λήψη υψηλής ποιότητας μεταβολικών προφίλ, όπως και επιβεβαιώνεται και από την εξαγωγή οξείων και μεγάλων αριθμών κορυφών στα χρωματογραφήματα αλλά και τον ιδανικό χρωματογραφικό διαχωρισμό που επιτεύχθηκε.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών έγινε με την χρήση του προγράμματος AMDIS και της βάσης δεδομένων NIST, επιτεύχθηκε η απόλυτη ή μερική ταυτοποίηση. Το μεταβολικό προφίλ σε ποσοστά αποτελείται από 28% υδατάνθρακες, 17% τα καρβοξυλικά, 17% λιπαρά οξέα και το υπόλοιπο ποσοστό 15% στα αμινοξέα, 5% τα κανναβινοειδή και 18% σε άλλα.

## **4.3. Επίδραση των χαλκούχων σκευασμάτων στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των φυταρίων κάνναβη (*C. sativa* L.)**

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αριθμών φύλλων, ύψους φυτών και μήκους φύλλων. Αν και υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν την μείωση της ανάπτυξης φυτών όταν σε αυτά εφαρμόζονται σκευάσματα χαλκού ειδικά για τα σκευάσματα βορδιγάλειου πολτού, εντούτοις στο παρόν πείραμα δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση της ανάπτυξης σε σχέση με τον μάρτυρα.

Σημαντικό επίσης είναι ότι δεν παρατηρήθηκαν σημάδια φυτοτοξικότητας σε καμία εφαρμογή σκευάσματος χαλκού καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

#### 4.4. Ο μεταβολισμός των φυταρίων κάνναβης (*C. sativa* L.) επηρεάστηκε σημαντικά από την επέμβαση με τα χαλκούχα σκευάσματα Kocide και Sergomil

Η μελέτη του μεταβολώματος μέσω της ανάλυσης GC/EI/MS έγινε για να διαπιστωθούν οι πιθανές αλλαγές στον μεταβολισμό του φυτού της κάνναβης μετά την εφαρμογή των σκευασμάτων χαλκού. Μέσω του GC/MS του οποίου απεικονίζονται οι μεταβολίτες οι οποίοι ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες καρβοξυλικών οξέων, αμινοξέων, λιπαρών οξέων, υδατανθράκων κ.α., αλλά και μέσω της ύπαρξης βάσεων δεδομένων, όπου είναι καταχωρημένα τα φάσματα μάζας (MS και MS/MS) δίνεται το πλεονέκτημα στην τεχνική του GC/MS να ταυτοποιήσει τους μεταβολίτες με πιο ακριβή τρόπο .

Μέσω της μελέτης διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση σε ορισμένους μεταβολίτες του φυτού, όπως εμφανίζονται παρακάτω μετά την βιοπληροφορική επεξεργασία των δεδομένων.

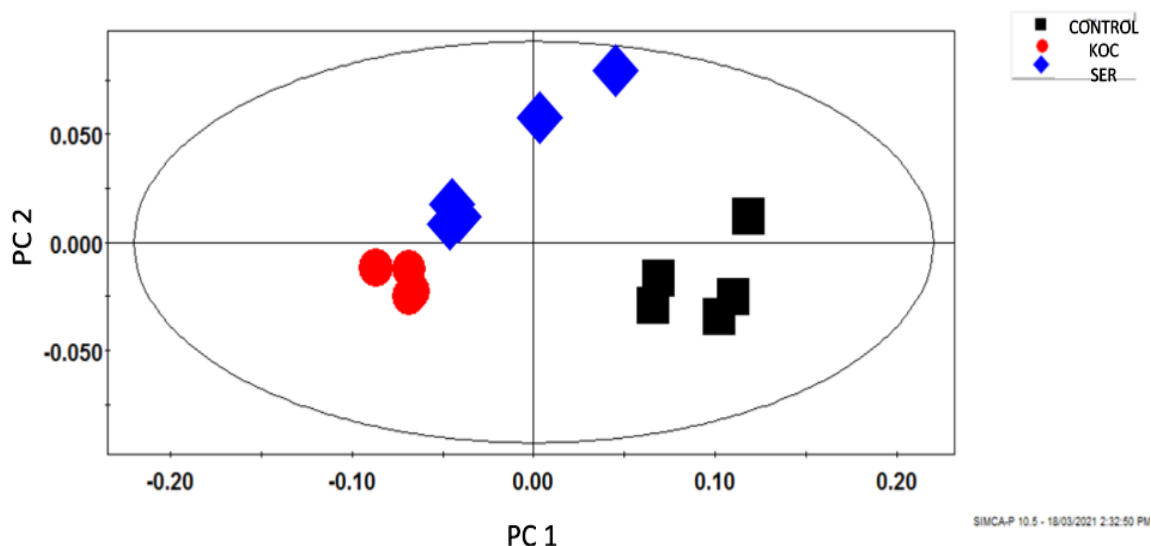
##### 4.4.1. Επισκόπηση της GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης φυταρίων κάνναβης (*Cannabis sativa* L.)

Μέσω του συνδυασμού του λογισμικού MS-Dial με την εφαρμογή της πολυπαραγοντικής ανάλυσης (PCA) επιτεύχθηκε η βιοπληροφορική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν παρουσιάζουν στενή ομαδοποίηση των βιολογικών επαναλήψεων (replications) στα διάφορα δείγματα φύλλων του φυτού χωρίς να παρουσιάζουν ακραίες τιμές (outliers).

Η εφαρμογή OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis) συνέβαλε στην διερεύνηση των διαφορετικών τάσεων μεταξύ των επεμβάσεων και των βιοσήμαντων μεταβολιτών και της κατάταξης αυτών των δεδομένων σε ομάδες. Συγκεκριμένα οι συντελεστές συσχέτισης ήταν:  $R^2X=68,9\%$  και  $R^2Y=82,5\%$  και η τιμή της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου  $Q^2=90,1\%$ . Επιβεβαιώνοντας την ορθή επαναληψιμότητα μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ των δειγμάτων λόγω των ομοιόμορφων πειραματικών χειρισμών κατά την ανάπτυξη των φυταρίων αλλά και κατά την επεξεργασία των δειγμάτων.

Γίνεται εμφανές όπως διακρίνεται μέσω του OPLS-DA scoreplot (**Εικόνα 27.**) η επίδραση των χαλκούχων σκευασμάτων στα μεταβολικά προφίλ των φυταρίων. Διακρίνονται οι σημαντικές διαφορές των μεταβολικών προφίλ των επεμβάσεων με

Kocide και Sergomil των φυταρίων ανάλογα με την επέμβαση που είχε γίνει σε αυτά. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ, στα OPLS-Dascoreplots.



**Εικόνα 27.** OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ φυτών κάνναβης αντιστοιχεί σε δειγματοληψίες 24h μετά την εφαρμογή των επεμβάσεων με απιονισμένο νερό-μάρτυρας (CONTROL), με το σκεύασμα χαλκού KOCIDE και το σκεύασμα χαλκού SERGOMIL.

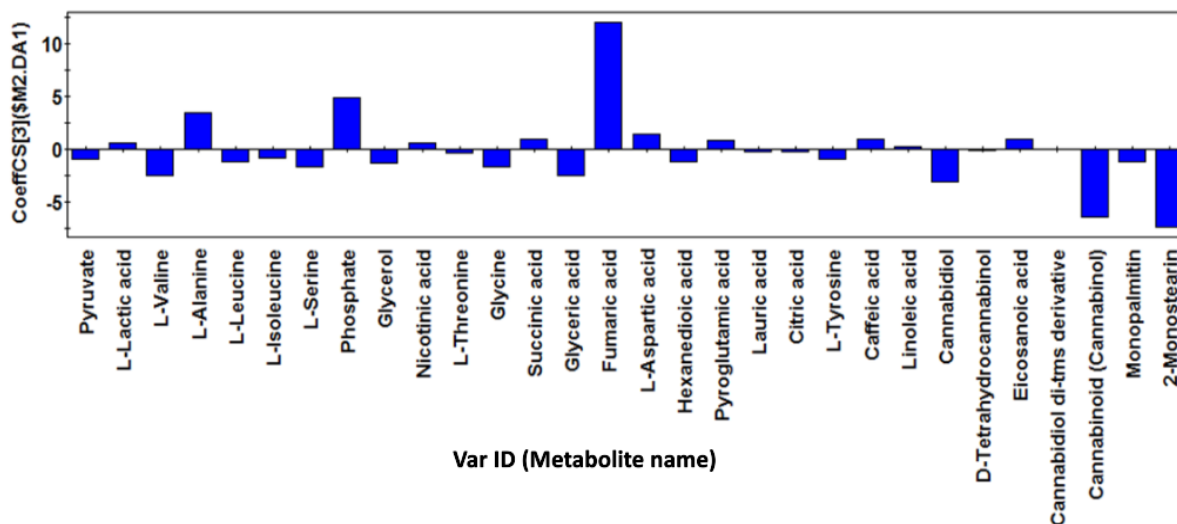
#### 4.4.3.Επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στην περιεκτικότητα των φύλλων φυταρίων κάνναβης σε επιλεγμένους μεταβολίτες

Η μελέτη αποσκοπεί στην αξιολόγηση ορισμένων μεταβολιτών της κάνναβης και όχι στην πλήρη αξιολόγηση των μεταβολιτών του φυτού. Η εκτιμώμενη επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στον μεταβολισμό των φυταρίων επιτυγχάνεται με την ανάλυση και την ποσοτική σύγκριση των βασικότερων ομάδων μεταβολιτών της κάνναβης (*C.sativa*L.) μεταξύ των φυτών που δέχτηκαν την επέμβαση και των μαρτύρων.

Μελετήθηκαν ορισμένοι μεταβολίτες από την ομάδα των καρβοξυλικών οξέων, των αμινοξέων, των κανναβινοειδών και των λιπαρών οξέων. Επίσης η μελέτη επεκτάθηκε και σε μεταβολίτες οι οποίοι επάγουν την άμυνα του φυτού ή αποτελούν οι ίδιοι την άμυνα του. Γνωρίζοντας τα προβλήματα και τις προκλήσεις που



αντιμετωπίζει η σύγχρονη φυτοπροστασία θεωρείται αναγκαία η εύρεση νέων πηγών βιοδραστικότητας αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της μελέτης των μεταβολιτών που συμβάλουν σημαντικά στην άμυνα των φυτών. Μεταξύ των μεταβολιτών που μελετήθηκαν είναι οι L-Alanine,  $\alpha$ -Linolenic acid, ferulic acid, caffeic acid, cannabidiol,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabinol και succinic acid.



**Εικόνα 28.** Coefficient Plot με τις αντίστοιχες τιμές Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data). Διακρίνεται η διακύμανση της περιεκτικότητας των μεταβολιτών στο σύνολο των επεμβάσεων.

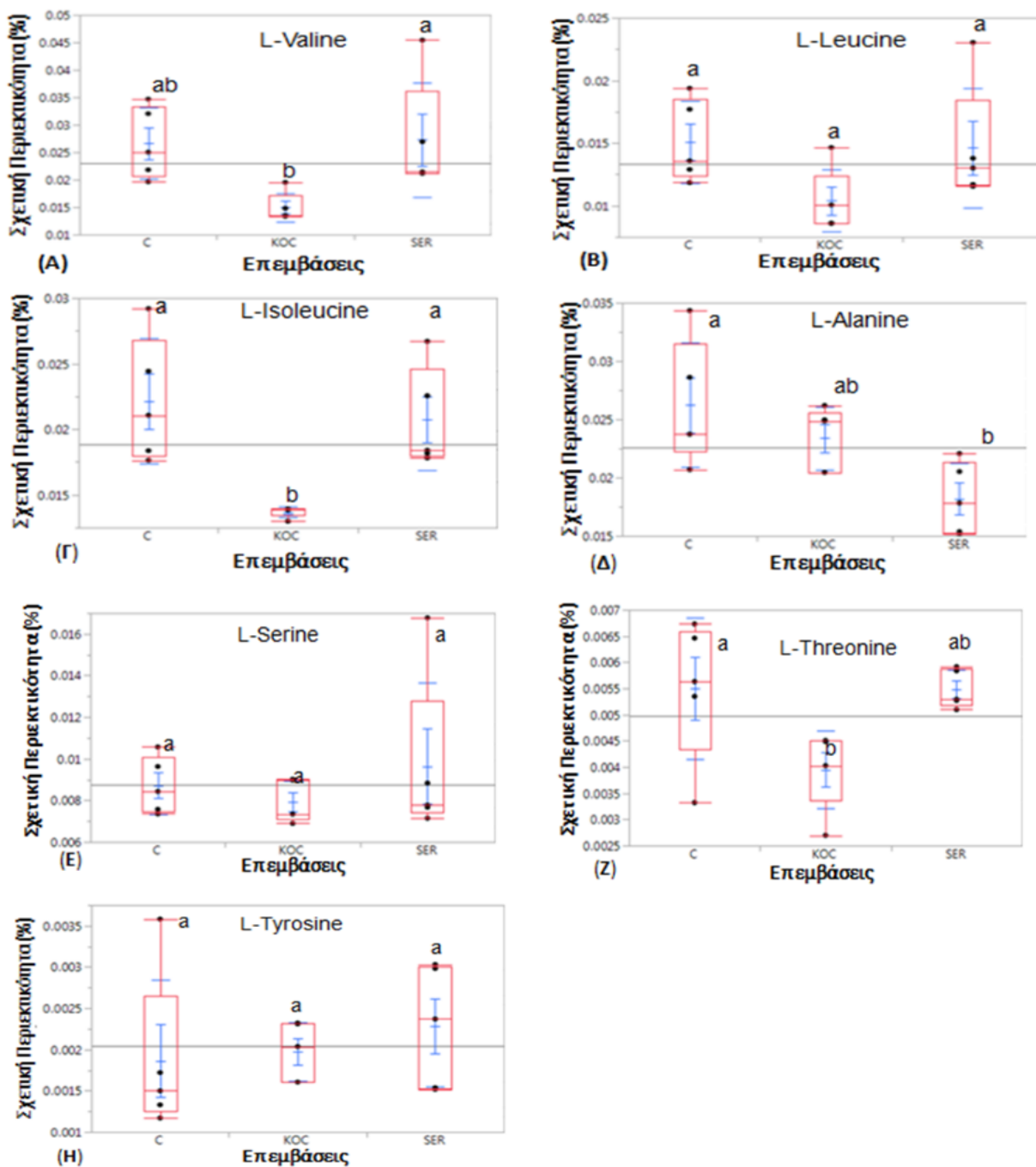
#### 4.4.3.1. Επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στα επίπεδα αμινοξέων

Τα αμινοξέα αποτελούν σταθερά προϊόντα ανόργανης αφομοίωσης αζώτου (Oaks 1965) και δομικά στοιχεία πρωτεϊνών. Αλλαγές στη συγκέντρωση αρκετών αμινοξέων, έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών διεργασιών που σχετίζονται με το μεταβολισμό του αζώτου στα φυτά (Causin 1996). Πολλά αμινοξέα δρουν επίσης ως πρόδρομοι άλλων ενώσεων που περιέχουν άζωτο όπως είναι τα νουκλεϊκά οξέα. Στις αρχές της δεκαετίας του πενήντα με την έλευση της χρωματογραφίας χάρτου (paper chromatography) πολλοί επιστήμονες άρχισαν να μελετούν τα ελεύθερα φάσματα αμινοξέων των φυτών υπό διάφορες καταπονήσεις, ιδίως σε μολύνσεις από παθογόνα και παρατήρησαν ότι ένα από τα πρώτα

συμπτώματα ήταν οι αλλαγές στα επίπεδα των ελεύθερων αμινοξέων, το οποίο οφείλεται σε μεταβολές του μεταβολισμού αμινοξέων και πρωτεϊνών. Πολλές μελέτες έχουν υποδείξει την συμμετοχή των αμινοξέων ενεργώντας ως σηματοδοτικά και ρυθμιστικά μόρια (Rai 2002). Αρκετά αμινοξέα μπορούν επίσης να δράσουν ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών και μορίων σηματοδότησης. Για παράδειγμα οι πολυαμίνες προέρχονται από την αργινίνη (Alcázar, Altabella et al. 2010), το αιθυλένιο συντίθεται από την μεθιονίνη (Amir 2010) και η ανοσοποιητική σηματοδότηση απαιτεί μετατροπή της λυσίνης σε N-υδροξυ πιπεκολίνη (Chen, Holmes et al. 2018, Hartmann, Zeier et al. 2018). Σύμφωνα με μελέτες έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις αμινοξέων όταν τα φυτά εκτίθενται σε αβιοτικές καταπονήσεις (Barnett and Naylor 1966, Draper 1972, Aleksza, Horváth et al. 2017, Huang and Jander 2017, Júnior, Gaion et al. 2018). Αυξημένη συγκέντρωση αμινοξέων έχει παρατηρηθεί σε συνθήκες ξηρασίας σε φυτά βαμβακιού, τομάτας και αραβόσιτου (Ranieri, Bernardi et al. 1989, Pérez-Alfocea, Estan et al. 1993, Martinelli, Whittaker et al. 2007), ενώ οι οδοί αποικοδόμησης για τα αμινοξέα Lys και τα διακλαδισμένα αμινοξέα Val, Leu και Ile έχουν ήδη αναγνωρισθεί ως βασικοί παράγοντες για την βελτίωση της ανοχής φυτών *Arabidopsis* σε συνθήκες ξηρασίας (Pires, Pereira Júnior et al. 2016).

