

---

Gradu Amaierako Lana

Kimikako Gradua

---

**Cannabis landareko 12 barietateetan  
kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioen  
jarraipena kontrol- eta estres-baldintzapeko  
hazkuntza-prozesuetan**

Egilea:

Garazi Kareaga Alvarez

Zuzendariak:

Aresatz Usobiaga Epelde

Oier Aizpurua Olaizola

**GRADU AMAIERAKO LANA**  
**KIMIKAKO GRADUA**

**CANNABIS LANDAREKO 12 BARIETATEETAN KANNABINOIDEEN  
ETA TERPENOEK KONTZENTRAZIOEN JARRAIPENA KONTROL-  
ETA ESTRES-BALDINTZAPEKO HAZKUNTZA-PROZESUETAN**

**GARAZI KAREAGA ALVAREZEK AURKEZTUTAKO MEMORIA**

**MATRIKULAZIO ETA DEFENTSA DATA:** 2023ko ekaina/uztaila

**ZUZENDARIAK:** Aresatz Usobiaga Epelde eta Oier Aizpurua Olaizola

**SAILA:** Kimika Analitikoa

## AURKIBIDEA

<b>1. SARRERA</b> .....	<b>1</b>
1.1. KONPOSATU BIOAKTIBOAK .....	2
1.1.1. Kannabinoideak.....	3
1.1.2. Terpenoak .....	6
1.2. ERABILPEN TERAPEUTIKOA .....	7
1.3. CANNABISAREN TAXONOMIA .....	9
1.4. ESTRES-BALDINTZEN ERAGINA.....	11
1.5. KANNABINOIDEEN ETA TERPENOEN ANALISIA .....	14
1.5.1. Kannabinoideak.....	14
1.5.2. Terpenoak .....	15
1.6. HELBURUAK.....	16
<b>2. PROZEDURA ESPERIMENTALA</b> .....	<b>17</b>
2.1. HAZKUNTZA ETA LAGINKETA.....	17
2.2. ERREAKTIBOAK ETA MATERIALA .....	19
2.3. KALIBRATUEN PRESTAKETA.....	20
2.4. LAGINEN AURRETRATAMENDUA ETA ANALISIA.....	21
2.4.1. Kannabinoideak.....	21
2.4.2. Terpenoak .....	22
<b>3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA</b> .....	<b>23</b>
3.1. ANALISIAREN ZEHAZTASUNA ETA EGOKITASUNA .....	23
3.1.1. Kalibratuak, detekzio-mugak eta kuantifikazio-mugak.....	23
3.1.2. Hezetasuna.....	25
3.1.3. Analisisien doitasuna .....	25
3.2. LANDAREEN HAZKUNTZA ESTRES-BALDINTZAPEAN.....	26
3.3. KANNABINOIDEEN ETA TERPENOEN KONTZENTRAZIOAK.....	28
3.3.1. Kannabinoideak.....	28
3.3.2. Terpenoak .....	33
3.4. OSAGAI NAGUSIEN ANALISIA (PCA).....	36
<b>4. ONDORIOAK</b> .....	<b>40</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>41</b>
<b>6. ERANSKINAK</b> .....	<b>46</b>

## 1. SARRERA

*Cannabis sativa L.*, *Cannabaceae* familiako espeziea da, gizakiek antzinatek erabili izan dutena, duela 10.000 urte baino gehiagotik. Mundu osoan zehar hedatu da, eta subespezieak hibridatu edo gurutzatu dira ezaugarri konkretuko landareak lortzeko. Horregatik, orain barietate desberdin asko, 2.300 baino gehiago, existitzen dira. Landare moldakorra eta fenotipikoki anitza izanda, helburu komertzial eta terapeutiko askotarako erabili izan da, giza kontsumorako zein zuntza edo olioak lortzeko.<sup>1,2</sup>

Munduan gehien erabiltzen den legez kanpoko landarea da, baina hainbat gaitz tratatzeko eraginkorra den sendabelarra ere bada.<sup>3</sup> Erabilpen terapeutikoa landareak ekoizten dituen kannabinoideak eta terpenoak bezalako konposatu bioaktiboak edo metabolito sekundarioak zor zaie. Kannabinoideek osasunean eragina dute sistema endokannabinoidean eragiten dutelako, eta azken hamarkadetan, sistema honek interes handia piztu du jomuga terapeutiko gisa gaixotasun patologiko askotan.<sup>4</sup> Bestetik, terpenoak landarearen usainaren eragile dira, efektu mediko espezifikoak dituzte, eta ea sinergikoki kannabinoideekin jarduten duten aztertzen ari da komunitate zientifikoa.<sup>3</sup>

Horrela, Ameriketako Estatu Batuetako Elikagaien eta Sendagaien Administrazioak (FDA-k) eta Europako Medikamentuen Agentziak (EMA-k) kannabinoideak osagai aktibo modura dituzten zenbait farmako onartu dituzte, esate baterako, dronabinola eta nabilona.<sup>5,6</sup> Izan ere, anorexiak, minbiziak, edo giza immunoeskasiaren birusaren infekzioak eta sindromeak (GIB-a eta HIESA-k) eragindako jateko gogo falta tratatzeko erabil daiteke, haren efektu antiemetikoak onuragarriak izan daitezke kimioterapia gaixoentzat, eta artritis edo esklerosi anizkoitza bezalako gaixotasunak eragindako min neuropatiko kronikoa arintzen du, besteak beste.<sup>3,7</sup>

*Cannabis* landareak izan ditzakeen erabilerak kontuan hartuta, landareak ekoiztutako kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioak neurtzea eta kontrolatzea garrantzitsua da. Izan ere, erabilera medizinaletarako eraziaren profila kontrolatzea eta estandarizatzea ezinbestekoa da. Horrez gain, inguruko estresak, esate baterako,

tenperaturak eta hezetasunak, landarearen hazkuntzan eragiteaz gain, konposatu bioaktiboen kontzentrazioan ere eragiten du. Hazkuntza-prozesua modu kontrolatuan eta estandarizatuan egin behar denez, inguruko baldintzak eta hauen eragina determinatzea garrantzitsua da. Modu horretan, landareak hazteko baldintza egokienak eta laginak jasotzeko momentu egokienak determinatu daitezke. Gainera, metabolito sekundarioen neurketa egiteak barietate desberdinen karakterizazioa egiteko balio du, hauek bereiztea ahalbidetuz.

### 1.1. KONPOSATU BIOAKTIBOAK

*Cannabis sativa L.* konposatu bioaktibo ugarietan aberatsa da, 750 konposatu inguru identifikatu baitira, hala nola, kannabinoideak, flabonoideak, terpenoak, estilbenoideak, alkaloideak, esteroideak, polisakaridoak, bentzokinonak, espiroindanoak, lignanoak, gantz azidoak, azukreak, hidrokarburoak, aminoazidoak, eta proteinak. Ohikoenak edo ugariak kannabinoideak eta terpenoak dira, eta izan dezaketen interes terapeutikoagatik hauek izan dira gehien aztertutakoak.<sup>8</sup> Kannabinoideak eta terpenoak metabolito sekundarioak dira, hau da, ez daude landarearen hazkuntzarekin eta garapenarekin zuzenean lotuta, baina zeregin garrantzitsua dute landarearen defentsa mekanismoan.<sup>9</sup> Horregatik, nagusiki, infloreszentzia femeninoen trikoma glandularretan, 1. Irudian ikus daitezkeenak, sintetizatzen dira.



**1. Irudia:** *Cannabis* landareko trikoma glandularrak, konposatu bioaktiboak sintetizatzen diren landarearen atala

### 1.1.1. Kannabinoideak

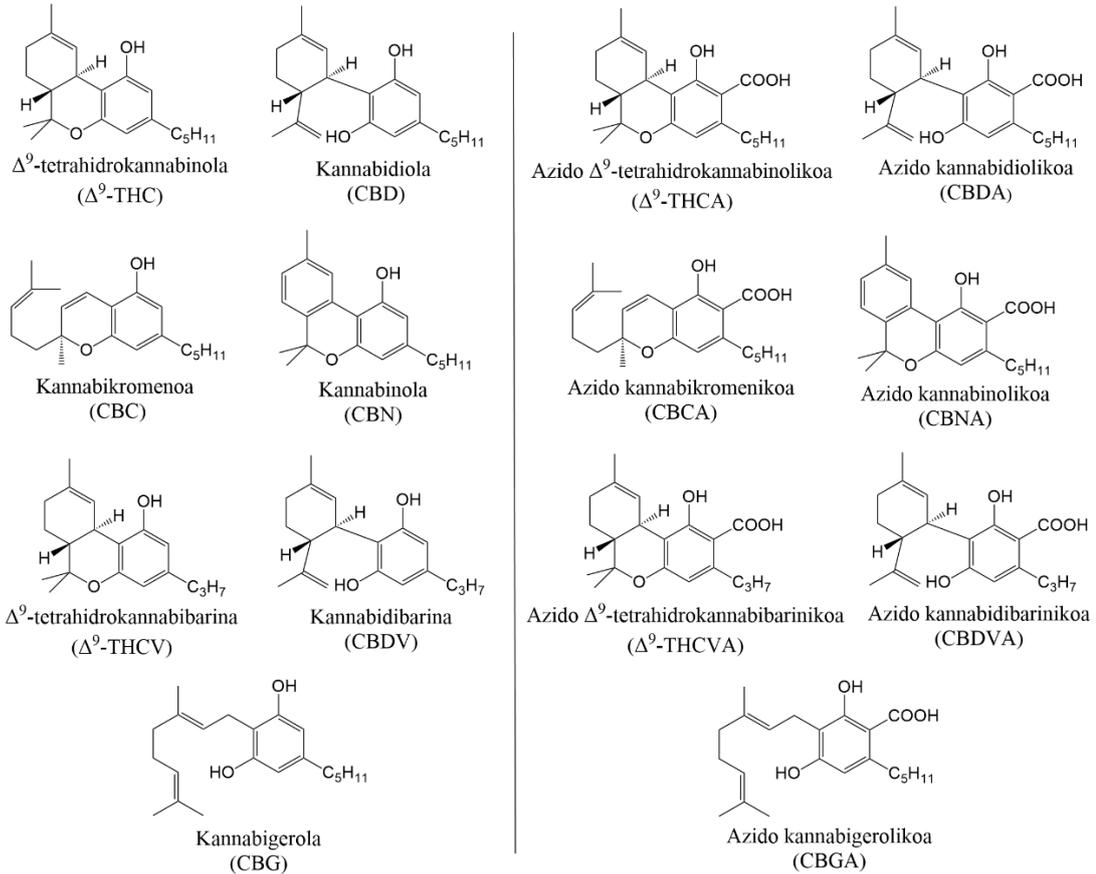
Kannabinoideak sistema endokannabinoideko kannabinoide-hartzaileekin, CB1-ekin eta CB2-rekin, besteak beste, elkarrengaitzeko gaitasuna duten konposatuak dira eta hiru multzotan bana daitezke: endokannabinoideak, fitokannabinoideak eta kannabinoide sintetikoak.<sup>2,8</sup>

Endokannabinoideak ia animalia guztiek ekoizten dituzten lipido endogenoak dira, nagusiki garunean aurkitzen direnak, esate baterako, anandamida eta 2-arakidonilglicerola. Hauek funtzio erregulatzailea dute prozesu fisiologiko askotan, hala nola, jateko gogoia, min-sentsazioa, aldartea, memoria, hantura, intsulina, sentikortasuna, eta gantzaren eta energiaren metabolismoa.<sup>2,4</sup>

Fitokannabinoideak, nagusiki, *Cannabis* landarean, batez ere, aipatutako infloreszentzia femeninoen trikoma glandularretan, ekoizten diren terpenofenolak dira. Bi motatako fitokannabinoideak bereizten dira: kannabinoide azidoak, landareak sintetizatzen dituenak, eta kannabinoide neutroak, degradazio-prozesu baten bidez sortzen direnak. Guztira 100 kannabinoide baino gehiago aurkitu dira hostoetan eta loreetan, besteak beste,  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinola ( $\Delta^9$ -THC), azido  $\Delta^9$ -tetrahidrokannabinolikoa ( $\Delta^9$ -THCA), kannabidiola (CBD), azido kannabidiolikoa (CBDA), kannabigerola (CBG), azido kannabigerolikoa (CBGA), kannabikromenoa (CBC), azido kannabikromenikoa (CBCA), kannabinola (CBN), azido kannabinolikoa (CBNA), tetrahidrokannabibarina (THCV), azido tetrahidrokannabibarinikoa (THCVA), kannabidibarina (CBDV), eta azido kannabidibarinikoa (CBDVA).<sup>8</sup> Cannabis landarean aurki daitezkeen kannabinoide nagusien egitura kimikoak 2. Irudian bildu dira.

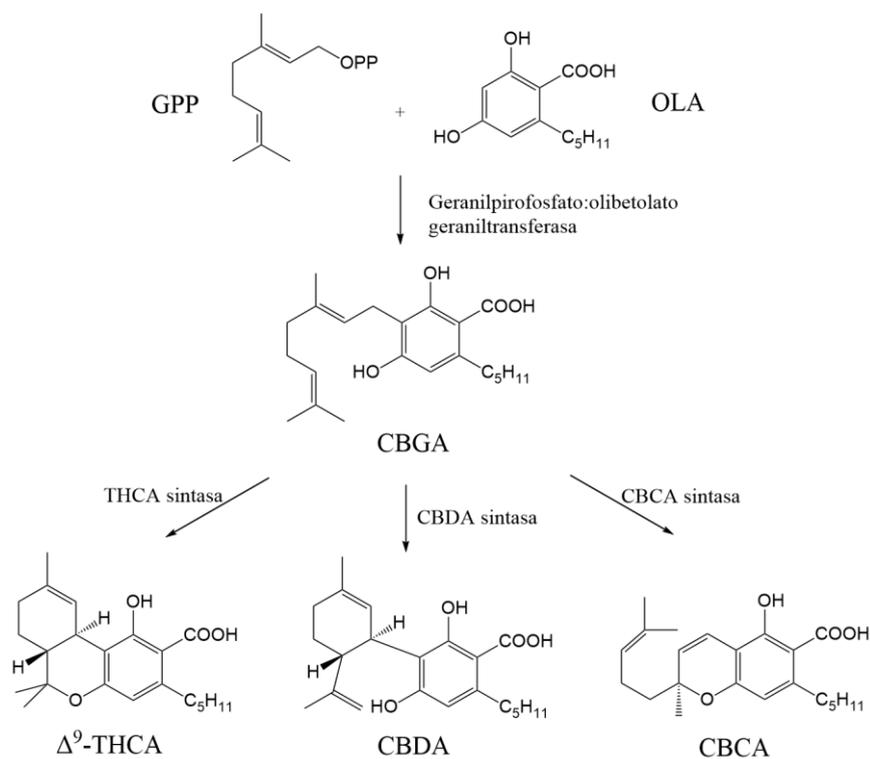
Kannabinoide sintetikoak, fitokannabinoideak bezala gizakien kannabinoide-hartzaileekin antzerako lotura afinitateak dituzten konposatu sintetikoak dira. Esate baterako, aurretik aipatutako, dronabinolak sintetizatutako  $\Delta^9$ -THC-a du, eta nabilonak landarean ez dagoen baina THC-aren antzeko efektuak dituen konposatu sintetiko bat du. Hauetako batzuk merkatu ludiko ilegalean erabiliak izan dira ("spice" edo "K2" deiturikoak), ez zegoelako legerik debekatzen zituena, eta batzuk efektu toxiko arriskutsuak izan ditzakete, beraien segurtasuna ez baita aurrez ziurtatu.<sup>2,10,11</sup>

## Kannabinoideak



### 2. Irudia: *Cannabis* landarean aurkitutako kannabinoide nagusiak

Fitokannabinoideen biosintesiari dagokionez, bide biosintetiko desberdinetatik sortzen dira kannabinoideen bi aitzindariak: polizetido bidetik azido olibetolikoa (OLA) lortzen da, eta 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) plastidalaren bidetik geranil difosfatoa (GPP). Azido olibetolikoa hexanoato gantz azidotik datorren hexanoil-CoA-ren eta 3 molekula malonil-CoA-ren arteko aldol kondentsazioan sintetisatzen da. Erreakzio hau polizetido sintetasa eta azido olibetoliko ziklasa entzimek katalizatzen dute. Geranilpirofosfato:olibetolato geraniltransferasak OLA eta GPP arteko alkilazioa katalizatzen du, kannabinoideen aitzindaria den CBGA sortuz. Ondoren, hiru oxidoziklasa dira kannabinoideen dibertsitatearen erantzule: THCA sintasa, CBDA sintasa, eta CBCA sintasa. (Ikusi 3. Irudia) CBDVA eta THCVA bezalako kannabinoide dibaroinikoen aitzindaria, azido olibetolikoa izan beharrean, azido dibarinolikoa da.<sup>4</sup>

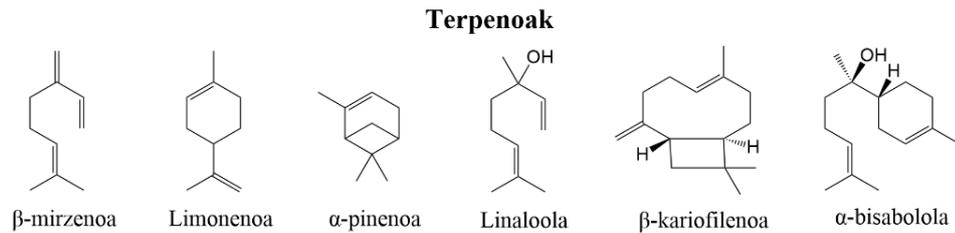


### 3. Irudia: *Cannabis sativa* L. landarean dauden kannabinoide azido nagusien bide biosintetikoak

Aipatutako kannabinoide azidoek deskarboxilazio ez-entzimatikoa jasaten dute kannabinoide neutroak emateko. Deskarboxilazio hau, beroaren, argiaren, baldintza alkalinoen, zein denboraren menpe dago. Horrez gain, ezaguna da THCA-ren degradazioan CBNA dela produktu nagusia, beraz, CBNA-ren eta CBN-aren kontzentrazioak handitzen dira laginketaren ostean.<sup>2,4</sup> Gainera, CBD-a ere degrada daiteke THC-a eta CBN-a sortuz.<sup>12</sup> Bestetik, THC-aren forma ohikoena  $\Delta^9$ -THC-a da, baina isomerizazio prozesu baten bidez  $\Delta^8$ -THC-a lortzen da, lotura bikoitzaren kokapenean desberdintzen dena. Prozesu hau kontrol termodinamikoak gidatzen du eta *Cannabis* landarean  $\Delta^8$ -THC-a aurki daitekeen arren, oso kontzentrazio txikitik egoten da.<sup>13</sup> Kannabinoide honen jarraipena egiten da batez ere erauzketa eta deribatizazio prozedurak ikertzean, hor gerta daitekeelako konbertsioa baldintza desegokietan lan eginez gero.<sup>14</sup>

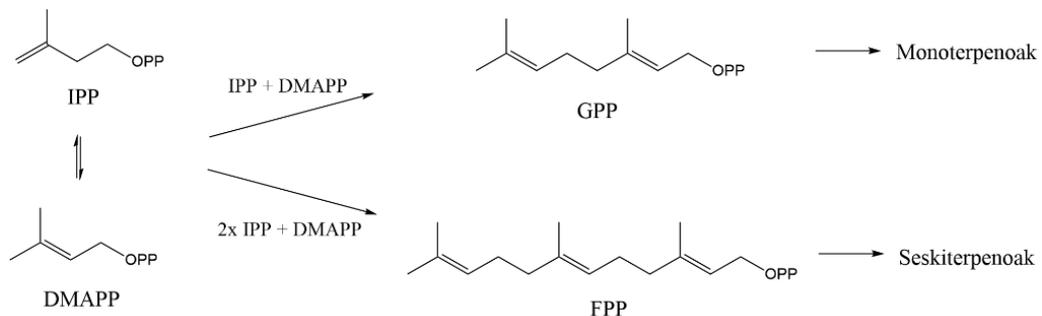
### 1.1.2. Terpenoak

Terpenoak landarearen usain bereizgarriaren arduradunak diren konposatu lurrunkorrak eta lipofilikoak dira. Landareek belarjaleak uxatzeko erabiltzen dituzte eta espezie honetan 100 terpeno baino gehiago aurkitu dira.<sup>2,4,8,15</sup> *Cannabis* landarean terpeno nagusiak monoterpenoak (10 karbono atomo dituztenak) eta seskiterpenoak (15 karbono atomo dituztenak) dira. Aromaren erantzule nagusiak direnak limonenoa,  $\beta$ -mirzenoa,  $\alpha$ -pinenoa, linaloola,  $\beta$ -kariofilenoa eta  $\alpha$ -bisabolola dira; hauetatik lehenengo laurak monoterpenoak dira eta azkenengo biak seskiterpenoak.<sup>8,15,16</sup> Aipatutako azken hauen egitura kimikoak 4. Irudian bildu dira.



