



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tinkara BIZJAK

**GENETSKE RAZLIKE MED RAZLIČNIMI TIPI  
NAVADNE KONOPLJE  
(*Cannabis sativa* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tinkara BIZJAK

**GENETSKE RAZLIKE MED RAZLIČNIMI TIPI NAVADNE  
KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**GENETIC DIFFERENCES BETWEEN DIFFERENT TYPES OF  
CANNABIS (*Cannabis sativa* L.)**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija 1. stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jano Murovec in za somentorja asist. dr. Marka Flajšmana.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Mentorica: doc. dr. Jana Murovec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum predavitve: 4.9.2017

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 633.522: 601.4: 575: 631.524: 581.15 (043.2)
- KG konoplja/*Cannabis sativa* L./genetske razlike/kemotipi/genom
- AV BIZJAK, Tinkara
- SA MUROVEC, Jana (mentorica)/ 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 GENETSKE RAZLIKE MED RAZLIČNIMI TIPI NAVADNE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VIII, 20 str., 5 sl., 32 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) v zadnjih letih doživlja pravi agronomski in ekonomski preporod. Konoplja je rastlina, ki se jo lahko izkorišča v številne namene. Poleg tradicionalne rabe v različnih industrijah (avtomobilska, papirna, živilska in tekstilna) se v zadnjem času vedno bolj uveljavlja pridobivanje in uporaba kanabinoidov v medicini. V diplomskem delu je predstavljena uporaba navadne konoplje glede na del rastline, opis morfologije, rasti in gojenja navadne konoplje, dilema glede poimenovanja navadne konoplje, sintezne poti pomembnih kanabinoidov s poudarkom na genetskih razlikah med različnimi tipi navadne konoplje. Opisanih je do sedaj ugotovljenih pet kemotipov navadne konoplje, genetsko ozadje nastanka različnih kemotipov in njihovo določanje. Na koncu so predstavljeni še osnutek genoma navadne konoplje, biotehnološki pristopi gojenja navadne konoplje in proizvodnje kanabinoidov, kar je trenutno še v fazi raziskav.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 633.522: 601.4: 575: 631.524: 581.15 (043.2)

CX cannabis/*Cannabis sativa* L./genetic differences/chemotype/genome

AU BIZJAK, Tinkara

AA MUROVEC, Jana (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 GENETIC DIFFERENCES BETWEEN DIFFERENT TYPES OF CANNABIS (*Cannabis sativa* L.)

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 20 p., 5 fig., 32 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is a plant that is currently undergoing a big popularity leap in agronomy and economy. Cannabis is a plant that can be widely used in the industry. Besides the traditional use in different industries (car, paper, food and textile) is more and more common to use cannabinoids in medicine. In this b. sc. thesis, cannabis is described based on its morphology, growth, confusion around Latin naming of the plant, synthesis pathways connected to the production of cannabinoids and use of different parts of the plant with emphasis to genetic differences among different types of *C. sativa*. The five chemotypes that have been discovered until now are presented in the thesis along with the genetic background of the inheritance of the chemotypes and methods to determine them. There are also mentioned the methods to determine genetic differences in the *Cannabis* family and the draft of the cannabis genome. In the end, there is a short presentation of biotech approaches to hemp breeding and cannabinoid production, which are currently being researched.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 NAVADNA KONOPLJA (<i>Cannabis sativa</i> L.)</b>	<b>1</b>
2.1 ZGODOVINA GOJENJA KONOPLJE	1
2.2 POIMENOVANJE	2
2.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI	3
2.4 LASTNOSTI RASTI IN RAZVOJA	4
<b>2.4.1 Razvoj navadne konoplje</b>	<b>4</b>
<b>2.4.2 Spol navadne konoplje</b>	<b>4</b>
<b>2.4.3 Biosintezna pot kanabinoidov</b>	<b>5</b>
2.5 POGOJI ZA RAST	5
2.6 BOLEZNI IN ŠKODLJIVCI	6
<b>3 UPORABA NAVADNE KONOPLJE</b>	<b>6</b>
3.1 RASTLINA	7
3.2 STEBLO	7
3.3 SEMENA	8
3.4 LISTI IN SOCVETJE	8
<b>3.4.1 Kanabinoidi</b>	<b>8</b>
<b>3.4.2 Terpeni</b>	<b>9</b>
<b>3.4.3 Fenolne spojine</b>	<b>9</b>
<b>4 KEMOTIP</b>	<b>9</b>
4.1 RAZLIČNI KEMOTIPI	9
4.2 DEDOVANJE KEMOTIPA	10

4.3	DOLOČANJE KEMOTIPA	13
4.3.1	Plinska kromatografija	13
4.3.2	Markerji za določanje kemotipa	14
4.3.3	Premer glave žleznih trihomov	14
5	<b>GENETSKE RAZLIKE UGOTOVLJENE Z GENOTIPIZACIJO NAVADNE KONOPLJE</b>	15
6	<b>RAZLIKE V NUKLEOTIDNEM ZAPOREDJU GENOMOV NAVADNE KONOPLJE</b>	16
7	<b>BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI PRI GOJENJU NAVADNE KONOPLJE IN PROIZVODNJI KANABINOIDOV</b>	17
7.1	RAZMNOŽEVANJE IN TRANSFORMACIJA	17
7.2	PRODUKCIJA KANABINOIDOV	17
8	<b>PRIHODNOST NAVADNE KONOPLJE</b>	17
9	<b>VIRI</b>	18

## KAZALO SLIK

Slika 1: Risba navadne konoplje .....	3
Slika 2: Prikaz biosintezne poti kanabinoidov .....	5
Slika 3: Možnosti uporabe različnih delov navadne konoplje .....	7
Slika 4: Prikaz dedovanja kemotipa .....	11
Slika 5: Prikaz plinskega kromatografa petih kemotipov .....	13



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CBD	kanabidiol
THC	delta 9 tetra hidro kanabinol
pr.n.št	pred našim štetjem
n.št.	našega štetja
ssp.	podvrsta
var.	tip
itd.	in tako dalje
t.i.	tako imenovani
bp	bazni pari
Mbp	mega bazni pari
cM	centimorgan
UV	ultra-vijolična
GPP	geranil pirofosfat
OLA	olivetolska kislina (ang. olivetolic acid)
CBG	kanabigerol
CBC	kanabikromen
HSV	virus progavosti konopljinih listov (ang. hemp streak virus)
AMV	virus mozaika lucerne (ang. alfalfa mosaic virus)
CMV	virus mozaika kumare (ang. cucumber mosaic virus)
HMV	virus mozaika konoplje (ang. hemp mosaic virus)
ArMV	virus mozaika repnjaka (ang. arabis mosaic virus)
CBGV	kanabigerovarin (ang. cannabigerovan)
THCV	delta 9 tetra hidro kanabivarin (ang. delta-9-tetrahydrocannabivarin)
CBDV	kanabidivarin (ang. cannabidivarin)
SCAR	ang. sequence characterized amplified regions
RAPD	ang. random amplification of polymorphic DNA
PCR	verižna reakcija s polimerazo
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ISSR	ang. inter simple sequence repeats
SSR	mikrosateliti (ang. simple sequence repeat)
GBS	genotipizacija s določanjem nukleotidnega zaporedja (ang. genotyping-by-sequencing)
NAA	1-naftalen ocetna kislina
IAA	indol ocetna kislina

## 1 UVOD

Navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.) je rastlina, ki je bila dolgo časa prezrta v zahodnem svetu, a ima ogromen potencial. V 20. stoletju se je pridelava navadne konoplje močno zmanjšala zaradi prepovedi gojenja. V zadnjem desetletju postaja konoplja vedno bolj popularna v Evropi, Ameriki, Kanadi in na Kitajskem, saj se jo lahko uporablja za proizvodnjo široke palete produktov. Tržna niša obstaja v tekstilni, avtomobilski, kozmetični, farmacevtski, živilski, gradbeni in papirni industriji. Čeprav je konoplja najbolj znana po proizvodnji za vlakna, se jo lahko goji tudi za semena, olje ali pridobivanje kanabinoidov (Salentijn in sod., 2015).

Navadna konoplja je rastlina, ki ima rada mokro, a odcedno in visoko hranilno zemljo, sonce ter toplo podnebje. Kljub tem pogojem najdemo konopljo skoraj po vsem svetu. Na severni polobli uspeva od ekvatorja do 60° severno in najdemo jo po skoraj vsej južni polobli. Rastlina je enoletnica, čeprav lahko v subtropskem podnebju preživi dlje kot leto. Poleg tega je konoplja dvodomna rastlina in za oprašitev potrebuje veter (Clarke in Merlin, 2016).

Navadna konoplja je znana pod veliko imeni: marihuana, kanabis, industrijska konoplja, rekreativna konoplja, medicinska konoplja, farmacevtska konoplja ... Ampak vsa ta imena opišejo le različne genotipe ene botanične vrste (*Cannabis sativa* L.) (Small in Cronquist, 1976). Po mnenju nekaterih raziskovalcev obstajata dve botanični vrsti navadne konoplje (*Cannabis sativa* in *Cannabis indica* Lamarck), kjer je bila nova botanična vrsta *C. indica* predlagana že leta 1785 s strani Lamarcka (Hillig, 2005). Še vedno pa niso izključili možnosti, da navadna konoplja obsega tri botanične vrste (*Cannabis sativa*, *Cannabis indica* in *Cannabis ruderalis* Janischevsky) (Hillig, 2005; Schultes in sod., 1974). Genetske razlike med različnimi ekotipi in sortami obstajajo in so verjetno posledica dolgotrajne človeške selekcije za lastnosti, ki so bile zaželene v različnih delih sveta. Zgodovinsko gledano najdemo dva tipa konoplje: konoplja (imenovan tudi severni tip) in marihuana (imenovan tudi južni tip) (Small in Cronquist, 1976). Konoplja je bila večinoma izbrana za pridelavo olja in vlaken, medtem ko se je marihuano uporabljalo za pridobivanje kanabinoidov. Sedaj pa se večinoma opredeljuje navadno konopljo glede na kemotip (de Meijer in sod., 2003). Konoplja namreč proizvaja številne kanabinoide, med katerimi sta trenutno najbolj poznana in preučevana kanabidiol (CBD) in delta 9 tetra hidro kanabinol (THC), njuno razmerje v rastlini določa konopljin kemotip.