Σύμφωνα με επιπλέον μελέτες σε περιπτώσεις ανεπαρκούς παροχής υδατανθράκων λόγω μειωμένης φωτοσύνθεσης, τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιούν αμινοξέα ως εναλλακτικά υποστρώματα για μιτοχονδριακή αναπνοή (Araújo, Tohge et al. 2011, Hildebrandt 2018). Εκτός από όσα προαναφέρθηκαν, τα αμινοξέα εμπλέκονται επίσης σε πληθώρα κυτταρικών αντιδράσεων και φυσιολογικών διεργασιών όπως είναι η ανάπτυξη των φυτών, ο έλεγχος του ενδοκυτταρικού pH και η παραγωγή μεταβολικής ενέργειας (Hildebrandt, Nesi et al. 2015).

Στην **Εικόνα 29** απεικονίζεται η σύγκριση των σχετικών περιεκτικοτήτων σημαντικών αμινοξέων στα φύλλα των φυτών μετά από επεμβάσεις με τα χαλκούχα σκευάσματα και αυτών του μάρτυρα με τη χρήση θηκογραμμάτων (boxplots).



**Εικόνα 29.** Θηκογράμματα (boxplots) των τριών διαφορετικών επεμβάσεων C: μάρτυρας, KOC: Kocide, SER: Sergomil για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων αμινοξέων των επεμβάσεων με χαλκούχα σκευάσματα με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάρναβης σε σε L-Valine (A), L-Leucine (B), L-Isoleucine (Γ), L-Alanine (Δ), L-Serine (E), L-Threonine (Z), L-Tyrosine (H). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-test ( $P > 95\%$ ).

Όσον αφορά το αμινοξύ **L-Valine**, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι επεμβάσεις με τα σκευάσματα Kocide και Sergomil φαίνεται να μην επηρέασαν σημαντικά τα επίπεδά της (**Εικόνες 29.**).

Η συγκέντρωση του αμινοξέος **L-Alanine** φαίνεται να μην παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή ύστερα από επέμβαση με το Kocide ενώ η επέμβαση με το Sergomil φαίνεται να προκάλεσε μείωση των επιπέδων της (**Εικόνες 29.**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η συγκέντρωση του αμινοξέος **L-Isoleucine** φαίνεται να μην μεταβλήθηκε σημαντικά σε κάποια από τις επεμβάσεις που εφαρμόστηκαν (**Εικόνες 29.**).

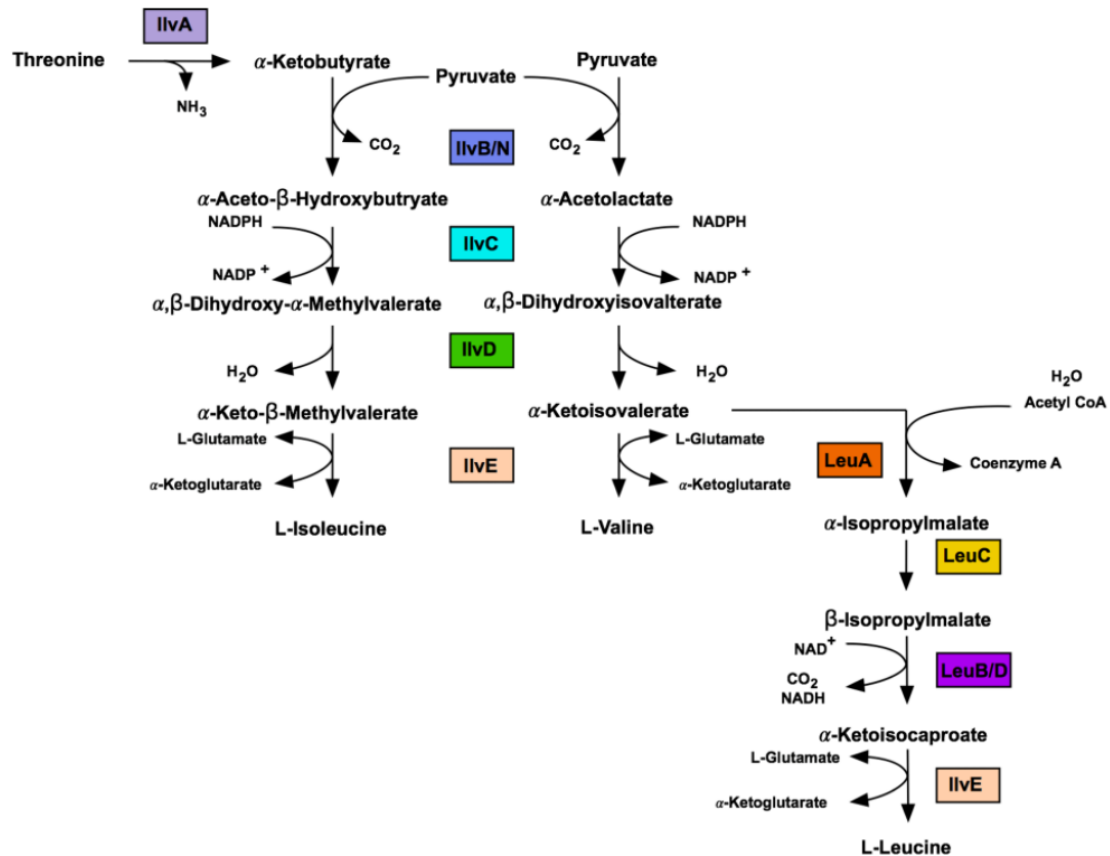
Όσον αφορά το αμινοξύ **L-Leucine** φαίνεται ότι και σε αυτή τη περίπτωση δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων με τα χαλκούχα σκευάσματα και του μάρτυρα (**Εικόνες 29.**).

Στην περίπτωση της **L-Serine** φαίνεται ότι δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις δύο επεμβάσεις (**Εικόνες 29.**).

Η συγκέντρωση του αμινοξέος **L-Threonine** φαίνεται να παρουσίασε μείωση στην επέμβαση με το Kocide, ενώ η επέμβαση με το Sergomil δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε αυτή (**Εικόνες 29.**).

Οι επεμβάσεις με τα χαλκούχα σκευάσματα φαίνεται να μην επηρέασαν σημαντικά την μεταβολή της συγκέντρωσης του αμινοξέος **L-Tyrosine** (**Εικόνες 29.**).

Είναι γνωστό ότι ορισμένα αμινοξέα δεν μπορούν να βιοσυντεθούν στο σώμα των θηλαστικών οπότε προσλαμβάνονται από τις τροφές σε αντίθεση με τα φυτά που διαθέτουν μηχανισμούς για να τα βιοσυνθέτουν. Τα αμινοξέα Λευκίνη, Βαλίνη και Ισολευκίνη είναι παράδειγμα τέτοιων αμινοξέων. Τα 3 αυτά αμινοξέα ανήκουν και στην κατηγορία των BCAA αμινοξέων (Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας) (Singh and Shaner 1995). Η βιοσύνθεση τους απεικονίζεται στην **Εικόνες 30**. Το αμινοξύ Αλανίνη μπορεί να βιοσυντεθεί στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του πυροσταφυλικού οξέος ή των BCAAs. Η Σερίνη στους περισσότερους οργανισμούς βιοσυντίθεται, στα φυτά παράγεται κυρίως κατά τη διάρκεια της φωτοαναπνοής. Το αμινοξύ Θρεονίνη δεν μπορεί να βιοσυντεθεί από τον οργανισμό μας, επομένως απαιτείται η πρόσληψή του (Bauwe, Hagemann et al. 2010). Η Τυροσίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο είναι πρόδρομη ένωση για μια σειρά δευτερογενών προϊόντων. Δεν μπορεί να βιοσυντεθεί από τα θηλαστικά αλλά μόνο από βακτήρια, μύκητες και φυτά (Häusler, Ludewig et al. 2014).



**Εικόνα 30.** Βιοσυνθετική οδός των αμινοξέων Λευκίνη, Ισολευκίνη, Βαλίνη. (Kaiser, King et al. 2018)

Σύμφωνα με μελέτες όπου εξετάστηκαν οι επιδράσεις του χαλκού σε φυτά αμπέλου (*Vitis vinifera*), βρέθηκε ότι η εφαρμογή του οδήγησε σε μείωση των συγκεντρώσεων πολλών βασικών αμινοξέων τόσο στις ρίζες όσο και στα φύλλα. Συγκεκριμένα η μείωση που παρατηρήθηκε στα αμινοξέα γλουταμίνη, ασπαραγίνη και αργινίνη θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική καθώς πιθανό σχετίζεται με μειωμένη πρόσληψη αζώτου δεδομένου ότι τα αμινοξέα αυτά είναι οι κύριοι οργανικοί φορείς του αζώτου (Llorens, Arola et al. 2000). Σε άλλη έρευνα που έγινε σε φυτά κινέζικου λάχανου (*Brassica pekinensis*) μελετήθηκαν οι φυτοτοξικές ιδιότητες του χαλκού και επιβεβαιώθηκε η αρνητική του επίδραση στον μεταβολισμό του αζώτου και την ανάπτυξη του φυτού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος η συνολική περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα στα φύλλα αυξήθηκε με την έκθεση στο χαλκό, υποδεικνύοντας τον θετικό ρόλο των ελεύθερων αμινοξέων στην βελτίωση της ανοχής του φυτού στην τοξικότητα του χαλκού (Xiong, Liu et al. 2006). Σε μια άλλη μελέτη που έγινε σε φυτά του είδους *Scenedesmus quadricauda* βρέθηκε ότι στα

φυτά που εφαρμόστηκε χαλκός αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις των αμινοξέων αργινίνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη και προλίνη (Κονάčik, Klejdus et al. 2010).

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να θεωρηθούν μη επιθυμητά καθώς οι συγκεντρώσεις όλων των αμινοξέων που εξετάστηκαν φαίνεται να μην επηρεάστηκαν από τις επεμβάσεις, με εξαίρεση τη συγκέντρωση της Θρεονίνης η οποία σημείωσε μείωση στην επέμβαση με το Kocide. Δεδομένης της σημασίας των αμινοξέων στις φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών θα είχε ενδιαφέρον να παρατηρούσαμε κάποια αύξηση στις συγκεντρώσεις των αμινοξέων. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε ένα αριθμός αμινοξέων δεν μπορούν να βιοσυντεθούν στο σώμα μας και γι'αυτό το λόγο προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Επίσης, η κάνναβη χαρακτηρίζεται από υψηλή διατροφική αξία και έχει αρχίσει να γίνεται μέρος της διατροφής μας όλο και περισσότερο. Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι μια πιθανή αύξηση στη συγκέντρωση αμινοξέων στο φυτό της κάνναβης ύστερα από εφαρμογή χαλκού πιθανό να συνδέεται με αύξηση της διατροφικής αξίας του προϊόντος.

#### **4.4.3.2. Επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στα επίπεδα καρβοξυλικών οξέων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs**

Ο κύκλος του Krebs αποτελεί μια μεταβολική διαδρομή η οποία αποσαφηνίστηκε από τον Sir Hans Krebs το 1937. Επίσης ονομάζεται και κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) επειδή αρχίζει με τον σχηματισμό ενός οργανικού οξέος (του κιτρικού) που έχει τρεις καρβοξυλικές ομάδες (Wiskich 1980).

Στον κύκλο του Krebs περίπου οκτώ ένζυμα τα οποία προέρχονται από το μιτοχόνδριο χρησιμοποιούνται για την οξειδωση του πυροσταφυλικού και του μηλικού οξέος. (Araújo, Nunes-Nesi et al. 2014). Ο κύκλος του Krebs ξεκινά πάντοτε με την είσοδο του ακετυλο-CoA. Η ακετυλομάδα με δύο άνθρακες συνδυάζεται με ένωση τεσσάρων ανθράκων (οξαλοξικό) για να προκύψει ένωση με έξι άτομα άνθρακα (**κιτρικό οξύ**). Κατά την διάρκεια περιστροφής του κύκλου δύο από τους έξι άνθρακες οξειδώνονται σε CO<sub>2</sub> και διαμορφώνεται το οξαλοξικό. Σε κάθε περιστροφή χρησιμοποιεί μια ακετυλομάδα και αναγεννά ένα μόριο οξαλοξικού, το οποίο είναι έτοιμο να ξαναρχίσει το κύκλο (Wiskich 1980).