#### 4. Irudia: *Cannabis* landarean aurkitutako terpeno nagusiak

Terpenoen sintesirako bi bide biosintetiko desberdin daude. Seskiterpenoentzako azido mebaloniko zitosoikoaren (MVA-ren) bidea jarraitzen da, eta monoterpenoentzako aurretik aipatutako MEP-aren bidea. Isopentenil difosfatoa (IPP) sortzen da eta dimetilalil difosfatoa (DMAPP-a) emateko isomerizatzen da. Zitosean, IPP bi molekula eta DMAPP molekula bat kondentsatzen dira farnesil difosfatoa (FPP-a) lortuz, seskiterpenoen aitzindaria dena. Bestetik, plastidoan, IPP molekula bat eta DMAPP molekula bat, GPP sintetatasaren bidez, kondentsatzen dira GPP-a sortuz, monoterpenoen aitzindari zuzena dena (Ikusi 5. Irudia).<sup>4</sup>



#### 5. Irudia: *Cannabis sativa L.* landarean dauden terpeno nagusien bide biosintetikoa

## 1.2. ERABILPEN TERAPEUTIKOA

*Cannabis* landarea agente terapeutiko natural gisa erabili izan da antzinatek. Bere hasierako propietate terapeutikoei erreferentzia egin zaie K.a. 2900.urtean, Fu-Hsi enperadore txinatarrak marihuana sendagai ezagun gisa aipatuz.<sup>17</sup>

Gaur egun, kannabinoideak osagai aktibo modura dituzten zenbait farmako daude merkatuan. Dronabinolak (Marinol<sup>®</sup>, Syndros<sup>®</sup>) eta nabilonak (Cesamet<sup>®</sup>) THC-a edo antzeko kannabinoide sintetikoak dituzte eta kimioterapiak eragindako goragaleak tratatzeko erabiltzen dira. Dronabinolak, horrez gain, giza immunoeskasiaren birusaren infekzioa eta hartutako immunoeskasiaren sindromea (GIB-a eta HIESA) duten pertsonen jateko gogo-falta edo anorexia tratatzeko ere balio du. Epidiolex<sup>®</sup> farmakoa landaretik eratorritako CBD erauzkin bat da eta haurtzaroko epilepsia tratatzeko erabiltzen da.<sup>18</sup> Bestetik, FDA-k Nabiximol (Sativex<sup>®</sup>) farmakoa onartu ez badu ere, Europako herrialde askotan merkatuan dago, EMA-k onartzen baitu.<sup>6</sup> Hau esklerosi anizkoitzarekin erlazionatutako sintoma neuropatikoei aurre egiteko erabiltzen da, CBD eta THC kannabinoideak dituen landaretik eratorritako erauzkin ekimolekularra izanik.<sup>5,19</sup> Azken bi medikamentuak, landarearen erauziak izanik, kannabinoideez gain beste konposatu bioaktibo batzuk ere badituzte, horregatik, medikamentu homogeneoak lortzeko edo merkaturatzeko zailtasun handiagoa egon daiteke.

Bestetik, ikertzen jarraitzen da kannabinoide eta terpeno bakoitzak dituen propietate farmakologikoak eta albo-ondorioak. Gainera, efektu farmakologikoak hainbat fitokimikoren arteko elkarrekintza sinergikoen edo antagonikoen ondorio direla ere aztertzen ari da. Izan ere, esaten da kannabinoideen jarduera biologiko batzuk areagotu egiten direla terpenoekin ekintza sinergiko baten ondorioz, segizio efektua edo “entourage effect” deritzona.<sup>4,15</sup> Jarraian, kannabinoide eta terpeno nagusiek erabilpen terapeutiko gisa erakutsitako potentziala aurkezten da.

THC-a, THCA-ren forma deskarboxilatu psikoaktiboa da eta, sistema endokannabinoideko CB1 eta CB2 hartzailen agonista partziala da, baina afinitate handiagoa du CB1 hartzailarekin, propietate psikoaktiboen bitartekaria dena.

THC-ak hartzaile gehiago ditu, eta jarduera antiinflamatorioa, analgesikoa, muskulu-erlaxatzailea, neuro-antioxidatzailea, antiespasmodikoa eta zenbait minbizien aurkakoa ditu. Hala ere, THC-a zenbait albo-ondorioekin ere erlazionatu da, hala nola, antsietatearekin, defizit kolinergikoarekin, kalteekin memorian eta garapen kognitiboan (batez ere, garuna garatzen dagoenean), koordinazio galerarekin, eta immunosupresioarekin. CBD-ak, CBDA-ren forma deskarboxilatuak, propietate farmakologiko ugari ditu, besteak beste, antsietatearen, goragaleen, artritaren, psikosiaren, eta hanturaren aurkako propietateak, eta propietate immunomodulatorioak ere. Gainera, nerbio-sistema zentraletako gaixotasun eredu preklinikoetan potentziala erakutsi du eragile terapeutiko gisa, hala nola, epilepsia, gaixotasun neurodegeneratiboak, eskizofrenia, esklerosi anizkoitza, eta nahasmendu afektiboak. Horrez gain, propietate antifungikoak eta antibakterianoak ere aurkezten ditu. Aipatzekoa da, CBD-ak THC-aren farmakozinetikari eragiten diola, eta horrela, THC-aren albo-ondorioak murrizteko gai dela. THC-aren eta CBD-aren ondoren, CBC-a da hirugarren kannabinoide ugariena. CBC-ak ezaugarri antiinflamatorioak, lasaigarriak, analgesikoak, antibakterianoak, eta antifungikoak ditu.<sup>4</sup>

Bestalde, terpenoek zelula-mintzak eta bereziki odolaren eta garunaren hesia erraz zeharkatzen dituzte, hori dela eta propietate farmakologikoak ere badituzte. Limonenoak, *Citrus* esentzia-olioetan ere aurkitu ohi dena, propietate antsiolitikoak, eta immunoestimulatzailerak ditu.  $\beta$ -mirzenoa, lupuluan ere dagoena, konposatu antiinflamatorioa, analgesikoa eta antsiolitikoa da.  $\alpha$ -pinenoa azetilcolinesterasa inhibitzaile bat da, eta horrela, THC-ak eragindako oroimen-defiziten kontra egin dezake. Linaloolak, *Lavandula angustifoliana* aurkitu ohi dena, beste monoterpenoen antzeko propietateak ditu, hau da, analgesikoak, antsiolitikoak, antiinflamatorioak, eta antikonbultsiboak.  $\beta$ -kariofilenoak, piper beltzaren eta Copaiba baltsamuan dagoen seskiterpenoak, jarduera antiinflamatorioak ditu, eta zitoprotektore gastrikoa da. Horrez gain, selektiboki lotzen da CB2 kannabinoide-hartzailearekin, beraz, teknikoki fitokannabinoide gisa ere har daiteke. Azkenik,  $\alpha$ -bisabolola propietate antifungikoak, antibakterianoak eta antiinflamatorioak ditu.<sup>4</sup>

Kannabinoideek eta terpenoek propietate farmakologiko ugari izan arren, hauen eraginkortasuna eta izan ditzaketen sinergiak eta albo-ondorioak ikertzen jarraitu behar da, erabilera terapeutiko optimoa duten farmako berriak lortu nahi baldin badira.

### 1.3. CANNABISAREN TAXONOMIA

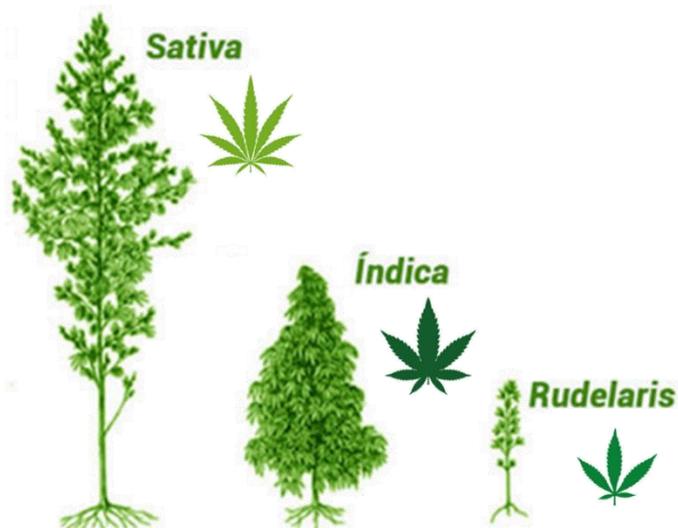
*Cannabis* landareak sailkatzeko hainbat modu daude, eta eztabaida handia dago honen inguruan. Izan ere, taxonomia botaniko formalak bi azpiespezie aitortzen ditu *C. sativa* espeziearen barruan, *C. sativa sativa* eta *C. sativa indica*; baina, beste botanikari batzuentzat bi espezie desberdin daude, *C. sativa* eta *C. indica*.<sup>20,21</sup>

1753. urtean Linnaeusek espezie batek osatutako genero monotopikotzat jo zuen, *C. sativa* L. Bere deskribapena oso laburra izan zen, baina ezaguna da bere landareak jatorri europarra zutela eta zuntz-motakoak zirela. Ondoren, 1785. urtean Lamarckek bi espezie bereizi zituen, *C. indica* Lam. deskubritzean. *C. sativa* Europan hazten zen bitartean, *C. indica* Indian hazten zen. Lamarckek *C. indicari* buruz egin zuen deskribapena zurtoinarenean, adarkatze moduaren, folioloen eta loreen ezaugarri morfologikoengatik desberdintzen zen *C. sativatik*. Gainera, desberdintasun kimiotaxonomikoak ere deskribatu zituen: *C. indica* usain sendoa zuen eta psikoaktiboa zen.<sup>20</sup>

Hala ere, urteekin, espezieak edo subespezieak izendatzeko orduan nahasketak egin dira, tokiko nomenklaturagatik. Horrela, “sativa”, “indica” eta “rudelaris” terminoak agertu dira, ez datozenak bat aurreko izenekin. Izan ere, “sativa” eta “indica” *C. sativa indicaren* azpipopulazioak dira, eta “rudelaris” barietate proteiko bati egiten dio erreferentzia, *C. sativa sativa* eta hibrido berriak barne.<sup>22</sup> Jarraian, nomenklatura honekin erlazionatutako ezaugarriak deskribatzen dira.

“Sativa”-k hosto estuko, itxura lerdin eta altuko, eta heltze berantiarreko landareei egiten die erreferentzia, zeinen arbasoak Asiako hegoekialdekoak diren (batez ere India), Afrikan eta Ameriketako bertako ondorengoekin. Landare hauek CBD-a baino askoz THC-a gehiago sortzen ohi dute eta terpenoei esker usain gozoa dute. Depresioa, buruko mina, goragalea, eta jateko gogo galera tratatzeko gomendatu

izan da, psikoaktibitate estimulatzailea eta energizantea duelako. Bestetik, “indica”-k hosto zabaleko, itxura trinko eta motzeko, eta heltze goiztiarreko landareei egiten die erreferentzia, zeintzuen arbaso autoktonoak Asiako erdialdekoak ziren (batez ere, Afganistan). Hauek, CBD-a gehiago sortzen dute, eta terpeno profilak usain garrantza ematen du. Landare hauek lasaigarria den psikoaktibitatea eragiten dutenez, insomnia, mina, hantura, giharretako espasmoak, epilepsia, eta glaukoma tratatzeko gomendatu izan dira. Azkenik, “ruderalis” Errusian sortutakoa da, THC gutxiago du eta beste bi landareak baino gutxiago neurtzen du. Horrez gain, azpiespezie honen ezaugarririk garrantzitsuena loratzea argi zikloekiko independentea dela da.<sup>20,22,23</sup> 6. Irudian hiru azpipopulazioen landareen eta hostoen itxura agertzen da.



#### 6. Irudia: *Cannabis* landarearen azpipopulazioen ezaugarri fenotipikoak

Hala ere, *Cannabis* landareak askotan gurutzatu izan dira helburu zehatzetarako fenotipo hibrido bideragarriak sortzeko, hala nola, kalamu industrialak (zuntza, elikagaiak, eta olioak) edo marihuana medizinalak. Hori dela eta, gaur egun ezin dira landareak sailkapen horretan bereizi.<sup>21,23</sup> Izan ere, “sativa”-ren ezaugarri fenotipikoak, baina “indica”-ren konposatu bioaktiboen profila duten landareak izan daitezke, edo alderantziz. Ondorioz, nomenklatura hori erabiltzen jarraitzen bada ere, ezaugarri fenotipikoak aztertuz, ez dago jakiterik konposatu bioaktiboen profila, eta ondorioz eragingo duen efektua.

Sailkapena ezaugarri kimikoen arabera egiteko aipatutako kalamu industrialak eta marihuana motak bereizi ziren. Horretarako, THC kontzentrazio totala aztertzen da, hau da, kannabinoide azidoaren eta kannabinoide neutroaren arteko gehiketa. Marihuanak, normalean, % 3 baino THC total gehiago (% 3-30) izaten du pisu lehorrean, aldiz, kalamu industrialean THC totalaren kontzentrazioa % 0,3 baino txikiagoa da, THCA-sintasaren absentsia edo aktibitate mugatuagatik.<sup>18,21</sup> Marihuana giza kontsumorako erabiltzen dena da, aisialdirako zein medikuntzarako; kalamua, aldiz, zuntza lortzeko edo olio erazteko erabiltzen da.<sup>1</sup>

Kimiotipoak barietateak sailkatzeko beste modu bat da, THC eta CBD kontzentrazio totalak hartzen dituen kontuan. I kimiotipoko landareetan THC kannabinoidea da nagusi, horregatik, THC totala/CBD totala  $\gg 1$  da. II kimiotipoan THC totala/CBD totala  $\approx 1$  da. III kimiotipoa CBD-a izatean nabarmentzen da, eta THC totala/CBD totala  $\ll 1$  da. Azkenik, IV eta V kimiotipoak zuntz motatako talde gehigarriak dira; lehenengoek CBGA dute kannabinoide nagusi gisa, eta bigarrenek ez dute ia kannabinoiderik.<sup>24</sup>

Bibliografian aipatu izan da terpenoak, kannabinoideekin batera, erabil daitezkeela markatzaile kimiotaxonomiko gisa *C. sativa*-ren barietate desberdinak bereizteko; izan ere, biak hartzen dira fisiologikoki aktiboak diren bigarren mailako metabolito nagusitzat.<sup>2,4,8</sup>

#### **1.4. ESTRES-BALDINTZEN ERAGINA**

Landareak organismo sentikorrek dira eta estres-baldintzen aurrean euren buruak defendatzeko hainbat mekanismo erregulatzaile dituzte. Hori dela eta, landareak estres-baldintza desberdinen eraginpean jartzeak metabolismoaren funtzionamendu normalari eragiten dio, eta ondorioz, erantzun fisiologiko bereziak sortzen dira, esate baterako, fotosintesian. Horrek askotan, II fotosistemaren funtzionamenduan eta klorofila edukian eragiten du.<sup>25,26</sup> Estres-baldintza hauek abiotikoak zein biotikoak izan daitezke, eta eragin positiboa edo negatiboa izan dezakete.

