

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nejc JAKOŠ

**VPLIV EKSTRAKTOV NAVADNE KONOPLJE NA
RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nejc JAKOŠ

**VPLIV EKSTRAKTOV NAVADNE KONOPLJE NA RAST IZBRANIH
PATOGENIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**THE EFFECT OF HEMP EXTRACTS ON THE GROWTH OF
SELECTED PLANT PATHOGENIC FUNGI**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, na Oddelku za biologijo, Biotehniška fakulteta. Karakterizacija ekstraktov je bila opravljena na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo pod vodstvom prof. dr. Sama Krefta. FTIR meritve pa so bile opravljene na Kemijskem inštitutu, v laboratoriju za strukturo biomolekul pod vodstvom prof. dr. Jožeta Grdadolnika.

Študijska komisija je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Katarino Vogel Mikuš.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: izr. prof. dr. Katarina VOGEL MIKUŠ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Franci Aco CELAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 18. 1. 2018

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:632.952:547.9:633.888(043.2)
KG	biotehnologija/fungicidi/rastline/konoplja/kanabinoidi/ekstrakti/inhibicija/glive
AV	JAKOŠ, Nejc
SA	VOGEL MIKUŠ, Katarina (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program druge stopnje Biotehnologija
LI	2018
IN	VPLIV EKSTRAKTOV NAVADNE KONOPLJE NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 89, [7] str., 10 pregl., 60 sl., 6 pril., 100 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Fungicidi so snovi, ki se uporabljajo za zatiranje gliv, povzročiteljic bolezni na rastlinah, s tem pa prispevajo k povečanju količine pridelkov. Uporaba fitofarmacevtskih sredstev (FFS) ima tudi slabo stran, saj so številni fungicidi strupeni za ljudi in okolje, zato je v zadnjem času velik poudarek na iskanju naravnih učinkovin za zatiranje bolezni na rastlinah. S tem namenom smo preverjali morebitne fungicidne lastnosti konopljinih ekstraktov. Slednje smo pripravili s tremi različnimi topili in jih razmazali na gojišča, na katera smo nato nacepili potencialno fitopatogene glive (<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis</i> sp., <i>Verticillium nonalfalfae</i>). Spremljali smo rast micelija gliv, analizirali konopljine ekstrakte in nato analizirali glivni micelij z metodo lipidne peroksidacije in FTIR metodo. Ugotovili smo, da etanolni in oljni ekstrakti vsebujejo največ kanabinoidov, prevladujeta kanabidiolna kislina in kanabidiol, medtem ko v vodnih ekstraktih kanabinoidov skorajda nismo zaznali. Etanolni ekstrakti so najbolj zavirali rast gliv, največjo inhibicijo rasti smo izmerili na ekstraktu iz vršičkov pri glivi <i>Botrytis</i> sp., kjer je ta znašala kar 70 %. Pri vseh treh glivah, ki so rastle na etanolnih ekstraktih, smo ugotovili, da koncentracija kanabidiola negativno korelira s površino rasti gliv. Metoda lipidne peroksidacije se ni izkazala kot primerna za merjenje stresnega odziva gliv na kanabinoide. Smo pa s FTIR metodo potrdili, da konopljini ekstrakti vplivajo na biomolekularni profil gliv, saj so bile ob manjši rasti nekatere molekule bolj, druge pa manj izražene. Z diskriminantno analizo površin rasti gliv in FTIR spektrov pa smo ugotovili, da so razlike med rastjo gliv na različnih koncentracijah listov in vršičkov statistično značilne. Na podlagi vseh rezultatov lahko zaključimo, da imajo konopljini etanolni ekstrakti potencial, da bi se jih lahko uporabljalo kot naravno sredstvo za kontrolo glivnih bolezni na rastlinah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 606:632.952:547.9:633.888(043.2)

CX biotechnology/fungicides/plants/hemp/cannabinoids/extracts/inhibition/fungi

AU JAKOŠ, Nejc

AA VOGEL MIKUŠ, Katarina (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology

PY 2018

TI THE EFFECT OF HEMP EXTRACTS ON THE GROWTH OF SELECTED PLANT PATHOGENIC FUNGI

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XII, 89, [7] p., 10 tab., 60 fig., 6 ann., 100 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Fungicides are substances used for controlling growth of pathogenic fungi, which are the major cause for crop lost. With increased use of pesticides in the global food production, there is a major side effect, as many fungicides are harmful for health and environment. In the recent years a great attempt was made to find natural products for controlling plant diseases. Our research focused on the study of potential fungicidal properties of hemp extracts. We have prepared hemp extracts with three different solvents and plated them on the media on which we inoculated potentially phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Botrytis* sp., *Verticillium nonalfalfae*). We measured the growth of fungi, analyzed hemp extracts and analyzed the fungal mycelium with the lipid peroxidation method and the FTIR method. The highest concentration of cannabinoids was found in ethanolic and oil extracts, the most concentrated were cannabidiolic acid and cannabidiol, while in aqueous extracts we detected only one cannabinoid. Ethanol extracts inhibited fungal growth the most, and the highest growth inhibition was measured in fungi *Botrytis* sp., where the inhibition was above 70% on the bud extracts. All three fungi grown on ethanolic extracts revealed, that the concentration of cannabidiol correlated negatively with the surface of the fungus growth. The lipid peroxidation method did not prove to be suitable for measuring the fungal stress response to the cannabinoids. However, with the FTIR method, we confirmed that hemp extracts influence the biomolecular profile of fungi, as some molecules were up- and others down-expressed. With the discriminant analysis of fungal growth surface and FTIR spectra we found significant differences between fungi treatments. Based on our results, we can conclude that hemp ethanol extracts have good potential to be used as a natural agent for the controlling fungal diseases on plants.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RASTLINSKE BOLEZNI	3
2.1.1 Panamska bolezen banan.....	5
2.1.2 Siva plesen (<i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr.)	5
2.1.3 Verticilijska uvelost hmelja (<i>Verticillium dahliae</i> Kleb. in <i>Verticillium nonalfalfae</i> Inderbitzin).....	5
2.2 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA (FFS)	6
2.2.1 Vpliv FFS na okolje.....	6
2.2.2 Vpliv FFS na zdravje ljudi	7
2.2.3 Nadzor uporabe FFS	8
2.2.4 Slovenija	9
2.2.5 Fungicidi.....	10
2.3 RASTLINE KOT BIOTIČNO SREDSTVO ZA VARSTVO PRED BOLEZNIMI.....	11
2.3.1 Uporaba rastlin za zatiranje bolezni človeka.....	11
2.3.2 Uporaba rastlin za zatiranje rastlinskih bolezni	12
2.3.3 Naravna fitofarmacevtska sredstva na osnovi rastlin v Sloveniji.....	13
2.3.4 Vpliv rastlinskih ekstraktov na rast gliv	13
2.4 NAVADNA KONOPLJA (<i>Cannabis sativa</i> L.)	14
2.4.1 Kanabinoidi.....	15
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 PRIPRAVA IN PRIDOBITEV RASTLINSKEGA MATERIALA	17

3.2 PRIRAVA EKSTRAKTOV NAVADNE KONOPLJE	18
3.3 PRIPRAVA GLIV ZA POSKUS	20
3.4 NASTAVITEV POSKUSA	20
3.5 SPREMLJANJE RASTI GLIV	20
3.6 PRIPRAVA GLIV ZA ANALIZO	21
3.7 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	21
3.8 FTIR	22
3.8.1 Splošne informacije o FTIR	22
3.8.2 Kako deluje FTIR?	22
3.8.3 Potek naših meritev	23
3.8.4 Analiza FTIR meritev	24
3.8.5 Povprečni FTIR spektri	24
3.8.6 Diferenčni povprečni FTIR spektri	25
3.8.7 Diskriminantna analiza	25
3.9 ANALIZA EKSTRAKTOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (HPLC)	26
3.10 GENETSKA TIPIZACIJA GLIV	27
3.10.1 Izolacija DNK	27
3.10.2 PCR	28
3.10.3 Agarozna gelska lektroforeza	29
3.10.4 Čiščenje PCR fragmentov iz gela	30
3.10.5 Priprava vzorcev za določanje nukleotidnega zaporedja	31
3.10.6 Obdelava zaporedij	31
4 REZULTATI	32
4.1 IDENTIFIKACIJA GLIV	32
4.2 ANALIZA EKSTRAKTOV	32
4.2.1 Koncentracije kanabinoidov v laboratorijski konoplji in konoplji s polja	33
4.2.2 Preverjanje učinkovitosti prvega in drugega koraka ekstrakcije	34
4.2.3 Vpliv topila na koncentracijo kanabinoidov v ekstraktu	35
4.2.4 Vpliv avtoklaviranja na koncentracijo kanabinoidov	35
4.3 RAST GLIV	36

4.3.1 Rast gliv na etanolnih ekstraktih	36
4.3.2 Rast glive <i>Fusarium oxysporum</i> na različnih vrstah ekstraktov in topil.....	38
4.3.3 Rast glive <i>Botrytis</i> sp. na različnih vrstah ekstraktov in topil.....	39
4.3.4 Rast glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> na različnih vrstah ekstraktov in topil.....	40
4.4 KORELACIJA MED POVRŠINO RASTI GLIV IN KONCENTRACIJO POSAMEZNEGA KANABINOIDA.....	41
4.4.1 Etanolni ekstrakti.....	41
4.4.2 Oljni ekstrakti.....	43
4.5 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	44
4.5.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	44
4.5.2 <i>Botrytis</i> sp.	44
4.5.3 <i>Verticillium nonalfalfae</i>	45
4.6 FTIR	46
4.6.1 FTIR spektri glive <i>Fusarium oxysporum</i>	46
4.6.1.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih	46
4.6.1.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih ..	47
4.6.1.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih	48
4.6.1.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih ..	49
4.6.1.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih.....	50
4.6.1.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih..	51
4.6.2 FTIR spektri glive <i>Botrytis</i> sp.....	52
4.6.2.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih	52
4.6.2.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih	53
4.6.2.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih	54
4.6.2.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih ..	55
4.6.2.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih.....	56
4.6.2.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih..	57
4.6.3 FTIR spektri glive <i>Verticillium nonalfalfae</i>	58
4.6.3.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih	58

4.6.3.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih	59
4.6.3.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih	60
4.6.3.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih	61
4.6.3.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih	62
4.6.3.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih ..	63
4.6.4 Območja skupin molekul, detektiranih na FTIR spektrih	64
4.6.5 Diskriminantna analiza FTIR spektrov in glivnih površin	65
4.6.5.1 Diskriminantna analiza pri glivi <i>Fusarium oxysporum</i>	65
4.6.5.2 Diskriminantna analiza pri glivi <i>Botrytis</i> sp.	68
4.6.5.3 Diskriminantna analiza pri glivi <i>Verticillium nonalfalfae</i>	70
5 RAZPRAVA	74
5.1 VPLIV TOPILA NA KONCENTRACIJO KANABINOIDOV V EKSTRAKTIH	74
5.2 VPLIV EKSTRAKTOV NA RAST GLIV	76
5.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	78
5.4 FTIR	78
6 SKLEPI	81
7 POVZETEK	82
8 VIRI	83
ZAHVALE	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Tipi ekstraktov, ki smo jih uporabili v poskusih.	19
Preglednica 2: Pearsonovi koeficienti korelacije med površino rasti gliv in koncentracijo kanabinoidov v etanolnih ekstraktih. Zgornja vrednost predstavlja Pearsonov koeficient korelacije, spodnja pa statistično značilnost. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki kažejo na statistično značilne povezave med površino rasti glive in koncentracijo kanabinoida.	42
Preglednica 3: Pearsonovi koeficienti korelacije med površino rasti gliv in koncentracijo kanabinoidov v oljnih ekstraktih. Zgornja vrednost predstavlja Pearsonov koeficient korelacije, spodnja pa statistično značilnost.	43
Preglednica 4: Oznake in meje območij na FTIR spektru, kjer smo detektirali posamezne molekule in funkcionalne skupine (prirejeno po: Salman in sod., 2010; Regvar in sod., 2013).	65
Preglednica 5: Korelacije med funkcijama F1 in F2 ter spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive <i>Fusarium oxysporum</i> , rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	66
Preglednica 6: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive <i>Fusarium oxysporum</i> . Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.	67
Preglednica 7: Korelacije med funkcijama F1 in F2 in spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive <i>Botrytis</i> sp., rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	68
Preglednica 8: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive <i>Botrytis</i> sp. Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.	69
Preglednica 9: Korelacije med funkcijama F1 in F2 ter spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	71
Preglednica 10: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> . Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.	72

KAZALO SLIK

Slika 1: Prodaja fitofarmaceutskih sredstev v Sloveniji od leta 1997 dalje (prirejeno po UVHVR, 2016, cit. po SURS, 2017a).....	9
Slika 2: Poraba fitofarmaceutskih sredstev na hektar obdelovalnih površin v državah EU v letu 2014 (prirejeno po SURS, 2017a).....	10
Slika 3: Navadna konoplja (Wikimedia Commons, 2017).....	15
Slika 4: Biosintezna pot kanabinoidov (Mohammad, 2017).	16
Slika 5: Posevek navadne konoplje.	17
Slika 6: Vršički pred zamrzovanjem.	18
Slika 7: Rotavapor.	19
Slika 8: Shema delovanja FTIR naprave (prirejeno po Smith, 2011)	23
Slika 9: Spektrofotometer TENZOR 27 (Bruker).	24
Slika 10: Prilagoditev povprečnega FTIR spektra s programom OPUS (7.0), Bruker.	26
Slika 11: Shema HPLC sistema (prirejeno po Töppner in sod., 2014).	27
Slika 12: Filogenetsko drevo gliv <i>Verticillium nonalfalfae</i> in <i>Verticillium dahliae</i> in njima najbolj podobna seva v GenBank podatkovni bazi.	32
Slika 13: Filogenetsko drevo vseh 8 gliv, ki smo jih uporabili v poskusih.....	32
Slika 14: Kromatogram vzorca, odvzetega iz etanalnega ekstrakta vršičkov.	33
Slika 15: Koncentracije kanabinoidov v etanolnih ekstraktih navadne konoplje, pridelane v laboratoriju in na polju. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).....	34
Slika 16: Primerjava koncentracij kanabinoidov v frakciji po prvem koraku ekstrakcije in po drugem koraku ekstrakcije.	34
Slika 17: Primerjava koncentracij izoliranih kanabinoidov v vseh pripravljenih ekstraktih. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$). ...	35
Slika 18: Koncentracija kanabinoidov v oljnih ekstraktih pred in po avtoklaviranju. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	36
Slika 19: Površine rasti gliv na etanolnih ekstraktih pri različnih koncentracijah listov in vršičkov. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).....	37
Slika 20: Odstotki inhibicije rasti gliv na gojiščih z etanolnimi ekstrakti navadne konoplje v primerjavi s kontrolo (100-odstotni etanol). Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije.....	37

Slika 21: Statistična dvodimenzionalna analiza grozdov vpliva etanolnih ekstraktov na rast gliv (oznake gliv: gl.2= <i>Fusarium oxysporum</i> , gl.3= <i>Epicoccum nigrum</i> , gl.4= <i>Botrytis cinerea</i> , gl.5= <i>Botrytis cinerea</i> II, gl.6= <i>Alternaria alternata</i> gl.7= <i>Botrytis</i> sp., gl.8= <i>Verticillium dahliae</i> in gl.9= <i>Verticillium nonalfalfae</i>	38
Slika 22: Površine rasti glive <i>Fusarium oxysporum</i> na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	39
Slika 23: Rast glive <i>Fusarium oxysporum</i> na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.	39
Slika 24: Površine rasti glive <i>Botrytis</i> sp. na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	40
Slika 25: Rast glive <i>Botrytis</i> sp. na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.	40
Slika 26: Površine rasti glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	41
Slika 27: Rast glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.	41
Slika 28: Korelacija med površino rasti glive <i>Fusarium oxysporum</i> in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	42
Slika 29: Korelacija med površino rasti glive <i>Fusarium oxysporum</i> in koncentracijo Δ^9 -tetrahidrokanabinola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	42
Slika 30: Korelacija med površino rasti glive <i>Botrytis</i> sp. in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	42
Slika 31: Korelacija med površino rasti glive <i>Botrytis</i> sp. in koncentracijo Δ^9 -tetrahidrokanabinola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	42
Slika 32: Korelacija med površino rasti glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> in koncentracijo kanabidiolne kisline v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	43
Slika 33: Korelacija med površino rasti glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.	43
Slika 34: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi <i>Fusarium oxysporum</i> , rastli na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	44
Slika 35: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi <i>Botrytis</i> sp., rastli na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili.	

Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	45
Slika 36: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi <i>Verticillium nonalfalfae</i> , rastli na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).	46
Slika 37: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje....	47
Slika 38: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	48
Slika 39: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	49
Slika 40: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.	50
Slika 41: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.	51
Slika 42: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Fusarium oxysporum</i> , gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.	52
Slika 43: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	53
Slika 44: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje. ..	54
Slika 45: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.	55
Slika 46: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	56
Slika 47: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.	57
Slika 48: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Botrytis</i> sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	58
Slika 49: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje. ..	59
Slika 50: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	60

Slika 51: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	61
Slika 52: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	62
Slika 53: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.....	63
Slika 54: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.....	64
Slika 55: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive <i>Fusarium oxysporum</i> , rastli na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.....	66
Slika 56: Razsevni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavitvev pri glivi <i>Fusarium oxysporum</i>	67
Slika 57: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive <i>Botrytis</i> sp., rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.	69
Slika 58: Razsevni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavitvev pri glivi <i>Botrytis</i> sp.....	70
Slika 59: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive <i>Verticillium nonalfalfae</i> , rastli na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.....	71
Slika 60: Razsevni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavitvev pri glivi <i>Verticillium nonalfalfae</i>	73

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z etanolnimi ekstrakti

PRILOGA B: Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z vodnimi ekstrakti

PRILOGA C: Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z oljnimi ekstrakti

PRILOGA Č: Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z etanolnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

PRILOGA D: Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z vodnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

PRILOGA E: Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z oljnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

FFS – fitofarmacevtska sredstva

MRL – najvišja dovoljena vrednost ostankov

ArfDs – aktuni referenčni odmerki

ADI – sprejemljivi dnevni vnos

THC – tetrahidrokanabinol

CBD – kanabidiol

CBG – kanabigerol

CBC – kanabikromen

CBL – kanabiciklol

CBE – kanabilsoin

CBN – kanabinol

CBND – kanabinodiol

CBT – kanabitriol

RCF – relativna centrifugalna sila

DNK – deoksiribonukleinska kislina

RNK – ribonukleinska kislina

PCR – verižna reakcija s polimerazo

bdH₂O – bidestilirana voda

bp – bazni pari

HPLC – visoko tlačna tekočinska kromatografija

MDA – malondialdehid

FTIR – Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija

ITS – notranji prepisni vmesnik ribosomske DNK

1 UVOD

Rastlinske pridelke ogrožajo številni škodljivci in bolezni. Le ti lahko povzročajo manjše poškodbe na rastlinah, v skrajnih primerih pa lahko uničijo celoten pridelek. Za varstvo pridelkov pred boleznimi obstaja nekaj možnosti. V kmetijstvu so tako v uporabi nekatere prakse, s katerimi se omejuje širjenje bolezni. Izbirajo se takšne sorte poljščin, ki so odporne ali tolerantne na bolezni, kolobarjenje zmanjša ohranjanje patogenov, pomembna pa sta tudi hitra identifikacija povzročitelja bolezni in uničevanje okuženih pridelkov. Potrebno je paziti na čas setve oz. saditve, stopnjo gnojenja ter na spremembe podnebja. K povečanju pridelkov precej doprinese uporaba fungicidov, kemičnih snovi, ki se uporabljajo za zatiranje gliv in glivam podobnih organizmov, saj so prav fitopatogene glive najpogostejši vzrok za izgubo pridelkov. V uporabi so že preko 100 let in nekatere študije kažejo, da bi bilo brez njih gojenje rastlin v nekaterih delih sveta nemogoče.

Vendar pa naraščajoča uporaba fungicidov sproža mnoge pomisleke glede njihovega vpliva na okolje in zdravje človeka, saj vsebujejo številne strupene snovi. Temu primerno je vse večji poudarek na iskanju naravnih sredstev za varstvo rastlin. Ta preprečujejo oz. zavirajo rast patogenih gliv, ki uničujejo vsakoletne rastlinske pridelke. Navadna konoplja vsebuje najrazličnejše presnovke (metabolite), ki rastlini služijo kot naravna zaščita pred škodljivimi organizmi. Vedno več raziskav kaže, da te spojine lahko uporabljamo tudi za varstvo drugih rastlinskih vrst pred glivičnimi boleznimi (Ali in sod., 2012). Konopljini ekstrakti so od klasičnih fungicidov cenejši in okolju prijaznejši (Kumar in sod., 2013), vendar pa je potrebno narediti še dosti raziskav, preden se bodo začeli uporabljati na pridelovalnih površinah. Zaradi majhnega števila raziskav na področju uporabe navadne konoplje kot vira ekstraktov s protiglivišnim delovanjem in vse večje pridelave konoplje v zadnjem času smo se odločili, da bomo preverili, kako različni ekstrakti navadne konoplje vplivajo na rast izbranih potencialno fitopatogenih gliv.

Delovne hipoteze:

- Ekstrakti iz vršičkov navadne konoplje bodo vsebovali večje koncentracije kanabinoidov kot ekstrakti iz listov.
- Ekstrakti navadne konoplje bodo vsebovali kanabinoide: kanabidiolno kislino, kanabidiol in kanabikromen, medtem ko Δ^9 -tetrahidrokanabinola in Δ^9 -tetrahidrokanabinolne kisline ne pričakujemo.
- Ekstrakti navadne konoplje bodo negativno vplivali na rast različnih potencialno patogenih gliv.

Cilji naloge:

- Preveriti vpliv različnih topil na učinkovitost ekstrakcije kanabinoidov iz listov in vršičkov navadne konoplje.
- Okarakterizirati dobljene ekstrakte z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije.
- Raziskati vpliv različnih koncentracij prej omenjenih ekstraktov na rast izbranih potencialno patogenih gliv.
- Raziskati vpliv različnih koncentracij prej omenjenih ekstraktov na sintezo glavnih primarnih metabolitov (proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov) v glivah z metodo infrardeče spektroskopije s Fourierjevo transformacijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKE BOLEZNI

Rastlinske bolezni so znane že iz časov pred prvimi zapisi, saj fosili kažejo na to, da so bile rastline okužene z boleznimi že pred 250 milijoni let. Že Biblija in druge zgodnje knjige omenjajo bolezni, kot so rja, sneti in plesni, ki so povzročale lakoto in gospodarsko škodo. Podobno se je dogajalo tudi v 19. in 20. stoletju, ko se je pojavila krompirjeva plesen na Irskem. Le to povzroča gliva *Phytophthora infestans*, zaradi katere je izguba pridelka popolna. Krompirjeva plesen je bila vzrok za veliko irsko lakoto v obdobju med leti 1845 in 1852, v kateri je umrlo milijon ljudi, 1–2 milijona pa jih je zapustilo Irsko. Francijo je prizadela peronospora vinske trte (*Plasmopara viticola*) leta 1851 in 1878, na Cejlonu (Šri Lanki) se je okoli leta 1870 na kavi pojavila kavovčeva rja (*Hemileia vastatrix*). V začetku 20. stoletja sta glivi iz rodu *Fusarium* povzročili fuzarijsko uvelost bombaža in lana, bakterija *Ralstonia solanacearum* pa venenje tobaka. V srednji Ameriki se je pojavila panamska bolezen banan, v ZDA pa pšenična progasta rja (*Puccinia graminis*) in južna pegavost koruze (*Bipolaris maydis*) (Leadbeater, 2014). V Indiji je v času velike bengalske lakote zaradi epidemične okužbe riža z glivo *Cochliobolus miyabeanus* umrlo okoli 2 milijona ljudi. Zgornje katastrofe so pokazale, da je prevelika odvisnost od ene same poljščine zelo nevarna, v primeru, če to poljščino prizadene bolezen (Strange in Scott, 2005).

Do bolezni rastlin pride, če so izpolnjeni naslednji pogoji: priti mora do interakcije med povzročiteljem in občutljivo rastlino, povzročitelj bolezni mora biti virulentni patogen in okolje mora biti primerno za razvoj bolezni (Francel, 2001). Glavni povzročitelji bolezni na rastlinah tako na polju kot tudi v procesih po žetvi so: virusi, bakterije, oomicete, glive, nematode in parazitske rastline. Ti organizmi resno ogrožajo preskrbo s hrano, saj naj bi letno izgubili okoli 10 % hrane zaradi bolezni rastlin (letna pridelava hrane je leta 1998 znašala 5 milijard ton) (James, 1998). Rastlinske patogene je težko nadzorovati, ker so njihove populacije spremenljive v času, prostoru in genotipu. Najhujše pa je to, da se sproti razvijajo in prilagajajo in tako premagujejo odpornost rastlin, ki jo želijo vzpostaviti žlahtnitelji (Strange in Scott, 2005). Glive povzročajo tako katastrofalne rastlinske bolezni, ker zelo dobro sporulirajo, spore pa predstavljajo obilen inokulum za okužbo rastlin. Spore lahko tvorijo že v nekaj dneh po okužbi rastline in slednje se lahko enostavno prenašajo s površinskimi vodami, dežjem ali pa z vetrom na dolge razdalje. Pomembne vektorje za prenos povzročiteljev bolezni predstavljajo tudi živali, npr. žuželke, ki prenašajo glive iz ene žužkocvetne rastline na drugo. Nekatere glive tvorijo fitotoksične spojine in encime, ki razgradijo rastlinske strukture. Patogeni lahko preusmerijo tok hranilnih snovi iz ekonomsko pomembnih delov rastline in zmanjšajo pridelke (Strange, 2003). Glive vplivajo na hranilno vrednost pridelka, njegove organoleptične lastnosti in krajšajo rok

trajanja, v nekaterih primerih pa izzovejo alergije in zastrupitve pri potrošnikih, saj tvorijo alergene in mikotoksine (Dellavalle in sod., 2011).

Izmed vseh glivičnih povzročiteljev bolezni rastlin smo se mi odločili, da bomo testirali vpliv etanolnih konopljinih ekstraktov na 8 glivah, za nadaljnje analize pa smo izbrali 3 glive, katerih sorodni izolati povzročajo rastlinske bolezni in imajo velik vpliv tudi na rastlinske proizvode, ki jih mi dnevno zauživamo. Rod gliv *Fusarium* povzroča številne bolezni na paradižniku, tobaku, stročnicah, bučnicah, sladkem krompirju, žitih in na bananah. Povzroča tudi gnitje korenin ajde (Milevoj, 1989). Škoda, povzročena na omenjenih rastlinskih pridelkih, je ogromna, podobno pa velja tudi za bolezen, ki prizadane banane. Izolat glive *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) namreč povzroča panamsko bolezen banan – sadja, ki se nahaja na dnevnem jedilniku velikega števila Slovencev. Omenjena bolezen je zaradi nove različice patogena prizadela tudi novo sorto banan, katere obstoj je sedaj ogrožen. Specializirana forma *cubense* (Foc), ki okužuje banane, je le ena od okoli 35 poimenovanih form glive *Fusarium oxysporum*. Specializirana forma je neformalna taksonomska skupina, ki se najpogosteje uporablja za poimenovanje parazitnih gliv, ki so prilagojene specifičnemu gostitelju. Druge forme okužajo dateljne, šparglje, sladki krompir, zelje, čičeriko, kavovec, lečo, paradižnik, deteljo, grah in tudi različne okrasne rastline (Lecomte in sod., 2016).

Pod podroben pogled smo vzeli tudi glive iz rodu *Botrytis*, saj slednje povzročajo gospodarsko škodo na več kot 200 rastlinah (Choquer in sod., 2007). Med drugim povzročajo velike izgube pridelkov na grozdju, paradižniku, grahu, fižolu, okrasnih pridelkih in tudi na ajdi, kjer povzročajo gnilobo stebel in korenin (Milevoj, 1989; Williamson in sod., 2017). Izolat glive *Botrytis cinerea* Pers.: Fr povzroča sivo plesen, ki se pojavlja tudi na grozdju. Slovenija je znana po profesionalni in rekreativni pridelavi vina, saj je leta 2015 znašala skupna proizvodnja vina v Sloveniji 823,1 tisoč hektolitrov (SURS, 2017a). Plesen povzroča v večini primerov veliko škodo vinogradnikom, saj povzroči gnitje grozdnih jagod, le v izjemnih primerih pa lahko privede v žlahtno gnilobo. Glivi *Fusarium oxysporum* in *Botrytis* sp. sta bili izoliran iz semen ajde. Glivi sta ajdo okužili verjetno zaradi tega, ker je kolobarjenje stalna praksa pri nas in so na istem polju predhodno gojili žita ali zelenjavo, ki jih glivi okužujeta. Povzročiteljici pa sta se ohranili na polju do naslednjega posevka. Možen je tudi vnos gliv na polje z gnojenjem, kmetijskimi stroji ali pa z okuženimi semeni in sadikami. Kot zadnjo glivo za testiranje pa smo si izbrali glivo *Verticillium albo-atrum*, sedaj znano kot *Verticillium nonalfalfae*. Ta gliva povzroča verticilijsko uvelost hmelja, ki je prvo večjo gospodarsko škodo v Sloveniji povzročila leta 1997 v Savinjski dolini. Pridelava hmelja je za Slovenijo zelo pomembna, saj ga povprečno letno pridelamo 1500–2000 ton, kar je okrog 3 % svetovne proizvodnje hmelja. Pridelujemo več kot 17 različnih sort hmelja, večino pa ga izvozimo (KGZS, 2017).

2.1.1 Panamska bolezen banan

Banane so eden izmed osmih najpomembnejših pridelkov na svetu, še posebej pa so pomembne za ljudi v najmanj razvitih državah, za katere so eno izmed osnovnih živil. Večina kultivarjev je naravnih hibridov, ki so ponavadi sterilni, triploidni in se vegetativno razmnožujejo (Perrier in sod., 2011). Izmed 50 podskupin bananovcev večino plodov proizvedeta podskupini bananovcev Cavendish in Plantain. Eno izmed najbolj uničujočih bolezni banan, fusariumsko ovenelost oz. panamsko bolezen povzroča delno saprofitska gliva *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Ta gliva ima širok spekter gostiteljev, največjo škodo pa je povzročila na podskupini bananovcev Gros Michel. Zaradi njene neodpornosti je to skupino bananovcev nadomestila odporna skupina Cavendish, ki jo sedaj ogroža nova različica patogena, imenovana tropska rasa 4, doslej najdena le na vzhodni polobli. Uporaba odpornih kultivarjev in preprečevanje širjenja bolezni na neokužena območja sta trenutno najboljša pristopa za omejevanje bolezni. Ukrepi, ki so učinkoviti proti letnim in kratkoživim gostiteljem, so neučinkoviti proti panamski bolezni banan zaradi trajnih nasadov in dolge obstojnosti glive v tleh (Ploetz, 2015).

2.1.2 Siva plesen (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.)

Siva plesen, ki jo povzroča gliva *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., je ena izmed glavnih bolezni namiznega grozdja (Panebianco in sod., 2015). *Botrytis cinerea* ter ostale vrste rodu *Botrytis* so zelo nezaželeni patogeni organizmi, ki povzročajo škodo na okrasnih rastlinah, poljščinah, vrtninah, v sadovnjakih ter v prehranski transportni verigi (Elad in sod., 2007). Omenjena gliva okužuje ogromno število rastlin (več kot 200 vrst dvokaličnic), zaradi česar jo je enostavno najti v pridelkih na polju in tudi v pridelkih, ki so že bili pobrani. Okužba se lahko pojavi že na polju in ostane latentna do skladiščenja. Takrat se patogena gliva razširi, ker večja vlaga in nižja temperatura zmanjšata obrambno sposobnost gostitelja. V rod *Botrytis* spada 22 vrst in en hibrid, več različnih rastlinskih gostiteljev pa okužuje samo *Botrytis cinerea* (Staats in sod., 2005). Letni svetovni stroški varstva pred sivo plesnijo naj bi presegali milijardo evrov, če pa štejemo še izgubo pridelka in izgubo kvalitete, je ta številka še večja. *B. cinerea* spada med nekrotrofne glive, saj najprej ubije gostiteljsko rastlinsko celico, nato pa se naseli v mrtvo tkivo. Raste pri temperaturah od 0 do 30 °C, njena idealna temperatura pa je 20 °C (Romanazzi in Feliziani, 2014).

2.1.3 Verticilijska uvelost hmelja (*Verticillium dahliae* Kleb. in *Verticillium nonalfalfae* Inderbitzin)

Hmelj spada v družino *Cannabaceae* in je trajna dvodomna rastlina. Že zelo dolgo časa se hmelj uporablja v pivovarski industriji, kjer so sekundarni metaboliti prekursorji. Ti se pretvorijo v snovi, ki dajo pivu grenkobo, aromo, uravnavajo peno, hkrati pa tudi

pomagajo pri ohranjanju okusa piva (Steenackers in sod., 2015). Nasadi hmelja so izpostavljeni številnim glivičnim boleznim, med drugim tudi verticilijski uvelosti. Le to povzročata predvsem glivi *Verticillium nonalfalfae*, predhodno znana kot *Verticillium albo-atrum* in *Verticillium dahliae*. To sta talni traheomikotični glivi, ki se v tleh ohranjata s trajnimi organi (sklerociji) in povzročata odmiranje rastlin. Poleg hmelja parazitirata več kot 300 rastlinskih vrst. Bolezenska znamenja na hmelju so odvisna od agresivnosti glive in odpornosti rastline. Blagi tip povzroča lažje simptome venenja, kot so rumenenje, zvijanje listov navzgor ter rumenenje žilnih tkiv. Letalni patotip pa povzroči venenje listov in vej, zaradi katerega rastline v nekaj mesecih po okužbi propadejo (Radišek in sod., 2006). Fitosanitarni ukrepi, kot so kolobarjenje in sajenje odpornih rastlin, so trenutno edini ukrepi za nadzor verticilijske uvelosti (Progar in sod., 2017).

2.2 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA (FFS)

Kmetijska pridelava se je v zadnjih desetletjih močno povečala, da bi zagotovili potrebo po hrani hitro naraščajočega števila prebivalstva. Pred 60 leti je moral kmet nahraniti dva človeka z vsakim hektarom zemlje, njihovi vnuki pa morajo danes nahraniti več kot dvakrat toliko ljudi. K povečani pridelavi je poleg novih tehnologij precej prispevala tudi povečana uporaba FFS, ki so postali pomemben del moderne kmetijstva.