## 2 NAVADNA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

### 2.1 ZGODOVINA GOJENJA KONOPLJE

Avtorji navajajo, da konoplja izhaja nekje iz Himalaje, Kitajske ali Sibirije (Small in sod., 2003). Na Kitajskem je bila cenjena že okoli leta 6500 pr.n.št. in okoli 1500 pr.n.št. je s pomočjo nomadskih plemen prišla tudi v Evropo, kjer pa se gojenje ni uveljavilo do okoli leta 500 n.št. (Small in sod., 2003; Hillig, 2005). Raziskovalci predvidevajo, da je bila konoplja najprej pomembna predvsem zaradi opojnih snovi, ki so verjetno igrale pomembno vlogo v duhovnem

življenju ljudi (Clarke in Merlin, 2016). Šele ko je število ljudi naraslo, so jo začeli uporabljati kot vir hrane in vlaken. V južno Ameriko je bila prinesena leta 1545 in leta 1606 je prispela tudi do severne Amerike. Do začetka 19. stoletja je bila konoplja glavni vir vlaken za vrvi in cenjena kot surovina, iz katere se naredi najboljše platno. Kasneje je postala konoplja prepovedana v Ameriki in Evropi zaradi psihoaktivnega kanabinoida THC. Do nedavnega je bila skoraj vsa kmetijska proizvodnja konoplje v teh državah zelo majhna ali neprisotna. Edina izjema je bila med drugo svetovno vojno, ko je bila konoplja gojena z namenom nadomestiti manjkajoče opijate v medicini (Small in sod., 2003). Zaradi prepovedi gojenja, vedno boljših pogojev za rast v zaprtih prostorih in visoki ceni marihuane (konoplja za drogo) se je začelo nelegalno gojenje konoplje v majhnih količinah v zaprtih prostorih. To je povzročilo, da je nastala ogromna variacija med geografsko in namensko ločenimi kultivarji konoplje (Clarke in Merlin, 2016).

## 2.2 POIMENOVANJE

Pri poimenovanju navadne konoplje je še vedno prisotna velika zmeda, saj nekaj avtorjev podpira idejo, da je navadna konoplja ena botanična vrsta, ki pa ima veliko podvrst; drugi avtorji pa podpirajo hipotezo, da lahko ločimo vsaj dve, če ne tri botanične vrste konoplje. Small in Cronquist (1976) sta predlagala, da je navadna konoplja ena botanična vrsta (*Cannabis sativa* L.), ki obsega veliko kultivarjev in ekotipov. Klasifikacija konoplje bi tako obsegala eno botanično vrsto, dve podvrsti in štiri tipe, kjer sta podvrsti ločeni glede na vsebnost THC in tipi glede na divji tip in udomačeno navadno konopljo. Podvrsta 'sativa' ima šibko opojno moč in 'indica' ima močno opojno moč, obe imata divji tip in udomačen tip. Tako so ssp. *sativa* var. *sativa* (lahko opojna, udomačena), ssp. *sativa* var. *spontanea* (lahko opojna, divja), ssp. *indica* var. *indica* (opojna, udomačena) in ssp. *indica* var. *kafiristanica* (opojna, divja). Široko variacijo v botanični vrsti *Cannabis sativa* pripisujeta dolgoletni selekciji glede na agronomske lastnosti, izmenjavo genskega materiala med različnimi podvrstami, udomačevanjem divjih tipov in tudi selekciji okolja. Hillig (2005) je s pomočjo 11 encimov in alozimske analize dokazal, da vse raziskovane rastline navadne konoplje izhajajo iz dveh različnih genskih bazenov in tako pokazal, da verjetno obstajata dve botanični vrsti konoplje (*C. sativa* in *C. indica*) in mogoče tudi tretja (*C. ruderalis*), ki pa je divji tip navadne konoplje. *C. sativa* naj bi obsegala kultivarje iz Evrope, centralne Azije in Male Azije; medtem ko naj bi *C. indica* obsegala kultivarje iz južne in vzhodne Azije, Indije, Nepala, Afganistana in Pakistana. Žal se znanstveniki še zdaj ne morejo sporazumeti, ali naj bi različni kultivarji navadne konoplje spadali pod eno ali več botaničnih vrst in dokler ne bomo bolje razumeli genetike rastline, se bo zmeda glede poimenovanja po vsej verjetnosti nadaljevala (Fike, 2016). Da pa postane problem še težji, obstajajo nestrinjanja ne samo glede na to, ali naj bi bila ena botanična vrsta ali več, temveč tudi o tem, kateri tipi naj bi spadali v isto vrsto ali celo kultivar in ali se lahko klasificira konopljo glede na vsebnost THC (Small in Naraine, 2016).

## 2.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI

*Cannabis sativa* spada v družino Cannabaceae (Kuddus in sod., 2013) ter je enoletna in diploidna rastlina, ki zraste do višine 5 metrov (čeprav so zabeleženi tudi primeri 12 metrov visoke rastline) (Fike, 2016; Small in sod., 2003). Steblo je visoko, razvejano, lesnato in občasno votlo v internodijih ter ima premer do 5 centimetrov (Fike, 2016). Konopljin listi so pogosto urejeni v paru in so orientirani ravno nasprotno glede drug na drugega. Vsak konopljin list je sestavljen iz neparnega števila nazobčanih in suličastih lističev. Število lističev je lahko od tri do trinajst na en konopljin list. Skoraj vsa nadzemna zelena površina rastline je pokrita z žleznimi trihomi, ki sintetizirajo kanabinoide, in trihomi, ki vsebujejo kalcijev karbonat. Žlezni trihomi, ki sintetizirajo kanabinoide, so sestavljeni iz dolgega peclja in glave, ki je pokrita s kutikulo (Small in Naraine, 2016). V glavi se sintetizirajo in skladiščijo kanabinoidi, ki so značilni za konopljo. Naloga trihomov s kalcijev karbonatom pa je zaščita pred rastlinojedi, saj imajo slab okus in so zelo trdi. Glavna korenina raste blizu površine in je tipično dolga 30 do 60 centimetrov. Korenina je lahko tudi daljša, če konoplja raste v zrahljani prsti (Small in sod., 2003). Kot že omenjeno, je konoplja tradicionalno dvodomna rastlina, ampak v sodobnih kultivarjih lahko najdemo tudi enodomne rastline. Enodomne rastline so hermafroditi (vsebujejo ženske in moške cvetove), medtem ko imajo moške dvodomne rastline moške cvetove s prašniki in ženske dvodomne rastline ženske cvetove s pestiči (Small in Naraine, 2016). Moški cvetovi vsebujejo pecelj in pet prašnikov, ki so obdani s petimi zelenimi ali belimi perigonalnimi listi, t.i. tepali. Moške rastline imajo manj cvetov in moški cvet odpade kmalu po cvetenju. Ženske rastline so značilno manjše od moških in imajo več cvetov, ki vsebujejo pestič obdan z neprepoznavnim in nedeljenim cvetnim odevalom (Fike, 2016; Small in sod., 2003). Seme navadne konoplje se imenuje orešek in je dolgo 2 do 5 milimetrov, rjavo-sive barve, ovalne, gladke in nekoliko sploščene oblike (Kuddus in sod., 2013). Seme je plevenec, saj se ga pri odpadu drži pleve.



Slika 1: Risba navadne konoplje; (A) moška rastlina s cvetovi, (B) ženska rastlina s cvetovi, (C) moško socvetje, (D) mlad ženski cvet ali brakteja, (E) mlad ženski cvet z odstranjenim cvetnim odevalom, (F) mlado seme v ovoju in (G) seme navadne konoplje-orešek (Small in sod., 2003).

## 2.4 LASTNOSTI RASTI IN RAZVOJA

### 2.4.1 Razvoj navadne konoplje

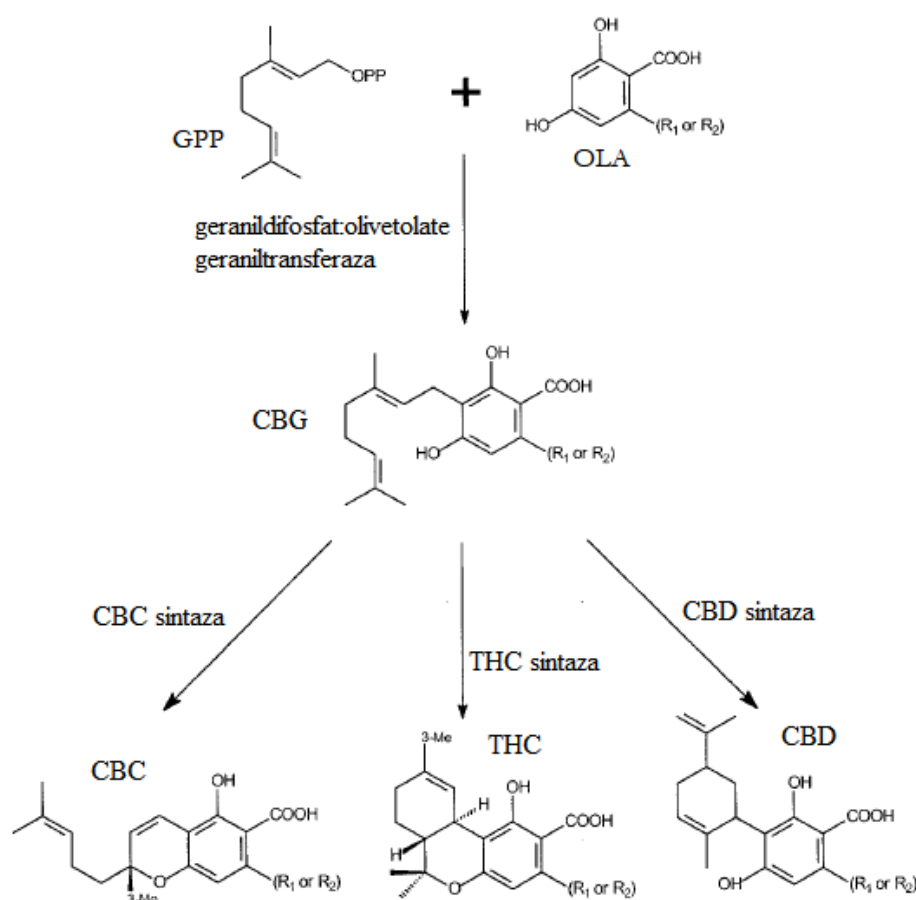
Seme navadne konoplje začne kaliti okoli 12 ur do 8 dni po vzpostavitvi ugodnih pogojev za rastlino. Po približno 3 dneh se semenska ovojnica odpre in ven pokukata dva klična lista in glavna korenina. Ravno zgodnja kalitev spomladi in kasnejša hitra rast sta zelo pomembni pri konoplji, da je plevel ne premaga v bitki za prostor. Po okoli 4 tednih začne rastlina hitro rasti. V času vegetativnega razvoja je pomembno, da je zemlja dovolj vlažna in da rastlina dobi veliko sonca (Kuddus in sod., 2013). Spol rastline je viden med drugim po obliki cvetov in višini rastline (moške rastline so višje od ženskih). Razlika v rasti pa ni samo med moškimi in ženskimi rastlinami, temveč tudi med sortami, ki so bile vzgojene za različen namene. Sorte namenjene za proizvodnjo vlaken so večinoma manj razvejane in imajo manjše število daljših internodijev kot sorte gojene za proizvodnjo semen ali kanabinoidov (Kuddus in sod., 2013). Konoplja je kratkodnevnik in ko se začnejo dnevi konec poletja krajšati, začne navadna konoplja cveteti. Nekatere sorte začnejo cveteti hitreje kot druge. Sorte navadne konoplje so razdeljene v tri skupine glede na čas cvetenja: zgodnje (40 do 60 dni po kalitvi), srednje (60 do 90 dni po kalitvi) in pozne (90 do 120 dni po kalitvi) (Zatta in sod., 2012). Obstajajo pa tudi sorte, ki cvetijo vedno isti čas po sejanju in ne glede na dolžino dneva, takšna je npr. finska sorta Finola. Moški cvet je izpostavljen vetru, ki odnese cvetni prah do ženskega cveta, ki je bolj zaprt in vsebuje dolge pestiče, na katere se ujame cvetni prah. Čebele pridejo do moškega cveta in zberejo veliko količino cvetnega prahu, toda nikoli ne zletijo do ženskega cvetu, tako da je konoplja samo vetrocvetka. Moške rastline zacvetijo okoli 3 tedne pred ženskimi in se kmalu zatem posušijo (Small in sod., 2003). Oplojene ženske rastline proizvedejo seme, ki v naravi pade na tla ali pa ga raznosijo veter, ptice in druge živali. Vsak moški cvet proizvede okoli 350000 zrn cvetnega prahu in vsaka rastlina ima več kot 100 cvetov. Ženske rastline pa lahko proizvedejo do okoli 2500 semen, a povprečno število semen je 95 na rastlino (Small in sod., 2003).

