



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Romana DORN

**UPORABA BIOTEHNOLOŠKIH METOD ZA
IZBOLJŠANJE LASTNOSTI MEDICINSKE
KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Romana DORN

**UPORABA BIOTEHNOLOŠKIH METOD ZA IZBOLJŠANJE
LASTNOSTI MEDICINSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**USE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR IMPROVING
CHARACTERISTICS OF MEDICINAL CANNABIS
(*Cannabis sativa* L.)**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomski seminar je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega seminarja imenovala prof. dr. Boruta Bohanca in za somentorja asist. dr. Marka Flajšmana.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: izr. prof. dr. Polona Jamnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Mentor: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Somentor: asist. dr. Marko Flajšman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jernej Jakše
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum predavitve: 6. 7. 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 633.522:602.6(043.2.)
- KG biotehnološke metode/medicinska konoplja/*Cannabis sativa*/kanabinoidi/
žlahtnjenje rastlin
- AV DORN, Romana
- SA BOHANEČ, Borut (mentor)/FLAJŠMAN, Marko (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni
študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2017
- IN UPORABA BIOTEHNOLOŠKIH METOD ZA IZBOLJŠANJE KANABINOIDNE
SESTAVE MEDICINSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 21 str., 3 sl., 74 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Medicinska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je rastlina, ki lahko zaradi vsebnosti kanabinoidov in drugih snovi, ki vplivajo na zdravje, marsikateremu bolniku izboljša življenje. Glavna kanabinoida, ki se nahajata v konoplji, sta delta-9-tetrahidrokanabinol (Δ^9 THC) in kanabidiol (CBD), ki se sintetizirata v žlezni trihomih. V človeku kanabinoidi delujejo preko endokanabinoidnega sistema. Δ^9 THC je psihoaktivna substanca, ki vpliva na povečanje apetita, zmanjšuje slabost, deluje proti bolečinam in stimulira imunski sistem, CBD pa poleg zdravilnih učinkov zmanjšuje neželene učinke Δ^9 THC. Zaradi vse večje uporabe konoplje v medicini je želja pridobiti rastline z različnimi vsebnostmi kanabinoidov in doseči čim večje donose za izolacijo. Uporaba biotehnoloških metod in razvoj novih protokolov za uspešno shranjevanje, razmnoževanje, gensko transformacijo in regeneracijo rastlin vodi v učinkovitejše žlahtnjenje medicinske konoplje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 633.522:602.6(043.2.)
- CX biotechnological methods/medicinal cannabis/*Cannabis sativa*/cannabinoids/plant breeding
- AU DORN, Romana
- AA BOHANEK, Borut (supervisor)/ FLAJŠMAN, Marko (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2017
- TI USE OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR IMPROVING CHARACTERISTICS OF MEDICINAL CANNABIS (*Cannabis sativa* L.)
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 21 p., 3 fig., 74 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) is a plant which can improve the quality of life for many patients because the content of cannabinoids and other substances that affect health. The main cannabinoids in cannabis are delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) and cannabidiol (CBD), which are synthesized in glandular trichomes. Cannabinoids work through the endocannabinoid system in humans. Δ^9 THC is a psychoactive substance that affects appetite, reduces nausea, acts against pain and stimulates the immune system. CBD, in addition to the therapeutic effects, reduces adverse effects of Δ^9 THC. Due to the increasing use of cannabis in medicine, the goal is to acquire plants with different cannabinoid contents and to achieve the highest possible yields in cannabinoids extractions. The use of biotechnological methods and the development of new protocols for successful storage, micropropagation, gene transformation, plant regeneration lead to more efficient breeding of medical cannabis.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
1 UVOD	1
2 UČINKOVINE IN UČINKI KONOPLJE	1
2.1 UČINKOVINE	2
2.1.1 Kanabinoidi	2
2.1.2 Terpeni	2
2.1.3 Flavonoidi	3
2.2 ENDOKANABINOIDNI SISTEM	3
2.3 KEMOTIPI KONOPLJE	4
2.4 BIOSINTEZA	4
2.4.1 Trihomi	5
2.5 CBDA- IN THCA- SINTAZA	7
2.5.1 Dedovanje in vpliv na kemotip	8
3 BIOTEHNOLOŠKE METODE	9
3.1 MIKROPROPAGACIJA	10
3.2 GENSKA TRANSFORMACIJA	12
3.2.1 Kulture koreninskih laskov	12
3.2.2 Transformacija kalusa	13
3.3 INDUKCIJA POLIPLOIDOV	14
3.4 KAPSULACIJA – UMETNA SEMENA	15
3.5 PRIDOBIVANJE KANABINOIDOV V HETEROLOGNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH	15
4 ZAKLJUČEK	16
5 VIRI	16

KAZALO SLIK

Slika 1:	Pot sinteze in biosinteze kanabinoidov v konoplji (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016: 325)	5
Slika 2:	Trihomi konoplje (Small in Naraine, 2016: 350)	6
Slika 3:	Dosežki in potencialni pristopi v prihodnosti za pridobivanje kanabinoidov v kulturah konoplje in v drugih rastlinskih gostiteljih (Andre in sod., 2016: 9)	10

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2,4-D – 2,4-diklorofenoksi očetna kislina
AFLP – Amplified fragment length polymorphism
BA – N⁶ benziladenin
BAP – 6-benzilaminopurin
CBC – kanabikromen
CBD – kanabidiol
CBDA – kanabidiolna kislina
CBDAS – CBDA sintaza
CBG – kanabigerol
CBGA – kanabigerolna kislina
CBN – kanabinol
FAD – flavin adenin dinukleotid
GC-FID – Gas chromatography with flame ionization detector oz. plinska kromatografija s plamensko ionizacijskim detektorjem
GC-MS – Gas chromatography mass spectrometry oz. plinska kromatografija z masno spektrometrijo
GFP – Green Fluorescent Protein
HPLC-DAD – High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection oz. tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem z nizom diod
IAA – indol očetna kislina
IBA – indol-3-maslena kislina
KN – kinetin
MS gojišče – Murashige in Skoog gojišče
TZ – trans zeatin
mT – meta topolin
ROS – Reactive Oxidative Species oz. reaktivne kisikove spojine
RT-qPCR – Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
NAA – 1-naftalen očetna kislina
TDZ – tidiazuron
THACAS – THCA sintaza
 Δ^9 THC – delta-9-tetrahidrokanabinol
 Δ^9 THCA – delta-9-tetrahidrokanabinolna kislina

1 UVOD

Konopljo (*Cannabis sativa* L.) ločimo predvsem po vrednosti psihoaktivnega delta-9-tetrahidrokanabinola (Δ^9 THC) ali poenostavljeno THC, od katerega je odvisna uporaba rastline. Ločimo sorte z visoko vsebnostjo Δ^9 THC, ki jih imenujemo medicinska konoplja ter sorte industrijske konoplje, ki imajo nizko vsebnost Δ^9 THC (Small in Naraine, 2016). Mejna vrednost THC, ki razmejuje oba tipa konoplje, je 0,2 % THC (v suhi snovi v zgornji tretjini rastline) v Evropski uniji in 0,3 % v Kanadi (Sarmiento in sod., 2015).

Medicinska konoplja je rastlina, ki ima veliko potenciala pri uporabi za zdravljenje, vendar je njeno gojenje močno omejeno in strogo nadzorovano. Andre in sod. so leta 2016 naredili pregled objav o konoplji in uporabi biotehnoloških metod za izboljšanje njenih lastnosti. Kanabinoidi se akumulirajo v sekretornih predelih žleznih trihomov, ki se večinoma nahajajo na ženskih cvetovih in na zračnih predelih rastline. V nizkih koncentracijah so bili detektirani tudi v drugih delih rastlin vključno s semeni (Ross in sod., 2000), koreninami (Stout in sod., 2012) in cvetnim prahom (Ross in sod., 2005). Večina bioloških lastnosti, povezanih s kanabinoidi, se navezuje na interakcije z endokanabinoidnim sistemom pri človeku.

V konoplji najdemo preko 100 kanabinoidov, od katerih sta Δ^9 THC in kanabidiol (CBD) najbolj raziskana in poznana po svojih zdravilnih učinkih (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016). V konoplji lahko v sledovih najdemo tudi psihoaktivno izomero Δ^8 THC in ima v primerjavi z Δ^9 THC manjši vpliv (Russo, 2007). Andre in sod. (2016) navajajo, da se je skozi leta vsebnost THC v medicinski konoplji povečala iz 3 % na 20 % v današnjem času, medtem ko se je vsebnost CBD nižala. Kratkoročna uporaba THC povzroči poslabšanje kognitivnih sposobnosti, psihozo ter slabšo motorično koordinacijo. Dolgotrajni učinki pa vodijo v povečano tveganje za odvisnost, kognitivne okvare, kronične psihoze, kot je npr. shizofrenija, ter spremembe v razvoju možganov ob uporabi v zgodnjem razvoju. Znano je, da CBD zmanjšuje negativne učinke THC (Iseger in Bossong, 2015). Aizpurua-Olaizola in sod. (2016) ugotavljajo, da povečana uporaba konoplje v medicini in zdravilni učinki nepsihotropnih kanabinoidov in terpenov vodijo do pobud za gojenje rastlin z različnimi vsebnostmi in kombinacijami kanabinoidov ter terpenov. Do sedaj je raziskovalcem že uspelo pridobiti rastlino z več kot 15 % vsebnostjo CBD in manj kot 1 % THC. Za nadaljnjo optimizacijo vsebnosti posamezne snovi pa potrebujemo razumevanje njihovega razvoja med rastjo rastline. Biotehnološke metode, opisane v nadaljevanju, so pregled dosedanjega dela raziskovalcev, katerih cilj je lažje gojenje in povečanje izkoristkov pridobivanja sekundarnih metabolitov medicinske konoplje.

2 UČINKOVINE IN UČINKI KONOPLJE

Konoplja je znana po različnih pozitivnih učinkih na človekovo zdravje, kot na primer stimuliranje apetita pri zdravljenju anoreksije, rakavih obolenj in pri kronični imunski oslABLjenosti, ki je posledica virusa HIV. Deluje tudi kot antiemetik, kar pomeni, da preprečuje bruhanje in s tem lajša težave rakavim bolnikom, ki se zdravijo s kemoterapijo. Lajša kronične bolečine bolnikom z virusom HIV in AIDS-om, revmatoidnim artritismom in multiplo sklerozo. Poznane so tudi druge klinične aplikacije pri zdravljenju različnih vrst raka, epilepsije, Alzheimerjeve bolezni, Huntingtonove bolezni, diabetesa ter Toulettovega

sindroma. V konoplji je identificiranih vsaj 554 komponent, od tega 113 fitokanabinoidov ter 120 terpenov (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016).