Pesticidi so snovi ali mešanice snovi, namenjene za preprečevanje, uničevanje ali nadzorovanje katerikoli škodljivih organizmov, vključno s prenašalci bolezni ljudi ali živali, neželenih vrst rastlin ali živali, ki povzročajo škodo ali na kakšen drug način ovirajo proizvodnjo, obdelavo, shranjevanje, transport ali prodajo hrane, kmetijskih pridelkov, lesa in lesnih izdelkov ali krme; snovi, ki se jih lahko da živalim za nadzor zajedavcev na ali v njihovih telesih; snovi za uravnavanje rasti rastlin, za odstranjevanje zelenih delov, redčenje sadja ali preprečevanje prezgodnjega odpadanja plodov z dreves; ter snovi, s katerimi se zaščitijo žita pred propadanjem med skladiščenjem in transportom (UVHVVR, 2017). Izraz pesticid pokriva širok spekter spojin vključno z insekticidi, herbicidi, rodenticidi, nematocidi, rastlinskimi rastnimi regulatorji, fungicidi, baktericidi, limacidi, akaricidi in drugimi (Aktar in sod., 2009). Idealni pesticidi so biološko učinkoviti, uporabniku prijazni, okoljsko sprejemljivi in tudi ekonomsko dosegljivi. Izpolnitev vseh zgoraj naštetih pogojev in postavitev produkta na trg predstavlja velik izziv za industrijo. Po poročanju nekaterih industrijskih študij je za razvoj novega FFS potrebnih deset let in približno 250 milijonov ameriških dolarjev (McDougall, 2016).

2.2.1 Vpliv FFS na okolje

Uporaba FFS je resda povečala količino pridelkov, vendar je s seboj prinesla tudi določene probleme. Eden izmed njih je ta, da 90 % FFS, uporabljenih v kmetijstvu, nikoli ne doseže

tarčnega organizma, temveč se razpršijo po zraku, zemlji in vodi. Posledično jih pogosto zasledimo v zraku, površinskih vodah in v podtalnici, v tleh, zelenjavi in tudi v drugi hrani. FFS prispevajo kar 6,3 % skupnih emisij hlapnega organskega ogljika v okolje (Yates in sod., 2011).

Kopičenje FFS v tleh vpliva na zdravje in produktivnost tal. FFS lahko povzročijo trajne spremembe v talni mikroflori, saj lahko negativno vplivajo na koristne mikroorganizme, kot so *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, ki so sposobni vezave dušika. Prav tako lahko vplivajo na celulolitične mikrobe in tudi na mikroorganizme, ki raztapljajo fosfate. Med škropljenjem kmetijskih površin lahko FFS pronicajo v površinske vode in vplivajo na tamkajšnje življenje ter zmanjšajo biodiverziteto vodnih vretenčarjev (Beketov in sod., 2013).

2.2.2 Vpliv FFS na zdravje ljudi

Povečana poraba FFS lahko v kombinaciji z neustrezno kontrolo in pomanjkanjem znanja o varnem ravnanju s FFS ter uporabljenimi opremo, povzroči številne škodljive učinke na ljudeh, ki delajo s FFS, kakor tudi na potrošnikih in okolju. FFS lahko pridejo v naše telo na različne načine: z vdihavanjem, zaužitjem, ali pa se absorbirajo preko kože. Po nekaterih študijah naj bi bila prav slednja prevladujoča oblika poti vnosa teh snovi v telo pri ljudeh, ki so neposredno v stiku s FFS (Lamnoglia in sod., 2017). Z izpostavljenostjo FFS so povezani tudi levkemija, limfomi, sarkomi v mehkem tkivu, možganski, kostni in želodčni rak (Bolognesi in Merlo, 2011). Vnos velike količine FFS lahko privede do akutnih zastrupitev, ki se lahko stopnjujejo v komo ali smrt. Večina negativnih učinkov pri potrošnikih je posledica dolgotrajnega vnosa nizkih koncentracij FFS s hrano (Oates in sod., 2014).

V vodo so pesticidi prišli preko izpiranja FFS iz pridelovalnih površin v podtalnico oz. z onesnaženjem pitnih virov (Oates in sod., 2014). Med kronične učinke spadajo možna zmanjšana plodnost in nižji inteligenčni količnik pri posameznikih, ki so bili izpostavljeni FFS v maternici (Isling in sod., 2014). FFS bi lahko vplivali tudi na pojav Parkinsonove bolezni in razvojnih napak (Bolognesi in Merlo, 2011). Glive v nekaterih primerih pri potrošnikih izzovejo alergije in zastrupitve, saj tvorijo alergene in mikotoksine (Dellavalle in sod., 2011). FFS lahko povzročajo tudi bolezni dihal. Dolgoročna okužba spodnjih dihal v otroštvu lahko povzroči kronično vnetje dihalnih poti, kot je astma (Ye in sod., 2017). Ostanki FFS se preko zaužite hrane živalskega ali rastlinskega izvora lahko v našem telesu presnovijo, izločijo, ali pa se v njem kopičijo, zlasti v maščobnem tkivu, krvnih in limfatičnih organih. Tako lahko povzročijo imunopatološke učinke, ki vodijo do imunske pomanjkljivosti, avtoimunosti in do preobčutljivostnih reakcij, kot so ekcem, dermatitis, alergijskih bolezni dihal. FFS povzročijo tudi kromosomske mutacije pri ljudeh in živalih, kar lahko vodi do raka na jetrih ali pljučih (Niti in sod., 2013). Velik problem pri sledenju

FFS je zelo težavna metodologija, saj je na trgu ogromno pripravkov, poleg tega pa posamezne snovi lahko razpadejo v manj ali še bolj strupene molekule, tako da jih je skoraj nemogoče vse identificirati.

2.2.3 Nadzor uporabe FFS

Pri nadzoru rabe FFS imajo zelo pomembno vlogo nacionalni programi za nadzor in zaščito hrane pred kontaminacijami. V razvitem svetu so takšni programi vsakdanji, kakor tudi raziskave o vsebnosti FFS v hrani, problem pa predstavlja pomanjkanje takšnih programov v manj razvitih državah. V slednjih je upoštevanje zbirke standardov, smernic, navodil in kodeksov ravnanja z živili, njihove pridelave in varnosti še toliko pomembnejše. Ena takšnih zbirk je Codex Alimentarius, katere komisija ima 188 članic, ena izmed njih je tudi Slovenija (FAO, 2017).

Z zavedanjem pomanjkanja informacij o ostankih FFS v hrani so v Boliviji naredili raziskavo, kjer so analizirali vzorce zelene solate, čebule in krompirja. V čebuli in krompirju niso našli ostankov teh snovi, so pa bili pesticidi detektirani v 50 % vzorcev zelene solate. Okoli 20 % te zelenjave je vsebovalo FFS nad MRL (angl. *maximum residue levels*; najvišja dovoljena vrednost ostankov), vendar pa te vrednosti niso presegle aktunih referenčnih odmerkov (ArfDs, angl. *acute reference doses*), kakor tudi ne sprejemljivega dnevnega vnosa (ADI, angl. *acceptable daily intake*) za posamezne FFS. V solati so poleg drugih FFS našli tudi piretroid in organofosfat, ki sodita v skupino najpogostejše uporabljenih pesticidov v kmetijstvu. V človeškem telesu se zelo hitro presnovijo v nestrupene komponente, zaradi česar so večinoma povezani z akutno toksičnostjo. S petminutnim spiranjem hrane pa lahko zmanjšamo koncentracijo FFS kar do 45 %, neodvisno od njihove vrste (Skovgaard in sod., 2017).

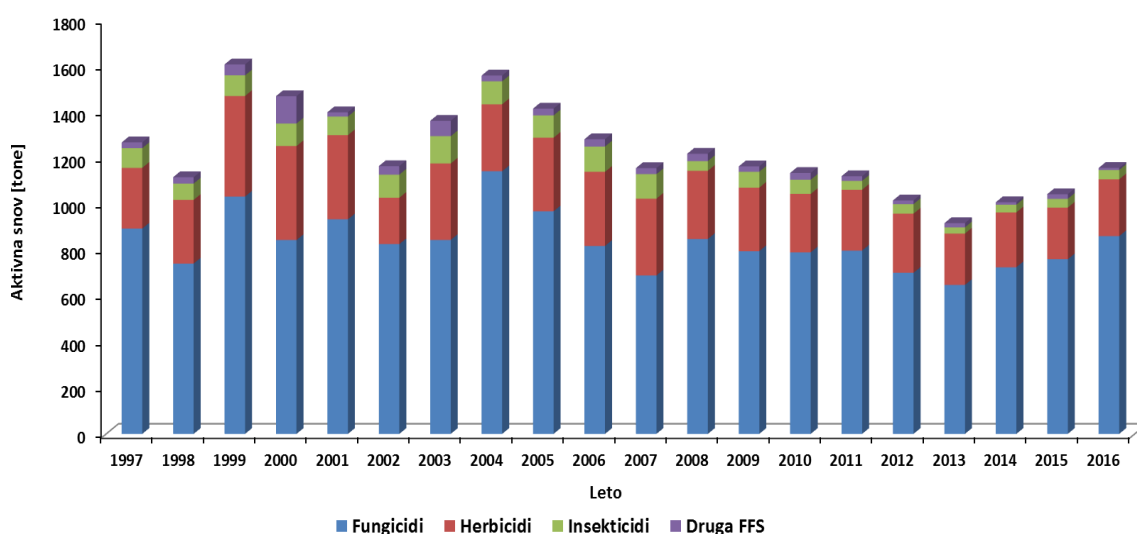
Na Danskem so ostanke FFS našli v 60 % vzorcev sadja in v 18 % vzorcev zelenjave. MRL je bila presežena pri 6 % vzorcev sadja in pri 2 % vzorcev zelenjave (Poulsen in Andersen, 2003). Kljub nizkemu deležu najdenih FFS v hrani, pa raziskave kažejo, da FFS v očeh potrošnikov predstavljajo veliko tveganje za človeško zdravje, celo večje kot druge nevarnosti (Harris in sod., 2001).

V nasprotju s pridelavo drugih rastlin v nemškem vinogradništvu fungicidi predstavljajo 95- odstotni delež vseh uporabljenih FFS. Zato ni presenetljivo, da so bili najdeni v vzorcih površinskih vod okrog vinogradov v kar velikih koncentracijah. V nekaterih vzorcih vode so vrednosti fungicidov presegle vrednosti zakonsko sprejemljivih koncentracij teh snovi (Bundschuh in sod., 2016).

2.2.4 Slovenija

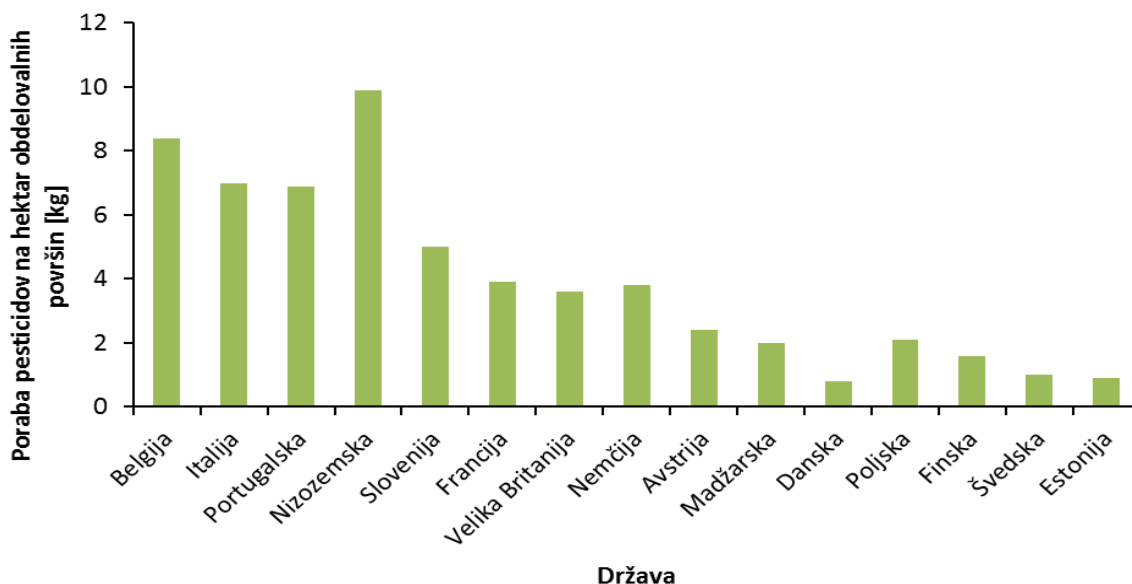
Podobna raziskava kot v Boliviji in na Danskem je bila narejena tudi v Sloveniji, kjer so med leti 2001 in 2004 merili ostanke FFS v vzorcih krompirja, solate in jabolk. V več kot pol vzorcih niso našli ostankov FFS, v 10 % vzorcev jabolk, solate in krompirja pa je bila presežena MRL, v večini na račun izmerjenih ditiokarbamatov v 36 vzorcih krompirja (Baša Česnik in sod., 2006).

V Sloveniji sicer nadzor nad ostanki pesticidov izvaja Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) skupaj s pooblaščenimi laboratoriji. Leta 2015 je bilo analiziranih 774 vzorcev živil, v katerih so iskali ostanke pesticidov. 250 vzorcev je bilo iz Slovenije, 345 iz drugih držav Evropske unije (EU), 179 pa iz tretjih držav. Kar 760 živil je bilo v skladu z določili Uredbe (ES) št. 396/2005, na podlagi katere so v EU urejeni ostanke FFS ter mejne vrednosti teh ostankov v hrani in krmi rastlinskega ter živalskega izvora. V 460 vzorcih ni bilo nobenih ostankov FFS ali pa so bile vsebnosti pod mejo detekcije uporabljene metode. V 14 vzorcih pa so izmerjene vrednosti ostankov pesticidov presegale mejne vrednosti in niso bile v skladu z Uredbo (ES) št. 396/2005. Od tega je 6 vzorcev paprike vsebovalo fungicid flusilazol, zaradi česar so bili zavrženi že na meji. Za ostalih 8 kritičnih vzorcev pa je bila narejena ocena, pri čemer je bilo kar 6 živil ocenjenih kot varnih. Delež nevarnih živil za leto 2015 je bil enak kot leto prej in malo manjši, kot je bil leta 2013 (Poročilo UVHVVR, 2016). Skupna prodaja fitofarmacevtskih sredstev (FFS) je leta 2016 znašala 1156 ton aktivnih snovi, od tega je bilo prodanih 860 ton fungicidov (Slika 1). V primerjavi z letom 2015 se je prodaja povečala za več kot 100 ton, predvsem na račun povečane prodaje fungicidov. Če pa gledamo zadnjih 20 let, je prodaja FFS padla za dobrih 100 ton, saj je bilo leta 1997 prodanih 1267 ton fitofarmacevtskih sredstev (SURs, 2017b).



Slika 1: Prodaja fitofarmacevtskih sredstev v Sloveniji od leta 1997 dalje (prirejeno po UVHVVR, 2016, cit. po SURs, 2017a).

Pri primerjavi porabe FFS med državami Evropske unije lahko ugotovimo, da se Slovenija nahaja nekje v sredini, saj je leta 2014 znašala povprečna poraba FFS na hektar obdelovalnih površin okrog 5 kilogramov (Slika 2). Najnižjo porabo FFS naj bi imela Danska, z manj kot 1 kg sredstev na hektar obdelovalnih površin, največjo pa Nizozemska, kjer naj bi za vsak hektar porabili skoraj 10 kg FFS.



Slika 2: Poraba fitofarmaceutskih sredstev na hektar obdelovalnih površin v državah EU v letu 2014 (prirejeno po SURS, 2017a).

2.2.5 Fungicidi

Prvo kemično sredstvo za varstvo pred rastlinskimi boleznimi je odkril B. Prévost leta 1807. Sneti in rje že stoletja omejujejo pridelavo žit s pojavljanjem na zdravih rastlinah. Prévost je bil prvi, ki je opazil, da spore kalijo in povzročijo pšenično snetljivost. Nato pa je odkril, da šibka bakrova raztopina preprečuje njihovo rast. Z eksperimenti je dokazal, da bi kmetje lahko nadzorovali pšenično snet z močenjem pšeničnih zrn z raztopino bakrovega sulfata. Ta je bila osnova, da je leta 1885 mikolog Millardet odkril bordojsko brozgo, fungicid, ki vsebuje bakrov sulfat in apno. Fungicidni pripravki na podlagi bakra, žvepla in apna naj bi po besedah Leadbeaterja (2014) prevladovali do konca 20. stoletja, njihov delež pa naj bi bil v resnici precej nižji.

Fungicidi se nahajajo v različnih oblikah (formulacijah), kot so: prah, granule, plin, tekočina itd. Poleg same aktivne sestavine (učinkovine) so v fungicidnem pripravku še pomožne inertne sestavine, ki izboljšajo učinkovitost pripravka. Pri mnogih boleznih je za učinkovito varstvo potrebnih več aplikacij fungicidov, včasih si sledijo zaporedne aplikacije na 5 dni. Dodatne aplikacije so potrebne, da se zaščiti nov prirast rastline ter da

se nadomesti fungicid, izgubljen zaradi erozije vetra in vode, kemične razgradnje in UV razpada (McGrath, 2004).

Večino današnjih fungicidov se na rastline nanese z običajno tehniko škropljenja po listih rastlin, saj je ta tehnika najbolj praktična in prikladna za zatiranje večine listnih bolezni. Ta tehnika ima nekaj pomanjkljivosti, saj za dobro porazdelitev fungicidov po rastlinah potrebujemo velike količine vode, prav tako pa je težko določiti pravo stopnjo v razvojnem ciklu patogena. Naslednji način uporabe fungicidov je vnos teh snovi v zemljo, kar je uporabno pri patogenih, ki se prenašajo z zemljo. Za zatiranje bolezni, ki se prenašajo s semeni, je najboljša izpostavitve semen s fungicidi. Redko pa se uporablja direktno vbrizgavanje fungicidov v samo rastlino (Leadbeater, 2014).

Fungicidi na ciljne organizme delujejo na različne načine. Nekateri fungicidi vplivajo na sintezo lipidov, sterolov in drugih sestavin membrane, drugi inhibirajo proteinsko sintezo, sintezo nukleinskih kislin ali pa prenos signala v glivi. Obstajajo tudi fungicidi, ki zavirajo encime celičnega dihanja, nekateri pa vplivajo na mitozo in celično delitev (Yang in sod., 2011).