### 2.4.2 Spol navadne konoplje

Navadna konoplja je dvodomna rastlina, kar pomeni, da obstajajo ločene ženske in moške rastline in obe rastlini imata 10 parov kromosomov ( $2n=20$ ). Genetska razlika med spoloma je v spolnih kromosomih, kjer je moška rastlina heterozigot (ima XY) in ženska rastlina homozigot (XX). Y kromosom je veliko večji kot X kromosom. Moški genom ima 1683 Mbp in ženski ima 1636 Mbp (Mandolino in Carboni, 2004). Razmerje med spoloma je v populaciji po večini 50:50, a veliko dejavnikov lahko vpliva na izražanje spola rastline in spremeni razmerje med spoloma. Večji delež rastlin bo moškega spola, če je prisotne več giberelinske kisline, več dušika v zemlji ali če so dnevi krajši. Višja koncentracija ogljikovega monoksida v zraku, višja koncentracija etilena, citokininov in avksinov ali več UV žarkov pa bo povišalo verjetnosti, da se bo na rastlinah izražal ženski spol (Clarke in Merlin, 2016; Small in sod., 2003).

### 2.4.3 Biosintezna pot kanabidoidov

Vsi kanabinoidi v konoplji se kopičijo v obliki karboksilne kisline in šele po sušenju ali ogrevanju postopoma sprememljivo v nevtralne oblike. Sinteza kanabinoidov v konoplji se začne z dvema spojinama: geranil pirofosfatom (GPP) in olivetolsko kislino (angl. olivetolic acid) (OLA). GPP dobi rastlina z 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfatno sintezno potjo in OLA s pomočjo poliketid sintezne poti. Encim geranildifosfat:olivetolategeranil transferaza katalizira kondenzacijo GPP z OLA in tako nastane spojina kanabigerol (CBG). CBG je prekursor za kanabidiol (CBD), delta 9 tetra hidro kanabinol (THC) in kanabikromen (CBC), ki nastanejo s pomočjo encimov CBD sintaze, THC sintaze in CBC sintaze (Andre in sod., 2016; Mandolino in Carboni, 2004).



Slika 2: Prikaz biosintezne poti kanabinoidov od kondenzacije GPP (geranil pirofosfata) z OLA (olivetolsko kislino) z nastankom CBG (kanabigerola) do sinteze CBD (kanabidiola), THC (delta 9 tetra hidro kanabinola) ali CBC (kanabikromena). Prikazana so tudi imena encimov, ki katalizirajo prikazane reakcije (prirejeno po de Meijer in sod., 2003).

## 2.5 POGOJI ZA RAST

Navadna konoplja uspeva pod zelo različnimi podnebnimi pogoji, kar je vidno v razponu držav, kjer lahko uspeva. Ampak ker so bile sorte razvite v različnih podnebnih tipih, se pogoji za uspešno rast med njimi precej razlikujejo. Nekatere sorte imajo tako večinoma zelo ozek pas

ugodnih pogojev za rast, medtem ko divji tip navadne konoplje prenese večje razlike v podnebjju (Small in sod., 2003). Seme začne kaliti, ko temperatura prsti doseže vsaj okoli 10 °C. Med rastjo je najbolj primerna temperatura za rastlino od 15 °C do 27 °C (Fike, 2016). Konoplja lahko prenese nižje temperature (tudi pod ničlo), a le za kratek čas (Small in sod., 2003). Za rast je pomembno sonce, saj so rastline, ki rastejo v senci, večinoma nižje kot rastline, ki niso senčene. Zelo pomembna je tudi voda – zemlja mora biti mokra in vlažna, saj rastlini škodujeta suša ali previsoka podtalnica (Small in sod., 2003). Zemlja mora biti rodovitna z visoko koncentracijo dušika in malo kislim pH-jem. Optimalno pH območje je nekje od 5,8 do 7,5 (Fike, 2016). Predvsem divji tip in nekaj kultivarjev je odpornih tudi na močan veter, saj so stebela konoplje lesnata (Small in sod., 2003). Veliko različnih okoljskih pogojev vpliva na produktivnost rastline (še posebej glede na proizvodnjo kanabinoidov) in to so: dolžina dneva, temperatura, UV intenzivnost osvetlitve, dostopnost hranil, itd. (Hillig in Mahlberg, 2004). Divji tip navadne konoplje raste prosto v naravi in ga lahko najdemo na rečnih bregovih, ob jezerih, robovih kmetijskih zemljišč, itd. (Clarke in Merlin, 2016). Različne kultivarje navadne konoplje namenjene industrijski pridelavi lahko najdemo po skoraj celi Evraziji, celotnem ameriškem kontinentu in v manjšem obsegu so prisotni v Afriki in Avstraliji (Small in sod., 2003). Kultivarje marihuane (konoplje za drogo) pa lahko najdemo skoraj po celem svetu, ampak predvsem v zaprtih prostorih (Clarke in Merlin, 2016).

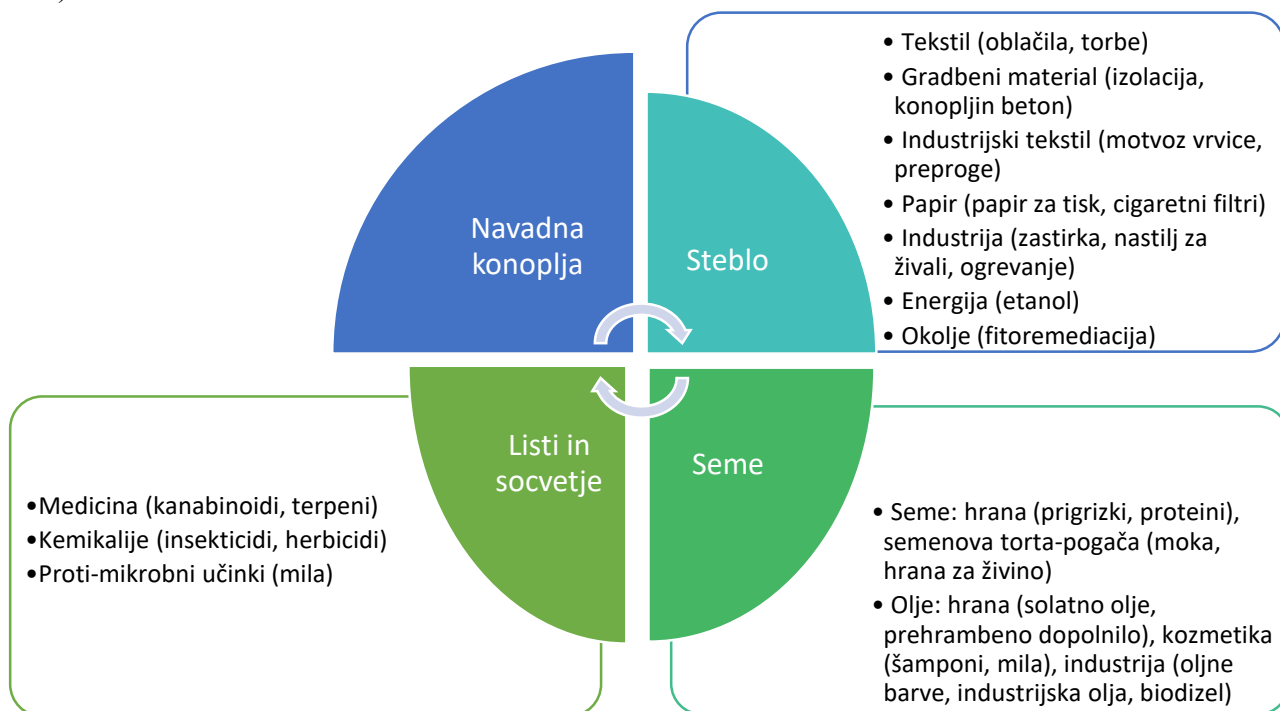
## 2.6 BOLEZNI IN ŠKODLJIVCI

Sesalci, ki napadejo in se prehranjuje z navadno konopljo, so zajci, jeleni in podgane. Največ škode pa na poljih navadne konoplje povzročijo ptice (sraka, kavka in več vrst manjših ptic) (Small in sod., 2003). Nekaj škode povzročijo tudi ogorčice in polži. Zabeleženih je tudi okoli 300 insektov, ki napadajo konopljo, vendar resnejše gospodarske škode ne povzročajo. Najbolj škodljivi sta koruzna vešča (*Ostrinia nubilalis*) in konopljina vešča (*Grapholita dilineana* in *G. tristrigana*), ki pojedjo velik del rastline in semen (Small in sod., 2003). Konoplja ima zaščito pred insekti v obliki terpenov in terpenoidov, katerih vonj odvrta večino škodljivcev. Navadno konopljo napadajo tudi virusi in bakterije. Zaenkrat je zabeleženih pet virusov: virus progavosti konopljinih listov (ang. hemp streak virus, HSV), virus mozaika lucerne (ang. alfalfa mosaic virus, AMV), virus mozaika kumare (ang. cucumber mosaic virus, CMV), virus mozaika konoplje (ang. hemp mosaic virus, HMV) in virus mozaika repnjaka (ang. arabis mosaic virus, ArMV), ki so že okužili konopljo in štiri bakterijske vrste (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia tracheiphila*, *Agrobacterium tumefaciens*), ki povzročijo največ škode na poljih (Small in sod., 2003). Največ škode na navadni konoplji pa povzročijo glivična obolenja – še posebej siva plesen (*Botrytis cinerea*) (Small in sod., 2003). Vseeno pa je uporaba pesticidov za zaščito konoplje majhna.