2.1 UČINKOVINE

2.1.1 Kanabinoidi

Kanabinoidi se sintetizirajo kot prenilirane aromatične karboksilne kisline in v večini primerov se v svežih rastlinah ne nahajajo v nevtralnem stanju, v primeru povišane temperature ali pod vplivom svetlobe pa se lahko spremenijo do nevtralnih homologov s spontano dekarboksilacijo. Glavna kanabinoida, ki ju poznamo zaradi njunih terapevtskih učinkov, sta delta-9-tetrahidrokanabinol (Δ^9 THC) in kanabidiol (CBD), ki sta nevtralna homologa delta-9-tetrahidrokanabinolne kisline (Δ^9 THCA) ter kanabidiolne kisline (CBDA). V tem diplomskem delu THC in THCA (ter isto za CBD in CBDA) zaradi lažjega razumevanja ne bomo ločevali med sabo. THC je glavna psihoaktivna snov v konoplji, ki ima protivnetne in analgetične učinke, stimulira apetit ter deluje antiemetično. CBD modulira evforične učinke THC in deluje antipsihotično, nevroprotektivno, protirakavo in antidiabetično, zmanjšuje pa tudi odvisnost od tobaka (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016). CBD vpliva na farmakokinetiko z utekočinjanjem membran. To poveča penetracijo THC v mišične celice in inhibicijo P450-pogojene jetrne presnove zdravil, ki je prisotna pri degradaciji in eliminaciji molekule, kar so povzeli Andre in sod. (2016). Tudi kanabigerol (CBG) ter kanabikromen (CBC) sta obetajoči komponenti, ki bi se lahko uporabljali za zdravljenje. Kljub pomanjkanju študij teh dveh substanc so ugotovili, da ima CBG velik potencial za zdravljenje glavkoma, kronične vnetne črevesne bolezni ter raka na prostati. CBC ima analgetičen učinek, potencialno stimulira rast možganskih celic in lahko normalizira gastrointestinalno hipermotiliteto (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016).

2.1.2 Terpeni

Terpeni predstavljajo največjo skupino rastlinskih metabolitov, v konoplji je znanih več kot 100 molekul (Rothschild in sod., 2005; Brenneisen, 2007). Odgovorni so za vonj in okus (Small, 2015). Poznamo več družin terpenov glede na število ponavljajočih se izoprenskih enot s petimi ogljiki. Monoterpeni imajo 10 ogljikov, seskviterpeni 15, triterpeni pa 30 (Meier in Mediavilla, 1998; Brenneisen, 2007). V konopljinih listih, cvetovih in koreninah so zaznali mono- in seskviterpene, triterpeni pa se nahajajo predvsem v koreninah, vlaknih in olju iz semen (Fischedick in sod., 2010), kot so povzeli Andre in sod. (2016). Zaradi sinergističnega delovanja s kanabinoidi je znanih več obetavnih aplikacij kombiniranih pripravkov: za zdravljenje aken CBD ter monoterpeni limonen, linalol in piren; nova antiseptična substanca iz kombinacije CBG in pinena; pripravek za zdravljenje anksioznosti iz CBD ter limonena in linalola. Za zdravljenje motenj spanca se uporablja mešanica kariofilena, linalola, mircena in ekstrakta CBD/THC (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016). Andre in sod. (2016) omenjajo tudi, da naj bi terpeni na farmakokinetiko THC vplivali s povečanjem permeabilnosti krvne možganske membrane, regulirali pa naj bi tudi afiniteto THC za CB1 receptor ter interakcijo z nevrotansmitorskimi receptorji in s tem prispevali k analgetičnemu in psihotičnemu učinku kanabinoidov (McPartland in Russo, 2001; Russo, 2011).

2.1.3 Flavonoidi

Andre in sod. (2016) so naredili pregled nad fenolnimi komponentami v konoplji, ki so znane tudi kot fenilpropanoidi in predstavljajo skupino najbolj pogostih sekundarnih metabolitov najdenih pri rastlinah. Pojavljajo se v več kot 10 000 različnih strukturah, med katere sodijo tudi fenolne kisline in flavonoidi (flavoni, flavonoli, stilbeni) (Andre in sod., 2010). V konoplji so določili okoli 20 flavonoidov, od katerih večina predstavlja flavone ter flavonolne podrazrede (Flores-Sanchez in Verpoorte, 2008). Fenolne komponente v rastlinah naj bi pod nekaterimi fiziološkimi pogoji na rastlino delovali kot antioksidant, torej kot zaščita pred oksidativnim stresom (Arts in Hollman, 2005). Fenolne komponente naj bi pri ljudeh spodbudile delovanje endogenih antioksidativnih encimov *in vivo* zaradi njihove sposobnosti delovanja kot pro-oksidenti in ustvarjanja reaktivnih kisikovih spojin (ROS) (Halliwell in sod., 2005). Flavoni in flavonoidi v konoplji imajo veliko bioloških učinkov, mnogi so podobni učinkom terpenov ter kanabinoidov, npr. delujejo protivnetno, protirakavo ter nevroprotektivno (Andre in sod., 2010). Flavonoidi naj bi imeli vpliv na regulacijo farmakokinetike THC preko inhibiranja P450 jetrnih encimov (McPartland and Russo, 2001; Russo, 2011). Tudi lignani na splošno pozitivno vplivajo na zdravje z antioksidativnim, protivirusnim, protidiabetičnim in protitumoromnim učinkom ter delovanjem proti debelosti. Zaradi strukturne podobnosti enterolignanov z estrogenom pri sesalcih imajo potencial pri zdravljenju hormonsko pogojenih rakov (Wang in sod., 2010).

2.2 ENDOKANABINOIDNI SISTEM

Andre in sod. (2016) opisujejo, da endokanabinoidni sistem pri človeku vključuje dva receptorja, ki sta sestavljena iz dveh G proteinov (CB1 in CB2) ter dva endogena liganda (anandamid in 2-arahidonilglicerol) (De Petrocellis in sod., 2011; Di Marzo and Piscitelli, 2015). THC, ki je psihoaktivna dekarboksilirana oblika THCA, se lahko veže na oba receptorja, ampak ima višjo afiniteto do receptorja CB1. Ti receptorji so prisotni v centralnem živčnem sistemu, odkrili pa so jih tudi v imunskih celicah, gastrointestinalnem, reproduktivnem, srčnem in pljučnem tkivu ter tkivih mehurja in nadledvične žleze. CB2 receptorji imajo vpliv na regulacijo imunskega odziva ter aktivnost citokinov. THC ima več učinkov, ker ima poleg receptorjev CB1 in CB2 še druge molekularne tarče. Deluje protivnetno, protirakavo, analgetično, sprošča mišice, deluje kot neuro-antioksidant (De Petrocellis in sod., 2011) in proti krčem gladkih mišic (Pacher in sod., 2006). Poleg pozitivnih učinkov ima tudi mnoge neželene, kot sta tesnoba in imunosupresija (Russo, 2011). CBD, ki je dekarboksilirana oblika CBDA, ima veliko farmakoloških učinkov in je pomembna substanca, ki zmanjšuje neželene učinke THC ter posledično zvišuje varnost ekstraktov iz konoplje (Englund in sod., 2012). V študijah na živalih so ugotovili, da deluje protivnetno in vpliva na imunski sistem (Burstein, 2015). CBD je tudi zelo obetajoča substanca za zdravljenje bolezni centralnega živčnega sistema (Hill in sod., 2012). Vsebuje protibakterijske in protiglivne komponente, ugotovljeno je bilo delovanje na bakterijo *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Appendino in sod., 2008). CBD je tretji izmed pomembnejših kanabinoidov in ima protivnetne učinke (DeLong in sod., 2010), je sedativ, analgetik (Davis in Haoum, 1983) in deluje protibakterijsko ter protiglivno (Eisohly in sod., 1982). Je inhibitor privzema anandamida, ki je endogeni ligand CB receptorjev (De Petrocellis in sod., 2011). V primerjavi s THC ima kanabinol (CBN) manjšo afiniteto do CB1 receptorjev in višjo do CB2 in ima zaradi tega večji učinek na imunski sistem kot na centralni

živčni sistem (McPartland in Russo, 2001). Tudi CBG je zelo obetajoč kanabinoid, za katerega predlagajo predklinične študije pri zdravljenju kronične vnetne črevesne bolezni (Borrelli in sod., 2013).

2.3 KEMOTIPI KONOPLJE

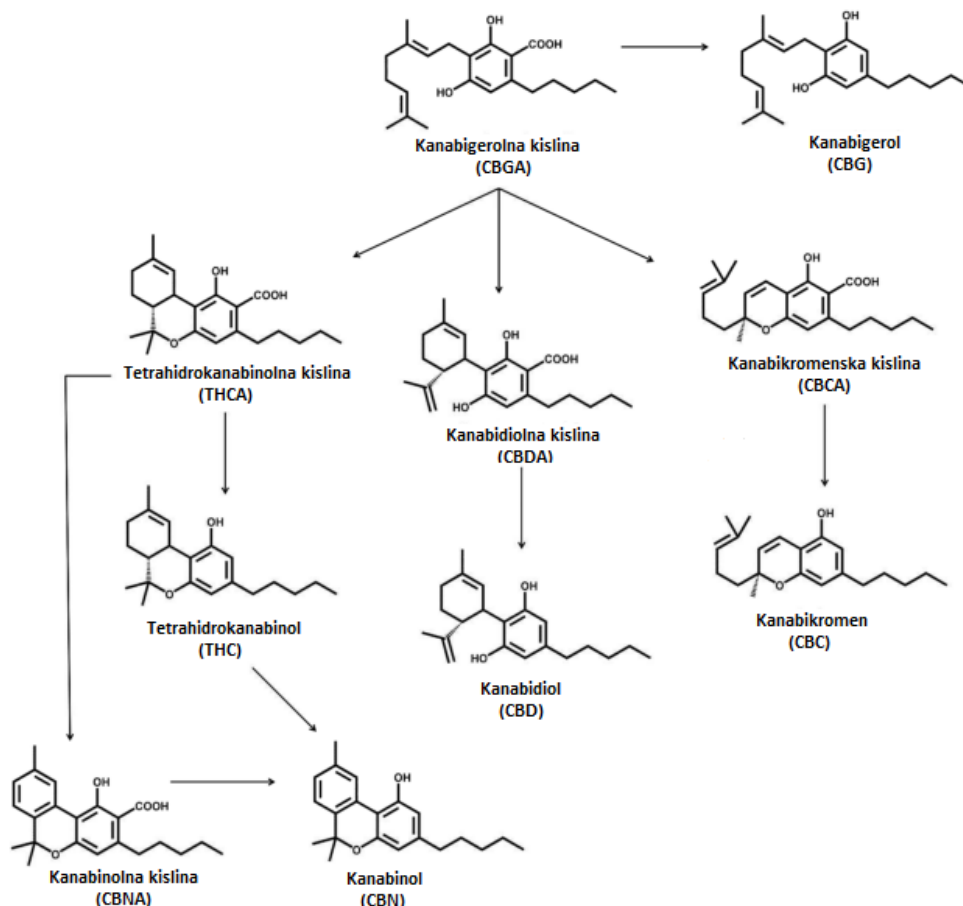
Fike in sod. (2016) v preglednem članku omenjajo, da se lahko vrednost THC med posameznimi rastlinami razlikuje, ker je odvisna od razvojne faze rastline in pogojev rasti. Bolj natančno je merjenje razmerja med CBD in THC, saj razmerje ostaja konstantno v vseh razvojnih fazah (Staginnus in sod., 2014). Rastline, ki vsebujejo manj kot 0,2 % THC (suhe teže) v socvetjih, spadajo med industrijsko konopljo (Sarmiento in sod., 2015).