2.3 RASTLINE KOT BIOTIČNO SREDSTVO ZA VARSTVO PRED BOLEZNIMI

2.3.1 Uporaba rastlin za zatiranje bolezni človeka

Rastline so glavni vir hrane, vlaknin, krme, zdravil in številnih drugih, za ljudi zelo uporabnih produktov. Na svetu naj bi obstajalo okoli 260 tisoč višjih rastlin in veliko je takšnih, ki so bogat vir potencialnih zdravil že tisoče let. Terapevtsko vrednost dajejo rastlinam kemične snovi znotraj rastlinskih tkiv, ki imajo določen fiziološki učinek na človeško telo. Med te kemične molekule spadajo: alkaloidi, flavonoidi, glikozidi, tanini, terpeni, smole, eterična olja, fenoli, steroidi, ogljikove spojine, dušikove soli (Sheeba, 2010). Nekateri deli medicinskih rastlin se uporabljajo kot zdravilo v obliki ekstrakta. Nadzor bakterijskih okužb se je izjemno izboljšal z odkritjem antibiotikov, vendar pa so nekateri patogeni mikroorganizmi postali odporni na antibiotike zaradi prevelike porabe slednjih, zato se tudi v rastlinah iščejo snovi z morebitnim protibakterijskim delovanjem (Nasrullah in sod., 2012; Ullah in sod., 2016).

Metanolni ekstrakt iz listov navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) je pokazal inhibitorno aktivnost že pri koncentraciji 25 mg/ml, in sicer proti bakterijam *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis* (Nasrullah in sod., 2012). Etanolni rastlinski ekstrakti *Allium sativum*, *Azadiracta indica*, *Ocimum sanctum*, *Syzygium cumini*, *Trigonella foenum-graecum* in *Cordia dichotoma* so pokazali antimikrobno aktivnost proti različnim izolatam kvasovk iz rodu *Candida*. V ta rod spada več vrst gliv, ki so ene izmed glavnih povzročiteljev bolnišničnih okužb. Ponavadi gre za sekundarno okužbo pri posameznikih z

oslabljenim imunskim sistemom (Khan in sod., 2017). Ekstrakti rastlin iz družin *Asteraceae* in *Lamiaceae* imajo antimikrobni vpliv na meticilin odporno bakterijo *Staphylococcus epidermidis* (Chovanová in sod., 2013).

2.3.2 Uporaba rastlin za zatiranje rastlinskih bolezni

Kot že rečeno, so številni fungicidi strupeni in imajo neželene učinke na organizme, ki so prisotni v okolju. Nekateri sintetični pripravki so biotično nerazgradljivi in se lahko zato akumulirajo v tleh, vodi, rastlinah ter tako vplivajo na človeka. Velik problem je tudi pojav odpornosti patogenih gliv na sintetične fungicide. Zato je čedalje bolj zaželen uporaba ekoloških ukrepov za obvladovanje rastlinskih bolezni. Na splošno med biopesticide uvrščamo naravne produkte, pridobljene iz mikroorganizmov, rastlin, živali, in same mikroorganizme (viruse, bakterije, glive, nematode in praživali) (Chopping in Menn, 2000). Rastlinski ekstrakti so že bili v uporabi kot fungicidi pred letom 1940, vendar pa so jih nato nadomestili številni sintetični pripravki. Zmanjšalo se je tudi število raziskav na temo naravnih produktov za uporabo v kmetijstvu, vendar je sedaj trend obraten, ker se je izkazalo, da imajo rastline ogromen agrokemijski potencial. K temu je veliko prispevala tudi osveščenost ljudi o škodljivih učinkih FFS (Choi in sod., 2004; Yoon in sod., 2013).

Naravni proizvodi se zdijo kot uspešna alternativa sintetičnim pripravkom in številni raziskovalci iščejo učinkovite naravne snovi. Prisotnost protiglivnih snovi v višji rastlinah je že dolgo časa znana in te snovi so zaradi biorazgradljivosti in selektivne toksičnosti zelo dragocene. FFS na rastlinski osnovi so tudi precej cenejši, bolj dosegljivi in predvsem niso strupeni. Dolgo je že v uporabi piretrin, insekticid, ki se ga izolira iz rastline *Chrysanthemum cinerariifolium* (bolhač) (Elliott, 1989). V uporabi so tudi strobilurini, fungicidi, izolirani iz glive *Strobilurus tenacellus*. Na tržišču obstaja ekstrakt rastline *Reynoutria sachalinensis*, imenovan Milsana, ki inducira odpornost kumar in paradižnika na pepelasto plesen (Konstantinidou-Doltsinis, 2006). Cinamaldehyd je bil izoliran iz cimeta in ima protiglivno delovanje, gama aminobutrična kislina in L-glutaminska kislina krepijo rast nekaterih rastlin in preprečujeta razvoj bolezni. Jojobino olje deluje kot fungicid, podobne lastnosti ima tudi laminarin, glukan, izoliran iz alge *Laminaria digitata*. Ekstrakt rastline *Macleaya cordata* vsebuje snovi, ki delujejo protiglivno in insekticidno (Yoon in sod., 2013). Kljub temu pa večina rastlin še vedno ni bila analizirana na prisotnost fitoaktivnih snovi. Z uporabo plevelov in invazivnih vrst rastlin kot biopesticidov bi lahko hkrati obvladovali bolezni rastlin in ekonomsko izkoristili nezaželene rastline (Tapwal in sod., 2011). V ZDA je registriranih že 245 biopesticidnih aktivnih sestavin, ki se nahajajo v stotinah produktov (Yoon in sod., 2010).

2.3.3 Naravna fitofarmacevtska sredstva na osnovi rastlin v Sloveniji

Tudi v Sloveniji lahko v lokalni trgovini, ki prodaja FFS, kupimo nekaj biotičnih pripravkov na podlagi rastlin. Bio Plantella Flora Kenyatox Verde je naravni insekticid, ki vsebuje piretrin, ta se pridobiva iz cvetov dalmatinskega bolhača. Uporablja se za zatiranje listnih uši, resokrilcev, ščitkarjev in ameriškega škržata na okrasnih rastlinah, zelenjavi ter na vinski trti. Bio Plantella Thymi je naravni sprej na podlagi timijana in brina, ki se uporablja za odganjanje škodljivcev na zelenjavi, sadnem drevju, jagodičevju, trti in okrasnih rastlinah. Bio Plantella Natur je naravni pripravek na podlagi njivske preslice, ki krepi rastline in jih v času vegetacije ohranja vitalne ter odporne proti boleznim. Bio Plantella Super pa je naravni pripravek na podlagi sojinega lecitina, ki krepi celične stene rastlin, prav tako pa ohranja rastline vitalne in odporne na bolezni. Na trgu je dolgo časa tudi insekticid NeemAzal, ki vsebuje aktivno snov azadirachtin, izolirano iz pečk tropskega drevesa *Azadirachta indica*. Uporablja se za zatiranje sesajočih in grizočih škodljivih žuželk na gojenih rastlinah. Tudi na našem trgu je možno dobiti piretrinski koncentrat, ki deluje kot insekticid in je poznan pod imenom Floral (Biotip). Pod imenom Finalsan je možno kupiti herbicid, ki vsebuje pelargonske kisline. HomeoGarden ponuja naravni rodenticid, imenovan Miši in podgane stop, ki je narejen izključno iz koruznih storžev in melase. Ogriol pa je naravni insekticid, ki vsebuje olje oljne ogrščice (FURS, 2018).

2.3.4 Vpliv rastlinskih ekstraktov na rast gliv

Listni ekstrakti vrst *Polystichum squarrosus*, *Adiantum venustum*, *Parthenium hysterophorus*, *Urtica dioica* in *Cannabis sativa* so pokazali proti glivno delovanje. Najbolj zaviralno je na fitopatogene glive deloval ekstrakt navadne konoplje, kateremu je sledil ekstrakt rastline *Parthenium hysterophorus*, na tretjem mestu po zaviranju rasti gliv pa je bila velika kopriva (*Urtica dioica*) (Tapwal in sod., 2011). Shahat in sod. (2017) so preverili fungicidne lastnosti 16 rastlin, ki jih v Savdski Arabiji uporabljajo v medicini. Najbolj je rast glive *Fusarium moniliforme* zaviral metanolni ekstrakt iz rastline *Echium arabicum*, saj je bila pri tem ekstraktu izmerjena največja cona inhibicije. Zelo dobro inhibicijo rasti bakterij (*Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) in gliv (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae*) so v drugi raziskavi pokazali tudi ekstrakti rastlin *Cuscuta pedicellata* in *Tribulus terrestris* (Naz in sod., 2017). Izmed 57 testiranih rastlin so zelo dobro inhibicijo rasti gliv (*Magnaporthe grisea*, *Corticium sasaki*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) pokazali metanolni ekstrakti *Chloranthus japonicus*, *Paulownia coreana* in *Rumex acetosella* (Choi in sod., 2004). Dellavalle in sod. (2011) so ugotovili, da vsebujejo kislinski ekstrakti žajblja, rožmarina in muškatne kadulje učinkovite bioaktivne snovi. Namigujejo, da gre za proteine, ki že pri nizkih koncentracijah zavirajo rast gliv.

2.4 NAVADNA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

Je enoletna zelnata rastlina, ki spada v družino *Cannabaceae*. Navadna konoplja (Slika 3) je dvodomna in spada med kritosemenke. Dobro raste pri nizkih temperaturah in je dobro prilagojena na zmerno podnebje. Konoplja izvira iz srednje Azije, kjer naj bi ji jo že 4000 let pred našim štetjem gojili na Kitajskem, z namenom pridobivanja vlaken in uporabe le teh pri proizvodnji tekstila, vrvi in pridobivanju papirja (Zuardi, 2006). V Evropo so konopljo vnesli muslimani, ko so jo začeli uporabljati pri tehnikah izdelave papirja okoli leta 1150 v Španiji. Konoplja je vir hrane, vlaken, psihoaktivnih snovi ter olja in je že stoletja uvrščena med najpomembnejše kmetijske in medicinske rastline. Zaradi navadni konoplji zelo podobne vrste *Cannabis indica*, ki vsebuje velike koncentracije sedativne in psihoaktivne snovi (THC – tetrahidrokanabinol), je gojenje konoplje v večini držav prepovedano. *C. indica* vsebuje kar 50-krat več THC kot navadna, industrijska konoplja (0,2 %) (Nissen in sod., 2010, Tapwal in sod., 2011, Bedini in sod., 2016). Vendar pa je jasno, da ima navadna konoplja številne dobre lastnosti, ki so koristne za zdravljenje mnogih bolezni, prav tako lajša bolečine, zato te dobre strani konoplje prevladajo nad psihoaktivnimi lastnostmi. Prav to je vodilo nekaj držav, kot so ZDA, Italija, Nemčija, Nizozemska, Romunija, Izrael, Slovenija, da so legalizirale to rastlino in njene derivate za medicinski namen. Evropska komisija je že leta 2001 dovolila gojenje konoplje z manj kot 0,2 % THC.

Vse to je pripeljalo do vse večjega interesa za gojenje konoplje in uporabe njenih surovin, kot so vlakna, ki se uporabljajo v papirni industriji in v gradbeništvu, ali semena, ki se uporabljajo kot hrana in krma ter vsebujejo olja, uporabna pri izdelavi črnila za tiskalnice ter zaščiti lesa, proizvodnji mil in detergentov (Clarke, 2002; Callaway in sod., 2004). Olja in stebila je možno uporabiti tudi za pridobivanje goriva. Konopljini cvetovi in zgornji listi vsebujejo eterična olja, ki se uporabljajo kot vonjave v parfumih, milu, svečah in kot aroma v živilih (Bedini in sod., 2016). Konopljo so že v 12. stoletju pred našim štetjem uporabljali za zdravljenje bolečih oči. Nekaj stoletij zatem pa se je konoplja začela uporabljati kot anestetik in antiflegmatik (Aisha in sod., 2012).



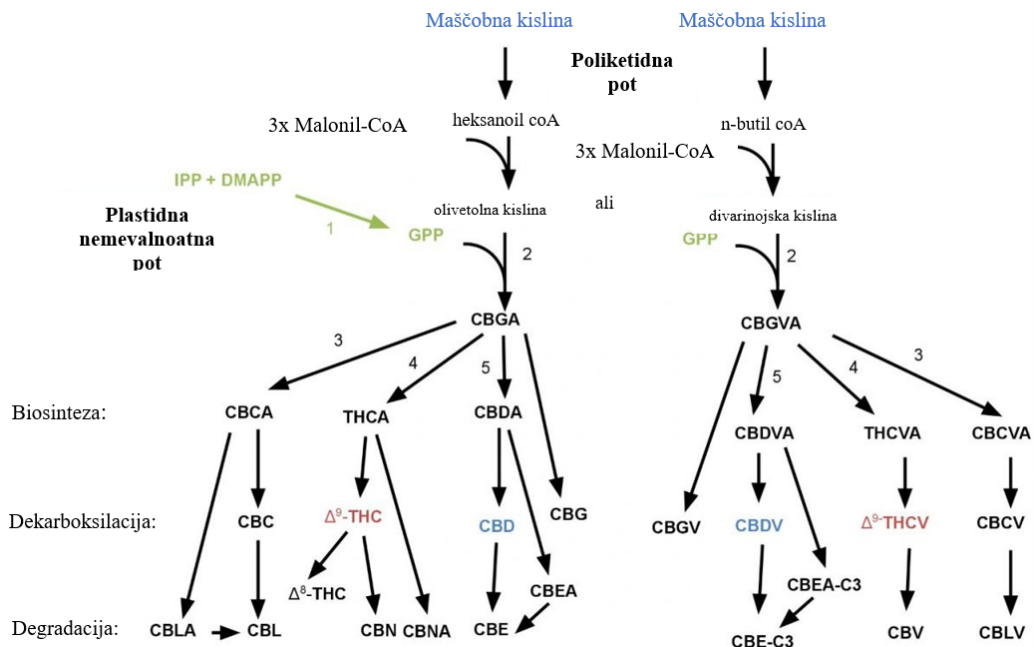
Slika 3: Navadna konoplja (Wikimedia Commons, 2017).

2.4.1 Kanabinoidi

Znano je, da konoplja vsebuje številne metabolite, tako primarne kot sekundarne. Med primarne metabolite sodijo aminokisline, maščobne kisline in steroidi. Med sekundarne pa uvrščamo kanabinoide, stilbenoide, flavonoide, terpenoide, lignane in alkaloide. Kanabinoidi, najbolj znani sekundarni metaboliti, so običajno sestavljeni iz 21 ogljikovih atomov in se v rastlini nahajajo v obliki karboksilnih kislin. Večinoma so skoncentrirani v viskozni smoli, proizvedeni v žleznihih trihomih in dajejo rastlini posebne farmakološke učinke (Amar, 2006). Kanabinoidi so aktivne kemične spojine, ki delujejo na kanabinoidne receptorje. Ti se nahajajo v človeških in živalskih celicah ter regulirajo sproščanje živčnih prenašalcev v možganih. Poleg rastlinskih kanabinoidov poznamo še endogene kanabinoide, ki se proizvajajo v telesih ljudi in živali, ter tudi sintezne kanabinoide, ki so proizvedeni v laboratorijih (Lambert in Fowler, 2015).

Konopljske kanabinoide lahko razdelimo v 11 različnih strukturnih tipov: kanabigerol (CBG), kanabikromena (CBC), kanabidiola (CBD), Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC), Δ^8 -THC, kanabiciklol (CBL), kanabilsoin (CBE), kanabinol (CBN), kanabinodiol (CBND), kanabitriol (CBT) in drugi tipi (Tandon in Mathur, 2017). Slika 4 prikazuje biosintezne poti omenjenih kanabinoidov. Najbolj poznana rastlinska kanabinoida sta THC in CBD. THC je najbolj proučevan zaradi psihoaktivnih lastnosti, CBD teh lastnosti nima, je pa v zadnjem času pridobil veliko pozornosti zaradi vse večjega števila dokazov o njegovi učinkovitosti pri zdravljenju nevroloških bolezni. Koncentracija aktivnih spojin je odvisna od sorte rastline, starosti, rastnih pogojev, časa žetve, pogojev shranjevanja in od vrste

tkiva. Kanabinoide najdemo v vseh delih konoplje, največ jih je v smolnatem izločku cvetnih vršičkov, zgornji, mlajši listi pa naj bi jih vsebovali več kot spodnji listi (Głodowska in Łyszcz, 2016).



Slika 4: Biosintezna pot kanabinoidov (Mohammad, 2017).