## 3 UPORABA NAVADNE KONOPLJE

Navadna konoplja se uporablja v industriji za veliko različnih namenov, npr. za papir, olje, prehranska dopolnila, tekstil, etanol, milo, opojna sredstva, insekticide, itd. Kot je razvidno iz

slike 3, je v industriji uporabljenih veliko različnih delov rastline in nekaj izdelkov iz konoplje bo predstavljenih v tem odseku. Gojenje konoplje bi postalo bolj ekonomično, če bi kmetje lahko prodali več delov navadne konoplje, ne pa v visokem donosu samo en del rastline. Trenutno so na trgu sorte, kjer je možno uporabiti rastline za pridobitev semen in vlaken, a izkupiček še ni dovolj visok. To je posledica dejstva, da če želimo semena, mora rastlina rasti dlje časa in tako vlakna postanejo pretrda, da bi še bila uporabna v tekstilni industriji. Velika izboljšava na trgu bi bile sorte, kjer bi bil uporaben več kot le en del rastline naenkrat (Fike, 2016).



Slika 2: Možnosti uporabe različnih delov navadne konoplje v industriji in družbi (prirejeno po Salentijn in sod., 2015).

### 3.1 RASTLINA

Veliko različnih raziskovalcev je ugotovilo, da lahko konoplja raste na tleh onesnaženih s težkimi kovinami. Ugotovljeno je bilo, da se težke kovine najbolj akumulirajo v listih in koreninah, delno tudi v semenih in steblo, nimajo pa fitotoksičnega učinka (Linger in sod., 2002; Cittero in sod., 2003). Rastline, ki rastejo na onesnaženih tleh, niso primerne za uporabo v prehranske namene, lahko pa bi jih gojili za uporabo stebel (vlakna in pezdir) ali npr. za pretvorbo olja v biodizel (Casas in Rieradevall i Pons, 2005). Tako bi lahko navadno konopljo izrabili za čiščenje onesnaženih tal z metodo fitoremediacije, hkrati pa uporabili dele rastlin v številne neprehranske namene (Small in Cronquist, 1976).

### 3.2 STEBLO

Pri steblo se uporabljata dva različna dela: vlakna iz ličja in notranji del steblo (sredika ali pezdir). Vlakna iz ličja, ki se nahajajo v žilnih snopih v povrhnjici steblo, so najbolj zaželeni;



saj so dolga, močna, trpežna in manj negativno vplivajo na okolje kot vlakna iz stekla ali nafte. Sredika ali pezdir so fragmenti, ki ostanejo od stebela po odstranitvi vlaken. Uporablja se jih za nastiljanje živalim in kot gradbeni material. Steblo se lahko uporablja tudi v papirni industriji, saj se lahko papir iz konoplje reciklira večkrat in tudi energija potrebna za proizvodnjo papirja je nižja v primerjavi s proizvodnjo papirja iz lesa. Toda proizvodnja papirja iz konoplje je zaenkrat dražja kot proizvodnja navadnega papirja in konopljin papir se tako uporablja delno za cigaretni papir, vrečke za čaj in ostale produkte, ki se ne smejo trgati ali pustiti okusa po močenju. Konopljina vlakna so zanimiva za avtomobilsko industrijo, kjer se jih uporablja za podlogo in plošče vrat, saj so vzdržljiva in lahka (Fike, 2016).

### 3.3 SEMENA

Semena navadne konoplje se lahko uporabljajo v prehrani živine, saj ugodno spremenijo profil maščobnih kislin v živalskem mesu, kar pozitivno vpliva na zdravje ljudi. Za prehrano živine bi bili primerni predvsem ostanki konopljinih semen po ekstrakciji olja iz njih, kar bi predstavljalo ekonomsko uporabo odpadkov (Fike, 2016). Semena navadne konoplje se uporabljajo tudi v prehrani ljudi, saj so vir omega 3 in omega 6 maščob, vlaken in aminokislin (lizina, arginina in alanina), in tako se semena smatrajo kot super hrana oz. zdrava hrana. Poleg tega so semena edini naravni vir gama-linolenske kisline, ki se uporablja kot prehranski dodatek (Fike, 2016). Semena se lahko uporablja tudi kot vir olja (olje predstavlja okoli 27-38% teže semena) ali pa zmleta v obliki moke v pekovski industriji (Apostol in sod., 2015).

### 3.4 LISTI IN SOCVETJE

V industriji so listi in socvetja še posebej pomembni za pridobivanje kanabinoidov, terpenov in fenolnih spojin (Andre in sod., 2016). Listi in še posebej socvetja se uporabljajo tudi za čaj ali pa kot droga (kjer se socvetja in občasno liste pokadi). Največ trihomov se nahaja na listih, ki so okoli socvetij in na braktejah (Small in Naraine, 2016), zato je to najbolj smiselno uporabiti za ekstrakcijo kanabinoidov in drugih metabolitov.

#### 3.4.1 Kanabinoidi

Navadna konoplja proizvede več kot 100 različnih kanabinoidov, ampak najbolj pomembni so kanabidiol (CBD), delta 9 tetra hidro kanabinol (THC) in kanabikromen (CBC). Ti se v rastlini nahajajo v obliki kisline in sintetizirajo ter kopičijo v žleznih trihomih, ki jih najdemo na večini nadzemnih delov navadne konoplje, v večjih količinah pa na ženskih socvetjih v času polnega cvetenja. THC je spojina, ki je odgovorna, da je konoplja najbolj uporabljena med rekreacijskimi drogami. A poleg psihotropnih učinkov ima THC tudi druge pozitivne lastnosti delovanja, npr. je protivnetna spojina, analgetik, mišični relaksant in spojina, ki deluje proti raku. A ker je vsebnost THC v drogi vedno višja (trenutno največ okoli 20 %), lahko dolgoročna uporaba take konoplje povzroči spominske in kognitivne motnje, poviša nagnjenost k duševnim boleznim in povzroči odvisnost (Andre in sod., 2016). CBD učinkuje proti vnetju, slabosti, zaskrbljenosti in glede na raziskave bo verjetno v prihodnosti uporabljena za zdravljenje

epilepsije, shizofrenije, multiple-skleroze, itd. (Andre in sod., 2016). Učinkovit je tudi kot proti bakterijsko in proti glivno sredstvo. Trenutno je CBD najbolj uporabljena spojina v farmacevtski industriji za zmanjšanje stranskih učinkov THC-ja in tako zagotavlja višjo varnost pri uporabi zdravil iz konopljinih ekstraktov. CBD ima protivnetne, protibakterijske in proti glivne učinke ter se v medicini uporablja kot analgetik in pomirjevalo (Andre in sod., 2016).

### 3.4.2 Terpeni

Konoplja vsebuje več kot 100 različnih terpenov, ki poskrbijo za vonj in barvo konoplje. Medtem ko se večina terpenov sintetizira v žleznihih trihomih, se najde terpeni tudi v cvetovih, listih in koreninah konoplje. Zanimivo je, da višja kot je vsebnost terpenov, višja bo tudi vsebnost kanabinoidov v konoplji. V konoplji so recimo prisotni D-limonen,  $\beta$ -mircena,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen in  $\beta$ -kariofilen. Terpeni imajo veliko pozitivnih farmakoloških lastnosti, saj se lahko uporabljajo proti raku, vnetju in tesnobi. Imajo tudi imuno-stimulirajoče in želodčno zaščitne lastnosti (Andre in sod., 2016).

### 3.4.3 Fenolne spojine

Do sedaj je bilo v konoplji odkritih okoli 20 fenolnih spojin in večina izmed njih spada v družino flavonov in flavonolov. Predvsem se uporabljajo proti vnetju in proti raku. Dokazano je bilo, da fenolne spojine tudi znižajo dovzetnost za nevrološke bolezni ter bolezni srca in ožilja (Andre in sod., 2016).