Aizpurua-Olaizola in sod. (2016) so ugotovili, da poznamo pet različnih kemotipov konoplje, glede na vsebnost dveh glavnih kanabinoidov CBD in THC. Kemotip I, kamor uvrščamo medicinsko konopljo, predstavljajo rastline z visoko koncentracijo THC in nizko CBD (razmerje THC/CBD \gg 1,0), kemotip II predstavljajo rastline z vmesnimi vsebnostmi (razmerje THC/CBD je med 0,5 in 2,0), med rastline kemotipa III pa uvrščamo rastline z nizko vsebnostjo THC in visoko vsebnostjo CBD (THC/CBD \ll 1,0), kamor spada industrijska konoplja. Rastline kemotipa IV spadajo med industrijsko konopljo, vendar je njihov glavni kanabinoid CBG. Med kemotip V pa se uvrščajo rastline, ki skoraj ne vsebujejo kanabinoidov. Z genskimi analizami so ugotovili, da je kemotip odvisen od prisotnosti dveh kodominantnih alelov B_T in B_D na B lokusu, ki preko encimov določata vsebnost in razmerje med THC in CBD. Iz tega sledi, da so B_T/B_T rastline kemotip I, B_D/B_D rastline so kemotip III, B_D/B_T pa predstavljajo kemotip II. Na tem lokusu se lahko nahajajo tudi nefunkcionalni aleli B_0 , ki ne morejo spreminjati CBGA. Ta v rastlini prevladuje, zato spada med kemotip IV.

2.4 BIOSINTEZA

Aizpurua-Olaizola in sod. so leta 2016 v raziskavi ugotavljali razvoj glavnih kanabinoidov in terpenov med rastjo ter vpliv kemotipa na njihovo vsebnost v konoplji. Izbrali so sedem različnih rastlin, od tega so bile po tri kemotip I in III ter ena rastlina kemotip II. Pod kontroliranimi pogoji so gojili petdeset klonov vsake matične rastline. Vsak teden so tri rastline vsakega kemotipa odrezali in posušili ter ločeno analizirali cvetove ter liste. Z metodo HPLC-DAD so analizirali osem glavnih kanabinoidov, 28 terpenov pa so določevali z metodo GC-FID ter potrdili z GC-MS. Za ta poskus so uporabili rastline, ki so prehajale v fazo cvetenja, ko je vsebnost kanabinoidov največja. Povišanje so zaznali v listih in cvetovih, kjer se tvori največ trihomov. Najvišja koncentracija THCA in CBDA v cvetovih je bila odvisna od kemotipa in stopnje razvoja. Rastlinam kemotipa I je v devetem tednu cvetenja koncentracija upadala zaradi začetka senescence, medtem ko so pri tipu II in III opazili naraščanje koncentracije do konca študije. CBGA je kanabinoid, ki je prvi v biosintezi kanabinoidov in iz njega se sintetizirajo THCA, CBDA in CBCA. Razvoj CBGA v listih je enak razvoju THCA in CBDA do začetka cvetenja, kjer se je koncentracija THCA in CBDA zviševala, koncentracija CBGA pa ne. Pri kemotipu I je bila konstantna, pri preostalih dveh kemotipih pa se je koncentracija znižala. Vsebnosti CBGA in THCA sta bili v času rasti stabilni, regulirani sta z B_T alelom. Nasprotno vsebnost CBDA, ki je regulirana z B_D alelom, ni bila stabilna. Analizirali so tudi 8 monoterpenov ter 20 seskviterpenov. Trend izražanja monoterpenov je bil podoben izražanju THCA in CBDA in je bil odvisen od kemotipa. Seskviterpeni so imeli drugačen vzorec. V listih je bil trend izražanja enak do prvih tednov

cvetenja, nato pa je koncentracija ostala stabilna. V cvetovih se količina seskviterpenov med cvetenjem ni spreminjala. Kemotipa II in III sta si bolj podobna, medtem ko je koncentracija CBDA pri kemotipu I višja.

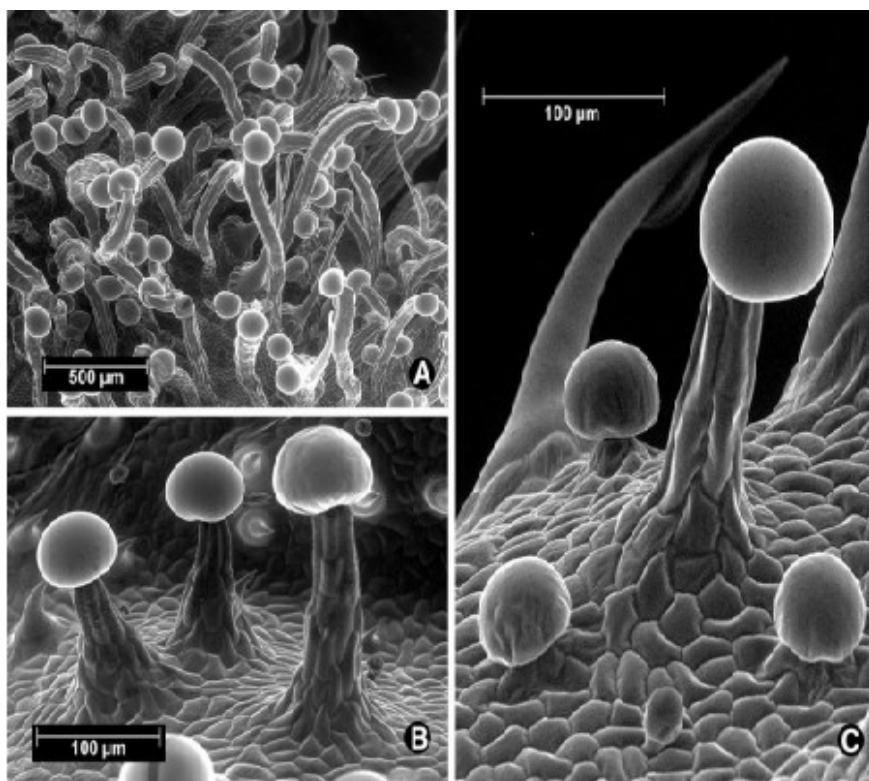


Slika 1: Pot sinteze in biosinteze kanabinooidov v konoplji (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016: 325)

2.4.1 Trihomi

Biosinteza kanabinooidov je lokalizirana predvsem v žlezni trihomih, kjer se tudi shranjujejo. Glavičasti trihomi ali laski so sestavljeni iz dveh delov - iz žlezni celic, ki se nahajajo v glavi ter peclja. Diskaste celice v glavi trihoma proizvajajo kanabinoide, obdaja pa jih votlina za shranjevanje (Happyana in sod., 2013). Trihomi se delijo v dve glavni kategoriji: žlezni in ne žlezni trihomi. Konoplja vsebuje tri različne razrede žlezni trihomov: glavičaste na dolgem peclju (ang. long-stalked capitate), glavičaste na kratkem peclju (ang. short-stalked capitate) in trihome brez peclja (ang. stalkless) (Small in Naraine, 2016). Glavičasti trihomi na dolgem peclju se pojavljajo samo med časom cvetenja v visoki gostoti na cvetnih listih in ovršnih listih, kjer so številčnejši. Analize so pokazale prisotnost glavičastih trihomov na kratkem peclju na cvetovih, steblih ter listih med vegetativnim obdobjem in obdobjem cvetenja. Glavičaste trihome z dolgim pecljem torej najdemo samo na cvetovih, tiste s kratkim pecljem pa poleg cvetov še na listih in steblih. Trihomi brez peclja imajo obliko balona in so najmanjši trihomi na površini rastline. Sestavljeni so iz dveh do največ štirih celic. Prisotni so na

cvetovih in listih, največ jih je na steblih, najmanjšo gostoto pa dosežejo na ovršnih listih (Happyana in sod., 2013).



Slika 2: Posnetki elektronske mikroskopije trihomov konoplje s spodnje povrhnjice ovršnih listov: (A) Visoka koncentracija glavičastih trihomov na dolgem peclju, (B) trije glavičasti trihomi na dolgem peclju, (C) glavičasti trihom na dolgem peclju na sredini, v okolici se nahajajo trije glavičasti trihomi na kratkem peclju (Small in Naraine, 2016: 350)

Happyana in sod. (2013) so raziskovali biosintezo kanabinoidov. Vzorcem trihomov, odvzetim po petem od skupnih osmih tednov rasti rastlin, so najprej določili kvalitativen profil kanabinoidov. Vsi vzorci, odvzeti med fazo cvetenja, so vsebovali THCA, CBDA, CBGA, THC, CBD in CBG, med tem ko so CBC in CBN določili samo v glavičastih trihomih v 8. tednu rasti. Po kvantitativni analizi so ugotovili, da je koncentracija kanabinoidov v glavičastih trihomih višja kot v brezpečljatih; najvišjo koncentracijo kanabinoidov pa je rastlina proizvedla v 8. tednu.

Velikost žlezni trihomov vplivala na količino kanabinoidov (Weiblen in sod., 2015). Večina THC se v konoplji sintetizira v glavah žlezni trihomov. Po žetvi se glave trihomov pri sobnih pogojih skrčijo v premeru, in sicer po eksponentni premici v odvisnosti od časa. Premer se zmanjšuje za 15 % po prvem mesecu, za 24 % po enem letu, za 32 % po 50 letih in po stoletju za 34 %. Vzorec medicinske konoplje z visoko vsebnostjo THC je imel v povprečju premer glave 129 µm, vzorec industrijske konoplje z nizko vsebnostjo THC pa v povprečju 80 µm. Povprečne prostornine glav trihomov pri sortah medicinske konoplje so bile več kot štirikrat večje kot pri sortah industrijske konoplje. Toda vse sorte medicinske konoplje nimajo velikih žlez. Majhne žleze imajo na primer nekateri relativno primitivni lokalni genotipi medicinske konoplje, kot tudi industrijska konoplja. Sorte z visoko vsebnostjo THC imajo večje žleze, velikost glav trihomov pa je tudi bolj raznolika v primerjavi s sortami z nizko vsebnostjo

THC. Elitne sorte medicinske konoplje so rezultat nedavnega žlahtnjenja, neenakost velikosti žlez pa se najverjetneje izraža zaradi pomanjkanja genetske stabilnosti (Small in Naraine, 2016).