Konopljna eterična olja imajo dobre toksične učinke proti invazivnim prenašalcem bolezni, kot sta azijski tigrasti komar *Aedes albopictus* in sladkovodni polž *Physella acuta* (Bedini in sod., 2016). Vodni ekstrakti navadne konoplje so pokazali tudi dobre nematocidne lastnosti in bi lahko zamenjali sintetične pripravke (Mukhtar in sod., 2013). Raziskave so pokazale, da 20-odstotni listni ekstrakti navadne konoplje popolnoma zavrejo rast glive *Curvularia lunata* ter 50-odstotno inhibirajo rast gliv *Alternaria zinniae* in *Alternaria solani* (Tapwal in sod., 2011). Konopljino olje, metanolni in naftni ekstrakt so pokazali tudi dobro protibakterijsko delovanje, medtem ko je bila njihova aktivnost proti glivama *Aspergillus niger* in *Candida albicans* precej majhna (Aisha in sod., 2012). Različni listni ekstrakti navadne konoplje so pokazali 40–50-odstotno inhibicijo rasti micelija gliv *Alternaria* spp., ki so bile izolirane iz zrn riža (Pal in sod., 2013). Protimikrobna aktivnost konoplje naj bila precej odvisna od časa setve in starosti rastline, zato stremenje k čim večji proizvodnji olja ni najbolj smotno, če bi ta olja uporabljali za varstvo pred rastlinskimi boleznimi (Nissen in sod., 2010). Rastlinski ekstrakti in eterična olja navadne konoplje kažejo dobre antimikrobne lastnosti, zato se pridelovanje konoplje splača, saj je to pridelok s širokim spektrom uporabe, med drugim omogoča tudi varstvo rastlin pred patogenimi organizmi.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA IN PRIDOBITEV RASTLINSKEGA MATERIALA

Liste in vršičke navadne konoplje smo nabrali konec meseca julija leta 2016 na polju v Podgorju pri Slovenj Gradcu (Slika 5). Rastlinski material smo v hladilni torbi nemudoma prinesli na Oddelek za biologijo ter ločili liste od vršičkov. Nato smo liste in vršičke ločeno zavili v aluminijasto folijo ter jih za kratek čas potopili v tekoči dušik, nato pa jih do liofilizacije hranili v zamrzovalniku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 5: Posevek navadne konoplje.

Del rastlinskega materiala smo pridelali tudi sami, tako da smo posadili po 10 semen navadne konoplje v korito z zemljo in jih dali pod modro-rdečo svetlobo ter jih gojili pri fotoperiodi 15/9 (dan/noč). Rastline so rastle v komori pri temperaturi $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, vmes pa smo jih enkrat tedensko zalivali s Hoaglandovo hranilno raztopino. Rastline so rastle približno 2 meseca, nato pa smo ponovno ločili liste od vršičkov (Slika 6) in material shranili na način, kot je bilo opisano zgoraj.

Sestava Hoaglandove raztopine:

- $0,5\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$,
- $0,5\text{M KNO}_3$,
- $0,5\text{M MgSO}_4$,
- $0,5\text{M KH}_2\text{PO}_4$,
- $0,1\text{mM FeNaEDTA}$,
- mikroelementi,
- destilirana H_2O .

Ko je bil rastlinski material zamrznjen, smo ga liofilizirali. V liofilizatorju (ScanVac, CoolSafe) smo material pustili 4 dni, da se je čisto posušil, saj smo se želeli znebiti vode iz našega vzorca. Sam princip liofilizacije je namreč tak, da zamrznjena voda ob zmanjšanju tlaka sublimira; preide iz trdega v plinasto agregatno stanje. Posušene liste in vršičke smo nato strli s pestilom v terilnici, ob dodatku tekočega dušika. Dobljeni fini prah smo spravili v večje centrifugirke in jih hranili v suhem, temnem prostoru do priprave ekstraktov.



Slika 6: Vršički pred zamrzovanjem.

3.2 PRIRAVA EKSTRAKTOV NAVADNE KONOPLJE

Etanolne ekstrakte smo pripravili tako, da smo najprej natehtali 1 g prahu listov/vršičkov, stresli prah v 200-mililitrsko steklenico s pokrovom, ter dodali 20 ml 99,8-odstotnega (absolutnega) etanola (Merck, Nemčija). Mešanico smo nato stresali na stresalniku 20 minut pri 120 obratih na minuto. Nato smo ekstrakt precedili preko filtrirnega papirja (MN-751) v stekleno bučko, odvzeli 1 ml vzorca za analizo in preostali rastlinski material, ki se je nabrali na papirju, vrnili v stekleničko in mu ponovno dodali 20 ml absolutnega etanola. Sledilo je stresanje in za njim še druga filtracija v majhno čašo. Nato smo odvzeli še 1 ml tega vzorca za analizo in preostanek ekstrakta združili s prvim ekstraktom v stekleni bučki (Romano in Hazekamp, 2013) ter od združenega ekstrakta vzeli 1 ml za analizo. Ta postopek smo ponovili po trikrat za liste in vršičke.

Nato smo stekleno bučko s 40 ml ekstrakta pritrdili na rotacijski rotavapor (uparjevalnik) (BÜCHI Rotavapor R-124), da bi skoncentrirali ekstrakt. Z napravo rotavapor (Slika 7) smo pri temperaturi vodne kopeli 45 °C pridobili skoncentriran rastlinski ekstrakt, ki se je pritrtil na stene bučke kot pri članku (Nasrullah in sod., 2012). Ko je vsa tekočina izhlapela iz bučke, smo jo odstranili z rotavaporja, pokrili s folijo in jo shranili v

zamrzovalniku ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) do pričetka priprave ekstraktov na dan nastavljanja poskusa. Takrat smo oborino raztopili v 10 ml absolutnega etanola, dobro premešali, da smo dobili koncentracijo ekstrakta 100 g/l. Iz tega ekstrakta smo nato v centrifugirkah pripravili redčitve ekstraktov, ki smo jih uporabili v poskusu (Preglednica 1).

Preglednica 1: Tipi ekstraktov, ki smo jih uporabili v poskusih.

Oznaka ekstrakta	Izvorni material	Koncentracija ekstrakta
A	topilo (etanol/voda/olje)	/
B	listi	25 g/l
C	listi	50 g/l
D	listi	100 g/l
E	vršički	25 g/l
F	vršički	50 g/l
G	vršički	100 g/l



Slika 7: Rotavapor.

Vodni ekstrakt je bil v večji meri pripravljen tako kot etanolni. Razlika v pripravi je bila v času stresanja, saj so se vodni ekstrakti namesto 20 minut stresali eno uro. Za pripravo ekstraktov smo uporabili bidestilirano avtoklavirano vodo. Poleg tega pa so bili vodni ekstrakti pred nanosom na gojišče prefiltrirani skozi $0,2\text{ }\mu\text{m}$ najlonski filter.

Oljne ekstrakte pa smo pripravili tako, da smo zatehtali 1 g prahu listov/vršičkov, stresli prah v stekleničko in dodali 10 ml sončničnega olja. To mešanico smo nato dve uri inkubirali v vodni kopeli (VWR) pri $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter precedili. Nato smo vzeli 1 ml ekstrakta za

analizo, preostali ekstrakt pa avtoklavirali (121 °C, 1,3 bara, 20 min). Po končani sterilizaciji smo ponovno odvzeli 1 ml ekstrakta za analizo ter pripravili redčitve ekstrakta v skladu s Preglednico 1.

3.3 PRIPRAVA GLIV ZA POSKUS

Glive *Fusarium oxysporum* (KP985737), *Epicoccum nigrum* (KP985739), *Botrytis cinerea* (KP985744), *Botrytis cinerea II* (KP985745), *Alternaria alternata* (KP985749), *Botrytis* sp. (KP985753) in dva seva rodu *Verticillium* so bile en teden pred nastavitvijo poskusa nacepljene na plošče z gojiščem PDA – krompirjev dekstrozni agar (Biolife, Italija) s koncentracijo 20 g/l. Glive so rastle en teden pri 20 °C v petrijevkah z notranjim premerom 87 mm, tako da so na dan nastavitve poskusa prerastle približno polovico površine petrijevke (Kovačec in sod., 2018).

3.4 NASTAVITEV POSKUSA

Pred začetkom nastavitve poskusa smo pripravili petrijevke (premer 9 cm, površina 60 cm²) s približno 25 ml PDA gojišča po protokolu Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta. Gojišče smo pripravili dan prej ter plošče z gojiščem pustili čez noč v laminariju, da so se strdile. Naslednji dan smo nato zjutraj v laminariju ob gorilniku na ploščo s pomočjo drigalske spatule razmazali po 200 µl redčitve ekstrakta oz. kontrole, ki je bila samo topilo, s katerim smo pripravili ekstrakte. Ekstrakt smo na plošči pustili dve uri, nato pa smo na ploščo inokulirali glivo. Glivo smo iz en teden starega micelija izrezali s plutovrtom številka pet, tako, da smo izbrali najmlajši micelij. Čepek z glivo in starim gojiščem smo prenesli na gojišče nove petrijevke z ekstraktom in ga obrnili navzdol, tako da je bila gliva oz. njen micelij takoj v kontaktu z ekstraktom. Vsako glivo smo testirali na sedem različnih ekstraktov v sedmih ponovitvah. Vse glive smo na isto vrsto ekstrakta (etanolni/vodni/oljni) nacepili isti dan. Tako smo imeli tri velike ločene poskuse. Petrijevke z nacepljeno glivo smo nato ovili s prozorno folijo, zložili v kartonasto škatlo in jih pustili rasti 7–10 dni pri temperaturi 20 °C.

3.5 SPREMLJANJE RASTI GLIV

Rast gliv smo spremljali s pomočjo fotoaparata (Canon EOS 1000D), saj smo glive fotografirali po štirih in po sedmih dneh od inokulacije. Fotografije smo nato računalniško obdelali s pomočjo programa ImageJ, preko katerega smo dobili podatke o dejanski rasti gliv, saj smo dobili podatke o površini rasti glive na vsaki petrijevki posebej. Podatke smo nato statistično obdelali in predstavili s programi Statistica 7, Microsoft Excel in R. Površino rasti pri različnih pogojih smo primerjali s kontrolo, tako da smo povprečno

vrednost površine pri določenemu pogoju delili s povprečjem kontrole in nato dobljen rezultat pomnožili s 100 %. Inhibicijo rasti pa smo dobili tako, da smo zgoraj dobljeno vrednost odšteli od 100 %.

3.6 PRIPRAVA GLIV ZA ANALIZO

Po sedmih dneh smo vse glive razen obeh vrst *Verticillium* pripravili za analize. Slednji sta rastli bolj počasi, tako da smo jih za analize pripravili po devetih dneh. Vsak glivo posebej smo ločili od gojišča s pomočjo skalpela in spatule ter jo osušili na filter papirju. Po štiri glive smo uporabili za test lipidne peroksidacije, tako da smo cel micelij strli v terilnici s pomočjo tekočega dušika in 80 mg glive zatehtali v prazno 2-militrsko epico. Epico smo takoj prenesli v tekoči dušik ter jo nato do analize shranili v zamrzovalniku na -20°C . Preostale tri glive od vsakega pogoja pa smo prav tako ločili od agarja kot pri lipidni peroksidaciji, a smo jih nato skupaj zavili v alufolijo, prenesli v tekoči dušik, nato pa shranili v zamrzovalniku. Potem smo jih, podobno kot ves izhodiščni rastlinski material, dali liofilizirati. Ko so bile glive čisto suhe, smo jih v terilnici strli s pomočjo tekočega dušika ter dobljen prah spravili v posodicah z žličko do FTIR analize.

3.7 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Malondialdehid (MDA) je sekundarni produkt oksidacije večkrat nasičenih maščobnih kislin in je uporaben indikator lipidne peroksidacije. MDA nastaja preko avtooksidacije in encimske razgradnje večkrat nasičenih maščobnih kislin, ki gradijo membrane celic. MDA nastane neposredno po kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov. MDA lahko reagira z dvema molekulama tiobarbaturne kisline (TBA) v rožnato rdeč produkt, katerega absorpcijo lahko izmerimo pri valovni dolžini 532 nm. Spektrofotometrično določanje TBA-MDA kompleksa omogoča hitro in enostavno oceno lipidne peroksidacije celice (Hodges in sod., 1999).

Epici z 80 mg micelija smo nato dodali 2 ml 80-odstotnega etanola ter epico vorteksirali. Nato smo epice centrifugirali 10 minut pri 3000 RCF (*angl. relative centrifugal force* oz. relativna centrifugalna sila). V tem času se je pelet (trdni ostanki glivne biomase) lepo ločil od supernatanta (tekočina brez vidnih delcev), tako da smo lahko prenesli dvakrat po 800 μl supernatanta v dve novi epici. Eni izmed epic istega vzorca smo zatem dodali 800 μl raztopine – TBA, drugi pa 800 μl raztopine + TBA. Vse epice smo dobro prevorteksirali, jih s pomočjo ostre kovinske konice in gorilnika trikrat preluknjali ter segrevali 25 minut v pečici (Heraeus instruments) na 95°C . Ko so se vzorci ohladili, smo jih ponovno centrifugirali 10 minut pri 3000 RCF. Vzorcem smo nato pomerili absorpcijo na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800) pri valovnih dolžinah 440, 532 in 600 nanometrov.

Nato smo iz izmerjenih absorpcij, volumna in mase vzorca s pomočjo Formul 1–3 izračunali količino MDA ekvivalenta (Hodges in sod., 1999).

Sestava raztopine –TBA:

- 20 % (w/v) trikloroocenta kislina (VWR Prolabo Chemicals)
- 0,01 % (w/v) butil hidroksitoluen (Sigma Aldrich, ZDA)

Sestava raztopine + TBA:

- 20 % (w/v) trikloroocenta kislina (VWR Prolabo Chemicals)
- 0,01 % (w/v) butil hidroksitoluen (Sigma Aldrich, ZDA)
- 0,65 % (w/v) tiobarbaturna kislina (Merck, Nemčija)

$$A = (Abs_{532+TBA} - Abs_{600+TBA}) \quad \dots (1)$$

$$B = (Abs_{440+TBA} - Abs_{600+TBA}) * 0,0571 \quad \dots (2)$$

$$MDA \text{ ekvivalent } \left[\frac{nmol}{g} \right] = \frac{(A-B)}{157000} * 10^6 * V_{vzorca} / suha \text{ masa}_{vzorca} \quad \dots (3)$$

3.8 FTIR

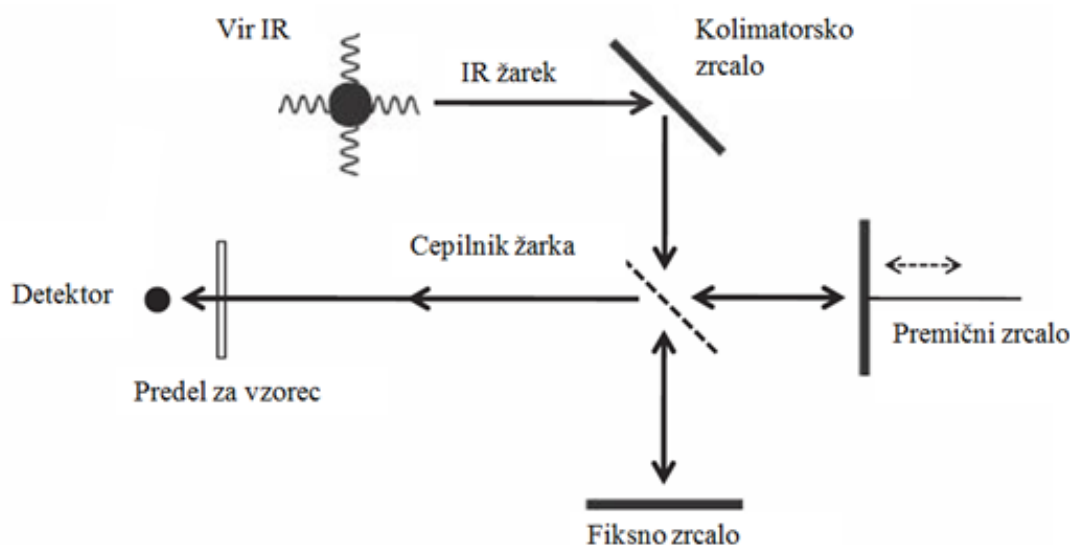
3.8.1 Splošne informacije o FTIR

Analiza infrardečega spektra nam lahko pove, katere molekule so prisotne v vzorcu in v kakšni koncentraciji. Poznamo več infrardečih spektrometrov, najbolj pogosto uporabljen pa je FTIR. FTIR (infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo) je fizikalno-kemijska neinvazivna metoda, ki meri absorpcijo infrardečega sevanja kemijskih vezi funkcionalnih skupin molekul. Tako dobimo spekter, sestavljen iz absorpcijskih vrhov, ki predstavljajo določena nihanja atomov v molekulah. Frekvenčno območje absorpcije teh molekul je odvisno od strukture molekul. S FTIR lahko proučujemo nukleinske kisline ($1000\text{--}1250 \text{ cm}^{-1}$), proteine ($1500\text{--}1560 \text{ cm}^{-1}$, $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$), lipide ($2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$), ogljikove hidrate, da bi odkrili spremembe v celicah in tkivih (Regvar in sod., 2013; Miller in sod., 2013; Chaber in sod., 2017). Ta tehnika ima veliko prednosti, saj je zelo hitra, enostavna, za analizo je potrebna zelo majhna količina vzorca, za katerega ni potrebno, da je predhodno obdelan, pogosto je cenejša od drugih metod in poda natančne rezultate v minuti (Chaber in sod., 2017).