## 4 KEMOTIP

### 4.1 RAZLIČNI KEMOTIPI

Določanje vsebnosti THC v navadni konoplji je zelo pomembno, saj je od vsebnosti te spojine v rastlini odvisen namen pridelave, možnosti uporabe konoplje v medicinske namene in predvsem, ali je trženje te rastline oz. izdelkov iz nje legalno (Small in Naraine, 2016). Med stroko so zaenkrat priznani trije kemotipi, ki so določeni glede na razmerje med THC in CBD v rastlini (Mandolino in Carboni, 2004). Obe vsebnosti sta izraženi v deležu (odstotkih) od suhe teže socvetja navadne konoplje (de Meijer in sod., 2003). Kemotip I obsega rastline, ki imajo razmerje CBD:THC  $< 1$  oziroma je suha teža THC  $> 0,3 \%$  in CBD  $< 0,5 \%$  in se večinoma uporabljajo kot medicinska konoplja. Kemotip II ima razmerje CBD:THC okoli 1 oziroma predstavlja THC  $\geq 0,3 \%$  suhe teže in CBD  $> 0,5 \%$ . Kemotip III pa ima razmerje CBD:THC  $> 1$  oz. THC  $< 0,3 \%$  in CBD  $> 0,5 \%$  suhe teže. Kemotip III prevladuje v kultivarjih industrijske konoplje (de Meijer in sod., 2003, Pacifico in sod., 2006). V Evropski uniji mora imeti navadna konoplja, ki se uporablja kot industrijska konoplja, vsebnost THC  $< 0,2 \%$  (Mandolino in Carboni, 2004). Poleg teh treh priznanih kemotipov sta bila v zadnjih letih predlagana dva nova kemotipa (Mandolino in Carboni, 2004). Kemotip IV naj bi predstavljal rastline, kjer je v sledih prisoten CBD, a je CBG glavni in najbolj prisoten kanabinoid. Kemotip V pa obsega rastline, kjer je nemogoče zaslediti katerikoli kanabinoid (Mandolino in Carboni, 2004). Rastline, ki ne

vsebujejo kanabinoidov, bi bile še posebej uporabne v farmacevtski industriji kot placebo v raziskavah učinkovitosti zdravil iz konoplje ali konopljinih izvlečkov (de Meijer in sod., 2009). Težavo pri določanju kemotipov predstavlja dejstvo, da vse rastline iz ene populacije ne pripadajo enakemu kemotipu (Pacifico in sod., 2006). Čeprav se rastline razvrsti v različne kemotipe glede na CBD:THC razmerje, nam kemotip ne pove ničesar o tem, kakšna je resnična koncentracija THC ali CBD v rastlini, saj je po navadi vsebnost te-dveh spojin porazdeljena po Gaussovi distribuciji (Mandolino, 2004).

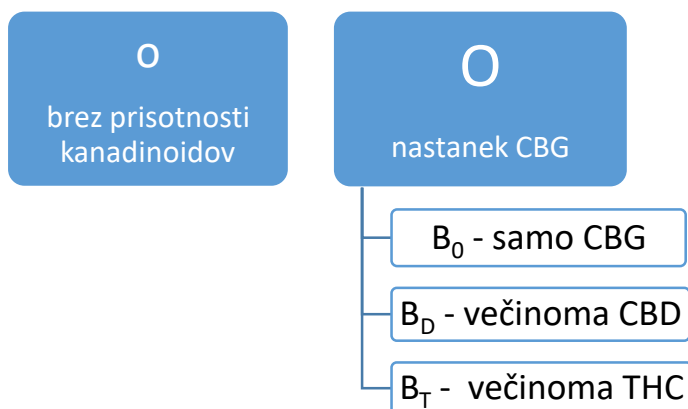
#### 4.2 DEDOVANJE KEMOTIPA

De Meijer in sodelavci so leta 2003 objavili članek, ki je nekoliko pojasnil dedovanje kemotipa pri navadni konoplji. S pomočjo križanja in samoopraševanja rastlin različnih kemotipov in določevanjem CBD:THC razmerja so ugotovili, da bo pri križanju čiste CBD rastline s čisto THC rastlino, F1 potomstvo vsebovalo tako THC kot tudi CBD (pri rastlinah ni bilo mogoče določiti čistega kemotipa) in potomstvo F2 bo imelo Mendlovo razmerje 1:2:1 (čista CBD: mešana CBD in THC: čista THC rastlina). Tako so dokazali, da se vsebnosti CBD in THC dedujeta po enostavnem Mendlovem modelu dedovanja z enim lokusom (B) in prisotnostjo kodominance. Predlagano je bilo, da ima CBD rastlina genotip  $B_D/B_D$ ; THC rastlina  $B_T/B_T$  in rastline, ki imajo genotip  $B_T/B_D$ , vsebujejo CBD in THC. Predlagan pa je bil tudi alel  $B_0$ , ki naj bi predstavljal neaktiven encim in tako bi v rastlini prevladoval CBG. Poleg lokusa B so opisali še lokus A, ki naj bi določil, ali imajo kanabinoidi pentilno ali propilno stransko verigo. Če imajo rastline prisoten gen  $A_{Pr}$ , je v rastlini proizveden CBG in kasneje nato THC in CBD s pomočjo B lokusa. Če pa ima rastlina  $A_{Pe}$ , pa je proizveden CBGV (kanabigerovarin) in kasneje CBDV (kanabidivarin) in THCV (delta 9 tetra hidro kanabivarin) s pomočjo B lokusa. Lokus A tako določa, ali bo lokus B proizvedel kanabinoid z propilno ali pentilno stransko skupino. Encima THC sintaza in CBD sintaza sta si zelo podobni v molekulski masi, pI, optimalnem pH in ostalih lastnostih, ki so pomembne za delovanje encima ( $V_{max}$ ,  $K_m$ , ...) in tako je bilo predlagano, da alela  $B_D$  in  $B_T$  (ki kodirata CBD- ali THC sintazo) oba predstavljata dve izoformi istega encima. Izpostavljeno je bilo tudi, da ima vsak encim verjetno možnost pretvorbe CBG v vse kanabinoide, a večinoma katalizira nastanek glavnega kanabinoida (THC ali CBD). Hkrati pa so avtorji opozorili, da bi enake rezultate dobili tudi, če bi imeli podvojen lokus (en za CBD sintazo in drug za THC sintazo), ki pa bi bila povezana; a ta teorija dedovanja naj ne bi bila preveč verjetna (de Meijer in sod., 2003).

Leta 2006 so nato Kojoma in sodelavci objavili raziskavo, kjer so predlagali, da obstajata dva različna lokusa za THC oziroma CBD sintazo. S pomočjo 13 rastlin (4 kemotipa I, 2 kemotipa II in 7 kemotipa III) so dokazali, da verjetno obstajata dve različni nukleotidni zaporedji THC sintaze (industrijski tip in opojni tip) ter tako predlagali, da za THC in CBD sintazo ni odgovoren isti lokus. V raziskavi so pomnožili s pomočjo PCR metode gen za THC sintazo (začetni oligonukleotidi so bili oblikovani tako, da ne bi dobili pomnožkov CBD sintaze) in ugotovili, da so dobili produkt velikosti 1638 bp pri vseh rastlinah. Ko so določili nukleotidno zaporedje teh pomnožkov, so ugotovili, da je med THC sintazo pri marihuani in industrijski

konoplji 62 nukleotidnih zamenjav, ki povzročijo razliko v 37 amino kislinah med THC sintazama in kot posledica je THC sintaza v industrijski konoplji manj učinkovita. Oblikovali so tudi par začetnih nukleotidov za PCR, kjer so lahko ločili med dvema vrstama navadne konoplje. Pri industrijski konoplji pri PCR reakciji niso dobili produkta, medtem ko so pri konoplji, ki se uporablja za drogo, dobili produkt velikosti okoli 1,2 kbp. To nakazuje, da se THC in CBD sintaza nahajata na različnih lokusih (Kojoma in sod., 2006).

Leta 2009 je de Meijer s sodelavci predlagal še lokus, ki je odgovoren za dejstvo, ali rastlina sploh proizvaja kanabinoide. Lokus je bil poimenovan O in rastlina, ki ne vsebuje kanabinoidov, naj bi imela genotip o/o in rastlina, ki vsebuje kanabinoide, ima genotip O/O. Če je v rastlini prisoten genotip O/o, bo rastlina proizvajala kanabinoide, a v manjših količinah. Gen O je neodvisen od alelov BT, BD in B0 ter se tudi deduje po Mendlovem modelu z enim genom (O) in kodominanco (razmerje pri F2 je 1:2:1 glede na o/o: O/o: O/O) in verjetno je gen O odgovoren za blokado nekje v poliketidni sintezni poti. Poleg tega so avtorji članka ugotovili, da je teorija o lokusu A, ki nadzoruje nastane kanabinoidov s pentilno ali propilno skupino, verjetno napačna. Imeli so rastline, ki so vsebovale kanabinoide s pentilno stransko skupino (torej je genotip  $A_{Pe}/A_{Pe}$  ali  $A_{Pe}/A_0$ ) in rastline, ki niso vsebovale kanabinoidov (torej bi bil njihov genotip  $A_0/A_0$ ). Križali so nato rastline  $A_{Pe}/A_0$  z rastlinami  $A_{Pr}/A_{Pr}$  in potomci, ki so imeli nizko koncentracijo kanabinoidov, bi imeli genotip  $A_{Pr}/A_0$ . Potomce so potem samooprašili in nenavadno je bilo, da so dobili potomce z genotipom  $A_{Pe}/A_{Pe}$ . To nakazuje, da je nemogoče, da lokus A nadzoruje odsotnost ali prisotnost kanabinoidov v rastlini in da sta prisotnost/odsotnost kanabinoidov ter prisotnost pentilne ali propilne stranske skupine regulirani preko dveh različnih lokusov (de Meijer in sod., 2009).



Slika 3: Prikaz dedovanja kemotipa s pomočjo gena O/o in gena BT, B0 in BD ter nastanek kanabinoidov povezanih z aleli.

Tudi v članku Bakel in sod., ki je bil izdan leta 2011, je podprta ideja o vsaj dveh različnih lokusih za THC in CBD sintazo. S pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja konopljinega genoma so namreč našli več neodvisnih lokusov s nukleotidnim zaporedjem, ki je bilo zelo podobno nukleotidnemu zaporedju THC in CBD sintaze. Predlagajo, da so visoko opojni tipi verjetno nastali s pomočjo selekcije nedelujočih CBD alelov. To bi pomenilo, da bi vsaka

visoko opojna konoplja lahko imela CBD alel, a jim ga v raziskavi ni uspelo najti, saj so bile vse visoko opojne rastline homozigotne za THC sintazo in zato tudi ni mogoče izključiti ideje, da je za vsebnost THC in CBD odgovoren le en lokus (Bakel in sod., 2011).

Leta 2015 je bila objavljena raziskava Weiblena in sodelavcev, kjer so ugotovili, da obstajajo dodatni aleli za THC in CBD sintazo in da se sintazi nahajata na ločenih lokusih. S pomočjo molekularnega kloniranja THC in CBD sintaze dveh različnih rastlin je avtorjem uspelo najti 6 homologov THC sintaze in 3 homologe CBD sintaze, ki so se vsi razlikovali od prej odkritih homologov THC ali CBD sintaze. Ravno prisotnost toliko homologov in pozicija lokusov, ki vsebujejo zapis za encima, na genomu nakazuje prisotnost večjega števila lokusov, ki pa so povezani. S pomočjo filogenetske raziskave so ugotovili, da je do večjega števila homologov prišlo s pomočjo podvojevanja in divergence. Poleg tega so pri analizi potomcev rastline, ki je vsebovala funkcionalno THC sintazo in nefunkcionalno CBD sintazo, in rastline, ki je imela delujočo THC in CBD sintazo, ugotovili, da imajo potomci vse štiri homologe (torej 2 homologa za THC sintazo in 2 homologa za CBD sintazo), kar dokazuje, da se THC sintaza in CBD sintaza ne moreta nahajati na istem lokusu. Ena od njihovih ugotovitev je bila tudi, da bi morale rastline z genotipom  $B_T/B_D$  (kemotip II) imeti razmerje CBD:THC okoli 1:1, a to ni vedno tako. Večinoma je razmerje bolj v smer CBD in to pripisujejo dejstvu, da ima CBD sintaza višjo afiniteto za substrat (Weiblen in sod., 2015).