2.5 CBDA- IN THCA-SINTAZA

CBDA in THCA sta kanabinoida, od katerih je odvisen kemotip rastline in nastaneta s pomočjo podobnih reakcijskih mehanizmov tako v medicinski kot tudi industrijski konoplji. Zrela CBDA sintaza (CBDAS) je sestavljena iz 517 aminokislinskih ostankov. Teoretična molekulska masa, preračunana iz sestave aminokislin, je 58,863 Da, kar pa se ne sklada z molekulsko maso očiščenega encima, ki je nižja (pribl. 74 kDa). Razlika bi lahko bila posledica postranslacijskih modifikacij, kot je glikozilacija, saj je znanih 7 glikozilacijskih mest na zreli CBDA sintazi. Strukturna homologija med CBDA sintazo in THCA sintazo (THCAS) je zanimiva, saj oba encima katalizirata podobne oksidociklizacijske reakcije s skupnim substratom CBGA. Nukleotidni zaporedji obeh encimov imata visoko homologijo (83,9 % identiteto ter prekrivanje 544 aminokislin) kar kaže na evolucijsko povezavo. CBDA in THCA sintaza sta se razvili iz skupnega prednika s spremembami aminokislinskih ostankov, ki vplivajo na strukturo njunih produktov. CBDA sintaza je pokazala visoko homologijo (40 do 50 % identitete) z različnimi oksidoreduktazami. Ti rastlinski encimi, vključno s THCA sintazo, so flavoencimi in imajo kovalentno vezan flavin adenin nukleotid (FAD). Analiza proteinskih motivov je pokazala, da CBDA sintaza sodi v isto skupino encimov, saj je bilo zaporedje, značilno za FAD vezavna mesta med vsemi flavoencimi, prisotno na CBDA sintazi. Kljub različnim katalitskim funkcijam imajo flavoencimi med sabo visoko sekvenčno homologijo (Taura in sod., 2007).

Reakcijski mehanizem CBDA sintaze je bil dolgo neznan, ker se za oksidacijo CBGA ne potrebuje koencimov ali kofaktorjev. Sekvenčne analize kažejo na to, da CBDAS vsebuje flavin, ki ima v tem primeru funkcijo koencima. Reakciji obeh encimov sta spodbujeni s prenosom hidridnega iona iz CBGA na reaktivno N-5 pozicijo na FAD. Pomembna razlika med tema dvema reakcijama je v prenosu protona. CBDA sintaza privzame proton iz terminalne metilne skupine CBGA, med tem ko je pri THCA sintazni reakciji proton odstranjen iz hidroksilne skupine substrata. Po eliminaciji protonov je končni korak reakcije stereoselektivno zapiranje obroča, ki poteka na aktivnem mestu obeh kanabinoidnih sintaz in tvori CBDA ter THCA. Hidridni ion se prenese iz reduciranega flavina na molekularni kisik, kar vodi v nastanek vodikovega peroksida in reaktivacijo flavina za naslednji cikel. Zaradi teh funkcionalnih podobnosti samo majhno število aminokislin vpliva na specifičnost produkta kanabinoidne sintaze (Taura in sod., 2007).

Med B_T/B_T genetskimi viri obstaja pomembna raznolikost v zaporedju za nastanek THCA sintaze. Takšna rastlina zaradi nedelujoče THCA sintaze CBGA ne more pretvarjati v THCA, kar povzroči kopičenje CBGA. Predvidevajo, da ta mutacija predstavlja nov alel, poimenovan B_{T0} . B_D/B_D genotipi niso imeli izraženih THCA sekvenc. Obstajata še dve različici, ki akumulirata izredno nizko vrednost CBDA, kljub temu da sta bili označeni za B_D/B_D . Zaradi nefunkcionalne CBDA sintaze se akumulira neaktivirani prekurzor CBGA. Ti dve različici predstavljata B_{D0} mutacije. Zaporedje, ki kodira minimalno funkcionalno CBDA sintazo, poimenujemo B_{D01} . Zaporedje, ki pa kodira popolnoma nefunkcionalno CBDA sintazo, pa

B_{D02}. Pretvorba CBGA v THCA in CBDA v večini primerov ni transkripcijsko regulirana. Šibka, ampak še vedno funkcionalna sintaza, kodirana z B_{Dw} alelom, ima tudi posebno mutacijo, ki posledično delno akumulira CBGA zaradi delne aktivnosti CBDA sintaze. B_{Dw} in B_{D02} CBDA sintazi z nepopolno funkcijo sta se razvili iz popolnoma funkcionalne CBDA sintaze, ki jo kodira isto zaporedje in si delita štiri od petih aminokislinskih variacij. Našli so več kot eno izraženo sekvenco za THCA in CBDA, ki vsebujejo odprt bralni okvir, ki omogoča translacijo v celoten protein. V primerih, ko so imele rastline visoke vrednosti CBGA, so zaznali različne mutacije na sekvencah za CBDA in THCA, kar pojasni kopičenje CBGA. Tem sekvencam so dodali nove alelne kode, ki razširijo alelne serije lokusa B (B_{Dw}, B_{D01}, B_{D02}, B_{T0}). Substitucije aminokislilin opažene pri mutantih ne vplivajo na terciarno strukturo ali na ekspresijo THCA v heterolognih sistemih (Onofri in sod., 2015).

2.5.1 Dedovanje in vpliv na kemotip

Dedovanje genov za glavna kanabinoida THC in CBD so najprej razlagali po splošnem Mendlovem modelu dedovanja, ki vključuje kodominantne alele na enem lokusu. Encima THCA sintaza ter CBDA sintaza naj bi bila produkta alelnih variant na enem lokusu, zato so predvidevali, da je medicinska konoplja homozigotna za THCA sintazo, industrijska konoplja pa homozigotna za CBDA sintazo, njun križanec pa je intermediat (de Meijer in sod., 2003). Toda dedovanje genov, ki kodirajo glavne kanabinoidne biosintetske encime, naj bi potekalo po alternativnem modelu, ki vključuje vsaj dva lokusa (Kojoma in sod., 2006).

Weiblen in sod. (2015) so preučevali princip dedovanja genov za THC in CBD pri medicinski in industrijski konoplji tako, da so oba tipa križali med sabo. 540 genetsko različnih rastlin konoplje so razvrstili v tri skupine: medicinska konoplja, industrijska konoplja in njuni križanci ali intermediiati. Kot kriterij so vzeli vsebnosti dveh glavnih kanabinoidov, in sicer po načelu, da razmerje $\log(\%THCA/\%CBDA) \geq 1.0$ pomeni medicinsko konopljo, $\log(\%THCA/\%CBDA) \leq 1.0$ pomeni industrijsko konopljo in $\log(\%THCA/\%CBDA) > 1.0$ in < 1.0 pomeni intermediiata.

Vse F1 rastline so bile intermediiati, segregacija kanabinoidnih fenotipov v F2 generaciji je bila v skladu z Mendelskim razmerjem 1:2:1. Neodvisno od kvalitativnih razlik v vsebnosti kanabinoidov pa je bila skupna vsebnost kanabinoidov med medicinsko in industrijsko konopljo različna. Medicinska konoplja je v povprečju vsebovala 4,5-krat več kanabinoidov na enoto biomase socvetja kot industrijska konoplja in F1 intermediiatne rastline. Medicinska konoplja F2 generacije je imela signifikantno nižjo povprečno vsebnost kanabinoidov kot starševska medicinska konoplja, med tem ko so imele F2 rastline industrijske konoplje signifikantno višjo vsebnost kanabinoidov kot starševska konoplja. 62 rastlin iz F2 populacije so genotipizirali s 103 AFLP markerji in 16 mikrosatelitnimi markerji. Sekvencirali so CBDA in THCA sintazo ter izdelali genetsko mapo.

Sekvencirana nukleotidna zaporedja THCA in CBDA sintaznih genov v sortah Skunk #1 (medicinska konoplja), Carmen (industrijska konoplja) kot tudi v F1 intermediiatnih rastlinah so bila podobna že znanim zaporedjem za THCA in CBDA sintazo. Med 139 kloni so določili devet različnih sekvenc obeh genov. Filogenetska analiza z vsemi poznanimi zaporedji sintaznih encimov kanabinoidov je pokazala, da medicinska konoplja ne vsebuje

funkcionalnega CBDAS gena, ampak samo homologe za THCAS gen, medtem ko industrijska konoplja vsebuje funkcionalne homologe tako za CBDAS kot tudi za THCAS. Socvetja rastlin medicinske in industrijske konoplje so imela signifikantno različno gensko ekspresijo THCAS in CBDAS genov, kar so določali s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo z reverzno transkriptazo (RT-qPCR). Ekspresija THCA sintaze v socvetjih medicinske konoplje je bila večja kot v socvetjih industrijske konoplje, CBDA sintaza pa je bila bolj aktivna v socvetjih industrijske konoplje. Socvetja F2 rastlin, ki so imela večjo ekspresijo CBDA sintaze, so imela večjo vsebnost CBDA kot THCA, med tem ko so socvetja F2 rastlin, ki so imela višjo ekspresijo THCA sintaze, imela višjo vsebnost THCA kot CBDA. F2 rastline, za katere so ugotovili približno enako ekspresijo CBDAS in THCAS, so bile intermediatnega fenotipa. Sekvenciranje produktov RT-qPCR je potrdilo, da izraženi geni intermediatnih rastlin ustrezajo THCA in CBDA sintaznim genom njihovih staršev. F2 rastline s povišano vrednostjo CBDA so izražale funkcionalni homolog CBDA sintaze in relativno nizko vrednost THCA sintaze industrijske konoplje. Povišana vsebnost THCA je bila povezana z ekspresijo THCA sintaze medicinske konoplje in nizkih vrednosti nefunkcionalne CBDA sintaze.