Alde batetik, estres abiotikoa ingurugiroko faktore inerteek, hala nola, muturreko tenperaturek, lehorreak, gainureztatzeak, gazitasunak, argiaren erradiazioak, nutrienteek edota azidotasanak, eragindakoa da.<sup>27</sup>

Tenperaturak eragin handia du jarduera metabolikoan eta landareen hazkuntzan, hori dela eta, tenperatura altuek hostoen seneszentzia goiztiarra eragin dezakete.<sup>27</sup> Gainera, ikusi da 45-50 °C-ko tenperaturek CBGA-ren ekoizpena, eta beraz, orokorrean kannabinoideen ekoizpena, nabarmenki txikitzen dutela.<sup>28</sup> Modu berean, tenperatura baxuek ere eragina dute. Aklimatazio hotzak CBD-aren eta THC-aren kantitate totalen beherakada dakar. Hala ere, aklimatazio honek hotzaren aurreko tolerantzia hobetzen du.<sup>29</sup>

Lehorreak eragindako estresa beste estres abiotiko garrantzitsua da. Orokorrean, ur eskasiaren estresak landare-materia lehorraren ekoizpena murrizten du eta efektu hau, estres gehienak bezala, fenotipoaren eta hazkunde fasearen arabera da.<sup>30</sup> Lehorreak pairatutako landareek CBG-a gehiago metatzen dute, eta CBD-a eta THC-a kantitateak nabarmenki jaisten dira. Gainera, egindako beste ikerketa batek frogatu zuen lehorrearen estresak geneen adierazpen ereduak nabarmen aldatzen dituela.<sup>28</sup> Horrez gain, uholdeak edo gainureztatzeak gerta daitezke prezipitazio handien ostean, batez ere, gaizki drainatutako lurzoruetan. Horrek, hipoxia eragin dezake sustraian, mantenugaiak murriztuz eta estres hormonak sortuz.<sup>31</sup>

Ingurune gaziak, lehorrearekin batera, zelulen deshidratazioa eragiten du, zeinak estres osmotikoa eta zitoplasmari ura kentzea ekartzen duen, bolumen zitosolikoa eta bakuolarra murriztuz.<sup>27</sup> Sustrai eta kimu biomasak gutxitu egiten dira NaCl-ren presentzian hazkunde begetatiboan zehar, eta estresari erantzuteko hainbat gene aktibatzen dira. Kalamua gatz-estresarekiko sentikorra da, batez ere, ernatzeko garaian. Izan ere, 200 mM NaCl-ren presentzian, hostoek hazkundearen geldialdia erakusten dute, lignifikazioaren gorakadaren ondorioz.<sup>32</sup>

Argia energia iturri nagusia da fotosintesian, landareen hazkunderako eta garapenerako. Horregatik, kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioak argiaren kalitate espektralaren, intentsitatearen, konposizioaren, iraupenaren eta

norabidearen araberakoak dira. Argi berdeak eragina du CBDA-ren sintesian, zeinak infragorriarekin (IR) eragin positiboa duen eta A zonaldeko ultramorearekin (UV-A) eragin negatiboa duen. Bestetik, THC-aren hazkundera lortzen da UV-B erradiazio kontrolatuan tratatuz. Hala ere, ikusi da UV-B erradiazioaren intentsitate handiek estresa eragiten dutela landarean, DNAn kalteak, fotoinhibizioa, lipidoen peroxidazioa, eta azkenik hazkunderaren atzerapena eraginez.<sup>33,34</sup> Horrez gain, hazkundera manipulatzeko, normalean, fase begetatiboan fotoperiodo, edo argi denbora, luzeekin hazten da landarea, eta ondoren, loratze-fasean fotoperiodoa murrizten da.<sup>35</sup>

Azidotasunari dagokionez, CBD-a, THC-a eta CBN-a ezegonkorak dira baldintza azidoetan, eta CBD-a baldintza basikoetan ere oso ezegonkorra da. Baldintza azidoetan, CBD-a degradatzen da  $\Delta^9$ -THC-a eta  $\Delta^8$ -THC-a sortuz.<sup>36</sup> Bestetik, nutrienteen eragina nahiko aldakorra da, adibidez, ikerketa batean fosforoa zuten ongarriek CBD, CBG eta CBN maila handitu zuten, baina THC maila gutxitu.<sup>28</sup>

Beste aldetik, estres biotikoa intsektuek, araknidoek, onddoek, bakterioek eta birusek bezalako organismo bizidunek eragindakoa da.<sup>37</sup> Jakina da izurrite ugarien ondorioz *Cannabis* landareak kaltetu eta suntsitu egin daitezkeela, ohikoenak armiarma akaroak, euli zuriak, tisanopteroak eta *Botrytis cinerea* bezalako onddoak izanik. Dena den, zenbait kasutan, ikusi da eragin positiboa izan dezaketela, izan ere, kannabinoideek eta terpenoek propietate antipatogenoak dituzte, eta landarearen defentsa sisteman paper garrantzitsua jokatzen dute. Horrela, frogatu da *Tetranychus urticae* akaroen populazioa haztean kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioek gora egiten dutela, bai hostoetan eta baita loreetan ere.<sup>38</sup> Gainera, hazkundera hobetzeko eta estres exogenoetatik babesteko balio duten bakterioak estrategia gisa erabiltzea gero eta arreta gehiago pizten ari da nekazaritzan. Adibidez, *Pseudomonas sp. SVB-B33* gatz-estresaren aurrean onuragarria da.<sup>32</sup>

Aipatutako guztiagatik, eta kutsadurak eta aldaketa klimatikoak eragin dezaketen estres berriak kontuan hartuz, oso garrantzitsua da baldintzak kontrolatzea. Izan ere, gehienetan, inguruko estres-baldintzek nekazaritza-produktibitatea mugatzen dute, eta beraz, baldintza optimoak determinatzeko garrantzitsua da.<sup>39,40</sup>

## 1.5. KANNABINOIDEEN ETA TERPENOEEN ANALISIA

### 1.5.1. Kannabinoideak

Kannabinoideen erauzketa burutzeko teknika edo prozedura ugari erabili izan dira, esate baterako, mazerazio dinamikoa, ultrasoinu bidezko erauzketa, mikrouhin bidezko erauzketa, eta jariakin superkritiko bidezko erauzketa.<sup>41</sup> Metodo ugari daude *Cannabis* landareko analitoak erauzteko, baina ohikoena, eta Drogen eta Delinkuentziaren Aurkako Nazio Batuen Bulegoak (UNODC-ak) eta "American Herbal Pharmacopoeia"-k (AHP-ak) gomendatzen dutena, sonikazioa da. Horrez gain, lehenik lagina labean lehortzea eta txikitzea ere gomendatzen da. Normalean, amaierako kontzentrazioak pisu lehorrean ematen direnez, hezetasuna kontrolatu behar da ziurtatzeko guztiz lehortzen dela (hezetasuna % 80a ingurukoa izanik<sup>42</sup>). Gainera, prozesua ahalik eta eraginkorrena izateko partikula tamaina ahal den txikiena izan behar da.<sup>43</sup>

Disolbatzailearen aukeraketa funtsezkoa da erauzketa-metodoa garatzeko, eta landarearen metabolito sekundarioen polaritatearen menpekkoa da. Kannabinoideen izaera polarra kontuan hartuz, etanola eta metanola bezalako alkoholak erauzketa-disolbatzaile egokienak bezala hartzen dira, baina, azetona, CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> 9:1, eta hexanoa bezalako polartasun txikiagoko disolbatzaileak ere erabili izan dira.<sup>41</sup> Hala ere, kontuan izan behar da polartasun txikiagoko disolbatzaileekin batez ere kannabinoide neutroak erauziko direla.<sup>44</sup>

Sailkapenari eta detekzioari dagokionez, kannabinoideak analizatzeko metodo instrumental ohikoenak HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector) edo HPLC-MS (High performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry), eta, GC-FID (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector) edo GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) dira.<sup>43,45</sup> Hala ere, GC ez da hain egokia, tenperatura altuagoak erabiltzen direnez eta denbora gehiago behar duenez, kannabinoide azidoak deskarboxilatzen direlako. Deskarboxilazio hau saihesteko trimetilsilil eter bidezko deribatizazioa egin daiteke, baina horretarako, laginaren tratamenduan urrats gehiago behar dira.<sup>43</sup> Gainera, kannabinoideen

degradazio termikoa gerta daiteke injekzio portuan, CBD-tik  $\Delta^9$ -THC-a eta CBN-a sortuz, edota  $\Delta^9$ -THC-tik CBN-a sortuz.<sup>12</sup>

Horrez gain, beste teknika batzuk ere erabili izan dira trikomen eta kannabinoideen analisisian, besteak beste, SEM (“Scanning Electron Microscope”), NIR (“Near-Infrared spectroscopy”), Raman eta  $^1\text{H-NMR}$  (“ $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ ”).<sup>46</sup> Adibidez, NIR espektroskopia kannabinoideen kontzentrazioa erauzi gabeko laginetan, hau da, lore eta hosto lagin lehor xehetuetan, determinatzeko erabil daiteke.<sup>47</sup> Dena den, oraindik lan handia dago egiteko, merkatuan dauden ekipoak ez baitira oso zehatzak.

### **1.5.2. Terpenoak**

Terpenoen erauzketarako ultrasoinu bidezko erauzketa, “headspace” eta fase solidoko mikroerauzketa erabiltzen dira, gehien bat.<sup>45,48</sup> Kasu honetan, lehortze-prozesuak terpeno lurrunkorren jatorrizko edukia aldatuko luke, beraz terpenoak ezin dira kannabinoideekin batera neurtu lagin prestaketa bakar batetik abiatuta. Horregatik, kannabinoideak neurtzeko laginak lehortzen dira, baina terpenoak neurtzeko laginak ez.<sup>43</sup> Terpenoak apolarragoak izanik, erauzketak eraginkorragoak dira etil azetatoa eta hexanoa bezalako disolbatzaileekin, baina etanola ere erabil daiteke.<sup>48,49</sup>

Bestetik, terpenoak bezalako molekula lurrunkorrek banatzeko GC metodo egokia da. Detektagailuari dagokionez, FID detektagailuak tarte lineal handia du eta aukera ematen du terpeno kontzentrazio tarte zabala (% 0,01-1,5) injekzio bakar batekin neurtzeko.<sup>43</sup> Horrez gain,  $\beta$ -kariofilenoa barietate guztietan presente egonik<sup>50</sup>, kromatografian erretentzio denborak zuzentzeko erabil daiteke. Gainera, terpeno desberdin asko egonda eta askorentzat estandarrak ez daudenez eskuragarri, GC-FID bidez kalibratua eraikitzeke estandar bakarra erabil daiteke, adibidez,  $\gamma$ -terpinenoa. Izan ere, detektagailu horrekin neurtutako seinalea erreduzitutako karbono atomoekiko proportzionala da, eta, tamaina eta egitura antzekoko konposatuetan kontzentrazio/seinale erlazioa nahiko egonkorra da.<sup>3,51</sup>

## 1.6. HELBURUAK

Kannabinoideek eta terpenoek izan ditzaketen aplikazioak kontuan hartuta, *Cannabis sativa* landarearen hazkuntza kontrolatua eta estandarizatua izatea garrantzitsua da. Izan ere, metabolito sekundarioen kontzentrazioetan desberdintasun handia dago inguru baldintzen, barietateen, hazkuntza-denboren eta lagin motaren arabera.

Horrela, estres tropikalak, hau da, tenperatura eta hezetasun altuek, hazkuntza prozesuan eragin ditzaketen aldaketak aztertzea da lan honen helburu nagusia, etorkizuneko hazkuntza-baldintzak erregulatzeko eta hobetzeko balio dezakeenak. Bestalde, estresak bariedade bakoitzaren, hazkuntza-denboren, eta lagin mota desberdinen gainean nola eragiten duen aztertu da. Horrez gain, bariedade oso desberdinak aztertu direnez, hauen karakterizazioa egitea ere posible izan da, kimiotipo desberdinetan sailkatuz. Gainera, lan hau beste ikerketa handiago baten barruan kokatzen da, zeinak tropikoko estres-baldintzetarako egokitzapen biomarkatzaileak aurkitzea eta modelo prediktibo bat eraikitzea duen helburu.

Horregatik, landarearen 12 bariedadeen kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioen jarraipena egin zen hazkuntza-baldintza desberdinetan, eta lagin biologiko mota desberdinetan. Landareak bi baldintza desberdinetan hazi ziren, tenperatura eta hezetasun altuek eragindako estres-baldintzetan eta estres gabeko kontrol-baldintzetan; bi lagin mota analizatu ziren, hostoak eta loreak; eta lau hazkuntza-denbora aztertu ziren, bi fase begetatiboan (t0 eta t1) eta bi loratze-fasean (t2 eta t3). Aztertutako 12 bariedadeak hurrengoak izan ziren: TA, KH, HT47, RE, WWDQ50, WWDQ48, WWRE52, WWFT47, WWTA50, WWTA46, WWRO49, eta WWWW36.

## 2. PROZEDURA ESPERIMENTALA

### 2.1. HAZKUNTZA ETA LAGINKETA

*Cannabis* landareak Sovereign Fields S.L. enpresan hazi ziren, propagazioa aldaxka bidez gauzatuta. 12 barietate eta barietate bakoitzetik 18 aldaxka 2 astez mantendu ziren “Jiffy”-etan hezetasun altupean sustraitzeko. Ondoren, 0,5 L-ko loreontzietan landatu ziren eta 2 astez aklimatazioan egon ziren negutegiko 24 m<sup>2</sup>-ko gela isolatu batean. Lumatek etxeko 6 zeramikazko haluro metalezko lanparak (315 W/37000 lm) jarri ziren gelako sabaian, 2,10 m-ko altueran, uniformeki banatuta gela osoan, eta Adjust-A-Wings markako islatzaile handiei akoplatuta.

4 asteak pasata, barietate bakoitzetik 12 landare 11 L-ko loreontzietara pasatu ziren, eta 6 landare 0,5 L-ko loreontzietan mantendu ziren bi aste geroago lehenengo laginketa (t0) bertatik egiteko. Landareak lurra/humus/nutriente nahaste batekin hazi ziren (% 80 “light mix” lurra eta % 20 humus, gehi 10 g/L Lurpe nekazari mantenugai nahastea). Aipatutako 12 landare horietatik 6 landare kontrol-baldintzetako gelan kokatu ziren eta beste 6 landareak estres-baldintzetako gelan, laginketa bakoitzean 6 erreplika biologiko izateko. 7. Irudian erakusten dira bi hazkuntza-gelak, ezkerrean kontrol-gela eta eskuinean estres-gela. Bi geletan tenperatura eta hezetasun desberdinak finkatu ziren.



**7. Irudia:** *Cannabis* landareen hazkuntzako kontrol-baldintzetako gela (ezkerra) eta estres-baldintzetako gela (eskuina)

Bi geletan temperatura nahiko konstantea mantendu zen hazkuntza-denbora guztian zehar, aldiz, hezetasunaren neurketek gorabehera handiagoak izan zituzten, batez ere, hasieran. Kontrol-baldintzetan batezbesteko temperatura 26,0 °C izan zen, temperatura minimoa 20,4 °C eta maximoa 35,7 °C izanik. Estres-baldintzetan batezbesteko temperatura 31,7 °C izan zen, temperatura minimoa 25,1 °C eta maximoa 40,5 °C izanik. Hezetasunari dagokionez, kontrol- eta stres-baldintzetan batezbesteko hezetasunak % 58a eta % 79a izan ziren, hurrenez hurren. Kontrol-baldintzetan hezetasun minimoa % 31a izan zen eta maximoa % 89a; bestetik, stres-baldintzetan minimoa % 57a izan zen eta maximoa % 99a.

Lehenengo laginketatik, t<sub>0</sub> moduan definitutakoa, 12 asteko hazkuntza izan zen: 4 aste fase begetatiboan (t<sub>1</sub> laginketa) eta 8 aste loraldi fasean (t<sub>2</sub> eta t<sub>3</sub> laginketak). Fase begetatiboko t<sub>1</sub> laginketa 4. astean egin zen, loraldi faseko t<sub>2</sub> laginketa 8. astean eta loraldi faseko t<sub>3</sub> laginketa 12. astean. Fase hauek fotoperiodoen erregimenak definitu zituen, hazkuntzaren lehenengo 4 asteetan fotoperiodoa 18 h argi/6 h ilun izan zen, eta loraldi fasean, 12 h argi/12 h ilun. Gainera, fase begetatiboan lanparak intentsitate osoaren % 50ean jarri ziren lanean, eta loraldi fasean intentsitatea % 100era igo zen. Bestetik, landare bakoitza tanta bidezko hodi batekin ureztatzen zen egunean birritan, 30 segunduz 65 mL/min-ko fluxuarekin, baina loraldi fasean egunean hirutan egin zen.

4. astean oidioprot produktua aplikatu zen, mikronutriente eta aminoazido nahaste bat, landareak oidio (hazkuntzan eragina duen onddoa) apur bat aurkezten hasi zirelako, eta 5. astean sufrea aplikatzea erabaki zen, onddoen edozein arrasto kentzeko. Horrez gain, arazo bat egon zen ureztatzeko urarekin 11. astean. Horrela, nahi gabeko stres azidoa sufritu zuten landareek ezusteko baten ondorioz gehiegi azidotu zelako ureztapeneko ura, eta pH = 1,6 izatera heldu zen.

Laginketari dagokionez, laginak hartu bezain laster izoztu ziren nitrogeno likidotan, “quenching metodoa” jarraituz, eta -40 °C-ko tenperaturan gorde ziren. “Quenching metodoa” metabolismoa gelditzeko prozesua da, hau da, laginketa prozesuan eta ostean profil metabolikoan aldaketak ez egoteko.<sup>52</sup> Bildutako laginak landare osoaren adierazgarri izateko laginketak modu honetan egin ziren:

- Hosto laginak: Erreplika biologiko bakoitzeko 12 hostoko nahastea bat prestatu zen, horietatik 6 landarearen goiko aldetik bildu ziren, eta beste 6 beheko aldetik.
- Lore laginak: Landare bakoitzeko 5 lore bildu ziren. Lehen lorea landarearen mutur apikaletik hartu zen, haren goiko puntuan. Bigarrena puntu hau baino 30 cm beherago hartu zen, zurtoinarene ondoan. Ondoren, aurrez aurre zeuden bi adar hurbilenak jarraitu ziren azken puntura arte, eta han zeuden bi lore bildu ziren. Azkenik, zurtoinarene ondoan zegoen lorerik baxuena bildu, eta guztiak nahastu ziren.

## **2.2. ERREAKTIBOAK ETA MATERIALA**

Laginak N<sub>2</sub> likidoa eta SPEX Sample Prep Freezer Mill 6770 ehogailu kriogenikoa erabiliz ehotu ziren, eta erreplika biologikoen nahasketa egiteko mortairua erabili zen. 15 mL-ko Falcon hodiedan (Sarstedt etxe komertzialekoak) eta Ohaus Discovery balantza analitikoan pisatu ziren laginak. Hauek sikatzeko Indelab markako labe lehorgailua erabili zen. Erauzketa egiteko erabilitako ultrasoinu bainua Lbx instruments etxe komertzialekoa izan zen eta disolbatzailea Labkem etxeko etanola (% 96, Grade ACS Ph Eur.) izan zen. Kannabinoideak neurtzeko laginetan fenantrenoa (Sigma Aldrich, % 100) gehitu zen barne estandar gisa, eta terpenoak neurtzeko laginetan nonanoa (Sigma Aldrich, % 100, 0,718 g/mL). Iragazteko 0,22 µm-ko nylonezko iragazkiak (Branchia), 2 mL-ko xiringak (Ecoject), eta 3 mL-ko plastikozko pasteur pipetak erabili ziren. Erauziak 2 mL-ko kromatografia bialeetan gorde ziren.