3.8.2 Kako deluje FTIR?

FTIR ponavadi sestavljajo vir infrardeče svetlobe, predel za vzorec, interferometer, detektor, ojačevalac in pretvornik signala. Vir infrardeče svetlobe ustvari žarek, ta potuje do optične naprave – interferometra, ki en žarek razcepi v dva žarka, ta dva opravita različne poti, pred izstopom iz interferometra pa se ponovno združita (Slika 8). Najbolj

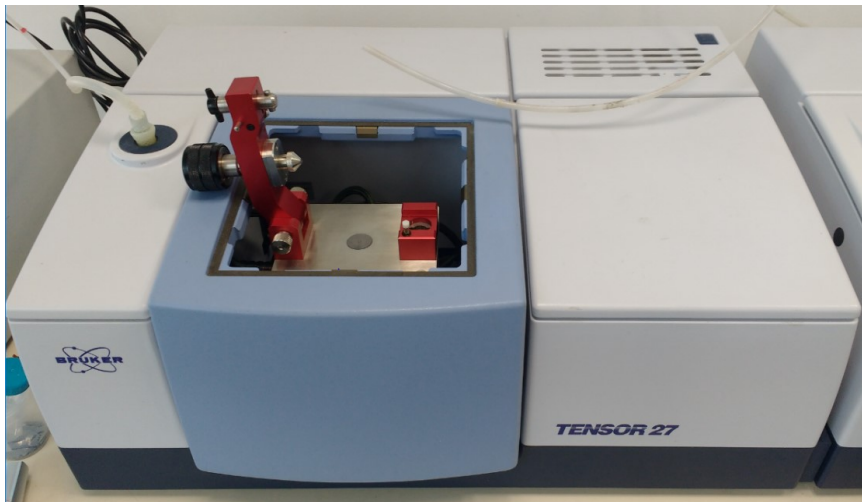
poznan je Michelsonov interferometer, ki je sestavljen iz štirih delov. Zgornji del predstavlja kolimatorsko zrcalo, ki zbere svetlobo iz vira in pripravi vzporedne žarke. Spodaj je fiksno zrcalo, na desni strani je premično zrcalo. V sredini se nahaja cepilnik, ki žarek razcepi na dva dela, del žarka prepusti, del pa ga odbije. Del žarka, ki ga cepilnik prepusti, potuje do fiksnega zrcala, odbita svetloba pa potuje do premičnega zrcala. Svetloba se nato odbije od omenjenih zrcal ter se v cepilniku ponovno združi v en žarek, ki zapusti interferometer ter gre preko vzorca do detektorja, ki zajame signal. Signal se nato okrepi in pretvori v digitalno obliko. Na koncu pa sledi še izračun infrardečega spektra ali Fourierjeva transformacija (Smith, 2011).



Slika 8: Shema delovanja FTIR naprave (prirejeno po Smith, 2011)

3.8.3 Potek naših meritev

Meritve naših vzorcev so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v Laboratoriju za strukturo biomolekul. Vse meritve so bile izvedene na FTIR spektrofotometru TENZOR 27 (Bruker) (Slika 9) s pomočjo programa Opus 6.5 (Bruker). Najprej smo pred vsakim vzorcem posneli spekter ozadja (*angl. Background single check*), nato smo na predel za vzorec, natančneje na diamantni kristal nanесли malo prahu vzorca, pokrili ter fiksirali z vijakom ter posneli še spekter vzorca (*angl. Sample single channel*). Vsak vzorec smo posneli v treh ponovitvah, s čimer smo zagotovili ponovljivost in ugotovili homogenost vzorca. Po vsaki meritvi smo predel za vzorec očistili z destilirano vodo, etanolom in posušili. Spekter ozadja smo posneli zato, da smo ga združili s spektrom vzorca in pridobili spektre, ki so odražali le lastnosti vzorca. Čas meritve vsakega vzorca je trajal eno minuto.



Slika 9: Spektrofotometer TENSOR 27 (Bruker).

3.8.4 Analiza FTIR meritev

Pomerjeni spektri naših vzorcev so bili prikazani na skali z recipročnimi centimetri (cm^{-1}). Na posameznem spektru lahko vidimo različne vrhove, vsak ponazarja nihanje določenih kemijskih vezi v molekuli, na podlagi katerih lahko določimo skupino molekul, za katero je to nihanje značilno. Na naših spektrih vzorcev gliv so bile prikazane vse skupine glavnih biomolekul v glivnih celicah (lipidi, proteini, nukleinske kisline in ogljikovi hidrati). Kljub velikim razlikam med biološkimi vzorci, pa so znana območja, ki prikazujejo glavne biološke molekule, imenovana trakovi in se nahajajo na točno določenih valovnih dolžinah. Tako lahko s pomočjo trakov razberemo informacije o vsebnosti molekul v naših vzorcih. Mi smo se pred analizami odločili, da si bomo podrobneje pogledali nihanje amidno-karbohidratnega dela molekul med 1850 cm^{-1} in 850 cm^{-1} .

3.8.5 Povprečni FTIR spektri

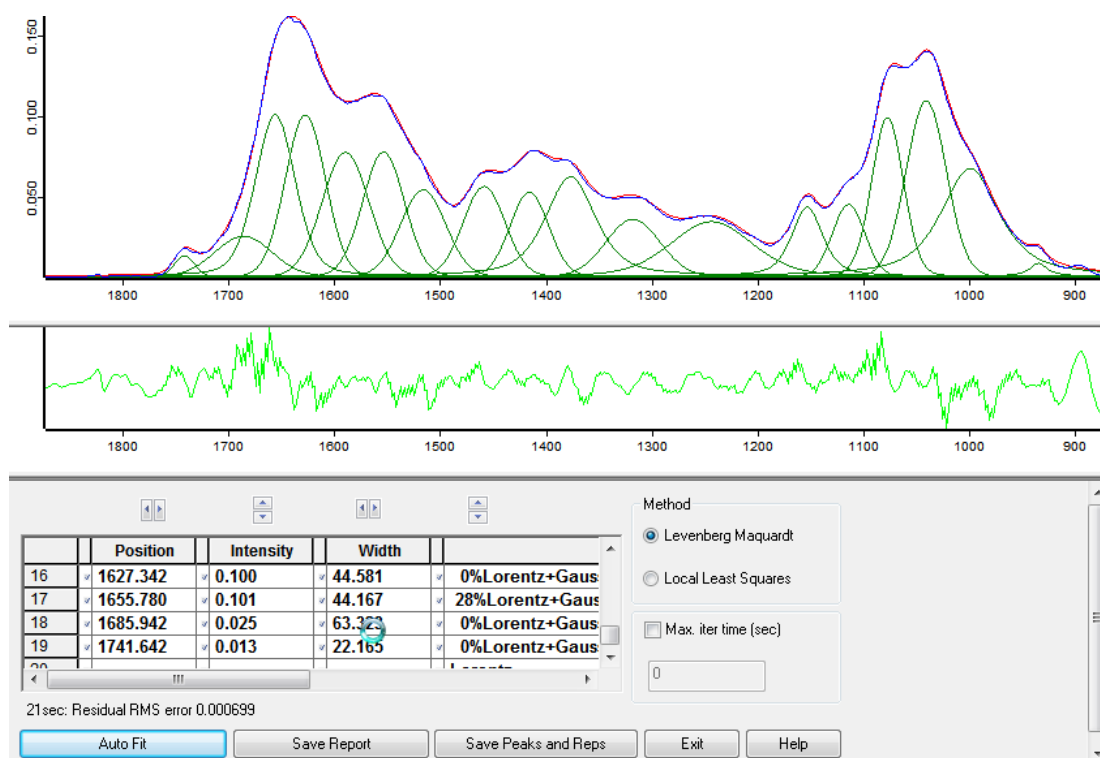
Povprečne FTIR spektre smo pripravili tako, da smo v program Opus 7.0 (Bruker) vnesli vse tri ponovitve istega vzorca. Nato smo spektre prilagodili območju med 1850 cm^{-1} in 850 cm^{-1} . Sledila je izvedba ATR normalizacije (*angl. extended ATR correction*) na izbranem območju, da smo se znebili morebitnega ozadja vzorcev in izboljšali primerljivost samih spektrov. Nato smo spektre še vektorsko normalizirali (*angl. vector normalization*), da so imeli vsi vzorci vsoto pod vrhovi enako 1. Dobljene spektre smo nato izpovprečili (*angl. average*), tako smo dobili po en spekter za vsak izhodiščni vzorec. Spektre smo shranili v obliki datoteke (.dat), da smo jo lahko odprli v Excelu in narisali povprečne FTIR spektre, ki se nahajajo pod točko 4.5 pri rezultatih.

3.8.6 Diferenčni povprečni FTIR spektri

Po pripravi povprečnih FTIR spektrov smo pripravili še diferenčne spektre, ki pokažejo razlike med povprečnim spektrom kontrole (v našem primeru glive, ki je rastla na kontrolnem gojišču samo z izbranim topilom, brez učinkovine) in povprečnim spektrom posameznega vzorca (glive, ki so rastle na gojišču s konopljinim ekstraktom, pridobljenim s kontrolnim topilom). V program Opus 7.0 (Bruker) smo nato vnesli povprečni spekter kontrole in povprečne spektre gliv, ki so rastle na konopljinih ekstraktih, pridobljenih z izbranim topilom. Od vsakega povprečnega spektra vzorca smo odšteli povprečni spekter kontrole. Tudi kontrolo smo odšteli od nje same, da smo nato lažje primerjali vzorce s kontrolo. Pridobljeni spekter smo ponovno shranili v obliki datoteke (.dat), da smo jo lahko odprli v Excelu in narisali diferenčne spektre. Na istem grafu smo prikazali diferenčne spektre kontrol in vzorcev iste glive, ki je rastla na gojiščih s konopljinim ekstraktom. Tudi ti grafi se nahajajo med rezultati pod točko 4.5.

3.8.7 Diskriminantna analiza

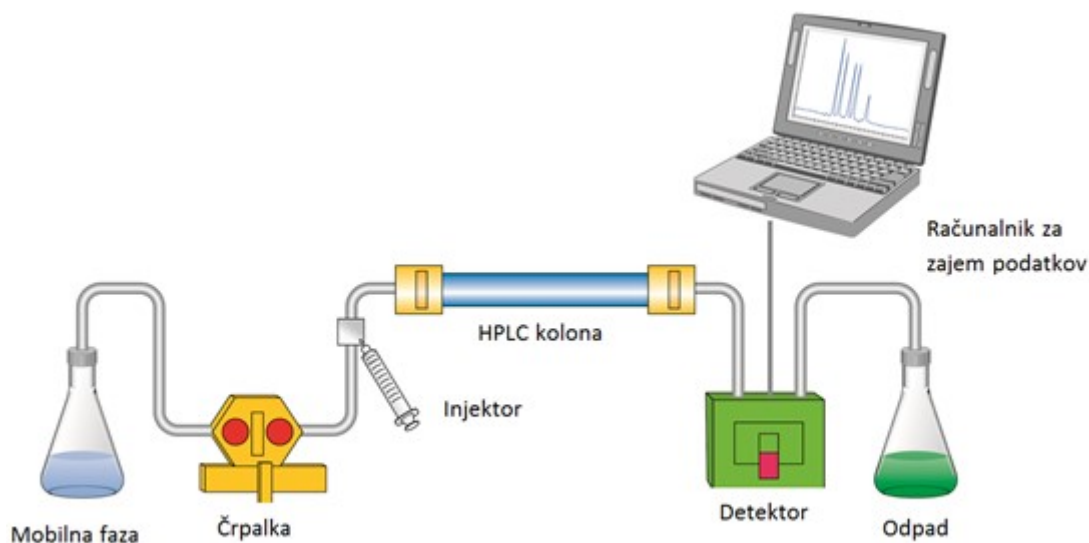
S pomočjo diskriminante analize smo želeli poiskati posamezne podobnosti in razlike med vzorci. Posamezne spektre gliv smo analizirali tako, da smo prilagodili krivulje v programu Opus 7.0, pri čemer smo pri posameznih vrhovih uporabili kombinacijo Lorenzove in Gaussove krivulje (Slika 10). Na podlagi povprečnega spektra smo naredili model, s katerim smo analizirali vse pomerjene spektre. Glavni absorpcijski trakovi modela so označeni s črkami v tabeli pri rezultatih. V diskriminanto analizo smo vključili tudi površine gliv, ki so jih le te prerastle pri določenih obravnavanjih. Diskriminantno analizo smo naredili v programu Excel, nadgrajenim z orodjem XLSTAT (<https://www.xlstat.com/>). Rezultate diskriminantne analize smo prikazali v obliki tabele in grafikona korelacijskih spremenljivk v ravnini dveh diskriminantnih spremenljivk. S tem smo videli, katere spremenljivke največ prispevajo k ločitvi posameznih skupin – v našem primeru različnih koncentracij ekstraktov listov in vršičkov.



Slika 10: Prilagoditev povprečnega FTIR spektra s programom OPUS (7.0), Bruker.

3.9 ANALIZA EKSTRAKTOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO (HPLC)

Kromatografija je tehnika, ki se uporablja za ločevanje posameznih snovi v vzorcu na podlagi molekularne strukture in molekulske sestave. Ta tehnika vključuje stacionarno fazo v koloni in mobilno fazo, ki teče skozi stacionarno fazo in s seboj nosi komponente vzorca. Komponente, ki so v močnejši interakciji oz. imajo večjo afiniteto do stacionarne faze, se bodo premikale počasneje kot komponente s šibkejšo interakcijo oz. nižjo afiniteto. Ta razlika povzroči ločevanje posameznih snovi znotraj enega vzorca. HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija) je izboljšana verzija kolonske kromatografije in se uporablja za ločevanje, identifikacijo ter kvantifikacijo sestavin znotraj vzorca. Pri HPLC mobilno fazo skozi kolono poganja do 400 barov visok tlak (Thammana, 2016). HPLC sistem je ponavadi sestavljen iz injektorja, mobilne faze, črpalke, kromatografske kolone, detektorja in računalnika (Slika 11).



Slika 11: Shema HPLC sistema (prirejeno po Töppner in sod., 2014).

Analize naših ekstraktov so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo pod vodstvom prof. dr. Sama Krefta. Vsi vzorci so bili pred analizo na HPLC sistemu prefiltrirani skozi 0,22 μ l najlonski filter. Oljni vzorci so bili zaradi problematičnega filtriranja predhodno segreti na okrog 60 °C.

Uporabljeni HPLC sistem (Shimadzu Prominence) je bil sestavljen iz systemskega krmilnika (CBM-20A), grelne kolone (CPO-20AC), črpalke z razplinjevalcem (DGU-20A5), ohlajenega avtomatskega vzorčevalnika z detektorjem (SPD-M20A), ki zaznava valovne dolžine med 190 in 800 nm. Odzivi detektorja so bili merjeni s programsko opremo LC Solution software, verzija 1.24 SP1. Sama reverzno fazna kromatografija je bila izvedena pri 40 °C in pretoku 2 ml/min. Uporabljena je bila C18 kolona (dimenzije: 10 cm x 5 mm z velikostjo delcev 3 μ m). Izvedena je bila gradientna metoda z uporabo vode (topilo A) in acetonitrila (topilo B), oba pa sta vsebovala 0,1 % trifluoroocetne kisline. Kromatogrami kažejo elucijske vrhove, detektirane pri 254 nm.

3.10 GENETSKA TIPIZACIJA GLIV

3.10.1 Izolacija DNK

Glive iz rodov *Botrytis* in *Fusarium* so bile izolirane iz semen ajde in molekularno okarakterizirane na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo (Kovačec). Glivo *Verticilium* smo dobili od prof. Jerneja Jakšeta s Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Oddelek za agronomijo. Le ta še ni bila molekularno okarakterizirana, zato smo karakterizacijo izvedli mi.

Glivno DNK (deoksiribonukleinska kislina, *angl. deoxyribonucleic acid*) smo pripravili za sekvenciranje. Prvi korak do tega je bila izolacija glivne DNK. Izolacija DNK je proces osamitve DNK iz vzorca s pomočjo fizikalnih in kemijskih metod. Glivno DNK smo izolirali s pomočjo kita GenEluteTM Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma).

Najprej smo pripravili vzorce dveh gliv, tako kot smo pripravili micelij za test lipidne peroksidacije, le da smo tu v epico zatehtali 100 mg glivnega micelija. Nato smo dodali 350 µl raztopine za lizo A in 50 µl raztopine za lizo B. Dobljeno mešanico smo večkrat premešali z obračanjem epice in vorteksiranjem ter nato inkubirali 10 minut pri 65 °C in vmes občasno obračali epico, da smo raztopili oborino. Po inkubaciji smo v epico dodali 130 µl raztopine za obarjanje, premešali raztopino z obračanjem ter inkubirali vzorec 5 minut na ledu. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 16000 RCF, da so se oborjeni celični ostanki, proteini in polisaharidi nabrali na dnu epice. Supernatant smo nato prenesli na GenElute filtracijsko kolono in eno minuto centrifugirali pri 16000 RCF. Kolono s preostalimi celičnimi ostanki smo zavrgli, v zbiralno epico s tekočino pa dodali 700 µl raztopine za vezavo ter premešali. Nato smo pripravili GeneElute vezavno kolono, tako da smo nanjo dodali 500 µl raztopine, ki bo povečala vezavo DNK na kolono, in jo eno minuto centrifugirali pri 12000 RCF. Na kolono smo nato nanesli 700 µl mešanice vzorca iz koraka pred pripravo kolone in eno minuto centrifugirali pri 16000 RCF. Tekočino, ki se je nabrala v zbiralni epici, smo zavrgli in na kolono nanesli preostanek mešanice našega vzorca, ponovili centrifugiranje in kolono prestavili na novo 2-mililitrsko zbiralno epico. Na kolono smo nato dodali 500 µl raztopine za spiranje, centrifugirali eno minuto pri 16000 RCF, odlili tekočino iz zbiralne epice in na kolono še enkrat nanesli 500 µl raztopine za spiranje. Sledilo je 3-minutno centrifugiranje pri 16000 RCF in nato prenos vezavne kolone na novo 2-mililitrsko zbiralno epico. Na kolono smo nato nanesli 100 µl prej segrete raztopine za elucijo s temperaturo 65 °C ter centrifugirali kolono z epico eno minuto pri 16000 RCF. Zadnji korak z elucijo smo še enkrat ponovili. Na koncu smo zavrgli kolono ter na -20 °C shranili čisto genomsko DNK, ki se je nahajala v zbiralni epici.