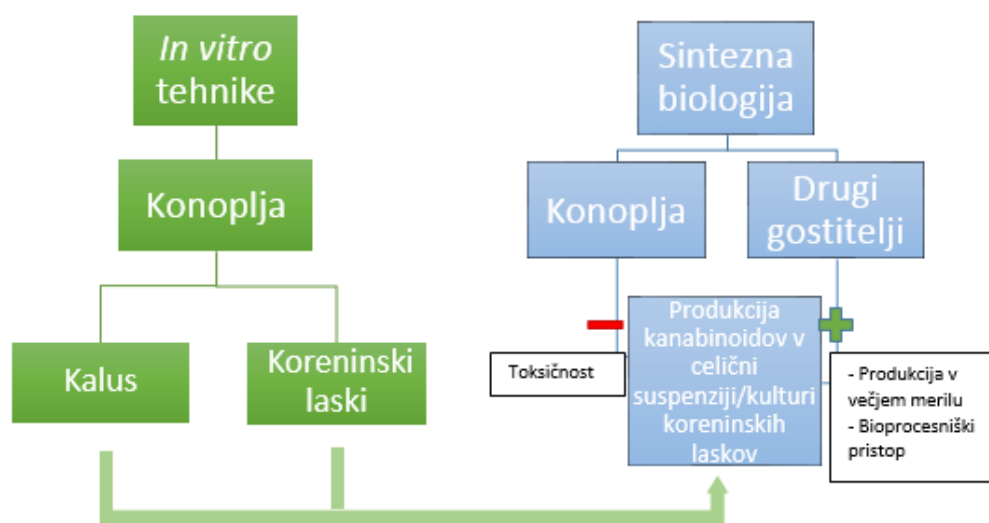
V opisani študiji porazdelitev in ekspresija homologov kanabinoidnih sintaz med potomci medicinske konoplje, križane z industrijsko konopljo, kaže na to, da se gena za THCAS in CBDAS nahajata na dveh ločenih lokusih. To potrujeta dve dejstvi: 1) po petih generacijah samoopraševanja bi predvidevali, da bodo starševske linije postale homozigotne, ampak sta Carmen in Skunk #1 pridobila 4 in 5 homologov kanabinoidne sintaze. Na podlagi tega lahko predvidevamo obstoj multiplih lokusov; 2) med devetimi različnimi homologi v mapirani populaciji so samo štirje pokazali gensko izražanje. Rastline medicinske konoplje so izražale funkcionalno THCA sintazo in nefunkcionalno CBDA sintazo. Rastline industrijske konoplje pa so izražale obe funkcionalni sintazi (THCAS in CBDAS). Vseeno pa so bili vsi štirje homologi prisotni v F2 intermediatnih rastlinah. To močno kaže na heterozigotnost na različnih lokusih za THCA in CBDA sintazo.

Po pregledu THCA/CBDA razmerja v intermediatnih rastlinah so ugotovili, da THCA in CBDA sintazi nista enako dovzetni za porabo prekursorja CBGA, ki si ga delita. Če bi bila tendenca za porabo med encimoma enaka, bi pričakovali razmerje 1:1 med THCA/CBDA pri rastlinah, ki izražajo funkcionalne kopije obeh encimov. Tako pa je bilo razmerje nagnjeno proti CBDA. Intermediatne rastline proizvajajo predvsem CBDA, kljub izražanju funkcionalne THCA sintaze, zato ima očitno CBDA sintaza večjo afiniteto za porabo kanabigerolne kisline (CBGA).

3 BIOTEHNOLOŠKE METODE

Zaradi pomembnosti kanabinoidov so za prihodnost zagotovo zanimive strategije za povečanje sekundarnega metabolizma ali pa povečanje gostote trihomov na konoplji. Andre in sod. (2016) navajajo metode za razmnoževanje konoplje *in vitro*, ki lahko poteka preko stimulacije aksilarnih brstov na nodalnih segmentih ali pa z indukcijo adventivnih poganjkov na rastnih vršičkih poganjkov (Lata in sod., 2009a; Wang in sod., 2009). Mikropropagirane rastline so bile genetsko stabilne, zato je metoda primerna za klonsko namnoževanje (Lata in sod., 2010). Razvit je bil tudi protokol za propagacijo z umetnimi semeni. Aksilarne poganjke ali nodalne segmente so kapsulirali v kapsule iz kalcijevega

alginata (Lata in sod., 2009a; 2011). Sistem omogoča uspešno rast homogenih in genetsko stabilnih rastlin tudi po 6 mesečnem shranjevanju (Lata in sod., 2011).



Slika 3: Dosežki (zeleni okvirji) in potencialni pristopi v prihodnosti (modri okvirji) za pridobivanje kanabinoidov v kulturah konoplje in v drugih rastlinskih gostiteljih (prirejeno po Andre in sod., 2016: 9)

3.1 MIKROPROPAGACIJA

Lata in sod. (2010) so za mikropropagacijo uporabili izsečke mladih listov potaknjencev klona elitne rastline, saj so bili bolj uspešni v primerjavi z listi odrasle cvetoče matere rastline. Med testiranimi različnimi koncentracijami različnih regulatorjev rasti so se najboljše izkazali avksin NAA (1-naftalen očetna kislina) v kombinaciji z 1 μM citokininom TDZ (tidiazuron) za indukcijo kalusa, TDZ za formacijo poganjkov in citokinin IBA (indol-3-maslena kislina) za nastanek korenin. Listni izsečki so bili inokulirani na MS gojišču s 3 % (w/v) saharozo, 0,8 % (w/v) agarjem tipa E, ki je bil obogaten z različnimi koncentracijami avksinov IAA (indol očetna kislina), IBA, NAA in avksinom 2,4-D (2,4-diklorofenoksi očetna kislina) v kombinaciji s TDZ-jem za testiranje indukcije kalusa. Eden do dva tedna po inokulaciji so se listni izsečki povečali ter tvorili kalus na vseh gojiščih. Od testiranih avksinov je NAA v različnih koncentracijah induciral največ kalusa (pribl. 82 %) iz listnih izsečkov. Interakcija drugih avksinov s citokininom TDZ v enakih koncentracijah je bila manj uspešna. Najučinkovitejše gojišče je bilo sestavljeno iz MS osnovnega gojišča z dodatkom 0,5 μM NAA in 1,0 μM TDZ. NAA v višji koncentraciji je induciral manjšo tvorbo kalusa. TDZ je znan citokinin za nastanek kalusa pri lesnatih rastlinah. Izpostavitve rastlin kombinaciji avksina ter TDZ je pokazalo, da naj bi TDZ vseboval avksinom podobne snovi, kar lahko vpliva na delovanje endogenih avksinov tako, da spremeni biosintezo ali metabolizem. Kljub temu, da je konoplja tvorila korenine na vseh gojiščih z dodatkom različnih koncentracij avksinov, je bil najvišji odstotek tvorbe korenin (80 do 96 %) dosežen pri uporabi IBA, ki je bil boljši od IAA in NAA.

Alternativni pristop dosedanjim dognanjem je lahko uporaba organogenega kalusa, pridobljenega iz mladih listnih tkiv za indukcijo poganjčnih brstov z naknadno regeneracijo. Regeneracijo rastlin s pomočjo listnega kalusa in internodijev, aksilarnih brstov ter listnih pecljev so dosegli tudi z drugimi hormoni, kot so 2,4-D, KN (kinetin), IBA in BAP (6-

benzilaminopurin). Ti hormoni niso dosegli tako visoke frekvence induciranih poganjkov kot TDZ (Lata in sod., 2010).

Lata in sod. (2016) so ugotovili, da se aromatični citokinin mT (meta topolin) od izoprenskih citokininov, kot sta npr. zeatin in 2-iP, razlikuje po biokemijski in biološki aktivnosti. Topolini spodbujajo proliferacijo poganjkov, povečujejo histogensko stabilnost, ukoreninjenje in zmanjšujejo možnost fizioloških nepravilnosti med mikropropagacijo. Testirali so več različnih citokininov ter avksinov in med vsemi se je za formacijo poganjkov najbolje odrezala kombinacija MS gojišča+TDZ, za nastanek korenin pa 1/2 MS+IBA. To so ugotovili na podlagi testiranja različnih koncentracij TDZ z MS gojiščem, ter različnih koncentracij IBA s polovičnim MS gojiščem. Nato so primerjali učinke kombinacij v primerjavi z učinkovitostjo meta topolina. Kulture so bile inkubirane pri 25 ± 2 stopinjah Celzija s 16-urno fotoperiodo pod fluorescentno svetlobo in pH 5,7. Namen tega dela je bil izboljšati obstoječ protokol pri mikropropagaciji konoplje. V prejšnji študiji so preverjali dva rastna regulatorja za formacijo poganjkov, in sicer TDZ v koncentraciji $0,5\ \mu\text{M}$, za korenine pa IBA v koncentraciji $2,5\ \mu\text{M}$. V tej študiji so odkrili poenostavljen postopek z enim korakom zaradi uporabe meta topolina. Največje povprečno število poganjkov (dolžina $13,44\pm 1,38$ cm) se je razvilo pri tretiranju z $\text{MS}+2,0\ \mu\text{M}$ mT, maksimalna dolžina poganjkov je bila $11,44\pm 0,80$ cm. Vsi izsečki, inokulirani na ta način, so bili sposobni razviti poganjke. V primerjavi s TDZ je mT dosegel boljše rezultate v povprečnem številu poganjkov in njihovi dolžini. Po treh tednih rasti v svežem gojišču z enako sestavo $\text{MS}+\text{mT}$, so se korenine začele pojavljati med 3. in 4. tednom. Popolno razvite korenine so se razvile po 6 tednih. Najboljša koncentracija za razvoj korenin je $2,0\ \mu\text{M}$ mT, 96 % regeneriranih poganjkov je razvilo korenine s povprečjem 14 korenin na poganjek in dolžino poganjka $18,68\pm 1,07$ cm po 4 tednih od prenosa na sveže gojišče. Koncentracija meta topolina nad $4\ \mu\text{M}$ deluje inhibitorno na razvoj korenin. V primerjavi z avksinom IBA je število in povprečna dolžina korenin signifikantno višja pri uporabi mT, opazili pa so tudi boljše zakoreninjenje med aklimatizacijo kot pri poganjkih, ki so rasli s TDZ. Pri *in vitro* propagiranih rastlinah na genetsko stabilnost in produkcijo sekundarnih metabolitov vplivajo različni dejavniki. To so na primer vpliv okolja, izbira in koncentracija rastnih faktorjev in podobno. V opisani študiji so se *in vitro* propagirane rastline nahajale pod enakimi okoljskimi pogoji kot matična rastlina, profil in vsebnost kanabinoidov je bil primerljiv.

Kot so navedli v preglednem članku Andre in sodelavci (2016), imajo suspenzijske celične kulture prednost pred tkivnimi kulturami, saj jih lahko transformiramo in nato gojimo v bioreaktorjih za produkcijo koristnih metabolitov (Weathers in sod., 2010; Bortesi in sod., 2012; Liu in sod., 2012; Han in sod., 2014). Celične kulture kalusa konoplje ne proizvajajo kanabinoidov, ne glede na kemotip konoplje (Pacífico in sod., 2008). Povečano produkcijo kanabinoidov v celični suspenziji celic konoplje lahko dosežemo z ekspresijo transkripcijskih faktorjev, ki so prisotni pri biokemiji žlez konoplje. Transkripcijski faktorji so pomembno orodje zaradi njihovega kaskadnega delovanja. Ob prisotnosti glavnega regulatorja biosinteze kanabinoidov v trihomih so lahko konstitutivno ali inducibilno izraženi tudi v konopljinih celičnih suspenzijskih kulturah. Inducibilna ekspresija omeji negativne učinke, ki so posledica toksičnosti akumuliranih kanabinoidov med rastjo transformiranih celic (Marks in sod., 2009). Z biotehnološkimi metodami lahko tudi povečamo produkcijo sekundarnih metabolitov. Biotski in abiotski stres, ki ga po navadi uporabljajo za stimuliranje

sekundarnega metabolizma, ni povzročil povečanja koncentracije kanabinoidov v konopljinih celičnih suspenzijah (Flores-Sanchez in sod., 2009).