Kannabinoideen analisirako likido kromatografia (HPLC) UV detektagailu bati akoplatuta erabili zen, Shimadzu Prominence-i LC-2030 plus sistema. Bertan, Nexleaf CBX zutabea (2,7 µm, 150 mm x 4,6 mm) erabili zen, Nexleaf CBX aurrezutabearekin (2,7 µm). Fase mugikorrerako ura (GC/HPLC GGR, Labkem), metanola (GC/HPLC GGR, Labkem), eta azido formikoa (% 85 AGR ACS, Labkem) erabili ziren. Erabilitako estandarrak 1000 ppm-ko kontzentrazioetan eskuratu ziren. THC (CH<sub>3</sub>OH-tan) Cerilliant etxe komertzialetik lortu zen. Beste kannabinoide guztiak Dr. Ehrenstorfer etxe komertzialetik lortu ziren eta hurrengoak izan ziren: THCA (CH<sub>3</sub>CN-tan), CBDA (CH<sub>3</sub>CN-tan), CBCA (CH<sub>3</sub>CN-tan), CBNA (CH<sub>3</sub>OH-tan), CBGA (CH<sub>3</sub>CN-tan), THCVA (CH<sub>3</sub>CN-tan), CBDVA (CH<sub>3</sub>CN-tan), CBD (CH<sub>3</sub>OH-tan), CBC (CH<sub>3</sub>OH-tan), CBN (CH<sub>3</sub>OH-tan), CBG (CH<sub>3</sub>OH-tan), THCV (CH<sub>3</sub>OH-tan), eta CBDV (CH<sub>3</sub>OH-tan).

Terpenoen analisirako, aldiz, gas kromatografia - sugarraren ionizazio detektagailua (GC-FID) erabili zen. Zehatzago, Shimadzu GC-2010 pro instrumentua erabili zen Shimadzu SH-Rxi-5ms zutabearekin (0,25  $\mu$ m, 30 m x 0,25 mm). Kalibratua prestatzeko  $\gamma$ -terpinenoa (Sigma Aldrich, % 100, 0,85 g/mL) izan zen erabilitako estandar bakarra.

### **2.3. KALIBRATUEN PRESTAKETA**

Hiru kalibratu ezberdin prestatu ziren, kannabinoide azidoena, kannabinoide neutroena, eta terpenoena. Kasu bakoitzean bi aldiz prestatu zen kalibratu bakoitza eta bien batezbestekoa erabili zen. Bestalde, hiru kalibratuetan bi kalibratu-tarte definitu ziren, bat kontzentrazio baxuen determinaziorako eta bestea kontzentrazio altuen determinaziorako erabili zirelarik.

Kannabinoide azidoen hurrengo kontzentrazioekin eraiki ziren kalibratuak: 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, eta 0,1 ppm. THCA eta CBDA kontzentrazio handiagoetan aurki daitezkeenez, kalibratu luzeagoak prestatu ziren 200, 150, eta 99,75 ppm-ko disoluzioak erabiliz. Horrez gain, detekzio- eta kuantifikazio-mugak zehazteko 0,05, 0,01, eta 0,005 ppm-ko diluzioak prestatu ziren. Disoluzio guztiek 10 ppm fenantreno zuten barne estandar modura erabiltzeko.

Kannabinoide neutroen hurrengo kontzentrazioak erabili ziren kalibratuak egiteko: 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2, eta 0,1 ppm. Detekzio- eta kuantifikazio-mugak determinatzeko kannabinoide azidoetan bezala 0,05, 0,01, eta 0,005 ppm-ko diluzioak prestatu ziren. Disoluzio guztiek 10 ppm fenantreno zuten barne estandar gisa.

Terpenoentzako kalibratua sinplifikatzeko terpeno bakarra erabili zen terpeno guztien kuantifikaziorako, izan ere, sarreran aipatu bezala, FID detektagailuaren erantzunen arteko aldakortasuna oso txikia da masa molekular antzekoko konposatuetan. Horregatik,  $\gamma$ -terpineno kalibratuak prestatu ziren hurrengo kontzentrazioekin: 2003,2, 1001,6, 500,8, 100,2, 50,1, 10, 5, eta 1 ppm. Bestalde, 0,5, 0,2, eta 0,1 ppm-ko diluzioak ere prestatu ziren, detekzio- eta kuantifikazio-mugak determinatzeko. Disoluzio guztiek 100 ppm nonano zituzten barne estandar modura.

## **2.4. LAGINEN AURRETRATAMENDUA ETA ANALISIA**

Laginak ehogailu kriogenikoa erabiliz txikitu ziren, eta -40 °C-ko izozkailuan gorde ziren. Ondoren, laginketa bakoitzaren 6 erreplika biologikoak lagin bakar bat osatzeko bildu ziren. Horretarako, nitrogenu likidoa erabili zen lagina homogeneousatzeko, hezetasunarekin partikulak edo zatiak pilatzen baitira. Hemendik aurrera, kannabinoideak neurtzeko laginek eta terpenoak neurtzeko laginek prozedura desberdinak jarraitu zituzten.

### **2.4.1. Kannabinoideak**

Kannabinoideak neurtzeko lagin bakoitzerako, 1 g lagin heze pisatu zen 15 mL-ko Falcon hodian, eta labean sikatu zen 50 °C-tan 2 egunez, lehertzeko eta hezetasuna kalkulatzeko asmoz. Laginak ultrasoinu bainuan 30 minututan erauzi ziren giro tenperaturan, 300 ppm fenantreno zituen 10 mL etanol disoluzioa erabiliz. Ondoren, 1:30 diluzioa egin zen eta iragazi zen.

Analisia egiteko aurrez garatutako metodo baten egokitzapena erabili zen.<sup>3</sup> Banaketa kromatografikoa aurrera eramateko aipatutako Shimadzu markako HPLC-UV erabili zen eta A/B gradiente bitar bat ezarri zen, non A disolbatzailea zen H<sub>2</sub>O % 0,085 azido ortofosforikoarekin eta B disolbatzailea zen MeOH % 0,085 azido ortofosforikoarekin. Gradiente programa hurrengoak izan zen: % 60 B-rekin hasi 5 minutu mantenduz, gero pixkanaka % 72 B-ra igo 11 minututan, ondoren % 95 B-ra igo 6 minututan eta 2 minutuz mantendu, azkenik % 60 B-ra jaitsi minutu batean eta mantendu 5 minutuz orekatzeko. 1 mL/min-ko emaria erabili zen, zutabea 50 °C-tan ezarri zen, eta injekzio-bolumena 5 µL-koa izan zen. Detektagailuari dagokionez, kannabinoideak 220 nm-ko detekzio uhin-luzerarekin kuantifikatu ziren.

Analizatutako kannabinoideak sarreran aipatutakoak dira: THC, THCA, CBD, CBDA, CBC, CBCA, CBN, CBNA, CBG, CBGA, THCV, THCVA, CBDV, eta CBDVA.

### 2.4.2. Terpenoak

Terpenoak neurtzeko laginen kasuan, ez ziren labean lehortu, eta zuzenean egin zen erauzketa. Horretarako, 1 g lagin 100 ppm nonano zituen 5 mL etanol disoluzioarekin ultrasoinu bainuan sonikatu zen 30 minutuz. Kasu honetan ez zen diluziorik egin (kontzentrazio txikiagoetan baitaude), baina injektatu aurretik iragazi egin zen.

Analisia egiteko aipatutako Shimadzu markako GC-FID erabili zen. Horretarako, aurrez garatutako metodo baten egokitzapena erabili zen.<sup>3</sup> Injekzio temperatura 250 °C-tan finkatu zen, injekzio bolumena 1 µL-koa izan zen, eta split ratioa 1:10 izan zen. Gas garraiatzailearen (H<sub>2</sub>) fluxua 1,12 mL/min izan zen. Labearen temperatura programa hurrengoa izan zen: 60 °C-tan hasi, 3 °C/min-ko aldaparekin, 106 °C-ra iritsi arte; gero, 160 °C-ra igo 12 °C/min-ko aldaparekin; ondoren, 202 °C-ra igo 3 °C/min-ko aldaparekin; eta azkenik, 320 °C-ra igo 40 °C/min-ko aldaparekin, eta 3 minutuko isoterma zutabea garbitzeko. Detektagailuaren temperatura 330 °C-tan ezarri zen. Bertan, H<sub>2</sub> fluxua 40 mL/min-koa izan zen eta aire sintetikoaren fluxua 400 mL/min-koa.

Terpenoak kuantifikatzeko integrazio automatikoa erabili zen. Hauen erretentzio denborak ezagutzeko GC-MS erabili zen, eskuragarri zeuden estandarrak injektatu ziren eta eskuragarri ez zeudenak NIST (National Institute of Standards and Technology) liburutegian begiratu ziren. Analizatutako 53 terpenoak hurrengoak izan ziren: α-pinenoa, kanfenoa, sabinenoa, β-pinenoa, β-mirzenoa, α-felandrenoa, Δ-3-karenoa, α-terpinenoa, p-zimenoa, limonenoa, eukaliptola, *cis*-b-ozimenoa, *trans*-b-ozimenoa, γ-terpinenoa, terpinolenoa, linaloola, fentxola, isopulegola, borneola, mentola, α-terpineola, nerola, zitronelola, pulegona, geraniola, *trans*-anetola, geranil azetatoa, β-elementoa, α-zedrenoa, β-kariofilenoa, γ-elementoa, α-bergamotenoa, α-humulenoa, α-amorfenoa, α-selinenoa, β-selinenoa, α-farnesenoa, isokariofilenoa, γ-maalienoa, *cis*-nerolidola, β-maalienoa, aromadendrenoa, eudesma-3,7(11)-dienoa, *trans*-neridola, kariofileno oxidoa, guaiola, γ-eudesmola, α-eudesmola, β-eudesmola, bulnesola, α-bisabolola, eudesm-7(11)-en-4-ola, eta farnesola.

### 3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

#### 3.1. ANALISIAREN ZEHAZTASUNA ETA EGOKITASUNA

Prozedura esperimentalaren hainbat kalitate-parametro aztertu ziren emaitzen egokitasunari buruzko informazioa izateko.

##### 3.1.1. Kalibratuak, detekzio-mugak eta kuantifikazio-mugak

*Cannabis* landarean terpenoen eta kannabinoideen kontzentrazioak nahiko aldakorak izan daitezke. Horregatik, aipatu bezala, behar izan zen kasuetan, bi kalibratu-tarte prestatu ziren, doiketa egokiagoa lortzeko asmoz. Lortutako kalibratuak bat baliotik oso gertu zeuden korrelazio-koefizienteak izan zituzten. Horrez gain, terpenoentzako kalibratuaren errepikakortasuna nahiko ona izan zen, desbideratze estandar erlatiboa (DEE) % 3koa izanik. Kannabinoideen kalibratuei dagokienez, neutroen kalibratuak azidoen kalibratuak baino egiazkotasun hobea izan zuten, agian azidoen deskarboxilazioagatik. Neutroen kalibratu guztiek % 2-3ko errore erlatiboa izan zuten eta, azidoen kalibratuen batez bestekoa % 9koa izan zen.

Bestalde, detekzio-muga (DM) eta kuantifikazio-muga (KM) instrumentalak determinatzeko kalibratuko kontzentrazio baxuenetako puntuen diluzioak erabili ziren, ez baitago kannabinoide gabeko kannabis erauzkinik DM-ak eta KM-ak matrize errealean aztertzeko. DM-a detektatzen zen kontzentrazio txikiena bezala definitu zen, gutxi gorabehera hiru aldiz zarata, eta KM-a eman ahal zen kontzentrazio txikiena bezala, gutxi gorabehera hamar aldiz zarata. Muga instrumental hauek lagin errealetan neurtuko liratekeen mugak baino baxuagoak izan ohi dira ez delako matrizearen eragina kontuan hartzen. Hori jakinda, eta ikusita analisisiko erreplikekin DEE handiak lortzen zirela kontzentrazio-mailak oso baxuak zirenean, kuantifikazio-muga altuagoak finkatu ziren, hain zuzen ere, kalibratuko-mugek ematen zituzten balioak bider bi kontsideratu ziren kuantifikazio-mugak (2xKM). Muga hauek lagin pisu hezearekiko kalkulaturakoak izan ziren eta hurrengo atalean (3.1.2. Hezetasuna) azaltzen da erabaki honen zergatia.

Analito guztien kalibratuen ekuazioen ordenatuak, maldak eta  $R^2$  balioak, eta, detekzio- eta kuantifikazio-mugak 1. Taulan bildu dira.

**1. Taula:** Analito bakoitzaren kalibratuen ekuazioen parametroak (ordenatua eta malda), linealtasuna, eta, detekzio- eta kuantifikazio-mugak %-tan (laginaren pisu hezearekiko) adierazita. Analito beraren kasuan bi balio agertzen direnean lehenengoa kalibratu-tarte estuari dagokio eta bigarrena zabalari.

<b>Analittoa</b>	<b>Ordenatua</b>	<b>Malda (ppm<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>DM (%)</b>	<b>KM (%)</b>	<b>2xKM (%)</b>
<b>THC</b>	0,0002	0,0619	0,9992	0,0015	0,0030	0,0060
	0,0201	0,0554	0,9986			
<b>THCA</b>	0,0016	0,0696	0,9989	0,0015	0,0030	0,0060
	0,2086	0,0465	0,9878			
<b>CBD</b>	-0,0004	0,0630	0,9978	0,0015	0,0030	0,0060
	0,0181	0,0567	0,9977			
<b>CBDA</b>	0,0001	0,0697	0,9978	0,0015	0,0030	0,0060
	-0,0313	0,0701	0,9996			
<b>CBC</b>	0,0006	0,0638	0,9991	0,0015	0,0030	0,0060
<b>CBCA</b>	0,0022	0,0233	0,9986	0,0015	0,0030	0,0060
	0,0041	0,0225	0,9983			
<b>CBN</b>	0,0000	0,1129	0,9991	0,0015	0,0030	0,0060
<b>CBNA</b>	0,0032	0,0547	0,9996	0,0003	0,0015	0,0030
<b>CBG</b>	-0,0002	0,0616	0,9989	0,0015	0,0030	0,0060
	0,0183	0,0559	0,9988			
<b>CBGA</b>	0,0017	0,0843	0,9994	0,0003	0,0015	0,0030
<b>THCV</b>	-0,0010	0,0664	0,9990	0,0015	0,0030	0,0060
<b>THCVA</b>	0,0000	0,0691	0,9996	0,0015	0,0030	0,0060
<b>CBDV</b>	-0,0040	0,0654	0,9993	0,0030	0,0060	0,0120
<b>CBDVA</b>	-0,0012	0,0797	0,9996	0,0015	0,0030	0,0060
<b>Terpenoak</b>	-0,0001	0,0092	0,9983	0,0003	0,0005	0,0010
	-0,0311	0,0101	0,9999			

### **3.1.2. Hezetasuna**

Kannabinoideak determinatzeko ohiko prozeduretan<sup>41,43</sup>, eta hezetasunak ekar ditzakeen desbiderazioak saihesteko, laginak lehortu egiten dira eta, ondorioz, kontzentrazioak pisu lehorrean ematen dira. Kontutan hartu beharrekoa da lehortze honetan labean kannabinoide azidoen portzentaia bat degradatu egiten dela.

Jarraitutako prozedurarekin, laginak 2 egunez 50 °C-ra labean mantenduz, ez zen lortu laginak guztiz lehortzea. Izan ere, lehorketan % 58a inguruko ur galera ikusten zen, baina benetan frogatu zen landareek % 80a inguruko hezetasuna zutela. Hau, erabilitako Falcon hodiak altuak eta estuak zirelako izan zitekeen, edota lagina konpaktuegia zegoelako.

Ondorioz, eta emaitzak beraien artean konparatu ahal izateko, lagin guztiekin prozedura berdina jarraitzea erabaki zen (hots 2 egunez lehortzea) nahiz eta laginak guztiz lehortzen ez ziren, eta emaitzak pisu hezearekiko kalkulatu ziren.

### **3.1.3. Analisisien doitasuna**

Kannabinoideen eta terpenoen errepikakortasuna aztertzeko, lagin asko zirenez, barietate baten kasuan hiru erreplika egin ziren lagin guztietarako, hau da, hazkuntza-denbora, hazkuntza-baldintza eta lagin mota (hostoak eta loreak) guztietarako, baina, gainontzeko barietateekin analisisia kontrolpean zegoela konprobatzeko, barietate bakoitzean hazkuntza-denbora, hazkuntza-baldintza eta lagin mota bakar baten hiru erreplika egitea erabaki zen.

Kannabinoideen analisisetan, kannabinoide azidoentzako DEE % 6koa izan zen eta kannabinoide neutroentzako % 5koa, kannabinoide desberdinen desbideratzeak beti % 12 baino txikiagoak izanik. Aldiz, terpenoen kasuan, doitasuna txarragoa izan zen haien lurrunkortasunagatik seguruenik, monoterpenoen batezbesteko DEE % 10a izanik eta seskiterpenoena % 9a izanik. Kalkulatutako desbiderapen erlatibo hauek lagin guztien batezbesteko errore modura kontsideratuko dira 3.3. atalean azalduko diren emaitzetan.

### 3.2. LANDAREEN HAZKUNTZA ESTRES-BALDINTZAPEAN

Barietateek estres-baldintzen aurrean erantzun desberdinak erakutsi zituzten, bai konposatu bioaktiboen ekoizpenari dagokionez, baita landarearen hazkuntza edo garapenari dagokionez ere. Tamainari erreparatuta, orokorrean, fase begetatiboan estres-gelan egondako landareak gehiago garatu ziren kontrol-gelako landareak baino, eta loratze-fasean, berriz, kontrol-gelako loratzea nabariagoa izan zen. Horrela, fase begetatiboan temperatura eta hezetasun altuek landarearen hazkuntzan laguntzen dute, baina loratze-fasean loreen garapena oztopatzen dute, kontrol-gelako baldintzak hobekiak izanik fase honetan. Hau 8. irudian ikus daiteke, loratze-fasean egindako argazkietan estres-gelan (eskuina) landare altuagoak behatu daitezke eta kontrol-gelan (ezkerra) lore garatuagoak dituzten landareak.



**8. irudia:** Hazkuntzaren 8. asteko kontrol-gelako (ezkerra) eta estres-gelako (eskuina) landareak

Modu berean, 7. astean egindako landareen tamainaren neurketek erakutsi zuten estres-gelako landare gehienak altuagoak zirela, kontrol-gelako landareekin 5-10 cm-ko aldea izanik. Bakarrik WWFT48, WWDQ48 eta WWT46 barietateen kasuan, kontrol-gelako eta estres-gelako landareek antzeko tamaina lortu zuten.

Horrez gain, aipatzekoa da “sativa” barietateak beste barietateak baino hobeto moldatu zirela estres tropikaleko baldintzei, gehiago haziz. Izan ere, hezetasunaren aurka egiteko morfologia egokiagoa dute, tarte handia izanez adarkatzeen eta hostoen artean, eta ondorioz, aireztapen optimoa areagotuz. Adibidez, WWWW36 barietatea, zeinetan estreseko landareak kontrolko landareak baino 15 cm altuagoak ziren.