Leta 2015 je bil tudi objavljen članek Onofri in sodelavcev, kjer so našli tri dodatne alele za CBD sintazo, ki je manj dejavna ali nedejavna ( $B_{DW}$ ,  $B_{D01}$  in  $B_{D02}$ ) ter dodatni alel za THC sintazo, ki je minimalno dejaven ( $B_{T0}$ ). Manj dejavni encimi THC sintaze in CBD sintaze tudi razložijo, zakaj se v rastlinah kopiči CBG. S pomočjo novih alelov so tudi ugotovili, katere aminokisliline so različne med temi sintazami in funkcionalnimi sintazami in s tem so tudi našli nove kritične aminokisliline v sintazi. S pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja je bilo tudi razvidno, da se THC sintaza in CBD sintaza nahajata na različnih lokusih. Ker je frekvenca mutacij višja v CBD sintazi kot v THC sintazi, predvidevajo, da je bila najprej prisotna CBD sintaza in se je THC sintaza razvila kasneje s pomočjo divergence in podvojevanja (Onofri in sod., 2015).

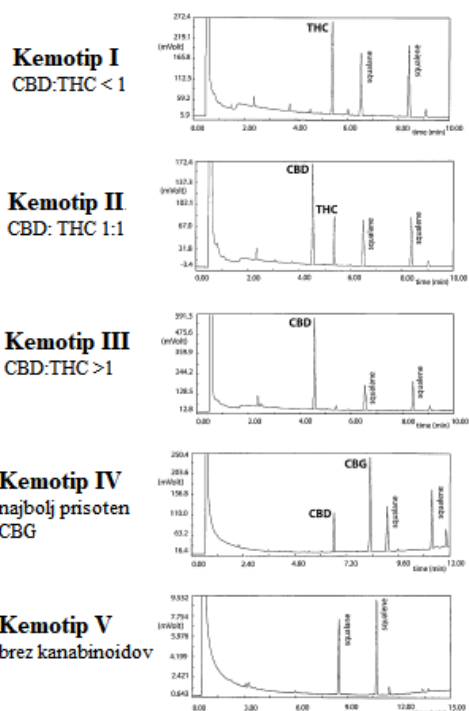
Avtor Welling in sodelavci so leta 2016 objavili raziskavo, kjer so s pomočjo tekočinske kromatografije, masne spektrometrije in DNA markerjev analizirali veliko število tipov navadne konoplje, ki rastejo pod zelo različnimi pogoji in so tudi zelo genetsko različni. V raziskavi so ugotovili, da je variabilnost CBD:THC razmerja pri rastlinah kemotipa II precej višja kot prej raziskano. Ker imajo rastline kemotipa II genotip  $B_T/B_D$ , bi morale imeti razmerje CBD:THC okoli 1:1, a njihova raziskava dokazuje, da temu ni tako. Razliko v CBD:THC razmerju med rastlinami pripisujejo genetskemu ozadju, saj so bile rastline gojene pod enakimi pogoji in ker se razmerje lahko nagiba k višji koncentraciji THC ali CBD. Predlagajo tudi, da bi model večjega števila lokusov lahko razložil višjo variacijo med rastlinami kemotipa II in nizko prisotnost kemotipa IV. Zanimivo pa je, da so odkrili tudi, da ni vedno prisotne povezave med genotipom in kemotipom iste rastline. Raziskovalci so recimo našli rastlino, ki je po

genotipu spadala v kemotip III, a v resnici proizvaja kanabinoide, ki jo uvrščajo v kemotip II. Predvidevajo, da je razlog za to proizvodnja THC med zgodnjimi fazami razvoja rastline in nato sinteza CBD iz CBG kasneje v razvoju (Welling in sod., 2016).

## 4.3 DOLOČANJE KEMOTIPA

### 4.3.1 Plinska kromatografija

Zaenkrat je plinska kromatografija najbolj uporabljena in tudi najbolj natančna metoda za določanje kemotipa. Metoda temelji na pretvorbi kanabinoidov iz kislinske v nevtrarno obliko s pomočjo toplote (Welling in sod., 2016). Za analizo profila kanabinoidov s pomočjo plinske kromatografije se kot vzorec večinoma uporablja posušene ženske cvetove (Weiblen in sod., 2015). Kromatogram se segreje na 200°C in pusti pri tej temperaturi 8 minut. Po tem se kromatogram počasi segreva 4 °C/minuto, dokler ne dosežemo temperature 300 °C, ko je proces zaključen (Hillig in Mahlberg, 2004). Vsak laboratorij uporablja malo spremenjen protokol in drugačne modele kromatografov in kromatografskih kolon. Ker je temperatura, pri kateri začne spojina izhlapevati, drugačna za vse glavne kanabinoide, je mogoče ločiti spojine s pomočjo računalniškega programa, detektorja in počasi rastoče temperature v kromatografu (Hillig in Mahlberg, 2004). Med kanabinoidi v navadni konoplji najprej izhlapi CBD, nato THC in končno CBG in glede na višino vrhov je možno določiti, h kateremu kemotipu spada rastlina, ki smo jo analizirali (Mandolino in Carboni, 2004). V zadnjih letih pa postaja vedno bolj priljubljena tudi tekočinska kromatografija, saj lahko s pomočjo le-te analiziramo kanabinoide v obliki kisline ali v nevtralni obliki in tako dobimo bolj točne podatke (Welling in sod., 2016).



Slika 4: Prikaz plinskega kromatograma za vseh pet kemotipov navadne konoplje (prirejeno po Mandolino in Carboni, 2004).

### 4.3.2 Markerji za določanje kemotipa

Kot prvi markerji za določanje kemotipa v navadni konoplji so se pojavili izoencimi, s pomočjo katerih je možno ugotoviti, ali je rastlina bogata s THC ali ne. Vendar, ker je občasno težko analizirati rastlinski material s pomočjo le-teh, metoda ni več pogosto uporabljena. Ugotovljeno je bilo, da lahko za analizo navadne konoplje uporabimo 11 encimov, za katere je odgovornih kar 65 alelov in s pomočjo le-teh lahko določimo, iz kje prihaja rastlina in ali je *C. sativa* ali *C. indica* (Hillig, 2005). Kasneje so se pojavili drugi markerji in eden prvih je bil dominantni DNA marker D589, ki lahko določi samo, če ima rastlina BT gen ali ne. Ker lahko marker določi samo prisotnost ali odsotnost gena BT, je s pomočjo tega markerja nemogoče ločiti med kemotipoma I in II; je pa marker natančen v 97 % primerih (Welling in sod., 2016). Poleg tega so bili odkriti RAPD (ang. random amplification of polymorphic DNA) markerji, ki se lahko uporabljajo za selekcijo navadne konoplje. Najbolj natančni markerji so OPA07<sub>2100</sub>, OPB06<sub>1000</sub> in UBC109<sub>620</sub>. Markerja OPA07<sub>2100</sub> in OPB06<sub>1000</sub> sta prisotna le v THC rastlinah, medtem ko je marker UBC109<sub>620</sub> prisoten le v CBD rastlinah. Markerji niso tako zelo natančni, saj se marker OPA07<sub>2100</sub> pojavi v vseh THC rastlinah in tudi v 3 % CBD rastlinah, marker OPB06<sub>1000</sub> v vseh THC rastlinah in 10 % CBD rastlin, marker UBC109<sub>620</sub> je prisoten v vseh CBD rastlinah in v 20 % THC rastlin (de Meijer in sod., 2003). Uporablja se tudi kodominantni SCAR (ang. sequence characterized amplified regions) marker B190/B200, kjer dobimo DNA pomnožek dolžine 190 bp (pri kemotipu I) ali 200 bp (pri kemotipu III) ali oba (pri kemotipu II) (Pacifico in sod., 2006). Natančnost markerja B190/B200 ni tako visoka, saj prepozna v 93 % primerov pravilno kemotip II, a le v 20 % primerov kemotip I in pri kemotipu II nista vedno vidna oba pomnožka (Pacifico in sod., 2006). Drug sistem markerjev je PCR marker B1080/B1192, kjer dobimo pri kemotipu I DNA pomnožek dolžine okoli 1190 bp, pri kemotipu III pomnožek dolžine 1080 bp in kemotip II ima oba pomnožka. Za ta marker je bilo dokazano, da 100% pravilno določi kemotip I, II ali III; ne more pa določiti kemotipov IV in V (Pacifico in sod., 2006). Vseeno bi bil marker B1080/B1192 lahko uporabljen za določitev legalnosti prodaje rastline in če vsebuje gen za THC sintazo (Pacifico in sod., 2006).

### 4.3.3 Premer glave žleznih trihomov

Žlezni trihomi so organ, kjer se proizvede in kopiči veliko število konopljinih sekundarnih metabolitov in predvsem kanabinoidi (Andre in sod., 2016). Kanabinoidi se kopičijo v glavi žleznih trihomov in velikost glave je mogoče izmeriti s pomočjo elektronskega mikroskopa. Avtorja Small in Naraine (2016) sta dokazala, da je s pomočjo merjenja premera glave trihomov možno določiti, ali navadna konoplja vsebuje visoko koncentracijo THC-ja ali ne. Rastline z visoko vsebnostjo THC imajo premer glave od 40 do 210  $\mu\text{m}$ , medtem ko imajo rastline z nizko vsebnostjo THC premer glave od 50 do 119  $\mu\text{m}$ . Ampak povprečna velikost glave je pri rastlinah, namenjenih za drogo, 129  $\mu\text{m}$ , pri industrijskih rastlinah pa samo 80  $\mu\text{m}$ . Čeprav s pomočjo te metode ni mogoče ločiti rastlin glede na kemotip, je metoda zelo uporabna v forenziki, saj je edina morfološka metoda, s pomočjo katere lahko ugotovimo, ali je rastlina legalna (nizka vsebnost THC) ali nelegalna (visoka vsebnost THC) (Small in Naraine, 2016).