3.2 GENSKA TRANSFORMACIJA

Andre in sod. (2016) navajajo, da je konoplja je zahtevna rastlina za transformacijo zaradi nizke stopnje regeneracije, ki pa je odvisna od sorte, tkiva, starosti rastline ter kombinacije regulatorjev rasti (Slusarkiewicz-Jarzina in sod., 2005). Kljub uspešni transformaciji kalusa konoplje z *Agrobacterium tumefaciens* nediferencirane celice niso regenerirale poganjkov (Feeney in Punja, 2003). Kolorimetrični testi so pokazali uspešno ekspresijo transgena pri celicah, ki so bile transformirane s fosfomanozo izomerazo. Nekaj uspešnih transformacij je bilo povezanih z izbiro specifičnih regulatorjev rasti. Dodatek citokinina tidiazurona (TDZ) je vplival na povečanje razvoja poganjkov pri izsečkih (Lata in sod., 2009a) in kalusa, pridobljenega iz listov klona konoplje z visoko vsebnostjo THCA (Lata in sod., 2010). Tudi herbicid DICAMBA je pozitivno vplival na regeneracijo poganjkov iz kalusa (Slusarkiewicz-Jarzina in sod., 2005). Protokoli z uporabo izsečkov so se začeli uporabljati predvsem zaradi tega, da se lahko izognemo pasaži nediferenciranih celic. Uspešna transformacija je potekala pri protokolu, kjer so uporabili rastne vršičke poganjka, ki imajo regeneracijski potencial apikalnega meristema poganjka po infekciji z bakterijo *A. tumefaciens* (MacKinnon in sod., 2001). Uspešni pa so bili tudi pri transformaciji, kjer so uporabili 1 od 2 cm dolge hipokotilne izsečke in jih inkubirali na gojišču s hormonoma zeatinom ter 6-benzilaminopurinom (BAP) (Sirkowski, 2012).

Ker je uspešen regeneracijski protokol pogoj za uspešno genetsko transformacijo, mikropropagacijo in ohranjanje genetskih virov, so Chaohua in sod. (2015) predstavili hitri protokol za *in vitro* regeneracijo poganjkov, kjer so uporabili kotiledone oz. klične liste. Ker se kalus pojavi na listih v 10 tednih ali več, je bil cilj razviti čim bolj časovno učinkovit protokol za *in vitro* regeneracijo poganjkov. V poskusu so testirali različne kombinacije avksina NAA z različnimi koncentracijami citokininov TDZ (tiazuron), BA (N⁶ benziladenin) in ZT (zeatin) v MS gojišču. Kombinacija citokinina TDZ v MS gojišču se je bolje izkazala v induciranju *in vitro* poganjkov kot kombinacije z BA in ZT. Najboljši rezultat (51,7 % uspešnost ter 3,0 poganjki na izseček) so zabeležili pri rasti na MS gojišču, ki vsebuje 0,4 mg/l TDZ in 0,2 mg/l NAA (T4N2). *In vitro* poganjki so zrastle v višino med 1,5 in 2 cm v 3 do 4 tednih po začetku gojenja v kulturi. V tem času je 80 % poganjkov tvorilo korenine na gojišču MS s polovičnimi koncentracijami, kombiniranimi z 0,5-2 mg/l IBA 4-5 tednov pred aklimatizacijo. Mlajši kotiledoni, ki so bili odvzeti 2-3 dni po kalitvi rastlin, so pokazali boljše regeneracijske sposobnosti v primerjavi s tistimi, odvzetimi 5-6 dni po kalitvi rastlin. Frekvenca regeneracije je variirala od 37, 7% do 54, 8%, kar nakazuje na uspešen protokol, ki pa je delno odvisen od genotipa. Protokol je alternativna metoda mikropropagacije in shranjevanja genetskega materiala, *in vitro* gojene rastline pa so primerne za transformacijo.

3.2.1 Kulture koreninskih laskov

Andre in sodelavci (2016) so povzeli, da lahko industrijska proizvodnja komponent s farmakološkimi učinki poteka tudi v sistemu koreninskih laskov, ki je tip rastlinskega tkiva transformiran z *A. tumefaciens*, ki so ga uporabljali za študij metabolizma rastlin (Wahby in sod., 2013). Konopljo so transformirali z bakterijama *A. tumefaciens* in *A. rhizogenes*, na

infekcijo se je najbolje odzvalo hipokotilno tkivo. Sistem koreninskih laskov je primeren za produkcijo sekundarnih metabolitov v zdravih rastlinah ali pa za transformacijo modelnih rastlin, ki nato izločajo industrijsko pomembne metabolite (Jiao in sod., 2014; Patra in Srivastova, 2014; Wawroschet in sod., 2014; Gai in sod., 2015; Tian, 2015). Poznan je uspešen primer proizvodnje THCA v koreninskih laskih tobaka (Sirikantaramas in sod., 2007).

Sistem koreninskih laskov je hormonsko neodvisen, hitro rastoč sistem z enakim metabolnim potencialom, kot ga ima izvorni organ (Pistelli in sod., 2010). Kulturo koreninskih laskov iz kalusa konoplje so pridobili z gojenjem kalusa na B5 gojišču z dodatkom 4 mg/l 1-naftalenocetne kisline (NAA) in opazovali produkcijo kanabinoidov. Po 28 dneh kultivacije v temi so opazili akumulacijo kanabinoidov v gojišču kulture z različnimi koncentracijami indol-3-ocetne kisline (IAA). Izkoristek kanabinoidov je bil pod 2 µg/g suhe mase rastline in na tem področju je potrebna optimizacija. Produkcija kanabinoidov v kulturah koreninskih laskov konoplje lahko izboljšamo z dodatkom adsorbentov, ki zmanjšajo težave s toksičnostjo ter z inducibilnimi promotorji, kot je glukokortikoid - inducibilni promotor, s katerim so do sedaj povzročili kontrolirano, reverzibilno in koncentracijsko odvisno ekspresijo zelenega fluorescentnega proteina (GFP) v koreninskih laskih *Catharanthus roseus* (Hughes in sod., 2002).

Wahby in sodelavci so leta 2013 raziskovali transformacijo korenin petih sort konoplje: Futura 77, Delta-Ilosa, Delta405, ki so sorte industrijske konoplje ter CAN0111 in CAN0221, ki sta sorti medicinske konoplje. Hipokotili nepoškodovanih rastlin so bili najbolj dovzeten material, ki je tvoril majhne, na izgled mesnate tumorje iz ran, kar je značilno za koreninske laske. Aseptično ranjene rastline, ki so bile kontrola za tvorbo kalusa, niso tvorile izrastkov. Tobak (*Nicotiana tabacum*) je bil uporabljen kot kontrola za formacijo korenin zaradi lastnosti visoke dovzetnosti za transformacijo z *Agrobacterium*. Enostavna sestava gojišča z 20 µM acetosiringona je dala zadovoljive rezultate, druga indukcijska gojišča pa niso imela velikega vpliva na virulenco seva. Vsi sevi *A. rhizogenes* so bili sposobni v kratkem času tvoriti koreninske laske na rastlinah konoplje. Dodatek GUS-1 plazmida ni občutno vplival na virulenco. CAN0221 in Delta405 sta imeli najvišjo frekvenco indukcije korenin, CAN0111 je dala najvišje število korenin, Futura 77 pa je dosegla boljšo rast transformiranih korenin. Stranski produkt interakcije rastlin z *A. rhizogenes* so koreninski laski. Konoplja je znana kot rastlina, ki jo je težko transformirati, ampak je dovzeta za transformacijo s številnimi divjimi tipi *A. rhizogenes*. Ti so inducirali transformirane korenine v kratkem času, v velikem številu ter dobrim vigorjem in preživetjem, ampak z različnimi frekvencami. Virulenca seva ni bila vedno ključna za uspešnost induciranja korenin, kot na primer pri rdeči pesi. Najbolj dovzetni za infekcijo so bili hipokotili rastlin, mladi listi ter kotiledoni pa se niso odzivali na infekcijo, kljub stimulaciji bakterije z acetosiringonom. Med linijami koreninskih laskov najdemo dva morfološka fenotipa - tanko in debelo morfologijo, ki sta bili stabilni več kot dve leti. Podobni fenotipi so bili opisani že pri drugih rastlinah, kjer so opazili korelacijo z biosintezo etilena, pri konoplji pa korelacije niso opazili.

3.2.2 Transformacija kalusa

Transformacija konopljinega kalusa je potekala s selektivnim genetskim markerjem za fosfomanozo izomerazo (*PMI*). *PMI* gen omogoča rast rastlinskih celic na selektivnem

gojišču, sestavljenem iz sladkorja manoze, ki deluje kot selektivna substanca. Manozna je edini vir ogljika v gojišču. Transformirane celice, ki vsebujejo *PMI* gen, lahko rastejo na takem gojišču, medtem ko netransformirane celice propadejo. Vgradnjo *PMI* gena so preverili tako, da so izolirali DNA iz transformiranih rastlin in z metodo PCR in hibridizacijo po Southernu potrjevali prisotnost gena. Povprečna frekvenca transformacije pri vseh transformacijskih eksperimentih je bila $31.23 \% \pm 0.14$. Enostavna metoda za spremljanje transformacije *PMI* gena je z barvilom klorofenol rdeče. Temelji na tem, da aktivne rastlinske celice med rastjo zakisajo okolje. Klorofenol rdeče je indikatorsko barvilo, ki je občutljivo na spremembe pH. Vključeno je v manoznem selekcijskem gojišču, ki spremeni barvo ob znižanju vrednosti pH. Barva se spremeni iz rdeče do rumene, kar pomeni, da kalus raste in potrjuje, da se gen *PMI* izraža. Kalus, ki ne more aktivno rasti v prisotnosti manoze, ne zakisa gojišča, zato ta ostane rdeče barve. Vse linije kalusa, ki so izražale *PMI* gen in so bile testirane s klorofenolom rdeče, so potrjeno s PCR vsebovale gen *PMI*. Visoka koncentracija klorofenola rdeče (nad 2 mg/ml) povzroči, da transgeni kalus absorbira barvilo in zato ne pride do barvne reakcije. To lahko vpliva na metabolizem in povzroči celično smrt. Takšen kalus ni več rasel kljub predstavitvi nazaj na gojišče z manozo ali saharozo. Kalus po 1 tednu na 1 % manoznem selekcijskem gojišču spremeni barvo iz svetlo rumene na temno rumeno. Po 4 tednih se celice, ki so sposobne presnavljati manozo, enostavno ločijo po njihovi barvi in velikosti. Svetlo rumen kalus je po velikosti večji in zraste iz temnejših celičnih skupkov. Metoda barvne analize *PMI* je lahko neučinkovita pri detekciji transgenega tkiva z nizko ekspresijo gena ali pri utišanem genu, saj so z metodo PCR ugotovili prisotnost gena pri nekaterih vzorcih, ki so bili pri metodi barvne analize *PMI* negativni. Kontrolni kalus brez vključenega *PMI* gena lahko daje lažno pozitivne rezultate pri preverjanju aktivnosti. Po prenosu na gojišče z manozo se barva gojišča spremeni in predvideli bi, da presnavlja manozo. Če ga ponovno predstavimo na sveže gojišče z manozo, kalus ne bo preživel. Spremembo barve gojišča lahko pojasnimo z možnostjo, da lahko kalus shrani zalogo sladkorja med rastjo na gojišču s saharozo in po prenosu na manozno gojišče te zaloge porabi za rast in tako zakisa gojišče. Lažne pozitivne rezultate preprečimo z inkubacijo kontrolnega kalusa na gojišču z manozo 1 teden. Čez čas se lahko spremeni tudi barva gojišča za barvno analizo *PMI* in zbledi z rdeče na svetlo rdečo ali oranžno barvo. Iz gojišča tudi hitro izhlapeva voda, zato je priporočljiva uporaba svežega gojišča (Feeney in Punja, 2015).