Bestetik, aipatu bezala, aurretiaz programatuta ez zeuden estres azidoa eta estres biotikoa ere sufritu zituzten landareek, barietate bakoitzean eragina desberdina izanik. Landarean agertutako onddoak (oidioa) azkar tratatu ziren, beraz estres biotikoak ez zuen eragin nabarmenik izan. Bestetik, estres azidoak landareen zurtoinak ahuldu zituen eta hostoak kolore horixka hartzea eragin zuen. Adar batzuk apurtu ziren eta horrela, landare batzuk hil egin ziren. Hildako landare gehienak kontrol-gelakoak ziren, orduan, esan daiteke estres azidoak kontrol-gelako landareei gehiago eragin ziela. Izan ere, hezetasun-maila baxuagoa izanda ureztatzeko ur gehiago xurgatuko zuten, eta beraz azido gehiago. Adibide modura, 9. Irudian kontrol-gelako HT47 barietateko landare bat erakusten da, ezkerreko argazkia estres azidoa sufritu aurrekoa da, eta eskuinekoa ondorengoa.



**9. Irudia:** Kontrol-baldintzapean hazitako HT47 barietateko landarea estres azidoa sufritu aurretik (ezkerra) eta sufritu ondoren (eskuina)

### 3.3. KANNABINOIDEEN ETA TERPENOEN KONTZENTRAZIOAK

#### 3.3.1. Kannabinoideak

Azaldutako analisi prozedurari jarraituz, laginen kannabinoide edukia neurtu zen. Balio hauek 1. Eranskinean taularatu dira.

Nahiz eta aukeratutako barietateen kimiotipoak definituta zeuden, barietate bakoitzaren kimiotipoa konfirmatu genuen. Horretarako, azken laginketako kontrol-baldintzapeko loreetako THC eta CBD kontzentrazio totalak zatitu ziren, sarreran aipatu den moduan. Horrela, THC totala / CBD totala  $\gg 1$  denean I kimiotipokoa kontsideratzen da, THC totala / CBD totala  $\approx 1$  denean II kimiotipokoa, eta THC totala / CBD totala  $\ll 1$  denean III kimiotipokoa. Emaitzak 2. Taulan bildu dira.

**2. Taula:** Azken laginketako kontrol-gelako barietateen lore-laginen THC-aren eta CBD-aren kontzentrazio totalak, THC/CBD erlazioa eta kimiotipoa

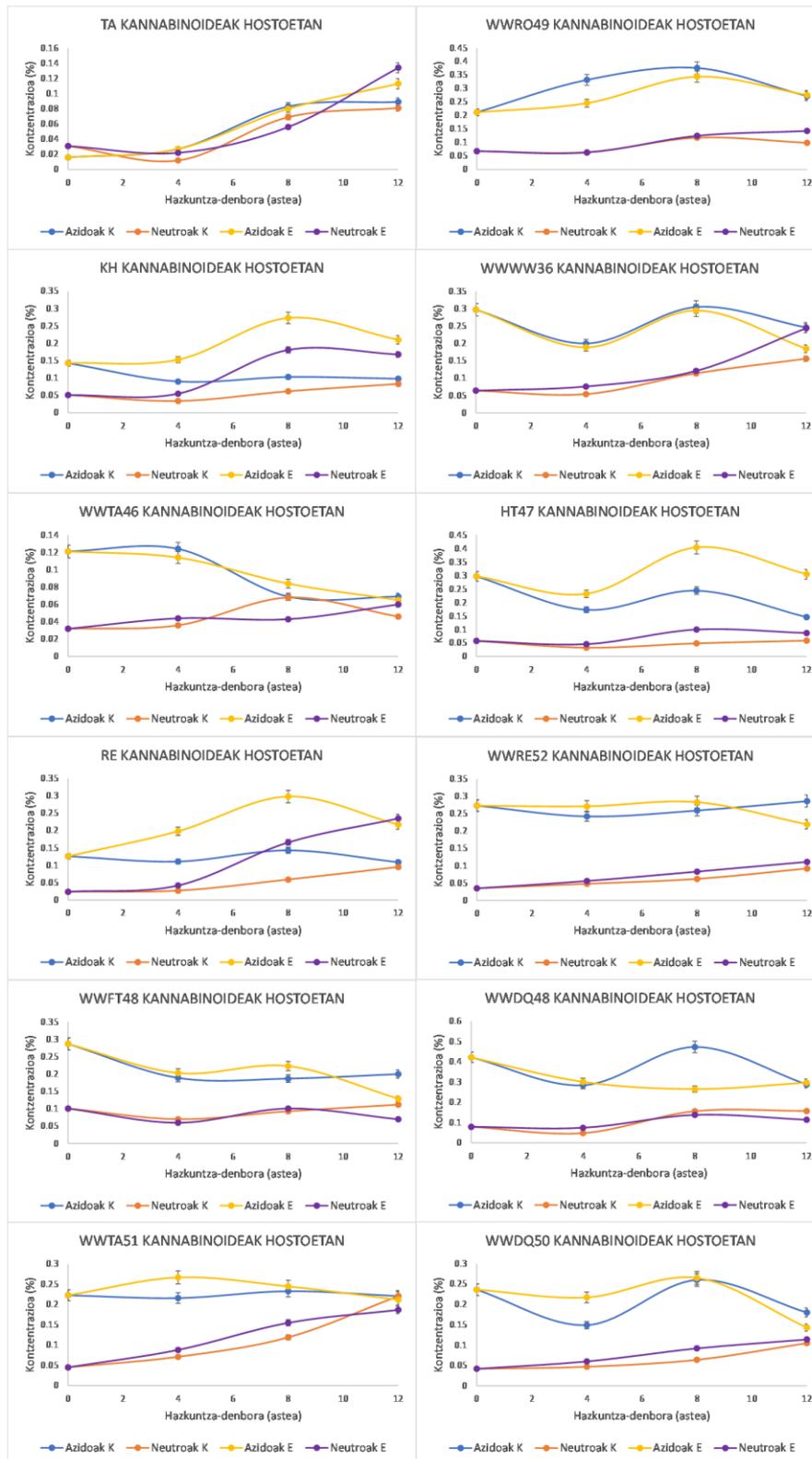
Barietatea	THC (% hezean)	CBD (% hezean)	THC/CBD	Kimiotipoa
TA	4,761	0,013	365,75	I
WWTA46	3,447	-	-	I
WWTA51	5,260	-	-	I
WWRO49	2,410	-	-	I
WWWW36	5,177	0,008	655,85	I
WWRE52	4,800	0,044	109,06	I
WWDQ48	5,204	0,052	100,52	I
WWDQ50	4,253	0,020	212,50	I
RE	1,281	1,248	1,03	II
WWFT48	1,447	1,308	1,11	II
HT47	0,064	1,682	0,04	III
KH	0,090	2,519	0,04	III

KH eta HT47 barietateak III kimiotipokoak dira, eta RE eta WWFT48 barietateak II kimiotipokoak dira. Beste barietate guztiak I kimiotipokoak dira. Emaidza hauek, aurretik esleitutako barietateen kimiotipoa konfirmatu zuten.

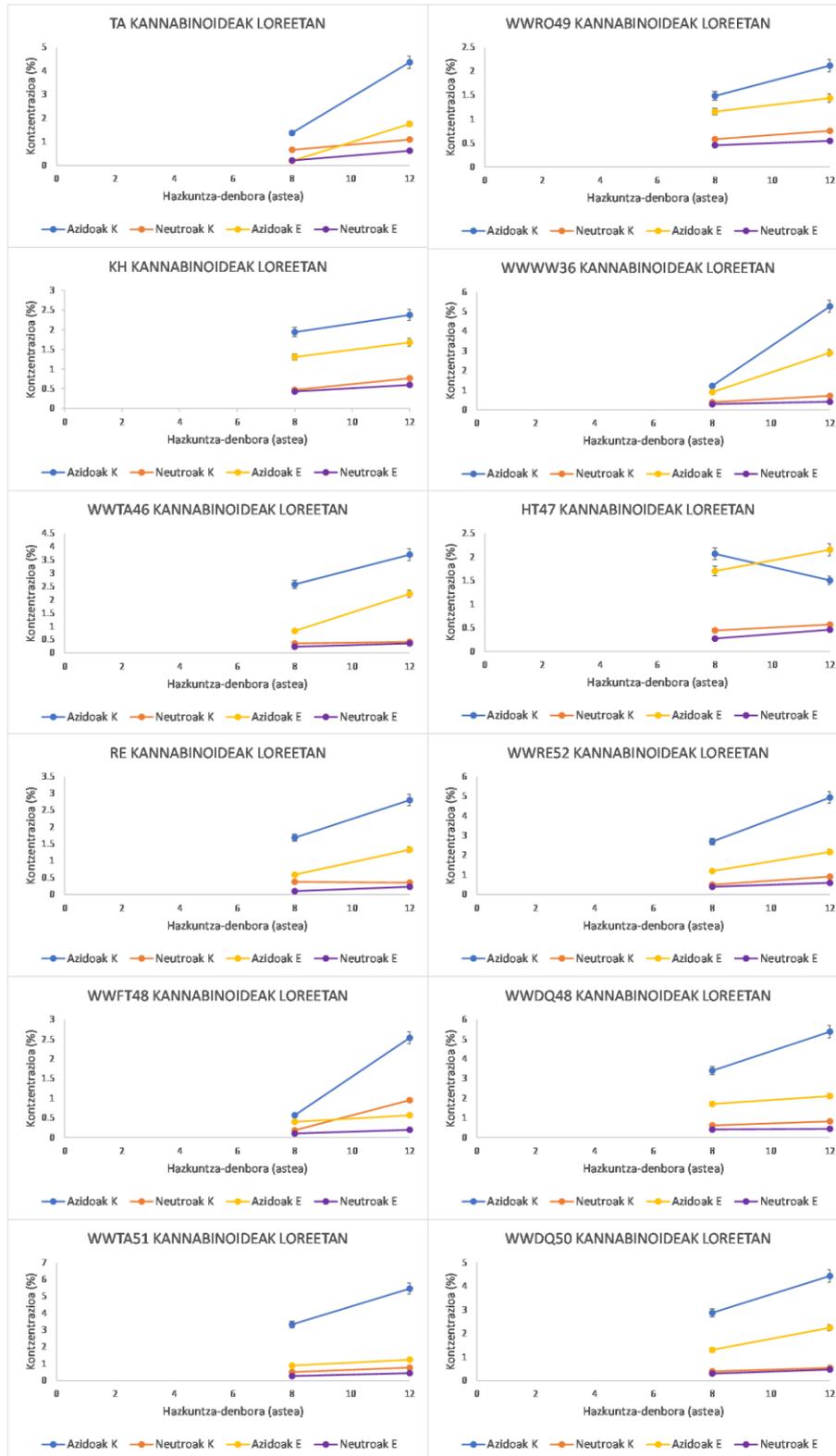
Hurrengo bi irudietan (10. Irudia eta 11. Irudia) barietate bakoitzak kontrol- zein estres-baldintzetan lortutako kannabinoide neutroen eta kannabinoide azidoen baturak agertzen dira hazkuntza denborarekiko. 10. Irudian hostoetan lortutako kontzentrazioak bildu dira eta 11. Irudian loreetan lortutakoak. Errore barrak 3.1.3. atalean azaldutako batezbesteko % DEE-aren arabera ezarri dira.

Joera orokorrari buruz hitz egitean, hostoetan, errepikatzen den joera bat ikusten da. Hasieran, fase begetatiboan kannabinoideen kontzentrazioa txikitzen da, landarea hazten dagoelako eta kannabinoide kantitatea ez delako nabarmenki handitzen. Loratze-fasea hastean, berriz, kontzentrazioaren igoera behatzen da, trikomak garatzearekin kannabinoide kantitatea handitzen delako. Horrez gain, hazkuntzaren azken asteetan kannabinoide neutroek eta azidoek portaera desberdina erakusten dute. Neutroetan kontzentrazioak igotzen jarraitzen duen bitartean, azidoetan malda beherakorra ikusten da. Honen arrazoia azidoak degradatzen hasten direla izan daiteke. Loreetan, bakarrik bi hazkuntza-denborako laginak izanda, joerei buruz ezin da askorik eztabaidatu, baina nagusiki joera gorakorra izan dutela esan daiteke.

Kannabinoide azidoen eta kannabinoide neutroen kontzentrazioak konparatzean, argi ikus daiteke azidoak kontzentrazio altuagoetan agertzen direla bi hazkuntza-baldintzetan eta hosto eta lore laginetan. Izan ere, landareak biosintetizatzen dituenak azidoak dira eta neutroak deskarboxilazio prozesuaren ondorioz sortzen dira. TA barietateko hostoetan ez da hori hain argi ikusten, agian arazoak egon zirelako pisaketarekin edo analisiarekin. Horrez gain, loreetan hostoetan baino kontzentrazio askoz handiagoak, gutxi gorabehera 10 aldiz handiagoak, lortu direla begi bistakoa da, loreetan eta hostoetan dauden trikomak desberdinak baitira.<sup>53</sup>



**10. Irudia:** Barietate bakoitzean hostoetan lortutako kannabinoide azidoen eta kannabinoide neutroen kontzentrazioen baturen garapena hazkuntzan zehar, kontrol-baldintzetan (K) eta estres-baldintzetan (E)



**11. Irudia:** Barietate bakoitzean loreetan lortutako kannabinoide azidoen eta kannabinoide neutroen kontzentrazioen baturen garapena hazkuntzan zehar, kontrol-baldintzetan (K) eta estres-baldintzetan (E)

Finkatutako estresak kannabinoideen kontzentrazioan izan zuen eraginari buruz ondorioak ateratzeko, batez ere, azken laginketako, 12. asteko, kontzentrazioak begiratu dira, horiek izango lirakeelako produkzioaren amaierako kontzentrazioak. Dena den, egondako azidifikazioa kontuan hartuz, azken laginketako emaitzak ez dira oso egokiak ondorioak ateratzeko. Izan ere, azken laginek estres azidoa ere sufritu zuten. Horregatik, hazkuntzan zehar kontzentrazioen eboluzioa aztertzea ere garrantzitsua zen.

Orokorrean, estres-baldintzen eragina nabarmena izan da, kontroleko eta estreseko kontzentrazio gehienak ez baitira konparagarriak. Hostoetan, kontzentrazio handiagoak lortu dira estres-baldintzetan. Kontroleko eta estreseko kontzentrazio desberdintasun nabarmenenak KH, RE, eta HT47 barietateetan behatu dira, hau da, kontzentrazioei erreparatuta barietate horietan estresak eragin handiagoa izan du. Dena den, zenbait salbuespen ikus daitezke. WWW36, WWFT48, WWRE52, eta WWDQ50 barietateetako kannabinoide azidoen kontzentrazioak, eta WWT51, WWFT48, eta WWDQ48 barietateetako kannabinoide neutroen kontzentrazioak, kontrol-baldintzetan estres-baldintzetan baino handiagoak izan dira. Horrez gain, WWT46, WWRO49, WWT51 eta WWDQ48 barietateetan kontroleko eta estreseko azidoen kontzentrazioak konparagarriak izan dira. Neutroen kontzentrazioei dagokienez, WWDQ50 barietateko kontzentrazioak soilik izan dira konparagarriak.

Bestalde, loreetan, barietate guztiek kontzentrazio ez-konparagarriak izan dituzte, eta kontzentrazio handiagoak lortu dituzte kontrol-baldintzetan, HT47 barietateko kannabinoide azidoen kasuan izan ezik. Barietate honetako kannabinoide azidoak kontrol-baldintzetan joera beherakorra erakusten duten bakarrak dira, hazkuntzan ikusitakoarekin erlazioa daitekeena. Izan ere, barietate honetako kontrol-gelako landareek estres-gelako landareek baino estres azido handiagoa sufritu zuten eta kontrol-gelako erreplika batzuk hil egin ziren. Gainerako barietateak kontrol-baldintzetan kontzentrazio handiagoak lortu izana emaitza fisikoekin ere erlazioa daiteke, loreak kontrol-baldintzetan hobeto garatzen zirela ikusi baitzen. Kontroleko eta estreseko kannabinoide azidoen kontzentrazioen artean desberdintasun txikiak izan dituzten barietateak WWRO49, KH eta HT47 izan dira.

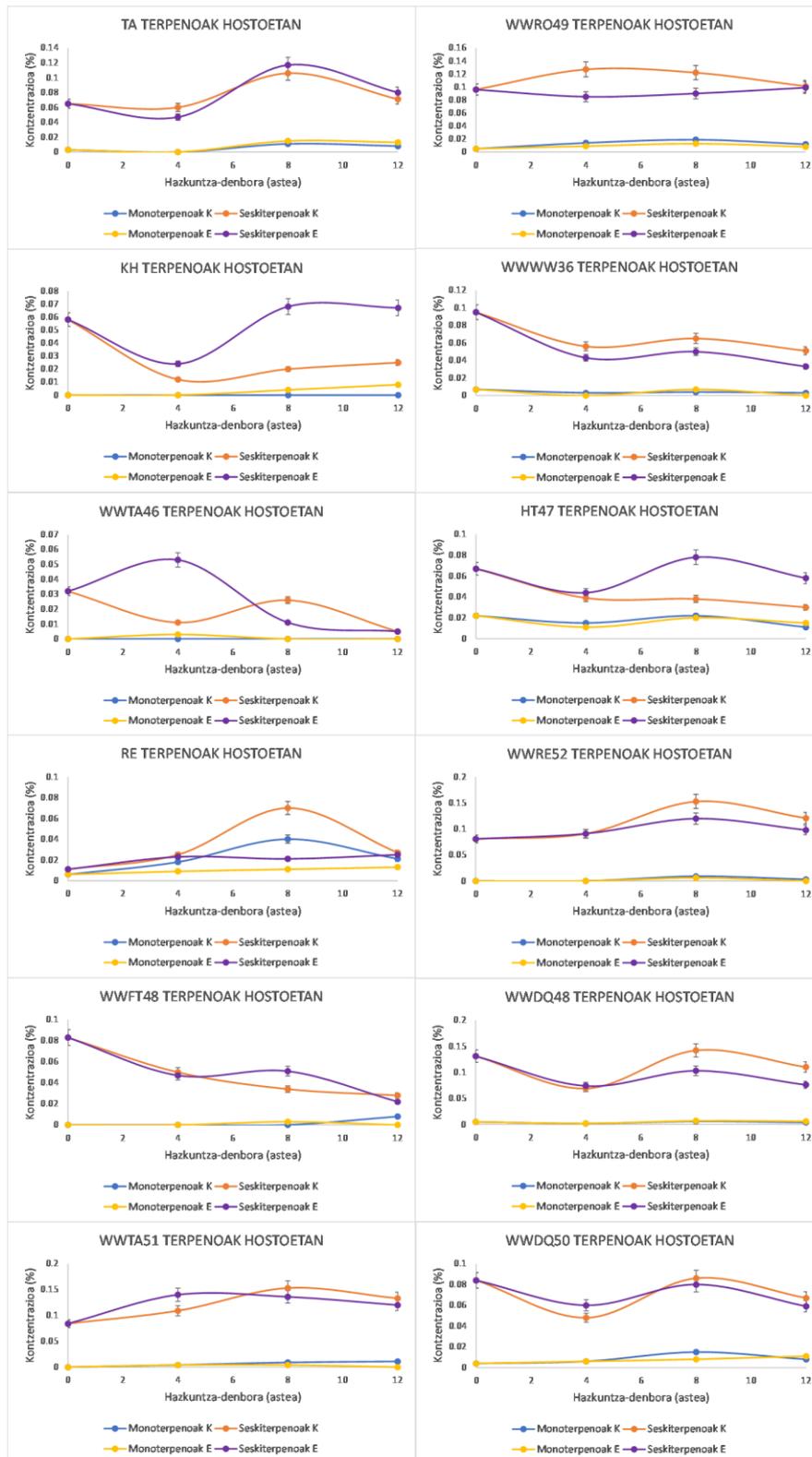
### 3.3.2. Terpenoak

Laginen terpeno edukia neurtu zen eta, monoterpenoen eta seskiterpenoen kontzentrazioen baturak 2. Eranskinetako taulan bildu dira. Hurrengo bi irudietan (12. Irudia eta 13. Irudia) barietate bakoitzak kontrol- zein estres-baldintzetan lortutako monoterpenoen eta seskiterpenoen baturak agertzen dira hazkuntza denborarekiko. 12. Irudian hostoetan lortutako kontzentrazioak bildu dira eta 13. Irudian loreetan lortutakoak. Errore barrak, aipatu den modura, batezbesteko % DEE-arekin definitu dira.