## 5 GENETSKE RAZLIKE UGOTOVLJENE Z GENOTIPIZACIJO NAVADNE KONOPLJE

Za ločevanje med različnimi tipi navadne konoplje se lahko uporabljajo mikrosateliti. Ugotovili so, da ima pri konoplji večina mikrosatelitov di- ali tri-nukleotidni motiv ponovitve ter da je najbolj pogost motiv ponovitve GA/CT (predstavlja kar 50 % vseh motivov), pri treh nukleotidih pa je najbolj pogost motiv GTT/CAA. S pomočjo analize motivov je avtorjem (Alghanim in Almirall, 2003) uspelo najti 11 markerjev, s pomočjo katerih bi bila verjetnost, da imata dve rastlini enak genotip mikrosatelitov,  $1.8 \times 10^{-7}$ . Avtorja tudi predlagata, da bi bila možna uporaba teh markerjev za določanje sorodnosti med rastlinami navadne konoplje. V drugem članku (Mandolino in Carboni, 2004) so zapisali, da je bilo do tedaj najdenih 27 mikrosatelitov v navadni konoplji, kjer je število alelov od 2 do 28. Dokazali so, da je variabilnost v navadni konoplji zelo visoka saj med 93 rastlinami samo 4 iz istega kultivarja niso bile ločljive med seboj s pomočjo petih mikrosatelitnih lokusov (Gilmore in sod., 2003). Kasneje je bila objavljena raziskava (Hakki in sod., 2007) o ločevanju rastlin s pomočjo ISSR (ang. inter simple sequence repeats) markerjev in računalniške analize. Ugotovili so, da če analizirajo DNA 10 izbranih rastlin iz istega tipa navadne konoplje naenkrat, lahko določijo, ali pripada rastlina industrijskemu tipu ali tipu namenjenemu za drogo. Ker je ta metoda cenovno ugodna, zanesljiva in enostavna, so predlagali, da bi bila lahko metoda uporabljena v forenziki pri določanju legalnosti konoplje (Hakki in sod., 2007). Nato so v raziskavi avtorja Piluzza in sod. leta 2013 s pomočjo 6 naključnih začetnih oligonukleotidov (sestavljenih iz 10 nukleotidov) ločili med različnimi skupinami navadne konoplje. Dobili so DNA pomnožke različnih velikosti in s pomočjo računalniške analize (kjer so rastline razporejene v skupine glede na genetsko podobnost med njimi) so lahko ločili skupine rastlin, ki so namenjene za drogo in za industrijo ter tudi glede na uporabo in izvor rastlin. Predlagali pa so tudi, da je možno pri dvomu o legalnosti konoplje preveriti površino s pomočjo elektronskega mikroskopa in velikost semen konoplje, saj so semena industrijske konoplje večja in tudi površina ima veliko lastnosti, ki bi lahko pomagale ločiti med skupinami navadne konoplje (Piluzza in sod., 2013). Drug način ugotavljanja genetskih razlik je s pomočjo mikrosatelitnih (ang. simple sequence repeat, SSR) markerjev in odkrili so 3,442 potencialnih markerjev (Gao, 2014). Od teh so preizkusili 117 naključnih markerjev in 108 od le-teh je bilo uspešnih. Dokazali so tudi, da je možno s pomočjo markerjev določiti, kje rastline rastejo. Odkrili so, da so si tipi, ki rastejo na Kitajskem in v Evropi, bolj podobni kot drugi tipi; kar so razložili s podobnostjo podnebja. Zanimivo pa je tudi, da je bil pri njih najbolj pogost motiv AAG/CTT in ne GA/CT. Druga raziskava (Sawler in sod., 2015) je pokazala, da je genetska razlika med industrijsko konopljo in marihuano precej velika in ne obsega samo razlik v genih za sintezo kanabinoidov. V raziskavi so s pomočjo genotipizacije s določanjem nukleotidnega zaporedja (ang. genotyping-by-sequencing, GBS) in 124 različnih tipov navadne konoplje našli 14.031 SNP-jev. Zanimivi sta bili tudi njihovi ugotovitvi, da čeprav je bila in je selekcija marihuane in navadne konoplje zelo stroga, sta si rastlini še vedno genetsko zelo blizu ter da prihaja industrijska konoplja najverjetneje iz 'indica' genetskega bazena, ne 'sativa' genetskega bazena.



## 6 RAZLIKE V NUKLEOTIDNEM ZAPOREDJU GENOMOV NAVADNE KONOPLJE

Leta 2011 je bil objavljen članek avtorja Bakel in sod., kjer je opisan osnutek DNA nukleotidnega zaporedja *Cannabis sativa* Purple Kush, ki je opojni tip in je uporaben v medicinske namene. Iz listov so izolirali DNA navadne konoplje in nato določili nukleotidno zaporedje s pomočjo tehnologije kratkih odčitkov s platforme Illumina. Iz dobljenih nukleotidnih zaporedij so odstranili bakterijska nukleotidna zaporedja, nukleotidna zaporedja slabe kakovosti, nukleotidna zaporedja mitohondrijev in plastidov, nezaželeno nukleotidna zaporedja in Illumina adapterje. Nato so s pomočjo programa SOAPdenovo naredili *de novo* assembly genoma. Uspelo jim je sestaviti haploidni osnutek genomska nukleotidnega zaporedja, ki obsega 534 milijonov bp. Sestava celotnega genoma je zelo težavna, saj je variabilnost v navadni konoplji zelo visoka in tudi nukleotidna zaporedja se pogosto ponovijo, a je avtorjem vseeno uspelo sestaviti kar velik del ne-ponavljajočega se dela genoma in individualnih genov. Čeprav genom ni popoln, bo genomska nukleotidna zaporedja lahko pomagala pri gojenju navadne konoplje in predvsem pri selekciji rastlin s pomočjo DNA molekulskih markerjev. Da bi lahko primerjali genomska nukleotidna zaporedja, so tudi določili nukleotidno zaporedje genoma navadne konoplje sorte Finola, ki je uporabljen za proizvodnjo olja iz semen. Zanimalo jih je, ali je med genomoma visoka razlika v številu genov za proizvodnjo encimov, ki so pomembni pri proizvodnji kanabinoidov. Ugotovili so, da razlike skoraj ni in da je verjetno razlika v vsebnosti THC in CBD med rastlinama posledica manjših genetskih razlik med rastlinama, ki spremenijo ekspresijo genov (avtorji predvidevajo, da je razlika med transkripcijskimi faktorji v *cis* ali *trans* obliki faktorjev). Nato so preučevali tudi variacijo med štirimi tipi in sortami navadne konoplje: Finola, Purple Kush, USO-30 in Chemdawg. Rezultati so pokazali, da je heterozigotnost v istem tipu od 0,18 % do 0,26 %. Verjetnost, da se isti SNP pojavi pri dveh različnih tipih pa je od 0,38 % do 0,64 %. Ta prvi osnutek zaporedja genoma omogoča tudi identifikacijo encimov, ki so pomembni za nastanek manj znanih kanabinoidov, ki pa bi lahko bili uporabni v medicini (Bakel in sod., 2011).

Za analizo transkriptomov pa so izolirali in določili nukleotidno zaporedje RNA iz korenine, stebela, poganjkov in bolj ali manj zrelih cvetov. Nato pa so s pomočjo programa Inchworm določili pokritje nukleotidnega zaporedja in sestavili transkripte. Odkrili so 30.074 transkriptov in zanimivo dejstvo je, da je veliko število transkriptov enakih kot pri rastlini *Arabidopsis*. Zanimala jih je razlika v ekspresiji genov v različnih tkivih in pri fotosinteznih tkivih ugotovili, da je ekspresija genov precej podobna med tkivi. Ampak ekspresija genov povezanih z nastankom kanabinoidov pa se je občutno spremenila glede na tip tkiva, ki so ga analizirali. V cvetovih (v vseh treh fazah) so bili encimi, ki katalizirajo nastanek kanabinoidov, najbolj prisotni, kar nakazuje, da so kanabinoidi res proizvedeni v izločevalnih žlezah. Ugotovili so tudi, da ni bilo prisotne mRNA CBD sintaze v tipu Purple Kush, prisotno pa je bilo visoko število transkriptov THC sintaze. Ugotovili so tudi, da koncentracija kanabinoidov ni odvisna od morfologije rastline, temveč od izražanja genov za encime, ki so del katabolne poti do

kanabinoidov, saj je bila ekspresija nekaterih encimov celo do 15x večja v Purple Kush (marihuana) kot v Finoli (industrijska konoplja) (Bakel in sod., 2011).

## **7 BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI PRI GOJENJU NAVADNE KONOPLJE IN PROIZVODNJI KANABINOIDOV**

### **7.1 RAZMNOŽEVANJE IN TRANSFORMACIJA**

Zaradi stroge regulacije gojenja navadne konoplje (posebej konoplje namenjene za drogo) postaja gojenje in *in vitro* razmnoževanje konoplje vedno bolj popularno. Do sedaj so bile opisane metode *in vitro* razmnoževanja s pomočjo stimulacije aksilarnih brstov na nodalnih segmentih, indukcija razraščanja poganjkov in celo proizvodnja sintetičnih semen. Sintetična semena so še posebej zanima, saj jih je možno shraniti za 6 mesecev in v bistvu predstavljajo klonsko razmnoževanje, saj gre za enkapsulacijo aksilarnih brstov ali nodalnih segmentov v kroglicah s pomočjo kalcijevega alginata. Pri transformaciji navadne konoplje še ni bilo narejenih veliko raziskav, a nekaj raziskovalcev je opisalo postopek uspešne transformacije s pomočjo gram negativne bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, kjer so transformirali kalus in meristeme poganjkov. Kljub temu je transformacija in *in vitro* razmnoževanje navadne konoplje težavno, saj ni znana točna sestava gojišča, ki bi bil najbolj optimalen za nadaljnji razvoj navadne konoplje in konoplja je znana kot rastlina, ki ima zelo nizko stopnjo regeneracije (Andre in sod., 2016).