3.10.2 PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR – *angl. polymerase chain reaction*) je preprosta, elegantna metoda, ki omogoča pomnožitev točno določenega fragmenta iz celotne DNK posameznega organizma. PCR lahko izvedemo, če imamo na voljo izvorno DNK iz tkiv, organizmov, krvi, kože, las, slin in mikrobov. PCR je zelo občutljiva metoda, saj za pomnožitev DNK fragmenta potrebujemo zelo nizke koncentracije DNK molekule, s samo metodo pa pridobimo dovolj velike količine DNK za analizo z ostalimi laboratorijskimi metodami. Za vsak PCR test potrebujemo matrično DNK, ki jo pomnožujemo, oligonukleotidna začetnika, nukleotide, encim DNK polimerazo, pufer, magnezijeve ione. Specifičnost pomnoževanja zagotovimo z izbiro oligonukleotidnih začetnikov, ki se

prilegajo točno določenemu odseku DNK. DNK polimeraza je ključni encim, ki povezuje posamezne nukleotide v PCR produkt (Garibyan in Avashia, 2014).

Pred pripravo PCR reakcijskih mešanic smo pripravili 100-kratne redčitve vzorcev izolirane DNK. Odločili smo se za pomnožitev glivnih regij ITS1 (notranji prepisni vmesnik ribosomske DNK, *angl. internal transcribed spacer*) in ITS2, med katerima je 5,8S rRNK gen, obdajata pa ju 18S rRNK gen in 28S rRNK gen (Martin in Rygielwicz, 2005). Ta del DNK smo nato poslali sekvenirati in tako določili glivno vrsto. PCR mešanico smo pripravili v prostoru za delo s PCR produkti v laminariju. Pripravili smo 25 µl PCR reakcijske mešanice, ki so vsebovale sledeče kemikalije v določenih koncentracijah:

- 2,5 µl 2,5 µM MgCl₂ (Thermo Scientific),
- 2,5 µl 1x PCR pufra (Thermo Scientific),
- 0,5 µl 200 µM dNTP (Thermo Scientific),
- 0,25 µl 500 µM ITS1 F začetnika (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA, Sigma),
- 0,25 µl 500 µM ITS4 začetnika (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC, Sigma),
- 0,15 µl 0,75 U DNK polimeraze,
- 6,35 µl ddH₂O (bidestilirana voda),
- 12,5 µl 100-kratne redčitve izolirane DNK.

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico za vse reakcije skupaj, tako da smo v 1,5-mililitrsko epico odpipetirali vse zgoraj navedene kemikalije, z izjemo izolirane DNK. Mešanico smo kratko prevorteksirali in centrifugirali in v 0,5-mililitrske epice odpipetirali po 12,5 µl reakcijske mešanice. V posamezno epico smo nato dodali še 12,5 µl 100-kratne redčitve izolirane DNK, vorteksirali, kratko centrifugirali in vstavili v nosilec PCR naprave (PTC-150 MiniCycler). Pri negativni kontroli smo namesto izolirane DNK dodali enak volumen bidestilirane vode. Izbrali smo program z začetnim 45-sekundnim segrevanjem pri 94 °C, kateremu je sledilo 32 ciklov, sestavljenih iz 35-sekundne denaturacije pri 93 °C, 53-sekundnega prileganja oligonukleotidnih začetnikov pri 55 °C in 0,5-minutnega podaljševanja verige pri 72 °C. Slednji korak je bil vsak cikel daljši za 5 sekund. Po zadnjem ciklu je sledilo še 5-minutno končno podaljševanje pri 72 °C. Po koncu programa smo PCR produkte shranili na –20 °C.

3.10.3 Agarozna gelska lektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza je metoda, ki se zelo pogosto uporablja za ločevanje in čiščenje proteinov, DNK in RNK molekul. DNK molekule, ki jih hočemo ločiti, damo v viskozen agarozni gel, ki ovira njihovo premikanje, in nato ustvarimo električno polje. DNK molekule so zaradi fosfatne skupine negativno nabite, tako da v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti elektrodi – anodi. Molekule se v gelu ločijo glede na

velikost, saj manjše molekule v istem času prepotujejo daljšo razdaljo kot velike molekule. Za vizualizacijo nukleinskih kislin v gelu uporabljamo fluorescentni, za DNK specifični barvili, kot sta etidijev bromid ali SYBR Green, ki ob izpostavitvi gela svetlobi s pravo valovno dolžino oddata svetlobo, ki omogoči detekcijo DNK fragmentov v gelu (Yilmaz in sod., 2012).

Pred pripravo gela smo najprej položili nosilec za gel v stojalo ter ga uravnotežili z vodno tehtnico, na koncu smo na nosilec pritrdili še glavniček za vzorce. Za pripravo 1-odstotnega agaroznega gela smo zatem zatehtali 400 mg agaroze (Sigma, Nemčija) in jo prenesli v čašo. Nato smo v čašo dolili 40 ml 0,5x TBE pufra in vse skupaj segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni vsa agaraza raztopila. Sledilo je ohlajanje tekočine do približno 60 °C. V čašo z raztopljeno agarozo smo nato dodali 2 µl etidijevega bromida, premešali in vsebino zlili v nosilec za gel. Po 20 minutah, ko se je gel strdil, smo nosilec z gelom prenesli v plastično banjico za elektroforezo (Hoefe HE 33). Banjica je bila napolnjena z 0,5x TBE pufrom, tako da je bil celoten gel v pufru. PCR produkte smo zmešali z nanašalnim barvilom in 20 µl mešanice nanесли v luknjice na gelu. V prvo in zadnjo luknjico smo nanесли 2 µl markerja (Gene marker 1kb, Fermentas). Elektroforezo smo pokrili s pokrovom, priključili kabla za anodo in katodo, na viru električne napetosti (Amersham Pharmacia Biotech EPS 301) nastavili napetost 100 voltov in pritisnili tipko *run*, da je električni tok stekel. Elektroforezo smo pustili teči 20 minut ter nato pod UV lučjo pogledali gel.

3.10.4 Čiščenje PCR fragmentov iz gela

Po PCR reakciji smo PCR produkte ločili z elektroforezo na agaroznem gelu. Da bi zagotovili primerno čistost PCR produktov, jih je bilo treba po izrezovanju iz gela očistiti ostankov gelov in preostalih kemikalij, ki bi motile določanje nukleotidnega zaporedja. Za čiščenje produktov smo uporabili GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Najprej smo pod UV lučjo s pomočjo skalpela izrezali edini DNK fragment, ki je bil viden na gelu in je bil velik okrog 530–540 bp (baznih parov). DNK fragment v gelu smo prenesli v 1,5-mililitrsko stehtano epico in jo skupaj z dodanim fragmentom v gelu ponovno stehtali. V epico smo za vsakih 100 mg gela dodali 100 µl vezavnega pufra. Mešanico smo nato 10 minut inkubirali na 55 °C, občasno premešali z obračanjem epice, da se je ves gel popolnoma raztopil. Če je bila raztopina rumene barve, je imela pravi pH za vezavo DNK na kolono, če pa je bila raztopina oranžna ali vijolična, smo v epico dodali 10 µl 3-molarnega natrijevega acetata (pH 5,2) in raztopino dobro premešali, da se je obarvala rumeno. Nato smo prenesli 800 µl rumene raztopine na GeneJET čistilno kolono. Kolono smo nato centrifugirali 1 minuto pri 13000 RCF, odlili tekočino iz zbiralne epice in vanjo postavili kolono. Na kolono smo nanесли 100 µl vezavnega pufra in ponovili

centrifugiranje ter odlivanje tekočine iz prejšnjega koraka. Na kolono smo nato nanesti še 700 µl pufru za spiranje, ponovno centrifugirali kot prej in spraznili zbiralno epico. Sledilo je enako centrifugiranje, da smo se poponoma znebili etanola iz pufru za spiranje. Kolono smo nato prenesli na novo 1,5-mililitrsko epico in nanjo nanesti 50 µl elucijskega pufru ter spet centrifugirali 1 minuto pri 13000 RCF. Kolono smo nato zavrgli in shranili našo prečiščeno DNK na -20°C .

Da bi se prepričali, ali smo uspešno očistili DNK fragmente, smo ponovno pripravili elektroforezni gel, kot je opisano zgoraj. Celoten postopek je bil enak, le da smo tukaj na gel nanesti le 5 µl očiščenega produkta. Sami pogoji elektroforeze so bili prav tako enaki in na koncu smo se pod UV lučjo prepričali, ali še imamo DNK fragmente, ki jim želimo določiti nukleotidno zaporedje.

3.10.5 Priprava vzorcev za določanje nukleotidnega zaporedja

Pred pripravo vzorcev za sekveniranje smo pri podjetju GATC Biotech naročili LIGHTRUN tube črtne kode, s katerimi smo označili naše vzorce pred pošiljanjem. V dve 1,5-mililitrski epici smo nato dodali po 5 µl našega očiščenega PCR produkta in v epico dodali 5 µl, 5 µM ITS1 F oligonukleotidnega začetnika, v drugo pa 5 µl, 5 µM ITS4 oligonukleotidnega začetnika. Na vsako epico smo nato nalepili svojo črtno kodo, kopijo črtne kode pa smo si shranili v laboratorijski dnevnik ob oznako vzorca, za pomoč pri nadaljnji identifikaciji gliv. Vse označene epice z vzorci smo nato v vrečki poslali podjetju GATC BIOTECH, ki je določilo nukleotidno zaporedje vzorcev.

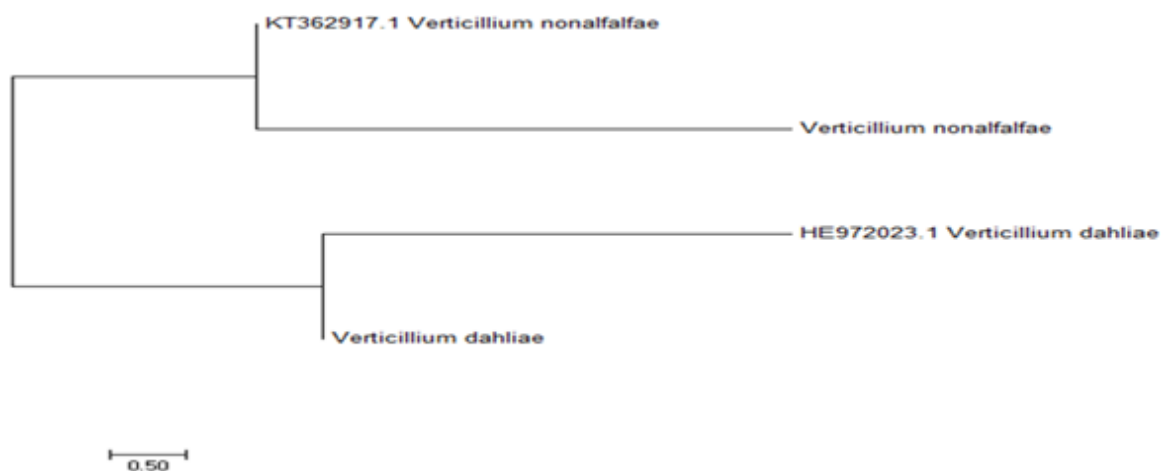
3.10.6 Obdelava zaporedij

Ko smo dobili določena zaporedja PCR fragmentov, smo s pomočjo orodja BLASTn naredili poravnavo dveh zaporedij istega fragmenta, kateremu smo v eno epico dodali ITS1 F, drugemu pa ITS4 oligonukleotidni začetnik, tako da je bil fragment posekveniran z obeh strani. Kumulativno sekvenco novega zaporedja smo nato vnesli v BLASTn, kjer smo ga primerjali z bazo vseh znanih sekvenc. Na podlagi ujemanja s sekvencami v bazi smo dobili podatke o identičnosti našega fragmenta z zaporedji v bazi. Tako smo lahko na podlagi identičnosti, dolžin ujemanja zaporedja z zaporedji v bazi in najvišjega rezultata (*S-angl. score*) določili, s katerimi glivami razpolagamo in narisali filogenetsko drevo (z metodo največjega verjetja, *angl. Maximum likelihood method*) naših dveh izolatov z njunima najbolj podobnima izolatoma v bazi. Ko smo imeli znane sekvence vseh naših gliv, smo z metodo največjega verjetja narisali še eno filogenetsko drevo s programsko opremo MEGA 7.

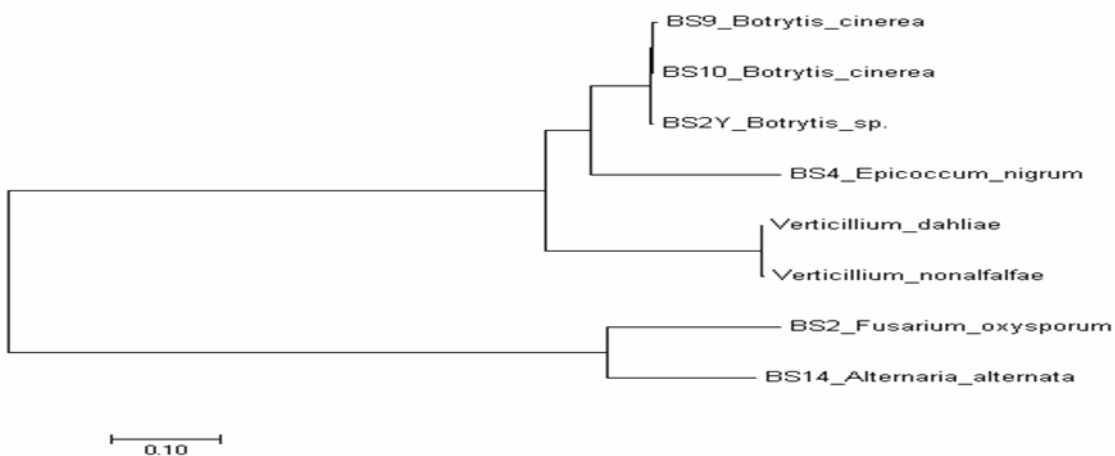
4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA GLIV

Pred začetkom eksperimentalnega dela magistrske naloge smo že imeli podatke o 6 izolatih gliv, ki smo jih uporabili (glej Metode), podatka o izolatih in vrsti dveh gliv *Verticillium* pa sta nam manjkala. Tako smo v magistrskem delu na podlagi dobljene sekvence omenjenih gliv ugotovili, da razpolagamo z glivama *Verticillium dahliae*, ki je najbolj podobna izolat (HE972023, GenBank), in *Verticillium nonalfalfae*, ki je najbolj podobna izolat (KT362917, GenBank) (Slika 12). Na podlagi vseh znanih sekvenc gliv, ki smo jih uporabili v poskusih, smo nato izrisali še filogenetsko drevo, ki prikazuje vseh 8 gliv (Slika 13).



Slika 12: Filogenetsko drevo gliv *Verticillium nonalfalfae* in *Verticillium dahliae* in njima najbolj podobna seva v GenBank podatkovni bazi.

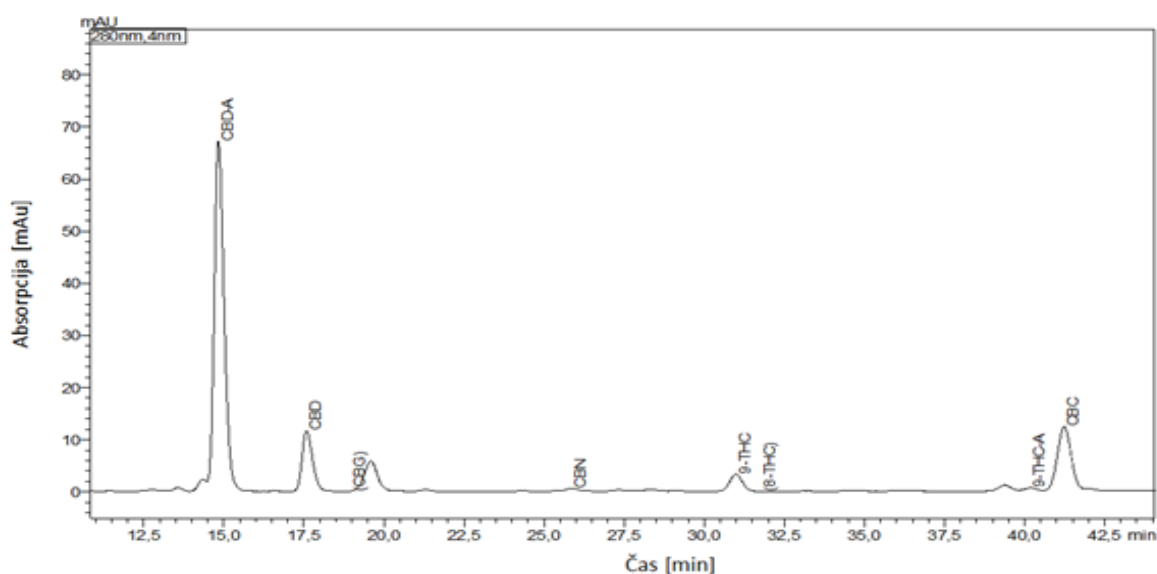


Slika 13: Filogenetsko drevo vseh 8 gliv, ki smo jih uporabili v poskusih.

4.2 ANALIZA EKSTRAKTOV

S pomočjo HPLC metode smo izmerili količino kanabinoidov v ekstraktih. V nobenem analiziranem ekstraktu nismo zaznali kanabigerola (CBG), kanabinola (CBN) in Δ 8-tetrahidrokanabinola (Δ 8-THC).