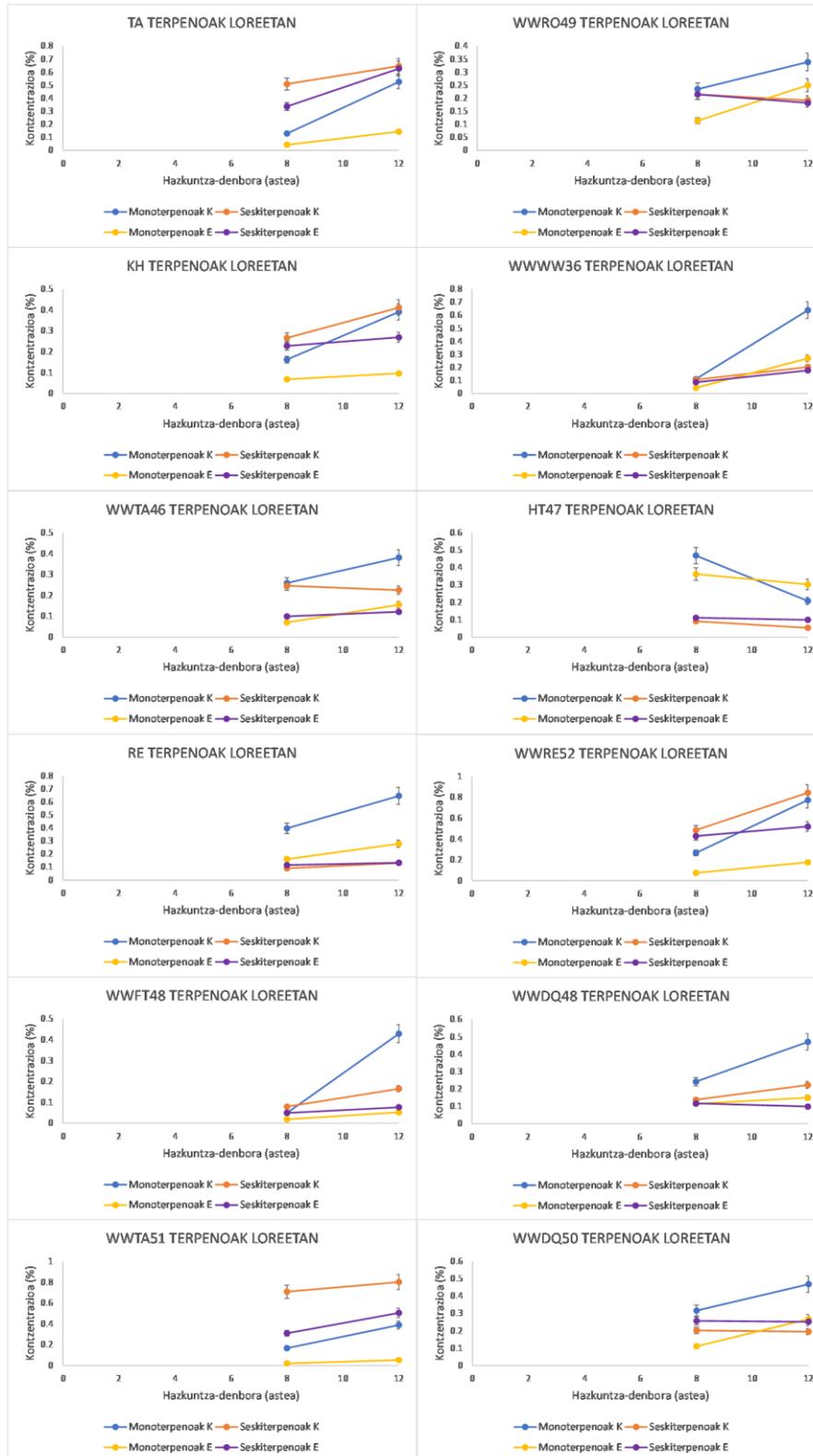
Hostoetan, zenbait kasutan, adibidez, TA eta WWW36 barietateetan, terpenoek ere kannabinoideetan ikusitako joera berdina erakutsi dute: fase begetatiboan malda beherakorra, loraldi fasearen hasieran gorakorra, eta amaieran beherakorra. Amaieran, malda beherakorraren arrazoia ez direla hainbeste terpeno produzitzen eta gainera, lurrunkorrek izanda, lurruntzen doazela izan daiteke. Loreetan, monoterpenoek eta seskiterpenoek joera desberdinak aurkezten dituzte, baina orokorrean joera gorakorra gailentzen da. Monoterpenoek beti erakusten dute joera gorakorra (HT47 barietatearen kasuan izan ezik), eta seskiterpenoek batzuetan joera konstanteak eta beherakorrak ere erakusten dituzte.

Monoterpenoak eta seskiterpenoak konparatzean, hostoetan seskiterpenoak monoterpenoak baino kontzentrazio handiagoetan aurkitzen dira barietate guztietan eta bi hazkuntza-baldintzetan. Loreetan, aldiz, aldakortasun handiagoa dago barietateen artean, baina barietate gehienek monoterpeno kontzentrazio handiagoak dituzte, bi baldintzetan. Izan ere, kannabinoideen atalean aipatu bezala, hostoetan eta loreetan dauden trikomak desberdinak dira. Horrela, hostoetan seskiterpeno gehiago produzitzen dira, eta loreetan monoterpeno gehiago.<sup>53</sup>

Kontrol- eta estres-baldintzapeko hazkuntzetan lortutako terpenoen kontzentrazioak konparatzeko, batez ere, azken laginketako kontzentrazioak erabili dira. Izan ere, kannabinoideen atalean esan den bezala, azken laginketa determinatzen baitu metabolitoen ekoizpen totala eta estresaren amaierako eragina.



**12. Irudia:** Barietate bakoitzean hostoetan lortutako monoterpenoen eta seskiterpenoen kontzentrazioen baturen garapena hazkuntzan zehar, kontrol-baldintzetan (K) eta estres-baldintzetan (E)



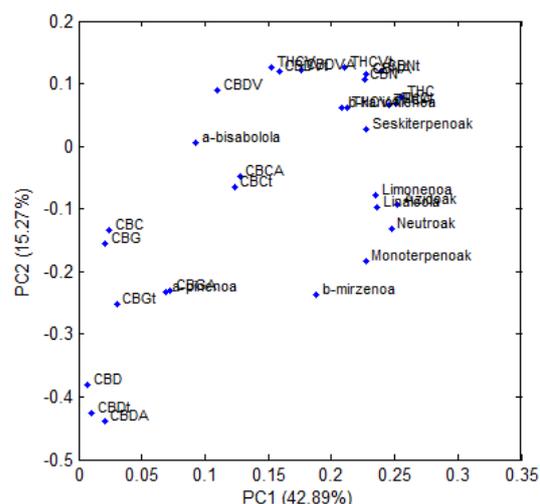
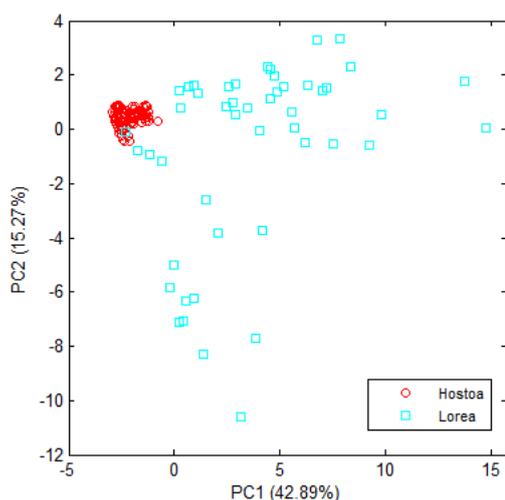
**13. Irdia:** Barietate bakoitzean loreetan lortutako monoterpenoen eta seskiterpenoen kontzentrazioen baturen garapena hazkuntzan zehar, kontrol-baldintzetan (K) eta estres-baldintzetan (E)

Hostoetan, barietate guztien kasuan, monoterpenoen bi hazkuntzetako kontzentrazioak ez direla konparagarriak ikusi da. Berriz, seskiterpenoen kasuan, barietateen erdiek kontzentrazio konparagarriak izan dituzte eta beste erdiek ez-konparagarriak. Seskiterpenoen kontzentrazio desberdintasun nabarmenenak KH eta HT47 barietateetan eman dira, eta ez-konparagarrien artean, barietate hauek izan dira estres-baldintzetan kontzentrazio handiagoak lortu dituzten bakarrak, seguruenik estres azidoagatik. Beste guztiak kontrol-baldintzetan kontzentrazio handiagoak lortu dituzte, izan ere, kontrol-gelan tenperaturak ez ziren hain altuak eta beraz, terpenoak ez ziren estres-gelan bezain erraz lurruntzen.

Lore laginen kasuan, antzekoa ikusi da. Barietate guztiek monoterpeno kontzentrazio ez-konparagarriak lortu dituzte bi baldintzetan, baina seskiterpenoen kontzentrazioak konparagarriak izan dira TA, RE, WWRO49 eta WWWW36 barietateen kasuan. Hau erlazionatuta egon daiteke monoterpenoen eta seskiterpenoen lurruntzeko gaitasunarekin, monoterpenoak molekula txikiagoak izanda lurrunkorragoak baitira. Horrez gain, hostoetan bezala, barietate gehienek kontzentrazio handiagoak lortu dituzte kontrol-baldintzetan. Dena den, aipatzekoa da, HT47 barietateko monoterpenoek eta seskiterpenoek, eta WWDQ50 barietateko seskiterpenoek estres-baldintzetan kontzentrazio handiagoak lortu dituztela, berriz ere, egondako estres azidoaren arazoari leporatu dakiokena.

### **3.4. OSAGAI NAGUSIEN ANALISIA (PCA)**

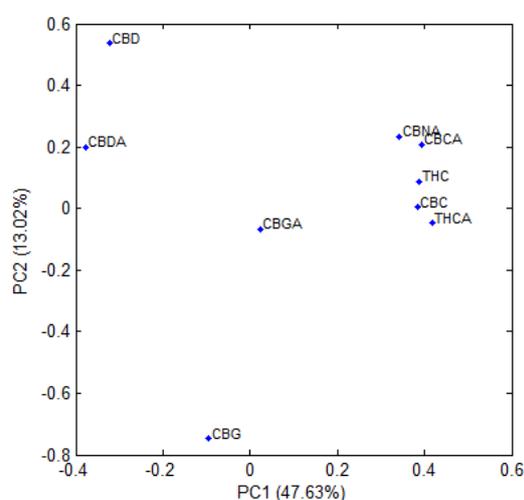
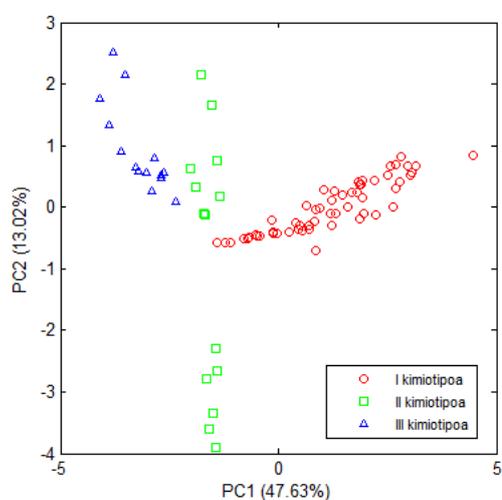
*Chemoface* programa erabiliz, osagai nagusien analisia egin da, ezkutuko informazioa azalertzeko. Aldagaiak hurrengoak izan dira: kannabinoideen kontzentrazio bakunak eta totalak, kannabinoide azidoen eta neutroen kontzentrazioen baturak, terpeno nagusien kontzentrazioak, eta monoterpenoen eta seskiterpenoen kontzentrazioen baturak. Lagin guztiak eta aldagai guztiak programan sartuz, 2 osagai nagusirekin (PC, "Principal Component") datuen bariantza osoaren % 58,16a azaltzen da. Hori nahikoa da lore laginak eta hosto laginak bereizteko, 14. Irudian ikus daitekeen moduan. Horregatik, hosto laginak eta lore laginak bakoitza bere aldetik aztertuko dira. Dena den, ez dago argi PC bakoitza zein aldagairekin lotuta dagoen.



**14. Irudia:** Lagin eta aldagai guztien irudikapena PC1 eta PC2 osagai nagusietan.

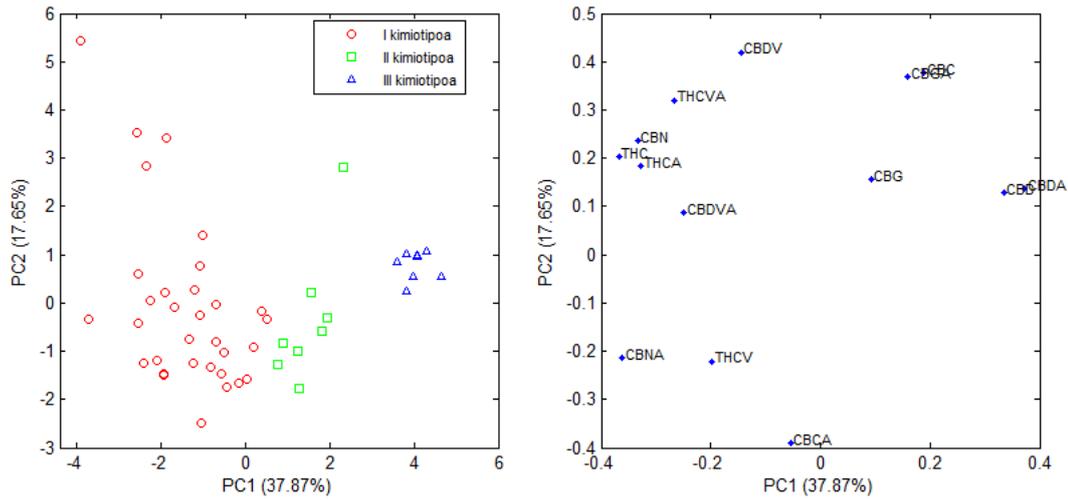
Laginen irudian hostoak eta loreak kolore desberdinez agertzen dira.

Barietateak kimiotipoka bereizten direla ere frogatu da, hosto laginetan (ikusi 15. Irudia) eta lore laginetan (ikusi 16. Irudia). Horretarako, kannabinoideak finkatu dira aldagai modura, ezaguna delako kimiotipoak THC/CBD kantitatearen menpekoak direla. Hostoetan, PC1-a CBDA eta THCA aldagaien menpekoa da batez ere, eta PC2-a CBD eta CBG aldagaien menpekoa; loreetan, berriz, PC1-a CBDA eta THC aldagaien menpekoa da, eta PC2-a CBCA eta CBDV aldagaien menpekoa. Horrez gain, kimiotipoen banaketan terpenoek erlaziorik bat duten ere aztertu zen, baina ez zen erlaziorik ikusi, ez baitzen bereizketarik ikusi.



**15. Irudia:** Hosto laginen eta aldagaien irudikapenak PC1 eta PC2 osagai nagusietan.

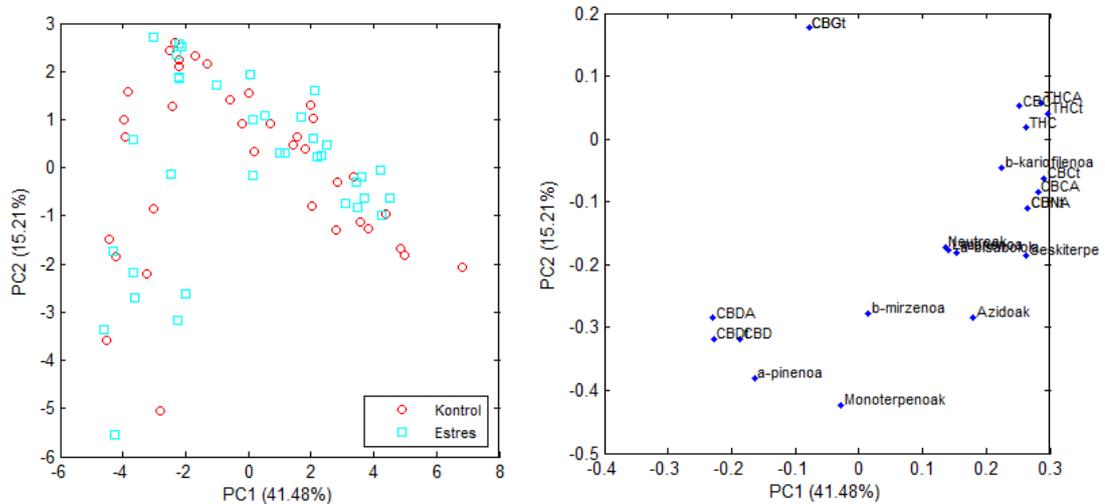
Laginen irudian kimiotipo desberdinak kolore desberdinetan ikus daitezke.