### **7.2 PRODUKCIJA KANABINOIDOV**

Za produkcijo kanabinoidov *in vitro* je možno uporabiti koreninske sisteme (hairy root systems) ali pa celične suspenzije. Hipokotili in kalus sta najbolj dovzetni rastlinski tkivi za nastanek koreninskih sistemov in tako sta transformirana s pomočjo *Agrobacterium tumefaciens* ali *Agrobacterium rhizogenes*. Ugotovljeno je bilo, da če je koreninski sistem gojen na B5 gojišču z dodatkom 4 mg/L NAA (1-naftalen očetna kislina) in 1 mg/L IAA (indol očetna kislina) je po 28 dneh inkubacije koncentracija kanabinoidov najvišja, ampak ne presega 2 µg/g suhe teže (Frag in Kayser, 2015). Kot že omenjeno je druga možnost proizvodnje kanabinoidov *in vitro* s pomočjo celičnih suspenzij. Ker je kalus nezmožen proizvodnje kanabinoidov, je potrebno celice transformirati. Da bi lahko povišali proizvodnjo kanabinoidov in drugih sekundarnih metabolitov v celičnih kulturah, bi lahko gojišču dodali silikon, ciklodekstrine ali pa spremenili pogoje inkubacije, da bi rastlina zaradi biotskega ali abiotskega stresa začela proizvajati več sekundarnih metabolitov. Druga možnost pa bi bila izražanje transkripcijskih faktorjev, ki so povezani s povišanjem proizvodnje kanabinoidov v izločevalnih žlezah (Andre in sod., 2016).

## **8 PRIHODNOST NAVADNE KONOPLJE**

Prepričana sem, da bo zaradi široke palete uporabe v industriji, medicini, farmaciji in vsakdanjem življenju navadna konoplja ostala ena od pomembnih agronomskih rastlin. Predvsem uporaba v farmaciji in medicini bo povišala potrebo po navadni konoplji (Piluzza in

sod., 2013). Čeprav pa ima konoplja dolgo zgodovino, je še vedno veliko nejasnega glede genetskega ozadja pri navadni konoplji (Fike, 2016). Potrebno bi bilo dokončno razrešiti poimenovanje navadne konoplje in dobro bi bilo tudi bolje razumeti dedovanje kemotipa in ostalih agronomsko pomembnih lastnosti. Bilo je sicer narejenih tudi že precej raziskav o genetskih razlikah med različnimi tipi navadne konoplje, a dejstvo ostaja, da je podatkov še vedno premalo, da bi lahko bili učinkovito uporabljeni pri žlahtnjenju navadne konoplje s pomočjo markerjev, kar postaja vedno bolj popularna metoda pri žlahtnjenju drugih kmetijskih rastlinah (Salentijn in sod., 2015). Določanje kemotipa je pomembno pri forenziki in tudi preverjanju legalnosti neke rastline, poleg tega pa bi enostavno določanje kemotipa v omogočalo hitrejšo in lažjo selekcijo rastlin primernih za proizvodnjo placebov v farmaciji ali za industrijsko proizvodnjo. Pomembna pa je seveda tudi medicinska uporaba navadne konoplje, kjer bi se s pomočjo raziskav vpliva različnih kanabinoidov na bolezni in človeško telo uporaba kanabinoidov v medicinske namene lahko povečala in s tem bi se povečala tudi potreba po gojenju navadne konoplje. Še neraziskana možnost proizvodnje kanabinoidov za farmacevtske in medicinske namene je proizvodnja v celičnih suspenzijah drugih rastlin ali celo v bakterijskih kulturah (Andre in sod., 2016). Prepričana sem, da bo veliko podatkov o genetskem ozadju navadne konoplje, novodobnih načinov selekcije rastlin s pomočjo markerjev in legalizacija gojenja industrijske konoplje omogočilo napredek pri žlahtnjenju navadne konoplje. Poleg tega je za uspešno agronomsko prihodnost navadne konoplje potrebna tudi izboljšava metod za žetev, shranjevanje in procesiranje navadne konoplje (Fike, 2016). Pomembno pa bo tudi določanje nukleotidnega zaporedja genoma večjega števila tipov konoplje, saj bo v prihodnosti s tem mogoče analizirati v kateri tip spada točno določena rastlina, kateri geni so od divjih tipov v sodobnih tipih navadne konoplje, kako so ljudje udomačili konopljo ter ali obstajata genski bazen 'sativa' in 'indica' (Bakel in sod., 2011).

V prihodnosti pa bo navadna konoplja definitivno srečala tudi nekaj težav, med njimi bo veliko finančnih težav zaradi nihanja potrebe po konoplji, a največji problem pri gojenju bo verjetno genetski bazen navadne konoplje, ki je vedno manjši zaradi prohibicije nelegalne droge, ekonomskega nezanimanja in predvsem drugačnega načina kmetovanja (Clarke in Merlin, 2016). Včasih so lokalni kmetje vzdrževali svoje kultivarje in dopustili prosto križanje rastlin, zdaj pa se večinoma kupuje seme in razmnožuje konopljo s pomočjo selekcije in kloniranja. Tako se izgublja genetska variacija, kar bi lahko vplivalo na odpornost konoplje na škodljivce in bolezni. Tako je zelo potrebno tudi ohranjanje kultivarjev, ki so zaenkrat še na svetu, s pomočjo genetskih bank. Glede na trenutno vedno bolj pomemben ekonomski vidik navadne konoplje in veliko zanimanja za navadno konopljo v medicini je število kultivarjev konoplje v genetskih bankah definitivno prenizko in če želimo ohraniti njeno variabilnost, moramo shraniti več različnih kultivarjev v genetskih bankah (Clarke in Merlin, 2016).

## 9 VIRI

Alghanim H. J., Almirall J. R. 2003. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376: 1225-1233

- 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.
- Apostol L., Popa M., Mustatea G. 2015. *Cannabis sativa* L. partially skimmed flour as source of bio-compounds in the bakery industry. *Romanian Biotechnological Letters*, 20, 5: 10843-10852
- Bakel H., Stout J. M., Cote A. G., Tallon C. M., Sharpe A. G., Hughes T. R., Page J. E. 2011. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*, 12, 10: R102, doi: 10.1186/gb-2011-12-10-r102: 18 str.
- Casas X. A., Rieradevall i Pons J. 2005. Environmental analysis of the energy use of hemp—analysis of the comparative life cycle: diesel oil vs. hemp—diesel. *International Journal of Agricultural Resources, Governance and Ecology*, 4, 2: 133-139
- Cittero S., Santagostino A., Fumagalli P., Prato N., Ranalli P., Sgorbati, S. 2003. Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. *Plant and Soil*, 256: 243-252
- Clarke R. C., Merlin M. D. 2016. Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects. *Critical Reviews in Plant Science*, 35, 5-6: 293-327
- de Meijer E. P., Bagatta M., Carboni A., Crucitti P., Moliterni V. M., Ranalli P., Mandolino G. 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163, 1: 335-346
- de Meijer E. P., Hammond K. M., Sutton A. 2009. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (IV): cannabinoid-free plants. *Euphytica*, 168, 1: 95-112
- Farag S., Kayser O. 2015. Cannabinoids Production by Hairy Root Cultures of *Cannabis sativa* L. *American Journal of Plant Sciences*, 6: 1874-1884
- Fike J. 2016. Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Critical Reviews in Plant Science*, 35, 5-6: 406-424
- Gilmore S., Peakall R., Robertson, J. 2003. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in *Cannabis sativa*: implications for forensic investigations. *Forensic Science International*, 131: 65-74
- Hakki E. E., Kayis S. A., Pinarkara E., Sag A. 2007. Inter simple sequence repeats separate efficiently hemp from marijuana. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10, 4: 570-581
- Hillig K. W., Mahlberg, P. G. 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 91, 6: 966-975
- Hillig K. W. 2005. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 2: 161-180
- Kojoma M., Seki H., Yoshida S., Muranaka, T. 2006. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” *Cannabis sativa* L. *Forensic Science International*, 159: 132-140
- Kuddus M., Ginawi I. A., Al-Hazimi A. 2013. *Cannabis sativa*: An ancient wild edible plant of India. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 10: 736-745
- Linger P., Müssig J., Fischer H., Kobert, J. 2002. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential. *Industrial Crops and Products*, 16: 33-42
- Mandolino G. 2004. Again on the Nature of Inheritance of Chemotype. *Journal of Industrial Hemp*, 9, 1: 5-7
- Mandolino G., Carboni A. 2004. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*, 140, 1-2: 107-120

- Onofri C., de Meijer C.P.M., 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
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G. 2006. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. *Molecular Breeding*, 17, 3: 257-268
- Piluzza G., Delogu G., Cabras A., Marceddu S., Bullitta S. 2013. Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domestic accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 2331-2342
- Salentijn E. M., Zhang Q. Y., Amaducci S., Yang M., Trindade, L. M. 2015. New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68: 32-41
- Sawler J., Stout J. M., Gardner K. M., Hudson D., Vidmar J., Butler L., Page J. E., Myles S. 2015. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLoS ONE* 10, 8: e0133292, doi:10.1371/journal.pone.0133292: 9 str.
- Schultes R. E., Klein W. M., Plowman T., Lockwood T. E. 1974. Cannabis: An example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets*, 23, 9: 337-367
- Small E., Cronquist A. 1976. Practical and natural taxonomy for Cannabis. *Taxon*, 25, 4: 405-435
- Small E., Pocock T., Cavers P. B. 2003. The biology of Canadian weeds. 119. *Cannabis sativa* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 83, 1: 217-237
- Small E., Naraine S. G. 2016. Size matters: evolution of large drug-secreting resin glands in elite pharmaceutical strains of *Cannabis sativa* (marijuana). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63, 2: 349-359
- Zatta A., Monti A., Venturi G. 2012. Eighty Years of Studies on Industrial Hemp in the Po Valley (1930-2010). *Journal of Natural Fibers*, 9, 3: 180-196
- Weiblen G. D., Wenger J. P., Craft K. J., ElSohly M. A., Mehmedic Z., Treiber E. L., Marks M. D. 2015. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytologist*, 208, 4: 1241-1250
- Welling M. T., Liu L., Shapter T., Raymond C. A., King G. J. 2016. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. *Euphytica*, 208, 3: 463-475

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Jani Murovec in somentorju asist. dr. Marku Flajšmanu za vso pomoč pri izdelavi diplomskega dela in času, ki sta mi ga posvetila. Še posebej bi se rada zahvalila za pomoč pri iskanju člankov ter preverjanju in popravljanju vsebinskih in slovničnih napak.

Poleg tega bi se rada zahvalila tudi svojim staršem, ki sta me cel čas študija podpirala in sta mi na vsakem koraku pomagala omogočiti moje želje glede šolanja z njunim časom, denarnimi sredstvi in podporo.