Κατά την γλυκόλυση, η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλλικό οξύ. Το επόμενο βήμα κάτω από αερόβιες συνθήκες είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του

πυροσταφυλικού οξέος σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O για να συμβεί αυτό πρώτα μετατρέπεται σε Α-κετυλοσυνένζυμο και στην συνέχεια μια σειρά αντιδράσεων του κύκλου Krebs γίνεται πλήρη αποκαρβοξυλίωση σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O (Wiskich 1980). Εκτός από το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο είναι το προϊόν διάσπασης υδατανθράκων και άλλα προϊόντα μεταβολισμού και αμινοξέων οξειδώνονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (Akram and biophysics 2014). Ο κύκλος αυτός είναι ο τελικός κοινός δρόμος για την αποικοδόμηση όλων των θρεπτικών ουσιών, το πυροσταφυλικό οξύ προκειμένου να διασπαστεί τελείως σε CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>O για αρχή αντιδρά με ένα μόριο συνένζυμο NAD<sup>+</sup> καθώς και συνένζυμο Α, και μας δίνει το ακετυλο-συνένζυμο Α (Araújo, Nunes-Nesi et al. 2014). Το ακετυλο-συνένζυμο Α θα εισαχθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος έτσι ώστε να γίνει πλήρη αποκαρβοξυλίωση της ακετυλομάδας σε CO<sub>2</sub> (Wiskich 1980). Κατά το πρώτο στάδιο του κύκλου του κιτρικού οξέος ένα μόριο οξαλοξικού οξέος αντιδρά με την ακετυλομάδα και δημιουργεί το **κιτρικό οξύ** το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για αυτήν την αντίδραση είναι η κιτρική συνθετάση. Στο επόμενο στάδιο έχουμε την ισομερείωση του **κιτρικού οξύ** και δημιουργείται το ισοκιτρικό οξύ για την παραγωγή του χρησιμοποιείται το ένζυμο ακονιτάση. Στο τρίτο στάδιο γίνεται ταυτόχρονα οξειδωση και αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού οξέος σε α-Κετογλουταρικό το ένζυμο το οποίο κάνει δυνατή την αντίδραση είναι η ισοκιτρική αφυδρογονάση. Στο επόμενο στάδιο γίνεται οξειδωση και ταυτόχρονη αποκαρβοξυλίωση του α-κετογλουταρικού οξύ σε ηλεκτυλοσυνένζυμο Α το ένζυμο που δημιουργεί την αντίδραση είναι η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση. Στο πέμπτο στάδιο έχουμε την μετατροπή του ηλεκτυλοσυνένζυμο Α σε **ηλεκτρικό οξύ** με το ένζυμο συνθετάση του ηλεκτυλοσυνένζυμου Α. Στο έκτο στάδιο έχουμε την οξειδωση του **ηλεκτρικού οξέος** σε **φουμαρικό οξύ** με το ένζυμο της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης. Στο έβδομο στάδιο το φουμαρικό οξύ το οποίο παρείχθει στο προηγούμενο βήμα ενυδατώνεται και δημιουργεί το μηλικό οξύ με το ένζυμο που κάνει την αντίδραση να είναι η φουμαράση. Στο όγδοο και τελευταίο στάδιο έχουμε την οξειδωση του μηλικού οξύ και την μετατροπή του σε οξαλοξικό οξύ το οποίο είναι το πρώτο μόριο το οποίο ξεκίνησε τον κύκλο του κιτρικού οξύ το ένζυμο που έκανε την αντίδραση είναι η μηλική αφυδρογονάση.

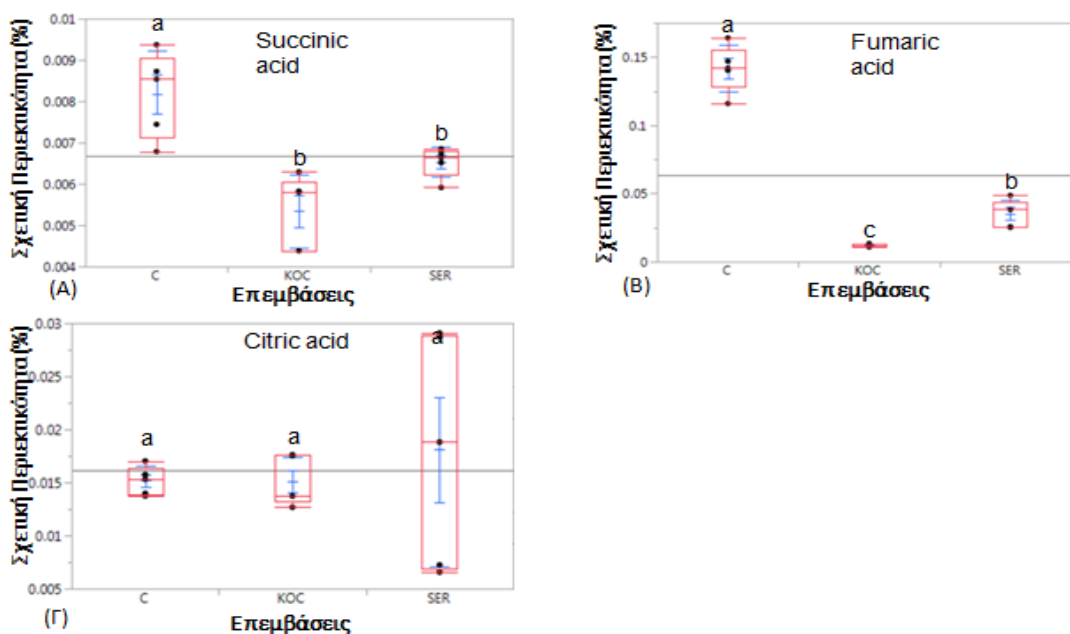
Εφαρμογές κιτρικού οξέος σε φυτά έχουν βελτιώσει τις φυσιολογικές παραμέτρους σε πολλά είδη φυτών όπως τα *Polianthes tuberosa*, *Lilium spp.* και *Phaseolus vulgaris* (κοινό φασόλι), καθώς επίσης ενισχύει την ανοχή στο αβιοτικό στρες στην αλατότητα, την ξηρασία, την αλκαλικότητα και την θερμοκρασία. Κατατάσσεται στους

σημαντικότερα οργανικά οξέα με ενεργή συμμετοχή στον κύκλο του Krebs αλλά και σε διεργασίες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπαρών οξέων και αμινοξέων (Tahjib,Ishrat 2021). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν πως η εφαρμογή κίτρικου οξύ αυξάνει την βιοσυσώρευση βαρέων μετάλλων στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε μολυσμένα εδάφη (Farid,Shafaqat, 2017)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η συγκέντρωση του **κίτρικου οξέος (Citric acid)** φαίνεται να μην μεταβλήθηκε σημαντικά σε καμία από τις δύο επεμβάσεις (**Εικόνα 31.**). Το **ηλεκτρικό οξύ (succinic acid)** είναι καρβοξυλικό οξύ το οποίο συμμετέχει στην κυτταρική αναπνοή μέσω του κύκλου του Krebs. Μελέτες έδειξαν ότι το εξωγενές εφαρμογές γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) αύξησε τη περιεκτικότητα στα φύλλα του **ηλεκτρικού οξύ** και του **φουμαρικού οξύ** συμβάλλοντας στην ενίσχυση του αβιοτικού στρες, όπως το στρες από το αλατότητα, από υψηλές θερμοκρασίες και ξηρασία (Hijaz,Kilin 2018) . Η συγκέντρωση του **ηλεκτρικού οξέος (succinic acid)** παρουσίασε μείωση και στις δύο επεμβάσεις με τα χαλκούχα σκευάσματα (**Εικόνα 31.**). Η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι η συγκέντρωση του **φουμαρικού οξέος (Fumaric acid)** μειώθηκε και στις δύο επεμβάσεις με τα σκευάσματα Kocide και Sergomil (**Εικόνα 31.**).

Γνωρίζοντας την σημασία των καρβοξυλικών οξέων στο κύκλο του Krebs και με βάση τα αποτελέσματα τα οποία εμφανίζουν μείωση της περιεκτικότητας του ηλεκτρικού οξύ και του φουμαρικού οξύ, συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή των χαλκούχων σκευασμάτων πιθανώς να επηρεάζει αρνητικά την φυσιολογία των φυτών





**Εικόνα 31.** Θηκογράμματα (boxplots) των τριών διαφορετικών επεμβάσεων C: μάρτυρας, KOC: Kocide, SER: Sergomil για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων οργανικών οξέων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs των επεμβάσεων με τα χαλκούχα σκευάσματα με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε Succinic acid (A), Fumaric acid (B), Citric acid (Γ). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-test ( $P > 95\%$ ).

#### 4.4.3.3 Επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στα κανναβινοειδή

Τα φυτοκανναβινοειδή αντιπροσωπεύουν την ομάδα των C21 ή C22 (για τις καρβοξυλωμένες μορφές) πρόδρομων τερφαινολικών ενώσεων που συντίθενται στην κάνναβη (Chandra, Lata et al. 2017). Επίσης σε αυτά περιλαμβάνονται και παράγωγα μετασχηματισμού τα οποία είναι και αυτά κανναβινοειδή (Kinghorn, Falk et al. 2017). στην ουσία είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι είναι μοναδικοί και περιέχουν μονάδες μονοτερπενίου και αλκυλορεσορκινόλη (τυπικά ολιετολικό οξύ ή ολιβέτολη) (Chandra, Lata et al. 2017). Η περιεκτικότητα και η βιοσύνθεση των κανναβινοειδών στα φυτά επηρεάζονται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (Gorelick και Bernstein, 2017). Γενετικά επηρεάζεται το είδος του παραγόμενου δευτερογενούς μεταβολίτη ενώ η περιεκτικότητά του και η κατανομή των ενεργών ενώσεων στο φυτό επηρεάζεται λόγω των περιβαλλοντικών συνθηκών. Το προφίλ των δευτερογενών μεταβολιτών είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών και φυσιολογικών διαδικασιών. Οι διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα των μικροστοιχείων και η αλατότητα του

εδάφους επηρεάζουν και αυτά του δευτερογενείς μεταβολίτες.(Singh and Misra, 2000; Bernstein et al., 2010). Σε μελέτες που έχουν γίνει αναφέρεται η αύξηση της περιεκτικότητας των κανναβινοειδών μετά από εφαρμογή Fe, Cu και άλλων μετάλλων (Bernstein,Gorelick 2019).

Τα κανναβινοειδή δρουν σε συγκεκριμένους υποδοχείς του εγκεφάλου που ονομάζονται κανναβινοειδείς υποδοχείς. Τα ενδοκανναβινοειδή επιδρούν πρωταρχικά στους υποδοχείς CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub>. Ερευνητές απέδειξαν ότι τα κανναβινοειδή, μιμούνται τους ενδοκανναβινοειδείς παράγοντες ενεργοποιώντας τους ειδικούς υποδοχείς, τον CB<sub>1</sub> ο οποίος «κυριαρχεί» στο κεντρικό νευρικό σύστημα και τον CB<sub>2</sub> που εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Vemuri, Makriyannis et al. 2015). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα CB<sub>1</sub> παράγει ψυχοτρόπα αποτελέσματα, ενώ του CB<sub>2</sub> όχι. Ως εκ τούτου, επιλεκτικοί ανταγωνιστές των CB<sub>2</sub> υποδοχέων έχουν αποκτήσει όλο και περισσότερο ενδιαφέρον στον ερευνητικό τομέα για τυχόν θεραπευτικές χρήσεις των κανναβινοειδών, όπως είναι αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-νεοπλασματικές δράσεις (Recht, Salmonsens et al. 2001, Sánchez, de Ceballos et al. 2001). Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα έχει ανακαλυφθεί εκατομμύρια χρόνια πριν καθώς έχει εντοπιστεί σε θηλαστικά, πουλιά, αμφίβια, ψάρια, αχινούς, μαλάκια, βδέλλες και ακόμη στο πρωτόγονο είδος *Hydra vulgaris* (De Petrocellis, Melck et al. 1999, McPartland and Mediavilla 2002).Τα κανναβινοειδή που παρουσιάζουν περισσότερο ενδιαφέρον χάρη στις ιδιότητες τους είναι το THC, το CBD και το CBN, οι οποίοι μας απασχόλησαν και στην παρούσα μελέτη.

Παρόλο που οι φαρμακευτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών είναι γνωστές εδώ και περίπου 4.000 χρόνια (Grotenhermen and Russo 2002, Guy, Whittle et al. 2004), η εισαγωγή τους στη σύγχρονη ιατρική έχει ξεκινήσει τα τελευταία χρόνια. Στη δεκαετία του 1930 και του 1940 δοκιμάστηκαν κλινικά τα πρώτα συνθετικά παράγωγα του THC (Loewe 1950) σε περιπτώσεις επιληψίας (Davis and Ramsey 1949), κατάθλιψης (Stockings 1947), εξάρτησης στο αλκοόλ και στα οπιούχα (Thompson and Proctor 1953). Ωστόσο, μόλις το 1964 καθορίστηκε και συντέθηκε η στερεοχημική δομή του (Gaoni and Mechoulam 1964). Το THC θεωρείται το περισσότερο μελετημένο φυτοκανναβινοειδές χάρη στις φαρμακολογικές ιδιότητες του.

Αν και έχει αποδειχθεί ότι τα κανναβινοειδή ασκούν άμεσες κυτταρικές επιδράσεις σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού συστήματος, του

ήπατος και του αναπαραγωγικού συστήματος, οι επιδράσεις στην συμπεριφορά και στις φαρμακολογικές επιδράσεις που έχουν μελετηθεί φαίνεται να περιλαμβάνουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (Ameri 1999). Τα κανναβινοειδή μπορεί να προκαλέσουν αντιφατικά αποτελέσματα όπως καταστολή ή επαγωγή σωματικών και ψυχικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων σπασμών, εμέτων, πόνου, τρόμου και άγχους, ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση. Συγκεκριμένα η κάνναβη και ειδικότερα το THC χρησιμοποιούνται κατά της ναυτίας και του εμέτου που προκαλούνται από αντινεοπλασματικά φάρμακα αλλά μπορεί σπάνια να προκαλέσουν εμετό. Χρησιμοποιούνται επίσης ως αναλγητικά αλλά μερικές φορές μπορεί να αυξήσουν τον πόνο (Grotenhermen and Disorders 2005). Σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν άγχος, αλλά μπορεί επίσης να δράσουν ως αγχολυτικοί παράγοντες κ.λπ. Αυτές οι παρατηρήσεις πιθανώς οφείλονται στον έλεγχο αυτών των επιδράσεων από διάφορα νευρωνικά κυκλώματα που επηρεάζονται από τα κανναβινοειδή. Στους ανθρώπους, η κατανάλωση THC ή κάνναβης, συνήθως περιγράφεται ως ευχάριστη και χαλαρωτική εμπειρία. Όταν χρησιμοποιείται σε κοινωνικό πλαίσιο μπορεί να οδηγήσει σε ευθυμία και αυξημένη ομιλητικότητα. Περιστασιακά, προκαλεί δυσάρεστα συναισθήματα όπως άγχος που μπορεί να κλιμακωθεί σε πανικό. Μια αίσθηση βελτιωμένης ευεξίας μπορεί να εναλλάσσεται με δυσφορικές φάσεις. Θεωρείται επίσης ότι μπορεί να προκαλέσει υπνηλία (Freemon 1972, Lissoni, Resentini et al. 1986). Οι πιο εμφανείς ψυχολογικές επιδράσεις του THC στον άνθρωπο έχουν χωριστεί σε τέσσερις ομάδες: συναισθηματική (ευφορία), αισθητήρια (αυξημένη αντίληψη εξωτερικών ερεθισμάτων), σωματική (αίσθηση του σώματος να αιωρείται ή να βυθίζεται στο κρεβάτι) και γνωστική (παραμόρφωση της αντίληψης του χρόνου, απώλεια μνήμης, δυσκολία συγκέντρωσης) (Nahas 1999). Αυτές οι επιδράσεις εμφανίζονται ωστόσο κυρίως σε περιπτώσεις αυξημένης δοσολογίας. Παρά τις πιθανές παρενέργειες που έχει η κατανάλωση κάνναβης υπάρχουν μια σειρά από καλά αποδεδειγμένα και πιθανά θεραπευτικά οφέλη των κανναβινοειδών, όπως είναι οι αντιεμετικές, αναλγητικές, αντισπασμωδικές ιδιότητες τους (Hollister 1986). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διεγερτικό της όρεξης σε άτομα που πάσχουν από AIDS. (Timpone, Wright et al. 1997, Volicer, Stelly et al. 1997). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει και η πιθανή χρήση της κάνναβης σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο. Θεωρείται ότι μπορεί να συνεισφέρει είτε διεγείροντας την όρεξη είτε προσφέροντας αναλγητική δράση ενώ ιδιαίτερα σημαντικές είναι και οι αντιεμετικές ιδιότητές του οι

οποίες αναστέλλουν την ναυτία που προκαλείται από τις χημειοθεραπείες. Στην Αμερική υπάρχουν εγκεκριμένα φάρμακα με THC που χρησιμοποιούνται για αυτές τις περιπτώσεις. Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα πειραμάτων που έχουν γίνει σε πειραματόζωα όπου έχει βρεθεί ότι τα κανναβινοειδή αναστέλλουν την ανάπτυξη όγκων σε αυτά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαμόρφωσης βασικών οδών σηματοδότησης κυττάρων προκαλώντας έτσι άμεση διακοπή της ανάπτυξης και θάνατο των καρκινικών κυττάρων, καθώς και αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης του όγκου. Τα κανναβινοειδή σε αντίθεση με τα συμβατικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις χημειοθεραπείες δεν έχουν γενικευμένες τοξικές επιδράσεις ωστόσο η χρήση τους περιορίζεται εξαιτίας των ψυχοδραστικών τους επιδράσεων (Guzman 2003).