3.3 INDUCIRANJE POLIPLIROIDOV

Poliploidizacija je močno orodje, s katerim izboljšujemo zaželene lastnosti rastlin, je pa tudi učinkovita metoda zlahatjenja za induciranje variabilnosti. Bagheri in Mansouri (2015) sta želela razviti metodo za induciranje tetraploidnosti pri konoplji in analizirati učinek ploidnosti na biokemijske lastnosti ter povečati medicinsko vrednost rastline. Testirala sta učinkovitost kolhicina za induciranje poliploidnosti v konoplji in opazovala učinke inducirane poliploidnosti na nekatere primarne in sekundarne metabolite. Vršičke poganjkov sta tretirala s tremi različnimi koncentracijami kolhicina (0, 0,1, 0,2 % w/v) 24 ali 48 ur. Največje sorazmerje med tetraploidi v skoraj isti ravnini (43,33 %) in miksopliodi (13,33 %) sta pridobila pri 24-urnem tretiranju s koncentracijama 0,2 in 0,1 % w/v. Kolhicin z 0,2 % koncentracijo in 48-urno izpostavljenostjo je bil bolj uničujoč kot pri izpostavljenosti 24 ur. Stopnjo ploidije sta opazovala s pretočno citometrijo. Biokemijske analize so pokazale, da se je pri miksopliodih signifikantno zvišala vrednost reducirajočih sladkorjev, topnih sladkorjev, celokupnih proteinov in celokupnih flavonoidov v primerjavi s tetraploidnimi in diploidnimi

rastlinami. Tetraploidne rastline so imele višje vrednosti celokupnih flavonoidov, proteinov ter škroba v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Rezultati so pokazali, da se je v primerjavi z diploidi s poliploidizacijo povečala vrednost THC pri miksploidih, tetraploidi pa so imeli nižje vrednosti zaradi manjšega števila trihomov. Za produkcijo THC za komercialno uporabo tetraploidizacija ni ustrezen rešitev, bolj primerni za to so miksploidi.

3.4 KAPSULACIJA – UMETNA SEMENA

Lata in sod. (2012) so razvili protokol kapsulacijske tehnike, s katero so konopljo uspešno hranili 24 tednov pri temperaturi 15 °C. Shranjena kapsulirana tkiva se lahko uporabljajo za izmenjavo genetskih virov med laboratoriji ali žlahtniteljske programe. Za shranjevanje genetskih virov THC donosnih tipov konoplje. so preizkušali uporabo umetnih semen oz. kapsulacijo in izpostavitvijo le-teh gojišču obogatenim z osmotskimi sredstvi. Izsečki nodalnih delov, ki so imeli po en aksilarni poganjek, so bili izrezani iz *in vitro* gojenih kultur poganjkov in nato kapsulirani. Nastanek umetnih semen so dosegli z natrijevim alginatom visoke gostote, ki se strdi ob stiku s CaCl₂. Nekapsulirane in kapsulirane nodalne dele so shranili pri različnih temperaturah in jih opazovali do 24 tednov. Spremljali so ponovno rast ter frekvenco preživetja pri pogojih tkivnih kultur (16 urna fotoperioda in 25 stopinj Celzija) na MS gojišču z dodanim thidiazuronom (TDZ). Ugotovili so, da shranjevanje kapsuliranih nodalnih delov pri temperaturi 15 °C omogoča 60 % stopnjo ponovne rasti in preživetja rastlin do 24 tednov. Podobno je pri nekapsuliranih, kjer so bili najboljši rezultati pri 15 °C brez dodatka osmotskih snovi. Uporaba osmotskih sredstev ni bila uspešna pri upočasnitvi rasti in povečanju časa shranjevanja genskih virov konoplje. Osmotski snovi manitol in sorbitol sta pri koncentraciji 2 % (w/v), kar pomeni 2g/100ml, dala najboljši rezultat, ki je bil pri nekapsuliranih kulturah viden kot povečanje preživetja ter ponovne rasti. V gojišče sta bila dodana posamezno, vsak v 2 % koncentraciji. Dobro razvite rastline, regenerirane iz kapsuliranih nodalnih delov, so bile uspešno aklimatizirane v rastlinjakih z 90 % frekvenco preživetja. Preverili so kemijski profil kapsuliranih nodalnih delov ter donorske rastline. Vsebnost kanabinoidov (THC, CBD, CBC, CBG in CBN) je bila med rastlinama primerljiva brez signifikantnih razlik. Kapsulacija omogoča daljše shranjevanje visoko donosnih genskih virov konoplje, ki so selekcionirani za izolacijo THC.

3.5 PRIDOBIVANJE KANABINOIDOV V HETEROLOGNIH EKSPRESIJSKIH SISTEMIH

Sirikantaramas in sod. (2005) navajajo, da so transformirali kulturo koreninskih laskov tobaka, ki je izražala THCA sintazo. Ta proizvaja THCA ob prisotnosti CBGA. Težava, ki se pojavi pri produkciji kanabinoidov v heterolognem rastlinskem gostitelju, je toksičnost THCA in CBGA, ki povzročita celično smrt preko apoptoze, enako vpliva tudi na celice konoplje v suspenzijski kulturi.

Zirpel in sod. (2015) so raziskovali možnost biotehnološke produkcije THCA v ne rastlinskih ekspresijskih sistemih. THCA sintaza iz *Cannabis sativa* je bila izražena intracelularno v različnih organizmih z uporabo celotnih celic. Funkcionalno izražanje THCA so zasledili pri *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia (Komagataella) pastoris* z uporabo signalnega peptida, ki se imenuje proteinaza A. Pri bakteriji *Echerichia coli* ni prišlo do funkcionalnega izražanja. Najvišje volumetrične aktivnosti so zasledili po 192 urni kultivaciji *P. pastoris* pri 15 °C.

Nizka topnost CBGA preprečuje THCA sintazi aplikacijo v vodnih brezceličnih sistemih, zato so bile uporabljene celotne celice za pretvorbo CBGA v THCA. Pred izgubo encimske aktivnosti so uspešno proizvedli 1 mM (0,36 g/l) THCA iz 10,5 g suhe celične mase/l.

Taura in sod. (2007) so heterologno ekspresijo CBDA sintaze poskušali doseči z bakulovirusno insektnim celičnim ekspresijskim sistemom. Rekombinantni encim je bil aktiven, kar je dokaz, da CBDAS kodira aktivno CBDA sintazo. CBDAS je dominantno izražena cDNA za CBDA sintazo, slaba aktivnost rekombinantnega encima pa je bila posledica razlike med insektnim in rastlinskim biosinteznim mehanizmom. Učinkovita ekspresija encima bo v pomoč razvoju biotehnološkega produkcijskega sistema za CBDA, kot je že do sedaj znano za produkcijo THCA v transgenem tobaku, ki izraža THCA sintazo.

4 ZAKLJUČEK

S pomočjo biotehnologije imamo možnost ustvariti uspešne sorte konoplje za proizvodnjo kanabinoidov. Poznavanje njihovih sinteznih poti nam omogoča heterologno ekspresijo v drugih organizmih. Mikropropagacija z izsečki mladih listov vegetativnih potaknjencev klona elitne rastline se je izkazala za najbolj uspešno, za formacijo korenin in poganjkov pa je najprimernejši meta topolin. Genska transformacija je bila do sedaj zahtevnejša zaradi slabe stopnje regeneracije konoplje, ki pa jo lahko rešujemo npr. s hitrim protokolom, kjer uporabimo kotiledone ali hipokotilne izsečke, ki jih tretiramo z BAP in zeatinom. Proizvodnjo kanabinoidov lahko dosežemo s kulturami koreninskih laskov ter transgenim kalusom, saj netransformirane kulture kalusa konoplje ne proizvajajo kanabinoidov, ne glede na kemotip konoplje. S kolhicinom lahko induciramo poliploidnost, največjo produkcijo pa dosegajo miksploidni. Za uspešnega se je izkazal tudi protokol za shranjevanje genetskega materiala do 24 tednov s kapsulacijsko tehniko in inkubaciji pri nizki temperaturi. Konoplja je rastlina z mnogo potenciala v medicini zaradi zdravilnega učinka kanabinoidov. V primerjavi s THC in CBD pridobljenima s sintezo, rastlinski ekstrakti vsebujejo celoten spekter kanabinoidov in so zaradi tega učinkovitejši. Posledično je interes pridobiti sorte medicinske konoplje s stabilno izraženim razmerjem THC/CBD in tudi stabilno vsebnostjo ostalih kanabinoidov. Intenzivno pa se preiskuje, katera razmerja najboljše vplivajo na simptome posameznih bolezni.