**16. Irudia:** Lore laginen eta aldagaien irudikapenak PC1 eta PC2 osagai nagusietan.

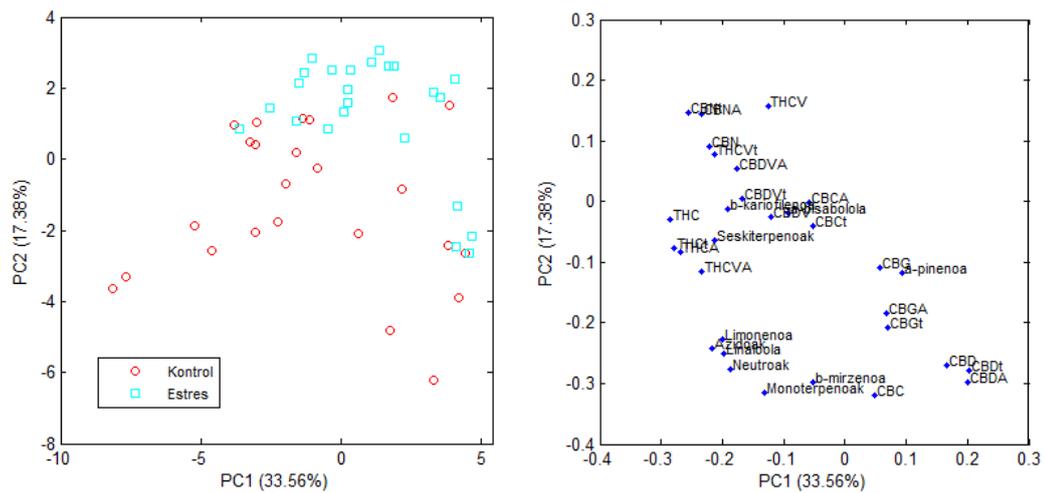
Laginen irudian kimiotipo desberdinak kolore desberdinetan ikus daitezke.

Kontrol- eta estres-baldintzapeko laginen osagai nagusien analisia egitean aldagai guztiak erabiliz, 2 osagai nagusirekin hostoen kasuan ez direla bi hazkuntza baldintzetako laginak banatzen ikusi da, baina loreen kasuan bai. Horrek esan nahi du kontroleko eta estreseko kontzentrazioak loreetan hostoetan baino desberdinagoak direla. PC-ak ez dira erlazionatzen aldagai bakar batekin, hau da, aldagai askoren menpekoak dira. Aldagai guztiak erabiliz lortutako kontrol eta estres hosto laginen irudikapenak 17. Irudian agertzen dira eta lore laginen irudikapenak 18. Irudian.



**17. Irudia:** Hosto laginen eta aldagaien irudikapenak PC1 eta PC2 osagai nagusietan.

Laginen irudian hazkuntza-baldintzak kolore desberdinez agertzen dira.



**18. Irudia:** Lore laginen eta aldagaien irudikapena PC1 eta PC2 osagai nagusietan.

Laginen irudian hazkuntza-baldintzak kolore desberdinez agertzen dira.

Osagai nagusien analisi honekin informazio berri asko lortu ez bada ere, zenbait ondorio ziurtatzeko balio izan du. Adibidez, loreen eta hostoen kontzentrazioak guztiz desberdinak izanda, bi lagin taldeak oso ondo bereizten dira. Kimiotipoei dagokienez, kannabinoideen arabera bereizketa lortzen da, baina ez terpenoen arabera. Azkenik, hostoetan kontrol- eta estres-baldintzetako kontzentrazioak ez direla loreetan bezain bereizgarriak ikusi da. Beraz, estresak loreetan eragin handiagoa duela esan daiteke.

#### 4. ONDORIOAK

Kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioak determinatzeko jarraitutako prozedura egokia izan zen. Hala ere, ikerketa hau berriz egingo balitz, hezetasan ekar ditzakeen desbiderazioak saihesteko laginak ondo lehortu beharko lirateke, pisaketa ontzia aldatuz. Bestalde, hazkuntza modu kontrolatuan aurrera eraman zen, baina nahi gabe sortutako estres azidoak eragin handia izan zuen zenbait landareen hazkuntzan. Horregatik, amaierako kontzentrazioetatik ateratako ondorioak estres horrek eragindako aldaketen menpekoak izan daitezke, eta ondorio zehatzagoak lortzeko estres azidorik gabeko esperimientua errepikatu beharko litzateke.

Estres tropikaleko tenperatura eta hezetasan altuek fase begetatiboan eragin positiboa dute, landarearen tamaina eta kannabinoideen produkzioa handiagotuz, baina, loratze-fasean eragin negatiboa dute. Beraz, hazkuntza optimoa lortzeko fase begetatiboan zehar estreseko baldintzak finkatu beharko lirateke eta loratze-fasean kontroleko baldintzak. Horrez gain, estresaren eragina landarearen morfologiaren arabera dela ondorioztatu zen, altuera handiagoa eta adarkatzeen artean distantzia handiagoa dutenak hobeto moldatu baitziren estres-baldintzetara.

Kannabinoide eta terpeno kantitatearen gaineko estresaren eragina desberdina izan zen bariatateen artean, baina aipagarriak dira ondorio orokor batzuk. Kannabinoideei dagokienez, estres-baldintzekin hostoetan kontzentrazio handiagoak lortzen dira eta loreetan kontzentrazio txikiagoak. Gainera, estresak eragin handiagoa du loreetan hostoetan baino, izan ere, loreetan ez zen kontrol-baldintzen eta estres-baldintzen kontzentrazioen artean emaitza konparagarriak lortu, baina bai hostoetan. Terpenoei dagokienez, bai hostoetan bai loreetan kontzentrazio handiagoak lortzen dira kontrol-baldintzekin, eta estresak eragin handiagoa du monoterpenoen galeran seskiterpenoen galeran baino, arrazoia hauen lurrunkortasuna izan daitekeelarik.

Laburbilduz, estresak kannabinoideen eta terpenoen kontzentrazioan eragiten du, batez ere, loreetan. Hortaz, hurrengo urratsa edo helburua estresaren biomarkatzaileak aurkitzea izango litzateke, hau da, estres honek zehazki biosintesiaren barruan non eragiten duen determinatzea.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Smith, C. J.; Vergara, D.; Keegan, B.; Jikomes, N. The Phytochemical Diversity of Commercial Cannabis in the United States. *PLoS One* **2022**, *17* (5), e0267498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267498>.
- (2) Addo, P. W.; Desaulniers Brousseau, V.; Morello, V.; MacPherson, S.; Paris, M.; Lefsrud, M. Cannabis Chemistry, Post-Harvest Processing Methods and Secondary Metabolite Profiling: A Review. *Ind Crops Prod* **2021**, *170*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113743>.
- (3) Aizpurua-Olaizola, O.; Soydaner, U.; Öztürk, E.; Schibano, D.; Simsir, Y.; Navarro, P.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis Sativa Plants from Different Chemotypes. *J Nat Prod* **2016**, *79* (2), 324–331. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00949>.
- (4) Andre, C. M.; Hausman, J. F.; Guerriero, G. Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci* **2016**, *7* (FEB2016), 19. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00019/BIBTEX>.
- (5) Darkovska-Serafimovska, M.; Serafimovska, T.; Arsova-Saradinovska, Z.; Stefanoski, S.; Keskovski, Z.; Balkanov, T. Pharmacotherapeutic Considerations for Use of Cannabinoids to Relieve Pain in Patients with Malignant Diseases. *J Pain Res* **2018**, *11*, 837–842. <https://doi.org/10.2147/JPR.S160556>.
- (6) Veit, M. Quality Requirements for Medicinal Cannabis and Respective Products in the European Union – Status Quo. *Planta Med* **2022**. <https://doi.org/10.1055/a-1808-9708>.
- (7) Fraguas-Sánchez, A. I.; Torres-Suárez, A. I. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs* **2018**, *78* (16), 1665–1703. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0996-1>.
- (8) Liu, Y.; Liu, H. Y.; Li, S. H.; Ma, W.; Wu, D. T.; Li, H. Bin; Xiao, A. P.; Liu, L. L.; Zhu, F.; Gan, R. Y. Cannabis Sativa Bioactive Compounds and Their Extraction, Separation, Purification, and Identification Technologies: An Updated Review. *Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *149*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116554>.
- (9) Khare, S.; Singh, N. B.; Singh, A.; Hussain, I.; Niharika, K.; Yadav, V.; Bano, C.; Yadav, R. K.; Amist, N. Plant Secondary Metabolites Synthesis and Their Regulations under Biotic and Abiotic Constraints. *Journal of Plant Biology* **2020**, *63* (3), 203–216. <https://doi.org/10.1007/S12374-020-09245-7>.
- (10) Basavarajappa, B. S.; Subbanna, S. Potential Mechanisms Underlying the Deleterious Effects of Synthetic Cannabinoids Found in Spice/K2 Products. *Brain Sci* **2019**, *9* (1), 14. <https://doi.org/10.3390/brainsci9010014>.
- (11) Musshoff, F.; Madea, B.; Kernbach-Wighton, G.; Bicker, W.; Kneisel, S.; Hutter, M.; Auwärter, V. Driving under the Influence of Synthetic Cannabinoids (“Spice”): A Case Series. *Int J Legal Med* **2014**, *128* (1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0864-1>.

- (12) García-Valverde, M. T.; Sánchez-Carnerero Callado, C.; Díaz-Liñán, M. C.; Sánchez de Medina, V.; Hidalgo-García, J.; Nadal, X.; Hanuš, L.; Ferreiro-Vera, C. Effect of Temperature in the Degradation of Cannabinoids: From a Brief Residence in the Gas Chromatography Inlet Port to a Longer Period in Thermal Treatments. *Front Chem* **2022**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1038729>.
- (13) Saroya, A. S. *Phytocannabinoids : Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis Sativa*; Springer,: Cham, Switzerland :, 2017.
- (14) Holler, J. M.; Smith, M. L.; Paul, S. N.; Past, M. R.; Paul, B. D. Isomerization of Delta-9-THC to Delta-8-THC When Tested as Trifluoroacetyl-, Pentafluoropropionyl-, or Heptafluorobutyryl- Derivatives. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43* (5), 674–679. <https://doi.org/10.1002/jms.1375>.
- (15) Pellati, F.; Brighenti, V.; Sperlea, J.; Marchetti, L.; Bertelli, D.; Benvenuti, S. New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis Sativa L. (Hemp). *Molecules* **2018**, *23* (10), 2639. <https://doi.org/10.3390/molecules23102639>.
- (16) Al Ubeed, H. M. S.; Bhuyan, D. J.; Alsherbiny, M. A.; Basu, A.; Vuong, Q. V. A Comprehensive Review on the Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Cannabis. *Molecules* **2022**, *27* (604), 604. <https://doi.org/10.3390/molecules27030604>.
- (17) Radwan, M. M.; Wanas, A. S.; Chandra, S.; ElSohly, M. A. *Cannabis Sativa L.--Botany and Biotechnology*; Springer,: Cham, Switzerland :, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_7).
- (18) Opie, S. R. An Introduction to Cannabis Laboratory Safety and Compliance Testing. *Cannabis Laboratory Fundamentals* **2021**, 1–20. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-62716-4\\_1/FIGURES/3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-62716-4_1/FIGURES/3).
- (19) Chouhan, R.; Ahmed, S.; Gandhi, S. G. *Botanical Leads for Drug Discovery*; Springer,: Singapore :, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5917-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5917-4_6).
- (20) McPartland, J. Cannabis: The Plant, Its Evolution, and Its Genetics—with an Emphasis on Italy. *Rend Lincei Sci Fis Nat* **2020**, *31* (4), 939–948. <https://doi.org/10.1007/s12210-020-00962-2>.
- (21) Springer Nature, ©; Switzerland, A. G. The Properties and Use of Cannabis Sativa Herb and Extracts. *Cannabis in Medicine* **2020**, 3–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45968-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45968-0_1).
- (22) McPartland, J. M.; Guy, G. W. Models of Cannabis Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names. *The Botanical Review* **2017**, *83* (4), 327–381. <https://doi.org/10.1007/s12229-017-9187-0>.
- (23) McPartland, J. M. Cannabis Sativa and Cannabis Indica versus “Sativa” and “Indica.” *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* **2017**, 101–121. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_4/TABLES/2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_4/TABLES/2).

- (24) Bolchi, C.; Pallavicini, M.; Casagni, E.; de Manincor, E. V.; Gambaro, V.; Cas, M. D.; Roda, G. Development and Early Identification of Cannabis Chemotypes during the Plant Growth: Current Analytical and Chemometric Approaches. *Analytical Sciences* **2021**, *37* (12), 1665–1673. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.21R004/METRICS>.
- (25) Valluru, R.; Van Den Ende, W. Plant Fructans in Stress Environments: Emerging Concepts and Future Prospects. *J Exp Bot* **2008**, *59* (11), 2905–2916. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERN164>.
- (26) Rodríguez Yzquierdo, G. A.; Patiño Moscoso, M. A.; Betancourt Vásquez, M. Caracterización Fisiológica En Plantas de Cannabis Medicinal Durante Distintas Etapas Fenológicas Bajo Estrés Biótico. *Agronomía Mesoamericana*, ISSN-e 2215-3608, ISSN 1021-7444, Vol. 32, N°. 3, 2021, págs. 823-840 **2021**, *32* (3), 823–840. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.44443>.
- (27) Ramakrishna, A.; Ravishankar, G. A. Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613> **2011**, *6* (11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/PSB.6.11.17613>.
- (28) Park, S. H.; Pauli, C. S.; Gostin, E. L.; Staples, S. K.; Seifried, D.; Kinney, C.; Vanden Heuvel, B. D. Effects of Short-Term Environmental Stresses on the Onset of Cannabinoid Production in Young Immature Flowers of Industrial Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *J Cannabis Res* **2022**, *4* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S42238-021-00111-Y/FIGURES/4>.
- (29) Galic, A.; Grab, H.; Kaczmar, N.; Maser, K.; Miller, W. B.; Smart, L. B. Effects of Cold Temperature and Acclimation on Cold Tolerance and Cannabinoid Profiles of *Cannabis Sativa* L. (Hemp). *Horticulturae* **2022**, *8* (6), 531. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8060531/S1>.
- (30) Babaei, M.; Ajdanian, L. Screening of Different Iranian Ecotypes of Cannabis under Water Deficit Stress. *Sci Hortic* **2020**, *260*, 108904. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.108904>.
- (31) Toth, J. A.; Smart, L. B.; Smart, C. D.; Stack, G. M.; Carlson, C. H.; Philippe, G.; Rose, J. K. C. Limited Effect of Environmental Stress on Cannabinoid Profiles in High-Cannabidiol Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *GCB Bioenergy* **2021**, *13* (10), 1666–1674. <https://doi.org/10.1111/GCBB.12880>.
- (32) Berni, R.; Hausman, J. F.; Villas-boas, S.; Guerriero, G. Impact of *Pseudomonas* Sp. SVB-B33 on Stress- and Cell Wall-Related Genes in Roots and Leaves of Hemp under Salinity. *Horticulturae* **2022**, *8* (4), 336. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8040336/S1>.
- (33) Islam, M. J.; Ryu, B. R.; Azad, M. O. K.; Rahman, M. H.; Cheong, E. J.; Lim, J. D.; Lim, Y. S. Cannabinoids Accumulation in Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Plants under Led Light Spectra and Their Discrete Role as a Stress Marker. *Biology (Basel)* **2021**, *10* (8). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10080710/S1>.

- (34) Reichel, P.; Munz, S.; Hartung, J.; Kotiranta, S.; Graeff-Hönninger, S. Impacts of Different Light Spectra on CBD, CBDA and Terpene Concentrations in Relation to the Flower Positions of Different Cannabis Sativa L. Strains. *Plants* **2022**, Vol. 11, Page 2695 **2022**, 11 (20), 2695. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11202695>.
- (35) Šrajer Gajdošik, M.; Vicić, A.; Gvozdić, V.; Galić, V.; Begović, L.; Mlinarić, S. Effect of Prolonged Photoperiod on Light-Dependent Photosynthetic Reactions in Cannabis. *Int J Mol Sci* **2022**, 23 (17). <https://doi.org/10.3390/IJMS23179702>.
- (36) Yangsud, J.; Santasanasuwan, S.; Ahkkrachinoreh, P.; Maha, A.; Madaka, F.; Suksaeree, J.; Songsak, T.; Vutthipong, A.; Monton, C. Stability of Cannabidiol,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, and Cannabinol under Stress Conditions. *Advances in Traditional Medicine* **2021**, 21 (3), 475–484. <https://doi.org/10.1007/S13596-021-00590-7/FIGURES/8>.
- (37) Singla, J.; Krattinger, S. G. Biotic Stress Resistance Genes in Wheat. *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition* **2016**, 4–4, 388–392. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00229-1>.
- (38) Kostanda, E.; Khatib, S. Biotic Stress Caused by Tetranychus Urticae Mites Elevates the Quantity of Secondary Metabolites, Cannabinoids and Terpenes, in Cannabis Sativa L. *Ind Crops Prod* **2022**, 176, 114331. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.114331>.
- (39) Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate. *Interacting Stresses on Plants in a Changing Climate* **1993**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-78533-7>.
- (40) Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants* **1994**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-79133-8>.
- (41) Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a New Extraction Technique and HPLC Method for the Analysis of Non-Psychoactive Cannabinoids in Fibre-Type Cannabis Sativa L. (Hemp). *J Pharm Biomed Anal* **2017**, 143, 228–236. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.05.049>.
- (42) Chen, C.; Wongso, I.; Putnam, D.; Khir, R.; Pan, Z. Effect of Hot Air and Infrared Drying on the Retention of Cannabidiol and Terpenes in Industrial Hemp (Cannabis Sativa L.). *Ind Crops Prod* **2021**, 172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114051>.
- (43) Giese, M. W.; Lewis, M. A.; Giese, L.; Smith, K. M. Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *J AOAC Int* **2015**, 98 (6), 1503–1522. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.15-116>.
- (44) United Nations Office on Drugs and Crime. *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products*; United Nations Office on Drugs and Crime: Erscheinungsort nicht ermittelbar, 2013.
- (45) Ternelli, M.; Brighenti, V.; Anceschi, L.; Poto, M.; Bertelli, D.; Licata, M.; Pellati, F. Innovative Methods for the Preparation of Medical Cannabis Oils with a High

Content of Both Cannabinoids and Terpenes. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *186*, 113296. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113296>.