Σύμφωνα με έρευνες έχει βρεθεί ότι το CBD μπορεί να μειώσει τις ψυχικές παρενέργειες του THC κάτι που μπορεί να βοηθήσει στην αυξημένη ανοχή σε φάρμακα. Σε μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους, το CBD αποδείχθηκε ότι έχει ισχυρή αγχολυτική και αντι-ψυχωτική δράση (Grotenhermen and Disorders 2005). Το CBD σε αντίθεση με το THC δεν χαρακτηρίζεται από ψυχοτρόπες ιδιότητες το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι το CBD δεν μπορεί να προσδεθεί ή να ενεργοποιήσει τον υποδοχέα CB<sub>1</sub> σε αντίθεση με το THC. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει έχει προταθεί ότι το CBD μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδη δράση σε περιπτώσεις όπως είναι η αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα, η οξεία πνευμονική βλάβη, η κολίτιδα, η αρθρίτιδα κ.α. Ωστόσο υπάρχει μεγάλη έλλειψη στο κομμάτι της έρευνας ιδιαίτερα σε μελέτες πάνω σε ανθρώπους. Ένας άλλος τομέας που χρειάζεται νέες μελέτες είναι η ανακάλυψη συνθετικών ανάλογων με μεγαλύτερη ισχύ από το CBD που εξακολουθούν να διατηρούν μια ευνοϊκή θεραπευτική αναλογία. Έχει προταθεί ότι η καλύτερη φαρμακευτική απόδοση προέρχεται από το συνδυασμό χρήσης του THC και του CBD (Burstein and chemistry 2015). Αποτελέσματα από κλινικές δοκιμές σε επιληπτικούς ασθενείς (Cunha and Pharmacology 1980) και από πολυάριθμες μελέτες σε πειραματόζωα (Consroe, Martin et al. 1981, KARLER and TURKANIS 1981) προτείνουν ότι το CBD μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό κατά των επιληπτικών κρίσεων.

Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση της **κανναβιδιόλης (Cannabidiol)** αυξήθηκε και στις δύο επεμβάσεις κάτι το οποίο θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένης της σημασίας του συγκεκριμένου μεταβολίτη και τις πολυάριθμες φαρμακευτικές του ιδιότητες με βάση όσο προαναφέρθηκαν (**Εικόνα 32.**).

Στην περίπτωση του κανναβινοειδούς **Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol)** φαίνεται ότι καμία επέμβαση δεν προκάλεσε αξιόλογη μεταβολή στη συγκεντρωσή του, κάτι το οποίο ίσως θα μπορούσε να κριθεί αρνητικό καθώς ο μεταβολίτης αυτός αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μεταβολίτες της κάνναβης με ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες όπως προαναφέρθηκε (**Εικόνα 32.**).

Η συγκέντρωση της **κανναβινόλης (Cannabinol)** σημείωσε σημαντική αύξηση και στις δύο επεμβάσεις με τα σκευάσματα Kocide και Sergomil (**Εικόνα 32.**).

Ο μεταβολίτης αυτός δεν έχει ψυχοτρόπες ιδιότητες και θεωρείται ότι θα μπορούσε να έχει κάποια φαρμακευτική χρήση. Είναι γνωστό ότι το CBN εντοπίζεται σε αυξημένη περιεκτικότητα σε ιστούς μεγάλης ηλικίας. Ωστόσο γενικά υπάρχει ελάχιστη έρευνα πάνω στο συγκεκριμένο κανναβινοειδές και τις πιθανές ωφέλιμες ιδιότητες του (Yamamoto, Watanabe et al. 1987).

Σε έρευνα που διεξάχθηκε από τους (Mansouri, Asrar et al. 2009) για την επίδραση του γιββερελλικού οξέως σε φυτά κάνναβης στο στάδιο της άνθισης, παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού THC σε θηλυκά αλλά και σε αρσενικά φυτά σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες όταν εφαρμόστηκαν 100 μM GA3. Διαπίστωσαν πως το γιββερελλικό οξύ μειώνει την δραστηριότητα του μονοπατιού βιοσύνθεσης του THC καθώς και την απαραίτητη συγκέντρωση των πρόδρομων ουσιών της.

Αντίθετα σε φυτά που ήταν σε στάδιο ανάπτυξης της βλάστησης (διέθεταν 7 ζευγάρια φύλλων) διαπιστώθηκε ότι εφαρμογή με 100 μM GA3 προκάλεσε αύξηση των συγκεντρώσεων THC και CBD αντιστοίχως. Βέβαια, θεωρούν πως η αύξηση αυτή καθαυτή δεν οφείλεται στην άμεση επίδραση του γιββερελλικού οξέως αλλά στην αλληλεπίδραση του με άλλες φυτικές ορμόνες όπως είναι το αιθυλένιο (Mansouri, Asrar et al. 2011).

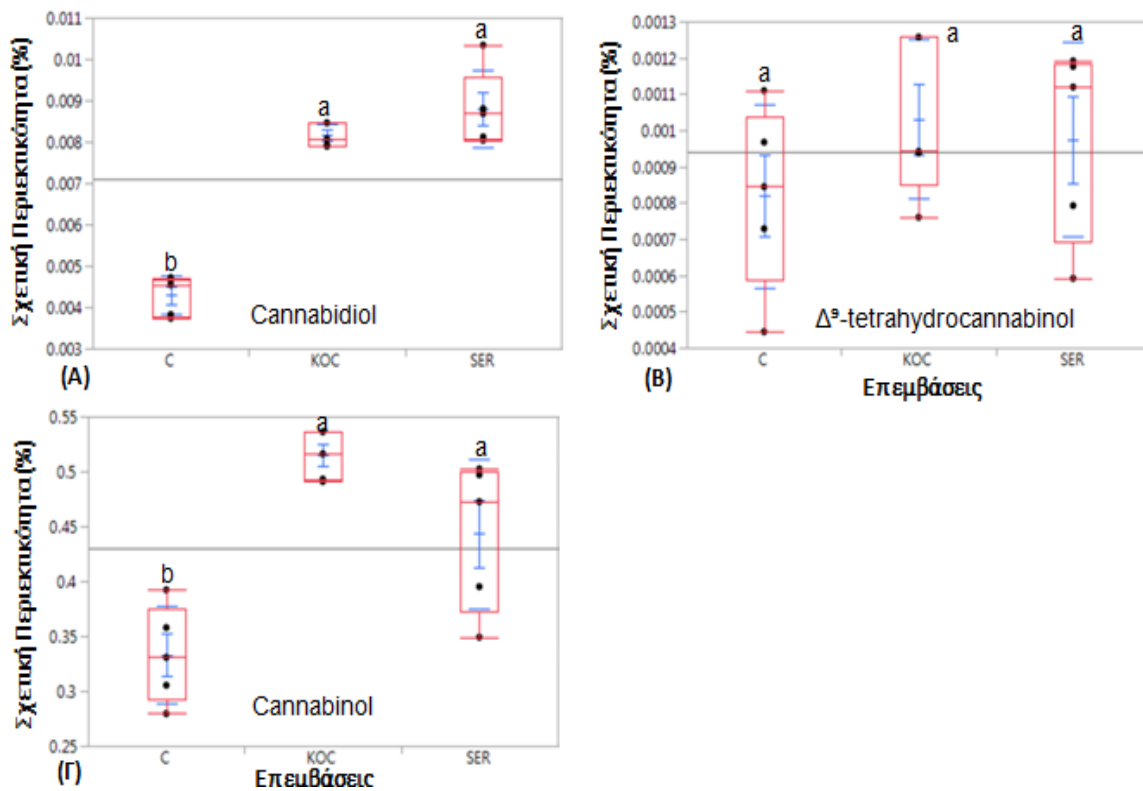
Ακόμη μία ορμόνη που έχει εφαρμοσθεί σε φυτά κάνναβης είναι το αιθυλένιο, το οποίο είναι απαραίτητο για την αύξηση και φαινοτυπική ανάπτυξη των φυτών. Επίσης η παραγωγή αιθυλενίου αυξάνεται σε συνθήκες καταπόνησης όπως είναι η ξηρασία, το κρύο, οι μηχανικοί τραυματισμοί, οι προσβολές από φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς και συνεπώς θεωρείται ορμόνη "στρεσαρίσματος"(Taiz and Zeiger 2012).

Σε αρσενικά και θηλυκά φυτά που βρίσκονταν στο στάδιο της άνθισης πραγματοποιήθηκε ψεκασμός με το σκεύασμα Ethernon το οποίο μετατρέπεται σε αιθυλένιο κατά τον μεταβολισμό του από τα φυτά. Τα αποτελέσματα της έρευνας

έδειξαν αύξηση της ποσότητας του THC στα φύλλα αρσενικών και θηλυκών φυτών κάνναβης, καθώς και αύξηση του στις αρσενικές ταξιανθίες αλλά μείωση στις θηλυκές. Επίσης, μελέτησαν και την περιεκτικότητα των φύλλων σε CBD και προέκυψε πως σε χαμηλές ποσοότητες από το Ethephon υπήρξε αύξηση της ποσότητας CBD στα αρσενικά φυτά, ενώ σε υψηλές ποσοότητες Ethephon, μείωση της περιεκτικότητας του σε σχέση με τους μάρτυρες. Αντιθέτως στα φύλλα θηλυκών φυτών κάνναβης παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης CBD ανεξαρτήτως της εφαρμοσμένης ποσότητας Ethephon (Mansouri, Salari et al. 2013).

Τελευταία φυτική ορμόνη που έχει εφαρμοσθεί σε φυτά κάνναβης είναι το αμπισισικό οξύ (ABA) υπεύθυνο για την ρύθμιση αρκετών πτυχών αύξησης και ανάπτυξης των φυτών συμπεριλαμβανομένης της ωρίμανσης των εμβρύων, την βλάστηση, την κυτταρική διαίρεση και την επιμήκυνση, καθώς και την αντίδραση των φυτών σε διάφορα περιβαλλοντικά στρες. Παρόλο που θεωρείται ορμόνη αναστολής της ανάπτυξης οι νέοι ιστοί περιέχουν υψηλά ποσοστά σε αμπισισικό οξύ (Tsai, Lin et al. 1997).

Στο πείραμα που διεξάχθηκε, πραγματοποιήθηκε ψεκασμός αρσενικών και θηλυκών φυτών στο στάδιο της άνθισης με διάλυμα ABA και μελετήθηκε η επίδραση του στην περιεκτικότητα σε THC. Αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση του THC στα φύλλα και τα άνθη των αρσενικών και θηλυκών φυτών κάνναβης αυξήθηκε σημαντικά (Mansouri, Asrar et al. 2009).



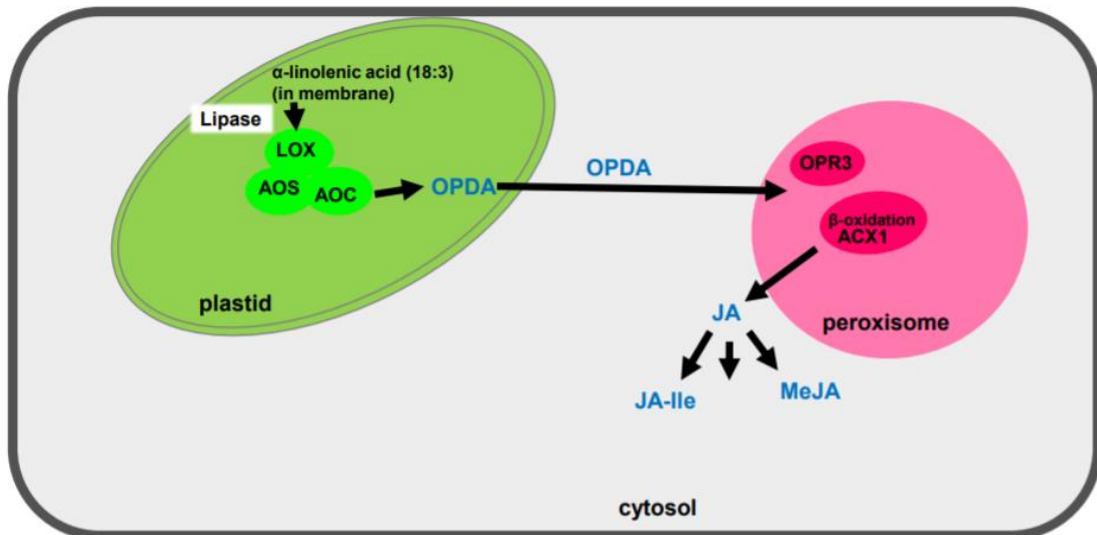
**Εικόνα 32.** Θηκογράμματα (boxplots) των τριών διαφορετικών επεμβάσεων C: μάρτυρας, KOC: Kocide, SER: Sergomil για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων κανναβιοειδών των επεμβάσεων με τα χαλκούχα σκευάσματα με αυτών του μάρτυρα. Συγκεκριμένα απεικονίζεται η σχετική περιεκτικότητα (%) φύλλων φυτών κάνναβης σε Cannabidiol (A), D-Tetrahydrocannabinol (B), Cannabinol (Γ). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-test ( $P > 95\%$ ).

#### 4.4.3.4. Επίδραση των σκευασμάτων χαλκού στην περιεκτικότητα των φυτών σε α-λινολενικό οξύ και καφεϊκό οξύ

Το α-λινολενικό οξύ αποτελεί πρόδρομη ένωση του **γιασμονικού οξέος** (Jasmonic Acid, JA) το οποίο ενεργοποιεί διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς στα φυτά. Συγκεκριμένα το JA συντίθεται μέσω της οκταδεκανοϊκής οδού κατά την οποία το λινολενικό οξύ μετατρέπεται σε JA με μια διαδικασία στην οποία συμμετέχουν ο χλωροπλάστης και το υπεροξειδωμάτιο. Είναι γνωστό ότι το JA επάγει την μεταγραφή ενός αριθμού γονιδίων που εμπλέκονται στον αμυντικό μεταβολισμό. Διαδραματίζει διάφορους ρυθμιστικούς ρόλους στην ανάπτυξη των φυτών και ανταποκρίνεται σε μια σειρά βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (León, Sánchez-Serrano et al. 1999). Το JA και ο μεθυλεστέρας του (MeJA) ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά ως αρωματικές ενώσεις στο αιθέριο έλαιο γιασεμιού και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι χημικές δομές τους (Demole, Lederer et al. 1962).