5 VIRI

- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E., Schibano D., Simsir Y., Navarro P., Etxebarria N., Usobiaga A. 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79: 324-331
- Andre C. M., Hausman J-F., Guerriero G. 2016. *Cannabis sativa*: the plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7: 19, doi:10.3389/fpls.2016.00019:17 str.
- Andre C. M., Larondelle Y., Evers D. 2010. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Current Nutrition and Food Science*, 6: 2–12
- Appendino G., Gibbons S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 71: 1427–1430

- Arts I. C., Hollman P. C. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal Clinical Nutrition*, 81: 317–325
- Bagheri M., Mansouri H. 2015. Effect of induced polyploidy on some biochemical parameters in *Cannabis sativa* L. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 2366–2375
- Borrelli F., Fasolino I., Romano B., Capasso R., Maiello F., Coppola D. 2013. Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochemical Pharmacology*, 85: 1306–1316
- Bortesi L., Rademacher T., Schiermeyer A., Schuster F., Pezzotti M., Schillberg S. 2012. Development of an optimized tetracycline-inducible expression system to increase the accumulation of interleukin-10 in tobacco BY-2 suspension cells. *BMC Biotechnology*, 12: 40, doi: 10.1186/1472-6750-12-40: 12 str.
- Brenneisen R. 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents. V: *Marijuana and the cannabinoids forensic science and medicine*. ElSohly M. (ur.). New York, Humana Press: 17–49
- Burstein S. 2015. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23: 1377–1385
- Cai Z., Kastell A., Knorr D., Smetanska I. 2012. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports*, 31: 461–477
- Chaohua C., Gonggu Z., Lining Z., Chunsheng G., Jianhua C., Xinbo G., Dingxiang P., Jianguang S., Qing T. 2016. A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis Sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 83: 61–65
- Davis W. M., Hatoum N. S. 1983. Neurobehavioral actions of cannabichromene and interactions with delta9-tetrahydrocannabinol. *General Pharmacology: The Vascular System*, 14: 247–252
- De Petrocellis L., Ligresti A., Moriello A. S., Allara M., Bisogno T., Petrosino S. 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 163: 1479–1494
- DeLong G. T., Wolf C. E., Poklis A., Lichtman, A. H. 2010. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by 9-tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*, 112: 126–133
- Di Marzo V., Piscitelli F. 2015. The endocannabinoid system and its modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*, 12: 692–698
- Di Sansebastiano G. P., Rizzello F., Durante M., Caretto S., Nisi R., De Paolis A. 2015. Subcellular compartmentalization in protoplasts from *Artemisia annua* cell cultures: engineering attempts using a modified SNARE protein. *Journal of Biotechnology*, 202: 146–152
- Eisohly H. N., Turner C. E., Clark A. M., Eisohly M. A. 1982. Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71: 1319–1323
- Englund A. M., Stone J., Morrison P. D. 2012. Cannabis in the arm: what can we learn from intravenous cannabinoid studies? *Current Pharmaceutical Design*, 18: 4906–4914
- Feeney M., Punja Z. K. 2015. Hemp (*Cannabis sativa* L.). V: *Agrobacterium protocols*, vol 2, *Methods in Molecular Biology*, vol 1224. New York, Springer: 319–329
- Fike J. 2017. Industrial hemp: renewed opportunities for an ancient crop. *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 35: 5–6, 406–424

- Fischedick J. T., Hazekamp A., Erkelens T., Choi Y. H., Verpoorte R. 2010. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71: 2058–2073
- Flores-Sanchez I. J., Verpoorte R. 2008. Secondary metabolism in *Cannabis*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 615–639
- Flores-Sanchez I. J., Pec J., Fei J., Choi Y. H., Dusek J., Verpoorte R. 2009. Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *Journal of Biotechnology*, 143: 157–168
- Gai Q. Y., Jiao J., Luo M., Wie Z. F., Zu Y. G., Ma W. 2015. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS ONE*, 10: e0119022, doi: 10.1371/journal.pone.0119022: 15 str.
- Halliwel B., Rafter J., Jenner A. 2005. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and otherphenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 268–276
- Han J. Y., Wang H. Y., Choi Y. E. 2014. Production of dammarenediol-II triterpene in a cell suspension culture of transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, 33: 225–233
- Happyana N., Agnolet S., Muntendam R., Van Dam A., Schneider B., Kayser O. 2013. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87: 51-59
- Hill A. J., Williams C. M., Whalley B. J., Stephens G. J. 2012. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in {CNS} disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 133: 79–97
- Hughes E. H., Hong S. B., Shanks J. V., San K. Y., Gibson S. I. 2002. Characterization of an inducible promoter system in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, 18: 1183–1186
- Iseger T. A., Bossong M. G. 2015. A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophrenia Research*, 162: 153–161
- Jiao J., Gai Q. Y., Fu Y. J., Ma W., Peng X., Tan S. N. 2014. Efficient production of isoflavonoids by *Astragalus membranaceus* hairy root cultures and evaluation of antioxidant activities of extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 12649–12658
- Khan B., Warner P., Wang H. 2014. Antibacterial properties of hemp and other natural fibre plants: a review. *Bioresources*, 9: 3642–3659
- Lata H., Chandra S., Khan I. A., Elsohly M. A. 2009b. Propagation through alginate encapsulation of axillary buds of *Cannabis sativa* L. - an important medicinal plant. *Physiol. Molecular Biology of Plants*, 15: 79–86
- Lata H., Chandra S., Khan I. A., ElSohly M. A. 2010. High frequency plant regeneration from leaf derived callus of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Medica*, 76: 1629-1633
- Lata H., Chandra S., Khan I., ElSohly M. A. 2009a. Thidiazuron induced high frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45: 12–19
- Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I. A., ElSohly M. A. 2011. Molecular analysis of genetic fidelity in *Cannabis sativa* L. plants grown from synthetic (encapsulated) seeds following in vitro storage. *Biotechnology Letters*, 33: 2503–2508
- Lata H., Chandra S., Techen N., Khan I. A., ElSohly M. A. 2016. In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin

- and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3: 18–26
- Lata H., Khan I. A., Chandra S., Mehmedic Z., ElSohly M. A. 2012. In vitro germplasm conservation of high Δ^9 -tetrahydrocannabinol yielding elite clones of *Cannabis sativa* L. under slow growth conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 743–750
- Liu Y. K., Huang L. F., Ho S. L., Liao C. Y., Liu H. Y., Lai Y. H. 2012. Production of mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by gateway technology and transgenic rice cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 1239–1247
- MacKinnon L., McDougall G., Azis N., Millam, S. 2001. Progress towards transformation of fibre hemp. V: Annual Report of the Scottish Crop Research Institute 2000/2001. Macfarlane Smith W. H., Heilbronn T. D. (ur.) Dundee, SCRI Invergowrie: 84–86
- Marks M. D., Tian L., Wenger J. P., Omburo S. N., Soto-Fuentes W., He J. 2009. Identification of candidate genes affecting delta-9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 13: 3715–3726
- McPartland J. M., Russo E. B. 2001. *Cannabis* and *Cannabis* extracts: greater than the sum of their parts? *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1: 103–132
- Meier C., Mediavilla V. 1998. Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *Journal of the International Hemp Association*, 5: 16–20
- Onofri C., P.M. de Meijer E., Mandolino G. 2015. Sequence heterogeneity of cannabidiolic- and tetrahydrocannabinolic acid-synthase in *Cannabis sativa* L. and its relationship with chemical phenotype. *Phytochemistry*, 116: 57–68
- Pacher P., B atkai S., Kunos G. 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, 58: 389–462
- Pacifico D., Miselli F., Carboni A., Moschella A., Mandolino G. 2008. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*, 160: 231–240
- Patra N., Srivastava A. K. 2014. Enhanced production of artemisinin by hairy root cultivation of *Artemisia annua* in a modified stirred tank reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174: 2209–2222
- Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L. 2010. Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698: 167–184
- Ross S. A., ElSohly M. A., Sultana G. N. N., Mehmedic Z., Hossain C. F., Chandra S. 2005. Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*, 16: 45–48
- Ross S. A., Mehmedic Z., Murphy T. P., ElSohly M. A. 2000. GC-MS analysis of the total 9-THC content of both drug- and fiber-type *Cannabis* seeds. *Journal of Analytical Toxicology*, 4: 715–717
- Rothschild M., Bergstrom G., Wangberg, S. 2005. *Cannabis sativa*: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, Northern Lights and Hawaiian Indica. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147: 387–397
- Russo E. B. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163: 1344–1364
- Sarmiento L., Carus M., Grotenhermen F., Kruse D. 2015. Scientifically sound guidelines for THC in food in Europe. Hurth, Chemiepark, Nova-Institute: 75 str.

- <http://eiha.org/media/2015/08/15-07-24-Report-Scientificaly-Safe-Guidelines-THC-Food-nova-EIHA.pdf> (15. 6. 2017)
- Singleton C., Howard T. P., Smirnoff N. 2014. Synthetic metabolons for metabolic engineering. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1947–1954
- Sirikantaramas S., Taura F., Morimoto S., and Shoyama Y. 2007. Recent advances in *Cannabis sativa* research: biosynthetic studies and its potential in biotechnology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8: 237–243
- Sirikantaramas S., Taura F., Tanaka Y., Ishikawa Y., Morimoto S., Shoyama Y. 2005. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant and Cell Physiology*, 46: 1578–1582
- Sirkowski E. 2012. Marked Cannabis for indicating medical Marijuana. US Patent 20120311744: 24 str.
- Slusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. 2005. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47: 145–151
- Small E. 2015. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *The Botanical Review*, 81: 189–294
- Small E., Cronquist A. 1976. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 25: 405–435
- Small E., Narraine S. G. U. 2016. Size matters: evolution of large drug-secreting resin glands in elite pharmaceutical strains of *Cannabis sativa* (marijuana). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63: 349–359
- Staginnus C., Zörntlein S., Meijer E. D. 2014. A PCR marker linked to a THCA synthase polymorphism is a reliable tool to discriminate potentially THC-rich plants of *Cannabis sativa* L. *Journal of Forensic Science*, 59: 919–926
- Stout J. M., Boubakir Z., Ambrose S. J., Purves R. W., Page J. E. 2012. The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *The Plant Journal*, 71: 353–365
- Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Yoshikai K., Shoyama Y., Morimoto S. 2007. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, 581: 2929–2934
- Tian L. 2015. Using hairy roots for production of valuable plant secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 149: 275–324
- Wahby I., Caba J. M., Ligerio F. 2013. Agrobacterium infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): establishment of hairy root cultures. *Journal of Plant Interactions*, 8: 312–320
- Wahby I., Caba J. M., Ligerio F. 2013. Agrobacterium infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): establishment of hairy root cultures. *Journal of Plant Interactions*, 8, 4: 312–320
- Wang C.Z., Ma X.Q., Yang D.H., Guo Z.R., Liu G.R., Zhao G.X. 2010. Production of enterodiol from defatted flaxseeds through biotransformation by human intestinal bacteria. *BMC Microbiology*, 10: 115, doi: 10.1186/1471-218D-10-115: 9 str.
- Wang R., He L. S., Xia B., Tong J. F., Li N., Peng F. 2009. A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture. *Pakistan Journal of Botany*, 41: 603–608
- Wawrosch C., Schwaiger S., Stuppner H., Kopp B. 2014. Lignan formation in hairy root cultures of Edelweiss (*Leontopodium nivale* ssp. *alpinum* (Cass.) Greuter). *Fitoterapia*, 97: 219–223

- Weathers P. J., Towler M. J., Xu J. 2010. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1339–13351
- Weiblen G. D., Wenger J. P., Craft K. J., ElSohly M. A., Treiber E. L., Marks M. D., Mehmedic Z. 2015. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytologist*, 208: 1241–1250
- Zirpel B., Stehle F., Kayser O. 2015. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinol acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinol from *Cannabis sativa* L. *Biotechnology Letters*, 37:1869-1875