- (46) Mazzara, E.; Torresi, J.; Fico, G.; Papini, A.; Kulbaka, N.; Dall'acqua, S.; Sut, S.; Garzoli, S.; Mustafa, A. M.; Cappellacci, L.; Fiorini, D.; Maggi, F.; Giuliani, C.; Petrelli, R. A Comprehensive Phytochemical Analysis of Terpenes, Polyphenols and Cannabinoids, and Micromorphological Characterization of 9 Commercial Varieties of Cannabis Sativa L. *Plants* **2022**, *11* (7). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11070891>.
- (47) Deidda, R.; Coppey, F.; Damergi, D.; Schelling, C.; Coïc, L.; Veuthey, J. L.; Sacré, P. Y.; De Bleye, C.; Hubert, P.; Esseiva, P.; Ziemons, É. New Perspective for the In-Field Analysis of Cannabis Samples Using Handheld near-Infrared Spectroscopy: A Case Study Focusing on the Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *J Pharm Biomed Anal* **2021**, *202*, 114150. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114150>.
- (48) Ibrahim, E. A.; Wang, M.; Radwan, M. M.; Wanas, A. S.; Majumdar, C. G.; Avula, B.; Wang, Y. H.; Khan, I. A.; Chandra, S.; Lata, H.; Hadad, G. M.; Abdel Salam, R. A.; Ibrahim, A. K.; Ahmed, S. A.; Elsohly, M. A. Analysis of Terpenes in Cannabis Sativa L Using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. *Planta Med* **2019**, *85* (5), 431–438. <https://doi.org/10.1055/A-0828-8387/ID/RC0377-2>.
- (49) Krill, C.; Rochfort, S.; Spangenberg, G. A High-Throughput Method for the Comprehensive Analysis of Terpenes and Terpenoids in Medicinal Cannabis Biomass. *Metabolites* **2020**, *Vol. 10*, Page 276 **2020**, *10* (7), 276. <https://doi.org/10.3390/METABO10070276>.
- (50) Booth, J. K.; Bohlmann, J. Terpenes in Cannabis Sativa - From Plant Genome to Humans. *Plant Sci* **2019**, *284*, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>.
- (51) Hazekamp, A.; Fishedick, J. T. Cannabis - from Cultivar to Chemovar. *Drug Test Anal* **2012**, *4* (7–8), 660–667. <https://doi.org/10.1002/DTA.407>.
- (52) Álvarez-Sánchez, B.; Priego-Capote, F.; Castro, M. D. L. de. Metabolomics Analysis II. Preparation of Biological Samples Prior to Detection. *Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29* (2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.004>.
- (53) Livingston, S. J.; Quilichini, T. D.; Booth, J. K.; Wong, D. C. J.; Rensing, K. H.; Laflamme-Yonkman, J.; Castellarin, S. D.; Bohlmann, J.; Page, J. E.; Samuels, A. L. Cannabis Glandular Trichomes Alter Morphology and Metabolite Content during Flower Maturation. *The Plant Journal* **2020**, *101* (1), 37–56. <https://doi.org/10.1111/tpj.14516>.

## 6. ERANSKINAK

### 1. Eranskina: Lagin guztien kannabinoideen kontzentrazioak

Bariatatea	Lagin mota	Baldintza	Denbora	THC	THCA	CBD	CBDA	CBC	CBCA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA		
TA	Hostoa	-	t0	0.016	0.007	< DM	< DM	0.015	0.009	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Kontrol	t1	0.006	0.011	< DM	< DM	0.006	0.016	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.043	0.037	< DM	< DM	0.026	0.046	< KM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t3	0.050	0.043	< DM	< DM	0.031	0.046	< KM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< KM	< DM	
		Estres	t1	0.013	0.014	< DM	< DM	0.009	0.013	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM
			t2	0.027	0.027	< DM	< DM	0.029	0.053	< KM	< KM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM
	t3		0.088	0.054	< DM	< DM	0.046	0.059	< KM	< KM	< DM	< KM	< DM	< KM	< DM	< DM	< DM	< DM	
	Lorea	Kontrol	t2	0.604	1.323	< DM	< KM	0.016	0.017	0.022	0.024	< KM	< KM	0.007	0.008	0.014	0.005		
			t3	0.993	4.296	0.006	0.008	0.030	0.016	0.031	0.029	0.014	0.004	0.008	0.013	0.016	0.005		
			t2	0.179	0.157	< DM	< KM	0.011	0.023	0.012	0.012	< DM	< KM	0.007	< DM	< KM	< KM	< KM	
		Estres	t3	0.556	1.686	< KM	0.007	0.018	0.018	0.024	0.032	< KM	0.003	0.008	0.008	0.016	0.006		
			t2	< DM	< DM	0.051	0.120	< DM	0.023	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM
t1			< DM	< DM	0.034	0.074	< DM	0.016	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
KH	Hostoa	Kontrol	t2	< DM	< DM	0.062	0.088	< DM	0.015	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	< DM	< DM	0.083	< DM	0.015	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t1	< DM	< DM	0.055	0.118	< DM	0.035	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t2	0.006	< DM	0.169	0.224	0.006	0.049	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t3	0.006	< DM	0.156	0.174	0.006	0.036	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.032	0.046	0.407	1.683	0.025	0.205	< DM	< DM	0.008	0.006	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
Lorea	Kontrol	t3	0.049	0.047	0.675	2.103	0.038	0.228	< DM	< DM	0.007	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		t2	0.029	0.027	0.366	1.089	0.025	0.183	< DM	< DM	0.011	0.01	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		t3	0.041	0.037	0.526	1.421	0.032	0.214	< DM	< DM	< DM	0.008	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
	Estres	t2	0.024	0.067	< DM	< DM	0.008	0.054	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
		t1	0.030	0.065	< DM	< DM	0.006	0.053	< DM	0.006	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		t2	0.059	0.040	< DM	< DM	0.009	0.029	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
WFTA46	Hostoa	Kontrol	t3	0.040	0.045	< DM	< DM	0.006	0.024	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t1	0.036	0.070	< DM	< DM	0.008	0.044	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.037	0.053	< DM	< DM	0.006	0.031	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t3	0.054	0.044	< DM	< DM	0.006	0.021	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.335	2.363	< DM	< DM	0.006	0.169	0.006	0.043	< DM	< DM	0.012	< DM	< DM	< DM	0.006	
			t3	0.397	3.478	< DM	< DM	0.010	0.171	0.006	0.045	0.006	< DM	< DM	0.009	< DM	< DM	< DM	
RE	Hostoa	Kontrol	t2	0.214	0.686	< DM	< DM	< DM	0.110	0.007	0.033	< DM	< DM	0.015	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.339	2.023	< DM	< DM	0.009	0.165	0.009	0.042	< DM	< DM	0.005	< DM	< DM	< DM		
			t1	0.006	0.027	0.018	0.057	< KM	0.042	< DM	< KM	< DM	< KM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t1	0.007	0.026	0.020	0.043	< DM	0.042	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.016	0.024	0.043	0.069	< DM	0.050	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t3	0.028	0.016	0.067	0.052	< DM	0.041	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
WWT48	Hostoa	Kontrol	t1	0.010	0.044	0.027	0.075	0.005	0.079	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.048	0.050	0.108	0.132	0.010	0.116	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.074	0.026	0.148	0.102	0.013	0.089	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t2	0.211	0.538	0.148	0.903	0.011	0.218	0.007	0.028	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t3	0.322	1.093	< DM	1.423	0.015	0.252	0.008	0.034	0.009	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.050	0.101	0.009	0.281	< DM	0.183	< DM	0.021	0.040	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
WFTA51	Hostoa	Kontrol	t3	0.125	0.440	< DM	0.623	0.007	0.228	0.008	0.041	0.090	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t1	0.018	0.053	< DM	0.095	0.011	0.041	< DM	< DM	0.041	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.029	0.053	< DM	0.104	0.011	0.030	< DM	< DM	0.053	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t3	0.037	0.059	< DM	0.109	0.012	0.032	< DM	< DM	0.063	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t1	0.015	0.057	< DM	0.106	0.010	0.040	< DM	< DM	0.035	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.034	0.071	< DM	0.130	0.009	0.022	< DM	< DM	0.058	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
WWT49	Hostoa	Kontrol	t3	0.023	0.042	< DM	0.072	0.006	0.015	< DM	< DM	0.041	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.103	0.150	< DM	0.381	0.011	0.036	< DM	< DM	0.071	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.574	0.995	< DM	1.492	0.027	0.034	0.007	0.008	0.343	0.006	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t2	0.053	0.129	< DM	0.247	0.007	0.026	< DM	< DM	0.043	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t3	0.109	0.179	< DM	0.362	0.006	0.012	0.006	0.011	0.076	0.004	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.432	1.016	< DM	0.008	< DM	0.164	0.012	0.055	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
WWT51	Hostoa	Kontrol	t0	0.036	0.118	< DM	< DM	0.009	0.096	< DM	0.006	< DM	0.003	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t1	0.061	0.116	< DM	< DM	0.010	0.093	< DM	0.007	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.105	0.117	< DM	< DM	0.014	0.103	< DM	0.013	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t3	0.195	0.117	< DM	< DM	0.026	0.090	< DM	0.014	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t1	0.077	0.141	< DM	< DM	0.011	0.115	< DM	0.011	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.141	0.119	< DM	< DM	0.014	0.108	< KM	0.018	< DM	< DM	< DM	< DM	< KM	< DM		
	Lorea	Kontrol	t3	0.173	0.112	< DM	< DM	0.014	0.081	< DM	0.019	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
			t2	0.490	3.054	< DM	< DM	0.011	0.194	0.006	0.065	< DM	0.003	< DM	0.006	< DM	0.006		
			t3	0.746	5.147	< DM	< DM	0.014	0.238	0.006	0.060	< DM	< DM	< DM	0.011	< DM	< DM		
		Estres	t2	0.254	0.654	0.006	< DM	0.005	0.193	0.006	0.046	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.432	1.016	< DM	0.008	< DM	0.164	0.012	0.055	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.043	0.094	< DM	< DM	0.025	0.118	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	
WWT51	Hostoa	Kontrol	t1	0.038	0.089	< DM	< DM	0.026	0.236	< DM	0.007	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.085	0.144	< DM	< DM	0.033	0.223	< DM	0.009	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.073	0.125	< DM	< DM	0.026	0.140	< DM	0.007	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
		Estres	t1	0.041	0.069	< DM	< DM	0.022	0.177	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t2	0.091	0.104	< DM	< DM	0.034	0.229	< DM	0.011	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
			t3	0.101	0.103	< DM	< DM	0.042	0.164	< DM	0.009	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM	< DM		
	Lorea	Kontrol	t2	0.544	1.206	< DM	0.014	0.015	0.215										

WWWW36	Hostoa	-	t0	0.040	0.127	<DM	<DM	0.024	0.170	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Kontrol	t1	0.037	0.083	<DM	<DM	0.017	0.117	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM
			t2	0.086	0.157	<DM	<DM	0.028	0.148	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM
			t3	0.115	0.127	<DM	<DM	0.041	0.119	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM
		Estres	t1	0.054	0.112	<DM	<DM	0.022	0.077	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM
			t2	0.098	0.176	<DM	<DM	0.023	0.119	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM
	t3		0.200	0.093	<DM	<DM	0.044	0.092	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
	Lorea	Kontrol	t2	0.367	1.094	<DM	0.007	0.018	0.100	0.008	0.021	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	0.668	5.141	<DM	0.009	0.018	0.046	0.011	0.038	0.022	<DM	<DM	0.023	<DM	<DM	
			t3	0.251	0.764	<DM	<DM	0.018	0.117	0.007	0.022	<DM	<DM	0.019	<DM	<DM	<DM	
		Estres	t2	0.385	2.797	<DM	0.016	0.013	0.037	0.014	0.040	0.006	0.004	<DM	0.012	<DM	<DM	
			t3	0.031	0.056	0.386	1.906	0.023	0.102	<DM	<KM	0.006	0.006	<DM	<DM	<DM	<DM	
t3			0.037	0.031	0.490	1.359	0.044	0.117	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
HT47	Hostoa	-	t0	<DM	0.008	0.058	0.289	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Kontrol	t1	<DM	<DM	0.033	0.173	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t2	<DM	0.009	0.049	0.235	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	<DM	<DM	0.059	0.146	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Estres	t1	<DM	0.007	0.046	0.225	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t2	<DM	0.012	0.100	0.363	<DM	0.029	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
	t3		<DM	0.009	0.087	0.296	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
	Lorea	Kontrol	t2	0.031	0.056	0.386	1.906	0.023	0.102	<DM	<KM	0.006	0.006	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	0.037	0.031	0.490	1.359	0.044	0.117	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	0.021	0.056	0.240	1.565	0.013	0.076	<DM	<DM	<DM	0.009	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Estres	t2	0.034	0.064	0.406	2.001	0.022	0.091	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	0.019	0.065	<DM	<DM	0.016	0.208	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
t3			0.030	0.060	<DM	<DM	0.018	0.174	<DM	0.008	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
WWRE52	Hostoa	-	t0	0.060	0.208	<DM	<DM	0.019	0.206	<DM	0.008	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Kontrol	t1	0.033	0.118	<DM	<DM	0.015	0.160	<DM	0.006	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t2	0.121	0.218	<DM	<DM	0.035	0.240	<DM	0.015	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t3	0.123	0.116	<DM	<DM	0.034	0.157	<KM	0.015	<DM	<KM	<DM	<DM	<DM		
		Estres	t1	0.053	0.126	<DM	<DM	0.021	0.167	<DM	0.008	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t2	0.107	0.087	<DM	<DM	0.031	0.167	<DM	0.011	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
	t3		0.089	0.105	<DM	<DM	0.025	0.173	<DM	0.019	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
	Lorea	Kontrol	t2	0.562	3.107	0.021	<DM	0.012	0.206	0.010	0.073	0.007	<DM	0.009	0.008	<DM	0.006	
			t3	0.739	5.091	0.043	0.010	0.018	0.195	0.011	0.075	0.014	<DM	<DM	0.012	<DM	<DM	
			t3	0.377	1.388	<DM	<DM	0.011	0.235	0.012	0.079	<DM	<DM	0.011	<DM	<DM	0.007	
		Estres	t2	0.412	1.804	<DM	<DM	0.010	0.217	0.015	0.082	<DM	<DM	0.007	<DM	<DM	0.006	
			t3	0.412	1.804	<DM	<DM	0.010	0.217	0.015	0.082	<DM	<DM	0.007	<DM	<DM	0.006	
t3			0.412	1.804	<DM	<DM	0.010	0.217	0.015	0.082	<DM	<DM	0.007	<DM	<DM	0.006		
WWDQ48	Hostoa	-	t0	0.031	0.135	<DM	<DM	0.011	0.101	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
		Kontrol	t1	0.037	0.078	<DM	<DM	0.010	0.071	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	
			t2	0.056	0.171	<DM	<DM	0.008	0.082	<DM	0.007	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
			t3	0.091	0.107	<DM	<DM	0.014	0.073	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
		Estres	t1	0.047	0.133	<DM	<DM	0.013	0.084	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
			t2	0.078	0.160	<DM	<DM	0.014	0.098	<DM	0.007	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM		
	t3		0.101	0.083	<DM	<DM	0.013	0.060	<KM	<KM	<DM	<DM	<DM	<DM	<DM			
	Lorea	Kontrol	t2	0.354	2.718	0.007	<DM	0.009	0.096	0.007	0.041	0.007	0.004	0.009	0.006	<DM	0.006	
			t3	0.491	4.290	0.013	0.008	0.016	0.091	0.008	0.032	0.013	<DM	<DM	0.009	<DM	<DM	
			t2	0.263	1.100	<DM	<DM	0.007	0.164	0.007	0.038	<DM	<DM	0.021	<DM	<DM		
		Estres	t2	0.263	1.100	<DM	<DM	0.007	0.164	0.007	0.038	<DM	<DM	0.021	<DM	<DM		
			t3	0.434	2.091	0.006	<DM	0.010	0.092	0.014	0.044	<DM	<DM	0.006	0.007	<DM	0.007	
t3			0.434	2.091	0.006	<DM	0.010	0.092	0.014	0.044	<DM	<DM	0.006	0.007	<DM	0.007		

## 2. Eranskina: Laginen monoterenoen (MT) eta seskiterpenoen (ST) kontzentrazioak

Analitoa	Lagin mota	Baldintza	Denbora	TA	KH	WWTA46	RE	WWFT48	WWTA51	WWRO49	WWWW36	HT47	WWRE52	WWDQ48	WWDQ50
MT	Hostoa	-	t0	0.003	<DM	<DM	0.006	<DM	<DM	0.005	0.007	0.022	<DM	0.005	0.004
		Kontrol	t1	<DM	<DM	<DM	0.018	<DM	0.004	0.014	0.003	0.015	<DM	0.002	0.015
			t2	0.011	<DM	<DM	0.040	<DM	0.009	0.019	0.004	0.022	0.009	0.006	0.015
			t3	0.008	<DM	<DM	0.021	0.008	0.011	0.012	0.003	0.011	0.003	0.004	0.008
		Estres	t1	<DM	<DM	0.003	0.009	<DM	0.004	0.009	<DM	0.011	<DM	0.002	0.006
			t2	0.015	0.004	<DM	0.011	0.003	0.004	0.013	0.007	0.020	0.006	0.007	0.008
	t3		0.013	0.008	<DM	0.013	<DM	<DM	0.008	<DM	0.015	<DM	0.006	0.011	
	Lorea	Kontrol	t2	0.129	0.162	0.259	0.397	0.049	0.167	0.235	0.110	0.469	0.267	0.242	0.316
			t3	0.526	0.391	0.381	0.646	0.429	0.389	0.339	0.639	0.208	0.774	0.471	0.468
			t3	0.043	0.068	0.070	0.161	0.018	0.021	0.114	0.043	0.362	0.075	0.115	0.111
		Estres	t2	0.144	0.096	0.155	0.279	0.052	0.053	0.250	0.269	0.303	0.177	0.150	0.267
			t3	0.065	0.058	0.032	0.011	0.083	0.084	0.096	0.095	0.067	0.081	0.131	0.084
t1			0.060	0.012	0.011	0.025	0.050	0.109	0.127	0.056	0.039	0.091	0.069	0.048	
ST	Hostoa	-	t0	0.106	0.020	0.026	0.070	0.034	0.153	0.122	0.065	0.038	0.153	0.142	0.086
		Kontrol	t1	0.071	0.025	0.005	0.027	0.028	0.133	0.101	0.051	0.030	0.121	0.110	0.067
			t2	0.047	0.024	0.053	0.023	0.047	0.140	0.085	0.043	0.044	0.091	0.074	0.060
			t3	0.117	0.068	0.011	0.021	0.051	0.136	0.090	0.050	0.078	0.120	0.103	0.080
		Estres	t2	0.080	0.067	0.005	0.025	0.022	0.120	0.099	0.033	0.058	0.098	0.076	0.059
			t3	0.509	0.266	0.246	0.090	0.079	0.708	0.215	0.105	0.091	0.485	0.138	0.202
	t3		0.647	0.412	0.225	0.131	0.165	0.801	0.192	0.203	0.053	0.844	0.223	0.195	
	Lorea	Kontrol	t2	0.337	0.228	0.099	0.115	0.049	0.309	0.215	0.086	0.111	0.428	0.117	0.257
			t3	0.628	0.269	0.121	0.133	0.076	0.505	0.182	0.177	0.099	0.520	0.099	0.252
			t3	0.628	0.269	0.121	0.133	0.076	0.505	0.182	0.177	0.099	0.520	0.099	0.252
		Estres	t2	0.337	0.228	0.099	0.115	0.049	0.309	0.215	0.086	0.111	0.428	0.117	0.257
			t3	0.628	0.269	0.121	0.133	0.076	0.505	0.182	0.177	0.099	0.520	0.099	0.252
t3			0.628	0.269	0.121	0.133	0.076	0.505	0.182						