Το JA έχει προσελκύσει ενδιαφέρον ως μόριο σηματοδότησης που ενεργοποιεί την γονιδιακή έκφραση σε διαφορετικές φυτικές αποκρίσεις σε περιβαλλοντικές πιέσεις, ειδικότερα με μηχανικό τραυματισμό. Ο C.A. Ryan και οι συνεργάτες του στις αρχές της δεκαετίας του '90 παρατήρησαν τη συμμετοχή των jasmonates στη μεταγωγή σημάτων τραύματος σε φυτά τομάτας που οδήγησαν στην ενεργοποίηση των γονιδίων αναστολέων πρωτεϊνάσης (proteinase inhibitor (pin) genes) (Farmer and Ryan 1990, Farmer and Ryan 1992). Παρόμοια με τον τραυματισμό, η εξωγενής εφαρμογή του JA σε φύλλα τομάτας και πατάτας προκάλεσε τη μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων όχι μόνο στον επεξεργασμένο ιστό αλλά και διασυστηματικά σε απομακρυσμένα φύλλα στα οποία δεν είχε γίνει επέμβαση (Farmer, Johnson et al. 1992, Hildmann, Ebner et al. 1992). Η διασυστηματική επαγωγή κατά τον τραυματισμό των γονιδίων αυτών υπέδειξε την ύπαρξη σήματος που δημιουργείται σε θέσεις πληγών και μεταφέρεται σε απομακρυσμένα μέρη του φυτού. Περαιτέρω εργασίες έδειξαν ότι το JA αντιπροσωπεύει πράγματι ένα τελικό βήμα σε ένα σύνθετο μονοπάτι σηματοδότησης που περιλαμβάνει τη δράση του πεπτιδικού συστήματος, ολιγοσακχαριτών, των φυτικών ορμονών αμπισισικό οξύ και αιθυλενίου, και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τοπικής και διασυστηματικής άμυνας κατά τον τραυματισμό (Peña-Cortés, Fisahn et al. 1995, Bergey, Howe et al. 1996, O'donnell, Calvert et al. 1996) (**Εικόνα 33.**).





**Εικόνα 33.** Η βιοσύνθεση του ιασμονικού οξέως (jasmonic acid, JA) λαμβάνει χώρα σε τρία διαφορετικά διαμερίσματα ενός φυτικού κυττάρου. Στα πλαστίδια, το α-λινολενικό οξύ απελευθερώνεται από μεμβράνες, οξυγονώνεται με μια λιπάση 13-λιποξυγενάση (13-lipoxygenase, 13-LOX) σε hydroperoxyoctadecatrienoic acid (13-HPOT), το οποίο μετατρέπεται σε ασταθές εποξειδίο από μια συνθάση οξειδίου 13-αλλενίου (13-allene oxide synthase, 13-AOS) και κυκλοποιείται από μια κυκλάση οξειδίου του αλλενίου (allene oxide cyclase, AOC) σε cis-(+)-12-οξοφυτοδιενικό οξύ (cis-(+)-12-oxo-phytodienoic acid, OPDA). Μετά τη μεταφορά του OPDA στο περοξύσωμα, ο δακτύλιος κυκλοπεντενόνης μειώνεται με OPDA αναγωγάση 3 (OPR3). Στη συνέχεια, ο μηχανισμός β-οξειδωσης λιπαρού οξέως καταλύει τη συντόμηση της πλευρικής αλυσίδας του καρβοξυλικού οξέος σε (+)-7-ισο-JA, το οποίο απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο και επιμερίζεται σε (-)-JA. (Gundlach, Müller et al. 1992).

Η συμβολή του JA είναι γνωστή και στην άμυνα των φυτών ενάντια σε προσβολές από έντομα και παθογόνα. Όπως προαναφέρθηκε το JA συσσωρεύεται σε τραυματισμένα φυτά και ενεργοποιεί γονίδια που κωδικοποιούν αναστολείς πρωτεΐνης που βοηθούν στην προστασία των φυτών από προσβολές εντόμων. Το JA ενεργοποιεί επίσης την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δρουν κατά των μυκήτων και ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών κυτταρικού τοιχώματος όπως είναι οι πρωτεΐνες PRP οι οποίες μπορεί να συμμετέχουν στην προστασία του φυτού σε περιπτώσεις μόλυνσεων. Επιπλέον, επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση φυτοαλεξίνων και φαινολικών ουσιών που συμμετέχουν στον αμυντικό μηχανισμό του φυτού. Τέλος αποτελεί πρόδρομη ένωση της οδού βιοσύνθεσης οξυλιπίνων οι οποίες σχετίζονται με την ανάπτυξη και την άμυνα των φυτών, μέσω της οποίας παράγονται και άλλες πτητικές αλδεύδες και

αλκοόλες που συμμετέχουν στην άμυνα των φυτών και στην επούλωση πληγών (Creelman and Mullet 1997).

Η GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση έδειξε ότι η συγκέντρωση του **α-λινολενικού οξέος** δεν παρουσίασε αξιόλογη μεταβολή σε κάποια από τις δύο επεμβάσεις που εφαρμόσαμε, κάτι που θα μπορούσε να κριθεί μη επιθυμητό καθώς ο μεταβολίτης αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός στον μηχανισμό άμυνας των φυτών (**Εικόνα 35.**). Θα ήταν χρήσιμο να γίνουν επιπλέον μελέτες και αναλύσεις προκειμένου να γίνει κατανοητό πώς ακριβώς επηρεάζεται η αντίδραση του φυτού από τη μείωση που προκαλούν τα σκευάσματα Kocide και Sergomil στη συγκέντρωση του α-λινολενικού οξέος καθώς και να εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζεται η ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού.

Σύμφωνα με μελέτες η εφαρμογή χαλκού σε φυτά προκαλεί μεταβολές στη διαδικασία αποκορεσμού λιπαρών οξέων, μέσω της μείωσης της περιεκτικότητας γλυκολιπιδίων το οποίο συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα λινολενικού οξέος (Ouariti, Boussama et al. 1997). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε φυτά *A. thaliana* βρέθηκε ότι σε φυτά που εφαρμόστηκε χαλκός σε αυξημένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της λιποξυγενάσης (LOX) καθώς και αυξημένα επίπεδα α-λινολενικού οξέος. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι στις ίδιες συνθήκες pH όταν εφαρμόστηκε χαλκός σε συγκέντρωση 5.0 μM σημειώθηκε αυξημένη δραστηριότητα της LOX κατά 240% σε σχέση με τον μάρτυρα ενώ με εφαρμογή 50.0 μM χαλκού αυξήθηκε 159% σε σχέση με τον μάρτυρα (Skórzyńska-Polit, Pawlikowska-Pawłęga et al. 2006).

Τα φυτά έχουν αναπτύξει έναν ισχυρό μηχανισμό δράσης που τους επιτρέπει να ανταποκρίνονται όταν εκτίθενται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και απότομες αλλαγές. Αυτός ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών. Αυτοί οι μεταβολίτες βοηθούν τα φυτά να ρυθμίσουν το εσωτερικό τους περιβάλλον και να εγκλιματιστούν στις μεταβαλλόμενες εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από βιοσυνθετικές οδούς των φυτών και είτε ενεργούν στο σημείο που βιοσυντίθενται είτε μεταφέρονται σε άλλα μέρη του φυτού. Η παραγωγή αυτών των μεταβολιτών είναι αναγκαίο κομμάτι της αντοχής των φυτών καθώς αυτοί εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών και της απόκρισης των φυτών σε διάφορες καταπονήσεις (Kaya, Tuna et al. 2007, Santner and Estelle 2009).

Οι πιο σημαντικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που συντίθενται από τα φυτά είναι οι

φαινολικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των φαινυλοπροπανοειδών και των φλαβονοειδών. Ένα από τα σημαντικότερα φαινυλοπροπανοειδή που σχετίζονται με τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών είναι ο μεταβολίτης καφεϊκό οξύ. Εμπλέκεται κυρίως στη βιοσύνθεση της λιγνίνης, αλλά και στην κυτταρική ρύθμιση, στο φωτοτροπισμό, στην ανάπτυξη των φυτών και στη μετακίνηση του νερού (Lattanzio, Lattanzio et al. 2006). Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που σχηματίζουν μια διαφορετική ομάδα πανταχού κατανεμημένων υδροξυβενζοϊκών και υδροξυκιναμικών οξέων στα φυτά. Έχουν εμπλακεί ευρέως σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών, συμπεριλαμβανομένης της αλληλοπάθειας (Rice 1984). Αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αλληλοχημικών που απελευθερώνονται στο έδαφος από τις ρίζες των φυτών αλλά και μέσω της έκπλυσης και αποσύνθεσης των υπολειμμάτων (Rice 1995). Τα φαινολικά οξέα παίζουν πλήθος οικολογικών και φυσιολογικών ρόλων στα φυτά. Για παράδειγμα, αναστέλλουν την ανάπτυξη τους (Rice 1984), μεταβάλλουν την πρόσληψη ανόργανων στοιχείων (Lyu and Blum 1990), διαταράσσουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Baziramakenga, Leroux et al. 1995), προκαλούν κλείσιμο των στοματίων και επάγουν την υδατική καταπόνηση (Barkosky and Einhellig 1993), επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση και τη πρωτεϊνοσύνθεση (Baziramakenga, Leroux et al. 1997) και μεταβάλλουν τις ενζυματικές δραστηριότητες (Rohn, Rawel et al. 2002, Doblinski, Ferrarese et al. 2003).

Το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκιναμικό οξύ, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) είναι ένα από τα πιο κοινά κιναμικά οξέα που απομονώνονται από μια ποικιλία καλλιεργειών, υπολειμμάτων ζιζανίων, καθώς και άλλων φυτών (Rice 1995). Έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη μυκήτων (Harrison, Peterson et al. 2003), βακτηρίων (BOWLES and Miller 1994) και άλλων φυτών (Rice 1984). Επιπλέον είναι ένας ισχυρός αναστολέας ανάπτυξης των ριζών (Vaughan, Ord et al. 1990, Baleroni, Ferrarese et al. 2000, Barkosky, Einhellig et al. 2000). Μεταβάλλει τη ριζική δραστηριότητα είτε παρεμβαίνοντας στην απορρόφηση του καλίου (Glass 1974) και του φωσφόρου (Glass 1975) είτε με αποπόλωση της ριζικής μεμβράνης (Glass and Dunlop 1974). Το καφεϊκό οξύ αποτελεί επιπλέον τμήμα της βιοσυνθετικής οδού για τη σύνθεση της λιγνίνης όπως προαναφέρθηκε, μιας ουσίας που είναι ιδιαίτερα σημαντική στην αντοχή του φυτού σε βιοτικές αλλά και αβιοτικές καταπονήσεις (Humphreys and Chapple 2002). Η λιγνίνη προσφέρει επίσης μηχανική στήριξη σε τμήματα φυτών όπως είναι οι βλαστοί καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των κυτταρικών

τοιχωμάτων, ενώ παίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά νερού και ανόργανων στοιχείων (Lincoln Taiz 2012). Γνωστό είναι επιπλέον ότι το καφεϊκό οξύ εκτός από την αντοχή που παρέχει στα φυτά σε περιπτώσεις προσβολών από παθογόνα, βοηθάει τα φυτά να ανταπεξέλθουν σε καταπονήσεις που οφείλονται σε ακραίες θερμοκρασίες, υπεριώδες φως, ξηρασία αλλά και σε αυτές που οφείλονται σε βαρέα μέταλλα ή αυξημένη αλατότητα (Douglas 1996, Martinez 2012).

Σύμφωνα με έρευνες σε περίπτωση προσβολής από καφέ σήψη η αυξημένη συγκέντρωση καφεϊκού οξέος σχετίστηκε με αυξημένη αντοχή (Martinez 2012). Σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι η αυξημένη συγκέντρωση καφεϊκού οξέος σχετίστηκε με μεγαλύτερη αντοχή έναντι σε παθογόνα της μηλιάς (Barkai-Golan 2001) καθώς και ότι η εξωγενής εφαρμογή του ενισχύει σημαντικά την άμυνα των φυτών όπως επιβεβαιώθηκε από μελέτη όπου η εφαρμογή 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  καφεϊκού οξέος οδήγησε σε αναστολή ανάπτυξης ενός αριθμού ειδών *Fusarium* και *Saccharomyces* (Davidson, Taylor et al. 2012). Επιπλέον έρευνες έχουν επιβεβαιώσει την σημασία του στην αντοχή των φυτών σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις καθώς έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση του σε τέτοιες συνθήκες (Bubna, Lima et al. 2011, Klein, Keyster et al. 2013), σε πειράματα που έγιναν κάτω από συνθήκες αυξημένης αλατότητας η αυξημένη παραγωγή καφεϊκού οξέος οδήγησε σε αυξημένη αντοχή (Jamalian, Gholami et al. 2013), ενώ άλλες έρευνες έδειξαν ότι μέσω της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας που προκαλεί ο μεταβολίτης αυτός αυξάνεται και η αντοχή σε συνθήκες ξηρασίας και τοξικότητας λόγω βαρέων μετάλλων. (Rivero, Ruiz et al. 2001). Η αντοχή των φυτών αυξάνεται κυρίως λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης και της ρύθμισης των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Είναι το φαινολικό οξύ που εντοπίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά από τα άλλα σε φυτά που εμπλέκονται στη πρόσληψη δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και ελεύθερων ριζών (Gutteridge 1995, Siquet, Paiva-Martins et al. 2006).

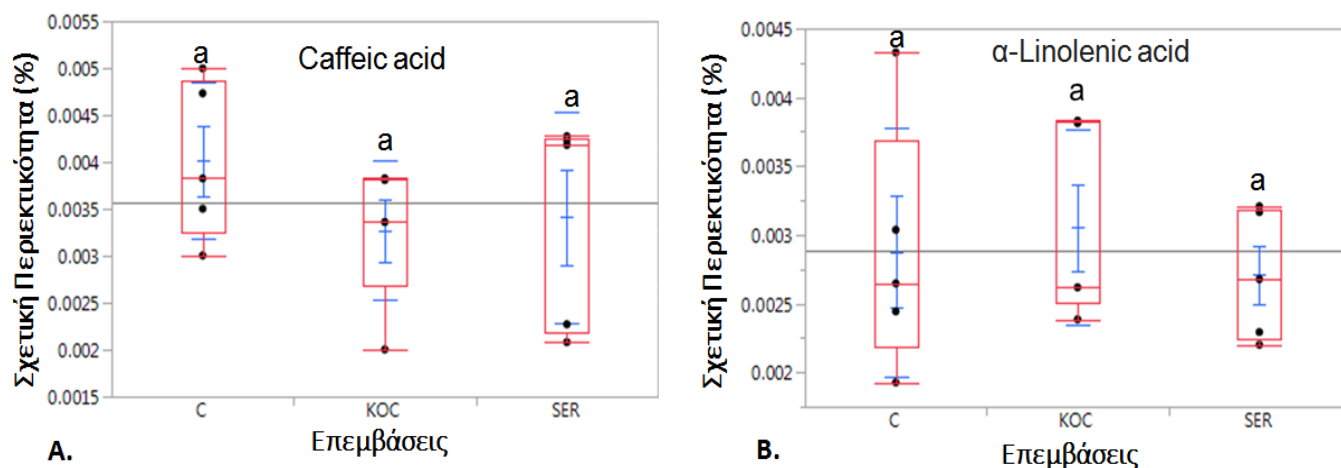
Στη παρούσα μελέτη ο μεταβολίτης **καφεϊκό οξύ** φαίνεται να μην μεταβλήθηκε σημαντικά στις επεμβάσεις με τα χαλκούχα σκευάσματα το οποίο θα μπορούσε να θεωρηθεί αρνητικό δεδομένης της σημασίας του στη φυσιολογία του φυτού (**Εικόνα 34.**).

Το φυτό *Elsholtzia splendens* αποτελεί ένα κυρίαρχο είδος σε εδάφη που έχουν αυξημένη συγκέντρωση χαλκού και χαρακτηρίζεται από υψηλή προσαρμογή σε αυτό το στοιχείο. Σε έρευνα που χρησιμοποίησε το συγκεκριμένο είδος, αφού έγινε η συλλογή του από έδαφος που παρουσιαζόταν ρύπανση λόγω περίσσειας χαλκού

απομονώθηκε και μετρήθηκε η συγκέντρωση καφεϊκού οξέος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα προέκυψε προϊόν καφεϊκού οξέος καθαρότητας 98,46% από απόδοση  $(0,092 \pm 0,007)\%$  ξηρής βιομάζας του *E. splendens*, με τη χρήση υπερήχων/εκχύλιση αιθανόλης, ακολουθούμενη από καθαρισμό χρησιμοποιώντας στήλη μακροπορώδους ρητίνης (τύπου D101) και χρωματογραφία όπου χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου. Το καφεϊκό οξύ είναι πιθανό παράγωγο της μετεπεξεργασίας της βιομάζας του *E. splendens* από φυτοθεραπεία (Xing, Peng et al. 2012). Σε άλλη έρευνα όπου έγινε εφαρμογή χαλκού σε φυτά *Scenedesmus quadricauda* βρέθηκε ότι η εφαρμογή χαλκού αύξησε τη συγκέντρωση καφεϊκού οξέος σε σχέση με τα φυτά του μάρτυρα (Κονάτσικ, Klejdus et al. 2010).

Σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, οι μεταβολίτες α-λινολενικό οξύ και καφεϊκό οξύ διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι μια πιθανή αύξηση στη συγκέντρωσή τους στη παρούσα μελέτη θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς θα μπορούσε να συνεισφέρει σε αυξημένη αντοχή σε βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις.

**Εικόνα 34.** Θηκογράμματα (boxplots) των τριών διαφορετικών επεμβάσεων C: μάρτυρας, KOC: Kocide, SER: Sergomil για τη σύγκριση των σχετικών περιεκτικότητων (%) των επεμβάσεων με τα



χαλκούχα σκευάσματα με αυτών του μάρτυρα σε α-λινολενικό οξύ (A) και καφεϊκό οξύ (B). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-test ( $P > 95\%$ ).

## 5. Συμπεράσματα

Η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) επανήλθε στο προσκήνιο λόγω των ιδιαίτερων βιοδραστικών χαρακτηριστικών αλλά και γενικότερα των διάφορων χρήσεων που παρουσιάζει το φυτό. Αποτελεί μια από τις καλλιέργειες που αρκετοί παραγωγοί θα αναζητήσουν προκειμένου να αυξηθούν τα έσοδα τους.

Η χρήση του φυτού για λάθους σκοπούς τα προηγούμενα χρόνια αποτέλεσαν την βασική αιτία για την χρόνια απαγόρευσή της. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το φυτό να μην έχει μελετηθεί αρκετά ιδιαίτερα στο θέμα της φυτοπροστασίας του. Στις περιπτώσεις που το φυτό χορηγείται για φαρμακευτική χρήση τα Φ.Π. που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια της καλλιέργειας του φυτού επιβάλλεται να μην θέτουν σε κίνδυνο την ήδη επιβαρυσμένη υγεία των ασθενών. Δεδομένων των προβλημάτων που υπάρχουν στην φυτοπροστασία των καλλιεργειών σήμερα, είναι αναγκαία η εύρεση νέων πηγών βιοδραστικότητας οι οποίοι θα πρέπει να είναι φιλικό προς το περιβάλλον, προς του καταναλωτές αλλά και αποτελεσματικοί. Στην Ελλάδα ακόμα δεν υπάρχουν εγκεκριμένα Φ.Π. γι' αυτόν τον λόγο επιλέχθηκε η μελέτη χαλκού ως φυτοπροστατευτικό ο οποίος χρησιμοποιείται κατά κόρων στην βιολογική γεωργία ακολουθώντας τον κανόνα του ελάχιστου τοξικού.

Μέσω της μελέτης εξετάστηκε η χρήση του χαλκού μελετώντας την επίδραση που θα έχει στη φυτοπροστασία αλλά και στην συγκέντρωση των κανναβινοειδών τα οποία λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν καθώς από αυτά κρίνεται η βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων κατά συνέπεια η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Στην παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια κάνναβης στα οποία εφαρμόστηκε μεταβολομική ανάλυση **GC/EI/MS** για να μελετηθεί η επίδραση του χαλκού στα αρχικά στάδια ανάπτυξης τους. Τα αποτελέσματα του πειράματος δίνουν θετικά συμπεράσματα για την χρήση χαλκούχων σκευασμάτων. Τα φυτά μακροσκοπικά δεν φαίνονταν να επηρεάστηκε η ανάπτυξη τους από την εφαρμογή τους, επίσης θετικό είναι η αύξηση ορισμένων τιμών στα επίπεδα των κανναβινοειδών. Τα σκευάσματα Kocide και Sergomil αύξησαν σημαντικά τις τιμές στα επίπεδα της κανναβιδιόλης CBD αλλά και της κανναβινόλης CBN. Βέβαια χρειάζεται παραπάνω έρευνα καθώς η μείωση που υπήρξε σε σχέση με τον μάρτυρα σε άλλους μεταβολίτες προκαλεί έντονο προβληματισμό. Συγκεκριμένα με την εφαρμογή του Kocide παρατηρήθηκε μείωση στο αμινοξύ L-Isoleucine, στο L-Threonine αλλά και στα καρβοξυλικά οξέα Fumaric acid και Succinic acid τα οποία ως γνωστών συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs. Αντίστοιχα με το σκεύασμα Sergomil είχαμε μείωση του αμινοξέους L-Alanine και στα καρβοξυλικά οξέα Fumaric acid και Succinic acid.

## 6. Βιβλιογραφία

- Alcázar, R., T. Altabella, F. Marco, C. Bortolotti, M. Reymond, C. Koncz, P. Carrasco and A. F. J. P. Tiburcio (2010). "Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance." **231**(6): 1237-1249.
- Aleksza, D., G. V. Horváth, G. Sándor and L. J. P. P. Szabados (2017). "Proline accumulation is regulated by transcription factors associated with phosphate starvation." **175**(1): 555-567.
- Aliferis, K. and S. J. M. Jabaji (2010). "1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia." **6**(1): 96-108.
- Aliferis, K. A. and D. J. F. i. P. S. Bernard-Perron (2020). "Cannabinomics: application of metabolomics in *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.) research and development." **11**: 554.
- Aliferis, K. A. and M. Chrysayi-Tokousbalides (2011). "Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives." Metabolomics **7**(1): 35-53.
- Aliferis, K. A. and M. J. M. Chrysayi-Tokousbalides (2011). "Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives." **7**(1): 35-53.
- Aliferis, K. A. and S. Jabaji (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.
- Aliferis, K. A. and S. J. P. O. Jabaji (2012). "FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection." **7**(8).
- Amaducci, S., D. Scordia, F. Liu, Q. Zhang, H. Guo, G. Testa, S. J. I. C. Cosentino and Products (2015). "Key cultivation techniques for hemp in Europe and China." **68**: 2-16.
- Ameri, A. J. P. i. n. (1999). "The effects of cannabinoids on the brain." **58**(4): 315-348.
- Amir, R. J. A. a. (2010). "Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants." **39**(4): 917-931.
- Andre, C. and A. J. P. m. Vercruyssen (1976). "Histochemical study of the stalked glandular hairs of the female *Cannabis* plants, using fast blue salt." **29**(04): 361-366.
- Andre, C. M., J.-F. Hausman and G. Guerriero (2016). "*Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules." Frontiers in plant science **7**: 19.
- Angelini, L. G., S. Tavarini and M. J. J. o. N. F. Di Candilo (2016). "Performance of new and traditional fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars for novel applications: Stem, Bark, and Core Yield and Chemical Composition." **13**(2): 238-252.
- Aranibar, N., B. K. Singh, G. W. Stockton and K.-H. Ott (2001). "Automated mode-of-action detection by metabolic profiling." Biochemical and biophysical research communications **286**(1): 150-155.
- Araújo, W. L., T. Tohge, K. Ishizaki, C. J. Leaver and A. R. J. T. i. p. s. Fernie (2011). "Protein degradation—an alternative respiratory substrate for stressed plants." **16**(9): 489-498.

- Arnon, D. I. and P. Stout (1939). "The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper." *Plant physiology* **14**(2): 371.
- Arru, L., S. Rognoni, M. Baroncini, P. M. Bonatti and P. Perata (2004). "Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution." *Euphytica* **140**(1-2): 33-38.
- Babu, T. S., J. B. Marder, S. Tripuranthakam, D. G. Dixon and B. M. Greenberg (2001). "Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity." *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **20**(6): 1351-1358.
- Baleroni, C., M. Ferrarese, N. Souza and O. J. B. P. Ferrarese-Filho (2000). "Lipid accumulation during canola seed germination in response to cinnamic acid derivatives." **43**(2): 313-316.
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control*, Elsevier.
- Barkosky, R. R., F. A. Einhellig and J. L. J. o. C. E. Butler (2000). "Caffeic acid-induced changes in plant-water relationships and photosynthesis in leafy spurge *Euphorbia esula*." **26**(9): 2095-2109.
- Barkosky, R. R. and F. A. J. J. o. C. E. Einhellig (1993). "Effects of salicylic acid on plant-water relationships." **19**(2): 237-247.
- Barnett, N. M. and A. J. P. P. Naylor (1966). "Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress." **41**(7): 1222-1230.
- Bauwe, H., M. Hagemann and A. R. J. T. i. p. s. Fernie (2010). "Photorespiration: players, partners and origin." **15**(6): 330-336.
- Baziramakenga, R., G. Leroux and R. J. J. o. C. E. Simard (1995). "Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots." **21**(9): 1271-1285.
- Baziramakenga, R., G. D. Leroux, R. R. Simard and P. J. C. J. o. B. Nadeau (1997). "Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedlings." **75**(3): 445-450.
- Benvenuto, E., B. Misra, F. Stehle, C. Andre, J. Hausman and G. J. F. P. S. Guerriero (2016). "*Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules." **719**.
- Bercht, C. L., H. M. Samrah, R. J. C. Lousberg, H. Theuns and C. A. J. P. Salemink (1976). "Isolation of vomifoliol and dihydrovomifliol from *Cannabis*."
- Bergey, D. R., G. A. Howe and C. A. J. P. o. t. N. A. o. S. Ryan (1996). "Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals." **93**(22): 12053-12058.
- Bona, E., F. Marsano, M. Cavaletto and G. Berta (2007). "Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots." *Proteomics* **7**(7): 1121-1130.
- Bopaiah, B. J. I. C. J. (1991). "Recycling the coconut wastes to improve the soil fertility in coconut gardens." **22**(3): 2-3.
- Borkow, G. and J. J. C. m. c. Gabbay (2005). "Copper as a biocidal tool." **12**(18): 2163-2175.



- BOWLES, B. L. and A. J. J. J. o. f. s. Miller (1994). "Caffeic acid activity against Clostridium botulinum spores." **59**(4): 905-908.
- Brenneisen, R. (2007). *Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. Marijuana and the Cannabinoids*, Springer: 17-49.
- Bubna, G. A., R. B. Lima, D. Y. L. Zanardo, W. D. Dos Santos, M. d. L. L. Ferrarese and O. J. J. o. p. p. Ferrarese-Filho (2011). "Exogenous caffeic acid inhibits the growth and enhances the lignification of the roots of soybean (*Glycine max*)." **168**(14): 1627-1633.
- Burstein, S. and S. LT (1975). "PROSTAGLANDINS AND CANNABIS. II. INHIBITION OF BIOSYNTHESIS BY ESSENTIAL OIL COMPONENTS OF MARIJUANA."
- Burstein, S. J. B. and m. chemistry (2015). "Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation." **23**(7): 1377-1385.
- Carchman, R., L. Harris and A. J. C. R. Munson (1976). "The inhibition of DNA synthesis by cannabinoids." **36**(1): 95-100.
- Carson, R. J. C., MA, USA (1962). "Silent Spring, Riverside Press."
- Carus, M. and L. J. D. d. h. e. o. m.-E. H. I. p. Sarmiento (2016). "The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers."
- Causin, H. F. J. J. o. P. P. (1996). "The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth." **149**(3-4): 358-362.
- Chandra, S., H. Lata and M. A. ElSohly (2017). *Cannabis sativa L.-botany and biotechnology*, Springer.
- Chandra, S., H. Lata, I. A. Khan and M. A. ElSohly (2017). *Cannabis sativa L.: botany and horticulture. Cannabis sativa L.-Botany and Biotechnology*, Springer: 79-100.
- Chandra, S., H. Lata, I. A. Khan, M. A. J. P. Elsohly and M. B. o. Plants (2008). "Photosynthetic response of *Cannabis sativa L.* to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO<sub>2</sub> conditions." **14**(4): 299-306.
- Chen, Y.-C., E. C. Holmes, J. Rajniak, J.-G. Kim, S. Tang, C. R. Fischer, M. B. Mudgett and E. S. J. P. o. t. N. A. o. S. Sattely (2018). "N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*." **115**(21): E4920-E4929.
- Clarke, R. C. and M. D. Merlin (2013). *Cannabis: evolution and ethnobotany*, Univ of California Press.
- Consroe, P., A. Martin and V. J. T. J. o. C. P. Singh (1981). "Antiepileptic potential of cannabidiol analogs." **21**(S1): 428S-436S.
- Cranshaw, W. and A. Broberg (2015). *Biological control organisms for insects and mites*.
- Creelman, R. A. and J. E. J. A. r. o. p. b. Mullet (1997). "Biosynthesis and action of jasmonates in plants." **48**(1): 355-381.
- Cunha, J. J. C. a. o. c. t. h. v. and e. p. Pharmacology (1980). "Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R." **21**: 175-185.
- Davidson, P. M., T. M. Taylor, S. E. J. F. m. F. Schmidt and frontiers (2012). "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds." 765-801.

- Davis, J. P. and H. Ramsey (1949). *Antiepileptic action of marihuana active substances*. Fed. Proc.
- Dayanandan, P. and P. B. J. A. J. o. B. Kaufman (1976). *"Trichomes of Cannabis sativa L.(Cannabaceae)." 63(5): 578-591.*
- de Lamarck, J.-B. d. M. (1786). *Encyclopédie méthodique: botanique*, chez Panckoucke. De Petrocellis, L., D. Melck, T. Bisogno, A. Milone and V. J. N. Di Marzo (1999). *"Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response." 92(1): 377-387.*
- Demole, E., E. Lederer and D. J. H. C. A. Mercier (1962). *"Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin." 45(2): 675-685.*
- Dettmer, K., P. A. Aronov and B. D. J. M. s. r. Hammock (2007). *"Mass spectrometry-based metabolomics." 26(1): 51-78.*
- Doblinski, P. M. F., M. d. L. L. Ferrarese, D. A. Huber, C. A. Scapim, O. J. B. a. o. b. Ferrarese-Filho and technology (2003). *"Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to p-coumaric and p-hydroxybenzoic acids." 46(2): 193-198.*
- Dollwet, H. J. T. E. M. (1985). *"Historic uses of copper compounds in medicine." 2: 80-87.*
- Douglas, C. J. J. T. i. P. S. (1996). *"Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees." 1(6): 171-178.*
- Draper, S. J. P. (1972). *"Amino acid changes associated with low temperature treatment of Lolium perenne." 11(2): 639-641.*
- Eisohly, H. N., C. E. Turner, A. M. Clark and M. A. J. J. o. p. s. Eisohly (1982). *"Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds." 71(12): 1319-1323.*
- EISohly, M. A., M. M. Radwan, W. Gul, S. Chandra and A. Galal (2017). *Phytochemistry of Cannabis sativa L. Phytocannabinoids*, Springer: 1-36.
- EISohly, M. A. and D. J. L. s. Slade (2005). *"Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids." 78(5): 539-548.*
- Erkelens, J. L. and A. J. C. Hazekamp (2014). *"That which we call Indica, by any other name would smell as sweet." 9(1): 9-15.*
- Farmer, E. E., R. R. Johnson and C. A. J. P. P. Ryan (1992). *"Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid." 98(3): 995-1002.*
- Farmer, E. E. and C. A. J. P. o. t. N. A. o. S. Ryan (1990). *"Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves." 87(19): 7713-7716.*
- Farmer, E. E. and C. A. J. T. P. C. Ryan (1992). *"Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors." 4(2): 129-134.*
- Fellermeier, M., W. Eisenreich, A. Bacher and M. H. J. E. J. o. B. Zenk (2001). *"Biosynthesis of cannabinoids: incorporation experiments with 13C-labeled glucoses." 268(6): 1596-1604.*

- Fellermeier, M. and M. H. J. F. I. Zenk (1998). "Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol." **427**(2): 283-285.
- Fernandes, J. and F. Henriques (1991). "Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants." The Botanical Review **57**(3): 246-273.
- Flores-Sanchez, I. J. and R. J. P. r. Verpoorte (2008). "Secondary metabolism in cannabis." **7**(3): 615-639.
- Formukong, E., A. Evans and F. J. I. Evans (1988). "Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L." **12**(4): 361-371.
- Freemon, F. R. J. J. (1972). "Effects of marihuana on sleeping states." **220**(10): 1364-1365.
- Gaetke, L. M. and C. K. J. T. Chow (2003). "Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients." **189**(1-2): 147-163.
- Gaoni, Y. and R. J. J. o. t. A. c. s. Mechoulam (1964). "Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish." **86**(8): 1646-1647.
- Gharieb, M. I., M. I. Ali and A. A. El-Shoura (2004). "Transformation of copper oxychloride fungicide into copper oxalate by tolerant fungi and the effect of nitrogen source on tolerance." *Biodegradation* **15**(1): 49-57.
- Glass, A. D. and J. J. P. P. Dunlop (1974). "Influence of phenolic acids on ion uptake: IV. Depolarization of membrane potentials." **54**(6): 855-858.
- Glass, A. D. J. P. (1975). "Inhibition of phosphate uptake in barley roots by hydroxy-benzoic acids." **14**(10): 2127-2130.
- Glass, A. J. J. o. E. B. (1974). "Influence of Phenolic Acids upon Ion Uptake: III. INHIBITION OF POTASSIUM ABSORPTION." **25**(6): 1104-1113.
- Grotenhermen, F. and E. Russo (2002). *Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*, Psychology Press.
- Grotenhermen, F. J. C. D. T.-C. and N. Disorders (2005). "Cannabinoids." **4**(5): 507-530.
- Gundlach, H., M. J. Müller, T. M. Kutchan and M. H. J. P. o. t. N. A. o. S. Zenk (1992). "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures." **89**(6): 2389-2393.
- Gutteridge, J. J. C. c. (1995). "Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage." **41**(12): 1819-1828.
- Guy, G. W., B. A. Whittle and P. Robson (2004). *The medicinal uses of cannabis and cannabinoids*, Pharmaceutical Press London, UK.
- Guzman, M. J. N. r. c. (2003). "Cannabinoids: potential anticancer agents." **3**(10): 745-755.
- Hammond, C. T. and P. G. J. A. j. o. b. Mahlberg (1973). "Morphology of glandular hairs of *Cannabis sativa* from scanning electron microscopy." **60**(6): 524-528.
- Hammond, C. T. and P. G. J. A. j. o. b. Mahlberg (1977). "Morphogenesis of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabaceae)." **64**(8): 1023-1031.

- Hamuda, H. and I. J. Ó. U. e.-B. Patkó (2010). "Relationship between environmental impacts and modern agriculture." **1**(1): 87-98.
- Harrison, H. F., J. K. Peterson, M. E. Snook, J. R. Bohac, D. M. J. J. o. a. Jackson and f. chemistry (2003). "Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm." **51**(10): 2943-2948.
- Hartmann, M., T. Zeier, F. Bernsdorff, V. Reichel-Deland, D. Kim, M. Hohmann, N. Scholten, S. Schuck, A. Bräutigam and T. J. C. Hölzel (2018). "Flavin monooxygenase-generated N-hydroxypipicolinic acid is a critical element of plant systemic immunity." **173**(2): 456-469. e416.
- Häusler, R. E., F. Ludewig and S. J. P. S. Krueger (2014). "Amino acids—a life between metabolism and signaling." **229**: 225-237.
- Hazekamp, A., K. Tejkalová and S. Papadimitriou (2016). "Cannabis: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to Cannabis classification." Cannabis and Cannabinoid Research **1**(1): 202-215.
- Hazekamp, A., K. Tejkalová, S. J. C. Papadimitriou and C. Research (2016). "Cannabis: from cultivar to chemovar II—a metabolomics approach to Cannabis classification." **1**(1): 202-215.
- Hildebrandt, T. M., A. N. Nesi, W. L. Araújo and H.-P. J. M. P. Braun (2015). "Amino acid catabolism in plants." **8**(11): 1563-1579.
- Hildebrandt, T. M. J. P. m. b. (2018). "Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response." **98**(1): 121-135.
- Hildmann, T., M. Ebnet, H. Peña-Cortés, J. J. Sánchez-Serrano, L. Willmitzer and S. J. T. P. C. Prat (1992). "General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding." **4**(9): 1157-1170.
- Hillig, K. W. and P. G. J. A. j. o. b. Mahlberg (2004). "A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae)." **91**(6): 966-975.
- Hillig, K. W. J. B. s. and ecology (2004). "A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis." **32**(10): 875-891.
- Hodakel, B. (2020, 2020). "What is Hemp Fabric: Properties, How its Made and Where." from <https://sewport.com/fabrics-directory/hemp-fabric>.
- Holland, J., G. Frampton, T. Cilgi and S. J. A. o. a. b. Wratten (1994). "Arable acronyms analysed—a review of integrated arable farming systems research in Western Europe." **125**(2): 399-438.
- Hollister, L. E. J. P. r. (1986). "Health aspects of cannabis." **38**(1): 1-20.
- Huang, T. and G. J. P. Jander (2017). "Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in Arabidopsis thaliana." **246**(4): 737-747.
- Humphreys, J. M. and C. J. C. o. i. p. b. Chapple (2002). "Rewriting the lignin roadmap." **5**(3): 224-229.

- Jamalian, S., M. Gholami, M. J. T. Esna-Ashari and E. P. Physiology (2013). "Abscisic acid-mediated leaf phenolic compounds, plant growth and yield is strawberry under different salt stress regimes." **25**(4): 291-299.
- Jiang, H.-E., X. Li, Y.-X. Zhao, D. K. Ferguson, F. Hueber, S. Bera, Y.-F. Wang, L.-C. Zhao, C.-J. Liu and C.-S. J. J. o. e. Li (2006). "A new insight into *Cannabis sativa* (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China." **108**(3): 414-422.
- Jordan, R., L. Asanuma, D. Miller and A. Macherone (2018). "A Comprehensive Approach to Pesticide Residue Analysis in Cannabis."
- Júnior, D. F., L. Gaion, G. S. Júnior, D. Santos and R. J. A. p. p. Carvalho (2018). "Drought-induced proline synthesis depends on root-to-shoot communication mediated by light perception." **40**(1): 1-5.
- Kaiser, J. C., A. N. King, J. C. Grigg, J. R. Sheldon, D. R. Edgell, M. E. Murphy, S. R. Brinsmade and D. E. J. P. g. Heinrichs (2018). "Repression of branched-chain amino acid synthesis in *Staphylococcus aureus* is mediated by isoleucine via CodY, and by a leucine-rich attenuator peptide." **14**(1): e1007159.
- KARLER, R. and S. A. J. T. J. o. C. P. TURKANIS (1981). "The cannabinoids as potential antiepileptics." **21**(S1): 437S-448S.
- Kaya, C., A. L. Tuna, M. Ashraf, H. J. E. Altunlu and E. Botany (2007). "Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate." **60**(3): 397-403.
- Keller, A., M. Leupin, V. Mediavilla, E. J. I. c. Wintermantel and products (2001). "Influence of the growth stage of industrial hemp on chemical and physical properties of the fibres." **13**(1): 35-48.
- Kent, A. D. and E. W. J. A. R. i. M. Triplett (2002). "Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems." **56**(1): 211-236.
- Kim, E. S. and P. G. J. A. J. o. b. Mahlberg (1997). "Immunochemical localization of tetrahydrocannabinol (THC) in cryofixed glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae)." **84**(3): 336-342.
- Kim, H. K., R. J. P. A. A. I. J. o. P. C. Verpoorte and B. Techniques (2010). "Sample preparation for plant metabolomics." **21**(1): 4-13.
- Kinghorn, A. D., H. Falk, S. Gibbons and J. Kobayashi (2017). Phytocannabinoids, Springer.
- Klein, A., M. Keyster and N. J. A. p. p. Ludidi (2013). "Caffeic acid decreases salinity-induced root nodule superoxide radical accumulation and limits salinity-induced biomass reduction in soybean." **35**(10): 3059-3066.
- Kováčik, J., B. Klejdus, J. Hedbavny and M. J. P. S. Bačkor (2010). "Effect of copper and salicylic acid on phenolic metabolites and free amino acids in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae)." **178**(3): 307-311.
- KUSHIMA, H., Y. SHOYAMA, I. J. C. NISHIOKA and P. Bulletin (1980). "Cannabis. Xii. Variations of cannabinoid contents in several strains of *Cannabis sativa* L. with leaf-age, season and sex." **28**(2): 594-598.

- Lamichhane, J. R., E. Osdaghi, F. Behlau, J. Köhl, J. B. Jones and J.-N. J. A. f. S. D. Aubertot (2018). "Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review." **38**(3): 28.
- Lanyon, V. S., J. C. Turner and P. G. J. B. G. Mahlberg (1981). "Quantitative analysis of cannabinoids in the secretory product from capitata-stalked glands of *Cannabis sativa* L.(Cannabaceae)." **142**(3): 316-319.
- Lattanzio, V., V. M. Lattanzio and A. J. P. A. i. r. Cardinali (2006). "Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects." **661**(2): 23-67.
- León, J., J. J. J. P. p. Sánchez-Serrano and Biochemistry (1999). "Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants." **37**(5): 373-380.
- Lewis, G. S. and C. E. J. J. o. P. S. Turner (1978). "Constituents of *Cannabis sativa* L. XIII: Stability of Dosage Form Prepared by Impregnating Synthetic (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol on Placebo Cannabis Plant Material." **67**(6): 876-878.
- Lincoln Taiz, E. Z. (2012).
- Linnaeus, C. (1799). Species plantarum, Impensis GC Nauk.
- Lissoni, P., M. Resentini, R. Mauri, D. Esposti, G. Esposti, D. Rossi, G. Legname and F. J. H. M. R. Fraschini (1986). "Effects of tetrahydrocannabinol on melatonin secretion in man." **18**(1): 77-78.
- Liu, J., J. Wang, S. Lee and R. J. P. o. Wen (2018). "Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves." **13**(9): e0203612.
- Llorens, N., L. Arola, C. Bladé and A. J. P. S. Mas (2000). "Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*." **160**(1): 159-163.
- Loewe, S. J. N.-S. A. f. e. P. u. P. (1950). "Active principals of the cannabis and the pharmacology of the cannabinoids." **211**(2): 175-193.
- Lorenz, W., M. Bahadir and F. J. C. Korte (1987). "Thermolysis of pesticide residues during tobacco smoking." **16**: 521-522.
- Lyu, S.-W. and U. J. J. o. c. e. Blum (1990). "Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water uptake by cucumber seedlings in a split-root system." **16**(8): 2429-2439.
- Ma, J. F., N. Yamaji, N. Mitani, X.-Y. Xu, Y.-H. Su, S. P. McGrath and F.-J. J. P. o. t. N. A. o. S. Zhao (2008). "Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain." **105**(29): 9931-9935.
- Macherone, A., R. Jordan, D. Miller, L. Asanuma, J.-F. Roy and P. J. J. A. L. Stone (2018). "A Multiplatform Approach to Residual Pesticide Quantitation in Cannabis Flower for the California and Canadian Target Lists." **60**(7): 14-16.
- Malingre, T., H. Hendriks, S. Batterman, R. Bos and J. J. P. m. Visser (1975). "The essential oil of *Cannabis sativa*." **28**(05): 56-61.
- Mansouri, H., Z. Asrar and R. Amarowicz (2011). *The response of terpenoids to exogenous gibberellic acid in Cannabis sativa L. at vegetative stage.* Acta Physiologiae Plantarum: 1085–1091.

- Mansouri, H., Z. Asrar and M. Mehrabani (2009). *Effects of Gibberellic Acid on Primary Terpenoids and Δ9-Tetrahydrocannabinol in Cannabis sativa at Flowering Stage*. Journal of Integrative Plant Biology. **51**: 553–561.
- Mansouri, H., Z. Asrar and J. Szopa (2009). *Effects of ABA on primary terpenoids and Δ9-tetrahydrocannabinol in Cannabis sativa L, at flowering stage*. Plant Growth Regulators: 269–277.
- Mansouri, H., F. Salari and Z. Asrar (2013). *Ethephon application stimulates cannabinoids and plastidic terpenoids production in Cannabis sativa at flowering stage*. Industrial Crops and Products: 269– 273.
- Marschner, H. J. E. A. P. (1995). "*Mineral nutrition of higher plants*. 2nd."
- Martinelli, T., A. Whittaker, A. Bochicchio, C. Vazzana, A. Suzuki and C. J. J. o. E. B. Masclaux-Daubresse (2007). "*Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the 'resurrection' plant Sporobolus stapfianus: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves*." **58**(11): 3037-3046.
- Martinez, J. A. (2012). *Natural fungicides obtained from plants. Fungicides for plant and animal diseases*, IntechOpen.
- McGarvey, D. J. and R. J. T. P. C. Croteau (1995). "*Terpenoid metabolism*." **7**(7): 1015.
- McPartland, J. (1996). "*Cannabis pests*." Journal of the International Hemp Association **3**(2): 52-55.
- McPartland, J. and V. J. H. I. H. P. Mediavilla, New York (2002). "*Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology and Therapeutic Potential* (Grotenhermen, F. and Russo, E., eds.)." 401-409.
- McPartland, J. J. J. I. H. A. (1994). "*Microbiological contaminants of marijuana*." **1**: 41-44.
- McPartland, J. J. J. o. t. I. H. A. (1996). "*A review of Cannabis diseases*." **3**(1): 19-23.
- McPartland, J. M. J. C. and c. research (2018). "*Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species*." **3**(1): 203-212.
- Mechoulam, R. and S. J. N. p. r. Ben-Shabat (1999). "*From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis*." **16**(2): 131-143.
- Mechoulam, R. and Y. Gaoni (1967). *Recent advances in the chemistry of hashish. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products/Progrès dans la Chimie des Substances Organiques Naturelles*, Springer: 175-213.
- Mechoulam, R. J. C. a. t. a. (1986). "*The pharmacohistory of Cannabis sativa*." 1-19.
- Mediavilla, V. and S. J. J. I. H. A. Steinemann (1997). "*Essential oil of Cannabis sativa L. strains*." **4**: 80-82.
- Minoeco. (2020). "*Δομική Κάνναβη*." Retrieved 4-2, 2020, from <https://www.minoeco.com/el/constructions/hempcrete>.
- Mittler, R., R. C. Schuurink, M. A. Haring, D. G. Clark, M. V. Thompson, E. Jamet, H. Canut, G. Boudart, R. F. Pont-Lezica and C. Robaglia (2006). "*15 Abiotic stress, the field environment and stress combination*." Plant Science **11**(1): 1-56.

- Mohanty, N., I. Vass and S. Demeter (1989). "Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, QB." *Plant physiology* **90**(1): 175-179.
- Morimoto, S., K. Komatsu, F. Taura and Y. J. J. o. N. P. Shoyama (1997). "Enzymological evidence for cannabichromenic acid biosynthesis." **60**(8): 854-857.
- Morimoto, S. J. C. T. P. (1999). "Biosynthesis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L." **2**: 103-113.
- Mostofa, M. G. and M. J. E. Fujita (2013). "Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems." **22**(6): 959-973.
- Nagarajan, R., T. Manickam, G. Kothandaraman, K. Ramaswamy and G. J. M. A. J. Palaniswamy (1985). "Manurial value of coir pith." **72**: 533-535.
- Nahas, G. G. (1999). *Marihuana and medicine. Marihuana and Medicine*, Springer: 807-810.
- O'donnell, P., C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H. Leyser and D. J. S. Bowles (1996). "Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants." **274**(5294): 1914-1917.
- Oaks, A. J. C. J. o. B. (1965). "The regulation of nitrogen loss from maize endosperm." **43**(9): 1077-1082.
- Ott, L. S., M. M. Riddell, E. L. O'Neill and G. S. J. F. p. t. Carini (2018). "From orchids to biodiesel: Coco coir as an effective drywash material for biodiesel fuel." **176**: 1-6.
- Ouariti, O., N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif and M. H. J. P. Ghorbal (1997). "Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids." **45**(7): 1343-1350.
- Pate, D. W. (2001). "Anandamide structure-activity relationships and mechanisms of action on intraocular pressure in the normotensive rabbit model."
- Peña-Cortés, H., J. Fisahn and L. J. P. o. t. N. A. o. S. Willmitzer (1995). "Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants." **92**(10): 4106-4113.
- Pérez-Alfocea, F., M. Estan, M. Caro and G. J. P. P. Guerrier (1993). "Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. Pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses." **87**(4): 493-498.
- Piomelli, D., E. B. J. C. Russo and c. research (2016). "The *Cannabis sativa* versus *Cannabis indica* debate: an interview with Ethan Russo, MD." **1**(1): 44-46.
- Piotrowski, S. and M. J. N. i. Carus (2011). "Ecological benefits of hemp and flax cultivation and products." **5**: 1-6.
- Pires, M. V., A. A. Pereira Júnior, D. B. Medeiros, D. M. Daloso, P. A. Pham, K. A. Barros, M. K. Engqvist, A. Florian, I. Krahnert, V. G. J. P. Maurino, Cell and Environment (2016). "The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis*." **39**(6): 1304-1319.
- Pretty, J., C. Brett, D. Gee, R. Hine, C. Mason, J. Morison, M. Rayment, G. Van Der Bijl, T. J. J. o. e. p. Dobbs and management (2001). "Policy challenges and priorities for internalizing the externalities of modern agriculture." **44**(2): 263-283.



Quarles, W. "IPM for Cannabis Pests."

Rai, V. J. B. p. (2002). "Role of amino acids in plant responses to stresses." **45**(4): 481-487.

Ranieri, A., R. Bernardi, P. Lanese, G. F. J. E. Soldatini and e. botany (1989). "Changes in free amino acid content and protein pattern of maize seedlings under water stress." **29**(3): 351-357.

Razdan, R., A. Puttick, B. Zitko and G. J. E. Handrick (1972). "Hashish VI 1: Conversion of (-)- $\Delta$  1 (6)-Tetrahydrocannabinol to (-)- $\Delta$  1 (7)-Tetrahydrocannabinol. Stability of (-)- $\Delta$  1 and (-)- $\Delta$  1 (6)-Tetrahydrocannabinols." **28**(2): 121-122.

Recht, L. D., R. Salmonsén, R. Rosetti, T. Jang, G. Pipia, T. Kubiátowski, P. Karim, A. H. Ross, R. Zurier and N. S. J. B. p. Litofsky (2001). "Antitumor effects of ajulemic acid (CT3), a synthetic non-psychoactive cannabinoid." **62**(6): 755-763.

Rice, E. J. A. n. e. A. P., Orlando, FL. (1984). "Allelopathy. Academic Press, Orlando, FL." -.

Rice, E. L. (1995). *Biological control of weeds and plant diseases: advances in applied allelopathy*, University of Oklahoma Press.

Rivero, R. M., J. M. Ruiz, P. C. Garcia, L. R. Lopez-Lefebvre, E. Sánchez and L. J. P. S. Romero (2001). "Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants." **160**(2): 315-321.

Rizwan, M., S. Ali, M. Adrees, H. Rizvi, M. Zia-ur-Rehman, F. Hannan, M. F. Qayyum, F. Hafeez, Y. S. J. E. S. Ok and P. Research (2016). "Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review." **23**(18): 17859-17879.

Robson, P. J. T. B. J. o. P. (2001). "Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids." **178**(2): 107-115.

Roessner, U. and D. M. Beckles (2009). *Metabolite measurements. Plant metabolic networks*, Springer: 39-69.

Roessner, U. and J. Bowne (2009). "What is metabolomics all about?" *Biotechniques* **46**(5): 363-365.

Rohn, S., H. M. Rawel, J. J. J. o. A. Kroll and F. Chemistry (2002). "Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes." **50**(12): 3566-3571.

Ross, S. and M. J. Z. J. P. S. ElSohly (1995). "Constituents of *Cannabis sativa* L. XXVIII—A review of the natural constituents: 1980–1994." **4**: 1-10.

Ross, S. A., H. N. ElSohly, E. A. ElKashoury and M. A. J. P. A. ElSohly (1996). "Fatty acids of cannabis seeds." **7**(6): 279-283.

Ross, S. A. and M. A. J. J. o. N. P. ElSohly (1996). "The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*." **59**(1): 49-51.

Ross, S. A., Z. Mehmedic, T. P. Murphy and M. A. J. J. o. a. t. ElSohly (2000). "GC-MS analysis of the total  $\delta$ 9-*thc* content of both drug-and fiber-type cannabis seeds." **24**(8): 715-717.

Sánchez, C., M. L. de Ceballos, T. G. del Pulgar, D. Rueda, C. Corbacho, G. Velasco, I. Galve-Roperh, J. W. Huffman, S. R. y Cajal and M. J. C. r. Guzmán (2001). "Inhibition of

*glioma growth in vivo by selective activation of the CB2 cannabinoid receptor.*" **61**(15): 5784-5789.

Santner, A. and M. J. N. Estelle (2009). "*Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling.*" **459**(7250): 1071-1078.

Savithri, P. and H. HAMEED (2007). "Characteristics of coconut coir pith and its utilization in agriculture."

Schaafsma, G. (2009). "*Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition.*" *European journal of clinical nutrition* **63**(10): 1161-1168.

Sheldon, A. and N. W. Menzies (2004). *The effect of copper toxicity on the growth and morphology of Rhodes grass (Chloris gayana) in solution culture.* SuperSoil 3rd Australian New Zealand Soils Conference.

Shoyama, Y., M. Yagi, I. Nishioka and T. J. P. Yamauchi (1975). "*Biosynthesis of cannabinoid acids.*" **14**(10): 2189-2192.

Singh, B. K. and D. L. J. T. P. C. Shaner (1995). "*Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field.*" **7**(7): 935.

Siquet, C., F. Paiva-Martins, J. L. Lima, S. Reis and F. J. F. r. r. Borges (2006). "*Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids-A structure-activity relationship study.*" **40**(4): 433-442.

F Hijaz, N Killiny - *Plant Signaling & Behavior*, 2019 - Taylor & Francis

*Exogenous GABA is quickly metabolized to succinic acid and fed into the plant TCA cycle*

Skórzyńska-Polit, E., B. Pawlikowska-Pawłęga, E. Szczuka, M. Drażkiewicz and Z. J. P. G. R. Krupa (2006). "*The activity and localization of lipoxygenases in Arabidopsis thaliana under cadmium and copper stresses.*" **48**(1): 29-39.

Slatkin, D. J., N. J. Doorenbos, L. S. Harris, A. N. Masoud, M. W. Quimby and P. L. J. J. o. p. s. Schiff (1971). "*Chemical constituents of Cannabis sativa L. root.*" **60**(12): 1891-1892.

Small, E. and A. J. T. Cronquist (1976). "*A practical and natural taxonomy for Cannabis.*" 405-435.

Stockings, G. T. J. B. M. J. (1947). "*A new euphoriant for depressive mental states.*" **1**(4512): 918.

Stone, D. J. R. T. and Pharmacology (2014). "*Cannabis, pesticides and conflicting laws: the dilemma for legalized States and implications for public health.*" **69**(3): 284-288.

Suzuki, N. and R. Mittler (2006). "*Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction.*" *Physiologia plantarum* **126**(1): 45-51.

Taiz, L. and E. Zeiger (2012). *Φυσιολογία Φυτών*, Utopia.

Tanaka, H. and Y. J. F. s. i. Shoyama (1999). "*Monoclonal antibody against tetrahydrocannabinolic acid distinguishes Cannabis sativa samples from different plant species.*" **106**(3): 135-146.

Taura, F., S. Morimoto, Y. Shoyama and R. J. J. o. t. A. C. S. Mechoulam (1995). "First direct evidence for the mechanism of. DELTA. 1-tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis." **117**(38): 9766-9767.

Taura, F., S. Morimoto and Y. J. J. o. B. C. Shoyama (1996). "Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid." **271**(29): 17411-17416.

Technology, A. L. (2020). "Combining lime and breathable natural materials to create healthy, comfortable, low energy buildings." 2020, from <http://www.americanlimetechnology.com/>.

Thompson, L. J. and R. C. J. N. C. m. j. Proctor (1953). "The use of pyrahexyl in the treatment of alcoholic and drug withdrawal conditions." **14**(10): 520-523.

Tie, S. G., Z. J. Tang, Y. M. Zhao and W. J. A. J. o. B. Li (2012). "Oxidative damage and antioxidant response caused by excess copper in leaves of maize." **11**(19): 4378-4384.

Timpone, J. G., D. J. Wright, N. Li, M. J. Egorin, M. E. Enama, J. Mayers, G. Galetto, D. S. G. J. A. research and h. retroviruses (1997). "The safety and pharmacokinetics of single-agent and combination therapy with megestrol acetate and dronabinol for the treatment of HIV wasting syndrome." **13**(4): 305-315.

Tsai, F.-Y., C. C. Lin and C. H. Kao (1997). A comparative study of the effects of abscisic acid and methyl jasmonate on seedling growth of rice. Plant Growth Regulation: 37–42.

Tsugawa, H., T. Cajka, T. Kind, Y. Ma, B. Higgins, K. Ikeda, M. Kanazawa, J. VanderGheynst, O. Fiehn and M. J. N. m. Arita (2015). "MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis." **12**(6): 523.

Turner, C. E., M. A. Elsohly and E. G. J. J. o. N. P. Boeren (1980). "Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents." **43**(2): 169-234.

Tye, A., S. Young, N. Crout, H. Zhang, S. Preston, F. Zhao and S. J. E. J. o. S. S. McGrath (2004). "Speciation and solubility of Cu, Ni and Pb in contaminated soils." **55**(3): 579-590.

Vaughan, D., B. J. J. o. t. S. o. F. Ord and Agriculture (1990). "Influence of phenolic acids on morphological changes in roots of *Pisum sativum*." **52**(3): 289-299.

Vemuri, V. K., A. J. C. P. Makriyannis and Therapeutics (2015). "Medicinal chemistry of cannabinoids." **97**(6): 553-558.

Villas-Bôas, S., U. Roessner, M. Hansen, J. Smedsgaard and J. Nielsen *Metabolome Analysis: An Introduction*. 2007, John Wiley & Sons, Inc.

Volicer, L., M. Stelly, J. Morris, J. McLAUGHLIN and B. J. J. I. j. o. g. p. Volicer (1997). "Effects of dronabinol on anorexia and disturbed behavior in patients with Alzheimer's disease." **12**(9): 913-919.

Wiklund, S., E. Johansson, L. Sjöström, E. J. Mellerowicz, U. Edlund, J. P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz and J. Trygg (2008). "Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models." Anal Chem **80**(1): 115-122.

Wiklund, S., E. Johansson, L. Sjöström, E. J. Mellerowicz, U. Edlund, J. P. Shockcor, J. Gottfries, T. Moritz and J. J. A. c. Trygg (2008). "Visualization of GC/TOF-MS-based

metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models." **80**(1): 115-122.

Wishart, D. S. (2016). "Introduction to cheminformatics." *Current protocols in bioinformatics* **53**(1): 14.11. 11-14.11. 21.

Xing, Y., H.-y. Peng, M.-x. Zhang, X. Li, W.-w. Zeng and X.-e. J. J. o. Z. U. S. B. Yang (2012). "Caffeic acid product from the highly copper-tolerant plant *Elsholtzia splendens* post-phytoremediation: its extraction, purification, and identification." **13**(6): 487-493.

Xiong, Z.-T., C. Liu, B. J. E. Geng and E. Safety (2006). "Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr." **64**(3): 273-280.

Yamamoto, I., K. Watanabe, K. Kuzuoka, S. Narimatsu, H. J. C. Yoshimura and p. bulletin (1987). "The pharmacological activity of cannabinal and its major metabolite, 11-hydroxycannabinal." **35**(5): 2144-2147.

Yruela, I. (2005). "Copper in plants." *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**(1): 145-156.

Β ΓΑΛΑΤΗΣ, Δ. Γ., Κ. ΓΚΑΝΗ-ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΥ, Γ. ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ, Κ. ΚΟΤΖΑΜΠΑΣΗΣ, Ε.-Ι. ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΙΔΟΥ, Ι. ΜΑΝΕΤΑΣ, Κ.Α. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΑΚΗ (2003). " Φυσιολογία Φυτών από το Μόριο στο Περιβάλλον ".

Ε. Τσαλίκη, Α. Κ., Ε. Μαλούπα (2017). "ΟΔΗΓΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΛΩΣΤΙΚΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ (*Cannabis Sativa* L.) ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΒΕΛΤΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΦΥΤΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ." Retrieved 01-02, 2020, from [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/KANABH/odhgos\\_kaliergeias2017\\_Cannabis.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/KANABH/odhgos_kaliergeias2017_Cannabis.pdf).

Ελένη Τσαλίκη, Α. Κ. (2018). "Βιομηχανική κάνναβη – μια νέα καλλιέργεια στην Ελλάδα." 2020.

Ζιώγας, Β. Μ. (2010). Γεωργική Φαρμακολογία.

Μητσιάς, Χ. Ι. (2015). "Η χασισοκαλλιέργεια και το εμπόριο κάνναβης στην Αρκαδία" Retrieved 29-01, 2020, from <http://www.arcadiaportal.gr/news/i-hasisokalliergeia-kai-emporio-kannavis-stin-arkadia>.