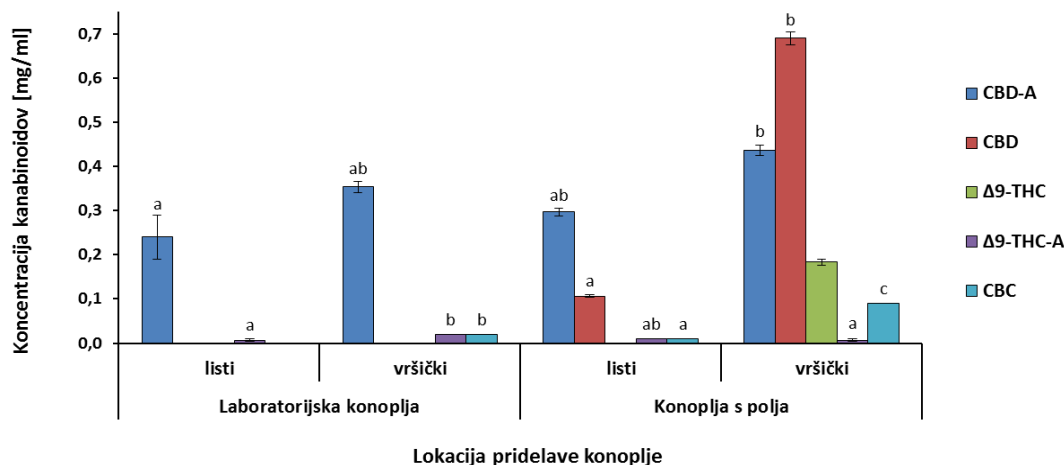
Slika 14 prikazuje tipično predstavitev rezultatov kromatografije v obliki diagrama (kromatograma) etanolnega ekstrakta vršičkov. V zaporedju si sledijo kanabidiolna kislina, kanabidiol, kanabigerol, kanabinol, Δ 9-tetrahidrokanabinol, Δ 8-tetrahidrokanabinol, Δ 9-tetrahidrokanabinolna kislina in kanabikromen. Iz kromatograma vidimo, da je bila v vzorcu izmerjena najvišja koncentracija kanabidiolne kisline.



Slika 14: Kromatogram vzorca, odvzetega iz etanolnega ekstrakta vršičkov.

4.2.1 Koncentracije kanabinoidov v laboratorijski konoplji in konoplji s polja

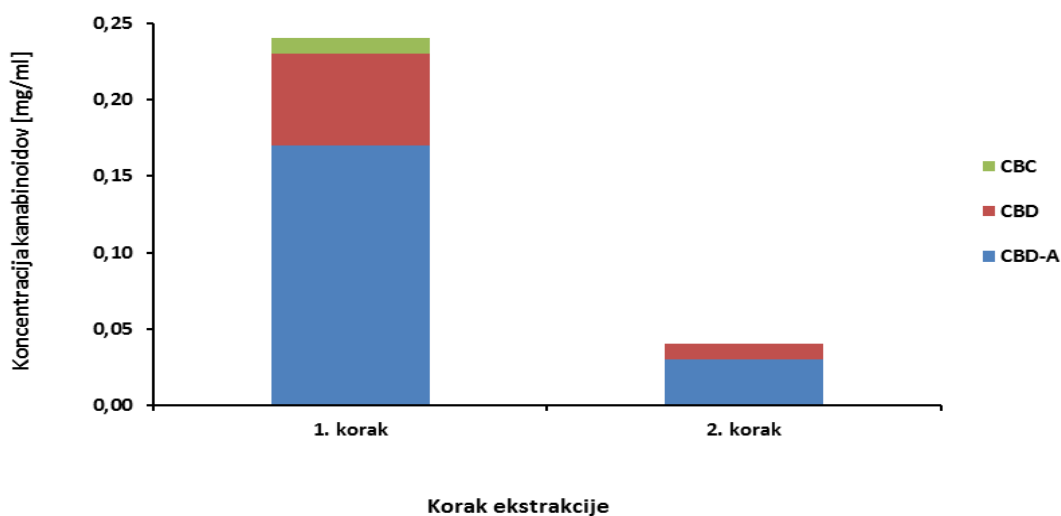
Pri primerjavi koncentracije kanabinoidov v etanolnih ekstraktih iz konoplje, pridelane v laboratoriju, in konoplje s polja (Slika 15) smo ugotovili, da je konoplja s polja vsebovala večje koncentracije kanabinoidov: CBD-A, CBD, Δ 9-THC in CBC. Edini kanabinoid, ki ga je bilo količinsko več v laboratorijski konoplji, pa je bil Δ 9-THC-A. Največ CBD-A so vsebovali vršički konoplje s polja, tu je bila izmerjena tudi statistično značilna največja koncentracija CBD-ja, ki ga v ekstraktih konoplje, vzgojene v laboratoriju, nismo detektirali. Samo ekstrakt iz vršičkov konoplje s polja je vseboval Δ 9-THC, v tem ekstraktu pa je bila izmerjena tudi statistično značilna največja koncentracija CBC-ja. Pri obeh načinih pridelave konoplje smo izmerili večje koncentracije kanabinoidov v vršičkih kot pa v listih. Na podlagi teh rezultatov smo se tudi odločili, da smo v vseh nadaljnjih poskusih uporabili liste in vršičke navadne konoplje, ki je rastla na polju.



Slika 15: Koncentracije kanabinoidov v etanolnih ekstraktih navadne konoplje, pridelane v laboratoriju in na polju. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.2.2 Preverjanje učinkovitosti prvega in drugega koraka ekstrakcije

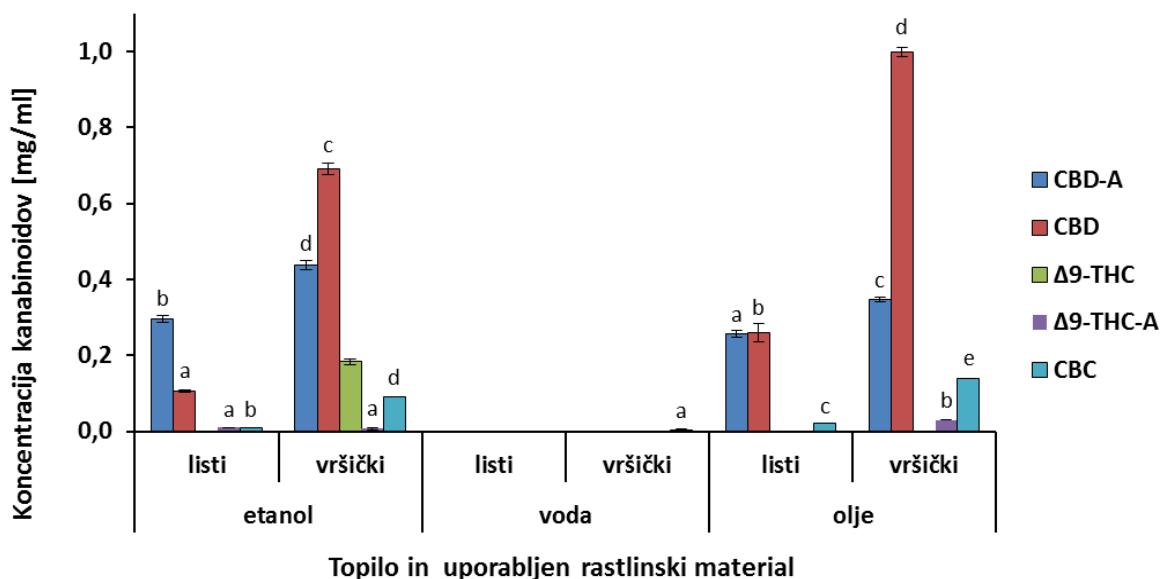
Rezultati etanolne ekstrakcije iz listov kažejo, da se večji del kanabinoidov ekstrahira iz rastlinskega materiala že v prvem koraku ekstrakcije, saj smo z njim pridobili veliko večje koncentracije kanabidolov (CBD in CBD-A) in kanabikromena (CBC). Koncentracija CBD-A je v frakciji po prvem koraku znašala 0,170 mg/ml, v drugi frakciji le 0,030 mg/ml (Slika 16). Podobno je bilo tudi s CBD, katerega smo v prvem koraku izmerili v koncentraciji 0,060 mg/ml, v drugem le 0,030 mg/ml, CBC pa smo zaznali le po prvem koraku (0,010 mg/ml), v drugem pa ne.



Slika 16: Primerjava koncentracij kanabinoidov v frakciji po prvem koraku ekstrakcije in po drugem koraku ekstrakcije.

4.2.3 Vpliv topila na koncentracijo kanabinoidov v ekstraktu

Na podlagi primerjave koncentracij kanabinoidov v vseh pripravljenih ekstraktih (Slika 17) vidimo, da nam z vodnimi ekstrakti ni uspelo izolirati nobenega kanabinoida, z izjemo zelo nizke koncentracije CBC-ja v ekstraktu iz vršičkov. Pri ekstrakciji z etanolom in oljem je bila koncentracija kanabinoidov dosti večja v ekstraktih iz vršičkov kot pa v listnih ekstraktih. Razlike v koncentraciji kanabidiolne kisline med oljnimi in etanolnimi ekstrakti so statistično značilne, največ je bilo v etanolnem ekstraktu iz vršičkov (0,44 mg/ml), najmanj pa v oljnem ekstraktu iz listov. Tudi v koncentraciji kanabidiola so statistično značilne razlike, le da je bilo slednjega največ v oljnem ekstraktu iz vršičkov navadne konoplje (1 mg/ml), najmanj pa v etanolnem ekstraktu iz listov. Etanolni ekstrakt iz vršičkov je edini vseboval Δ^9 -THC (0,18 mg/ml). V oljnem ekstraktu iz vršičkov pa sta bili izmerjeni tudi najvišja koncentracija Δ^9 -tetrahidrokanabinolne kisline (0,03 mg/ml) in kanabikromena (0,14 mg/ml), v koncentraciji katerega so statistično značilne razlike in je bil tudi kot edini kanabinoid detektiran v vodnem ekstraktu iz vršičkov navadne konoplje (0,003 mg/ml).

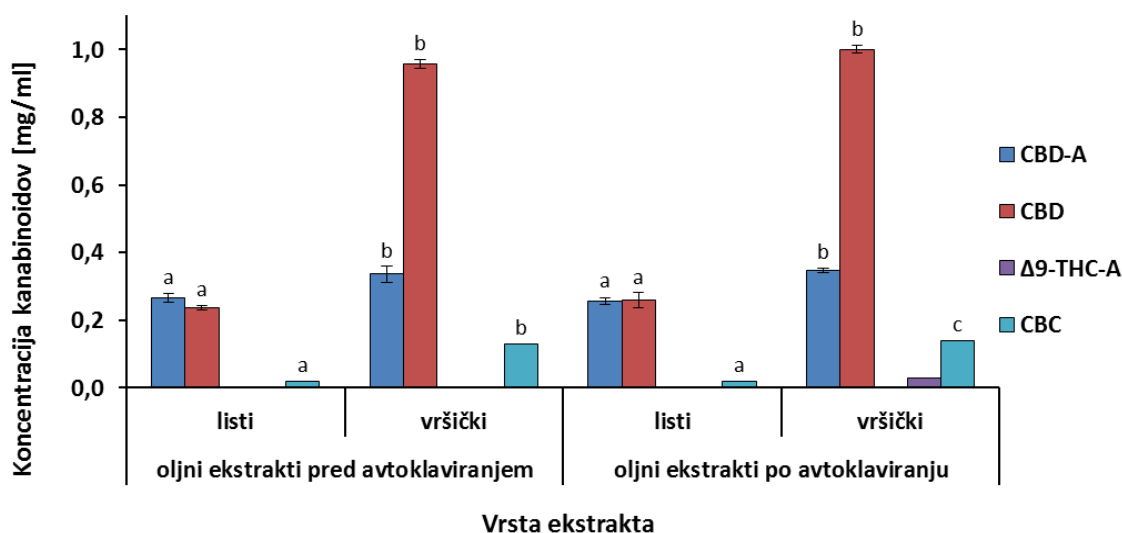


Slika 17: Primerjava koncentracij izoliranih kanabinoidov v vseh pripravljenih ekstraktih. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.2.4 Vpliv avtoklaviranja na koncentracijo kanabinoidov

Pri pregledu rezultatov koncentracij kanabinoidov v oljnih ekstraktih pred in po avtoklaviranju (Slika 18) ugotovimo, da je pri avtoklaviranju prišlo do dveh sprememb pri koncentracijah kanabinoidov. Vrednosti koncentracij CBD-A in CBD-ja pred avtoklaviranjem se statistično ne razlikujejo od koncentracij omenjenih kanabinoidov po

avtoklaviranju. Do statistično značilnih sprememb pa je prišlo pri koncentraciji CBC-ja v oljnem ekstraktu iz vršičkov navadne konoplje, saj je bila po avtoklaviranju izmerjena večja koncentracija kanabikromena kot pred avtoklaviranjem. Tudi do druge spremembe je prišlo v istem ekstraktu, saj je bil po avtoklaviranju izmerjen $\Delta 9$ -THC-A v koncentraciji 0,030 mg/ml, pred avtoklaviranjem pa tega kanabinoida v ekstraktu nismo zaznali.

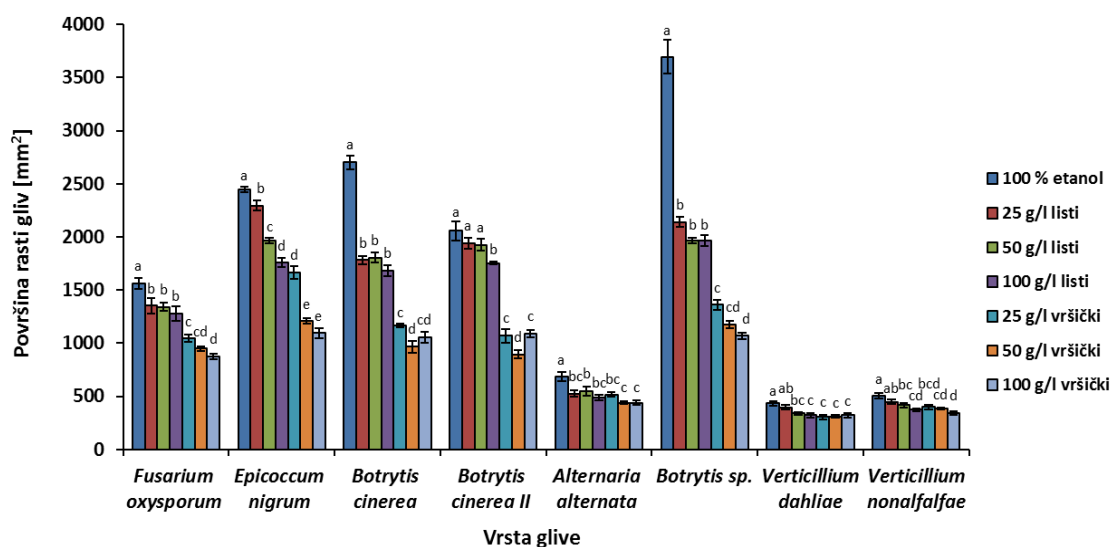


Slika 18: Koncentracija kanabinoidov v oljnih ekstraktih pred in po avtoklaviranju. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.3 RAST GLIV

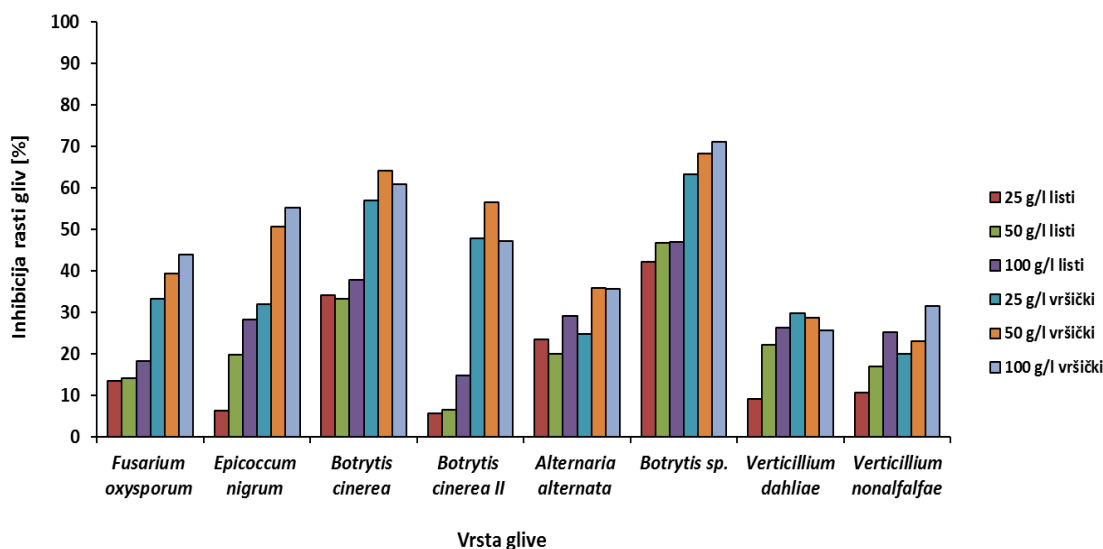
4.3.1 Rast gliv na etanolnih ekstraktih

Rezultati rasti gliv na etanolnih ekstraktih (Slika 19) kažejo, da različne glive različno hitro rastejo, na njihovo rast pa ima velik vpliv tudi vrsta ekstrakta. Med kontrolami je bila največja izmerjena površina zabeležena pri glivi *Botrytis* sp., saj je bila povprečna površina glive skoraj 3700 mm². Prav pri omenjeni glivi vidimo, da so ekstrakti najbolj zavirali njeno rast, saj se je njena površina pri koncentraciji vršičkovega ekstrakta 100 g/l zmanjšala na slabih 1070 mm², razlike površin so tudi statistično značilne. Vršičkov ekstrakt s koncentracijo 100 g/l je statistično značilno najbolj zaviral rast tudi pri glivah: *Fusarium oxysporum*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria alternata* in *Verticillium nonalfalfae*. Pri glivah *Botrytis cinerea* in *Botrytis cinerea* I pa je bila najmanjša površina izmerjena pri koncentraciji vršičkov 50 g/l, medtem ko smo najmanjšo rast pri glivi *Verticillium dahliae* zaznali pri koncentraciji vršičkov 25 g/l, pri čemer nismo opazili statistično značilnih razlik med površinami gliv pri različnih koncentracijah vršičkov.



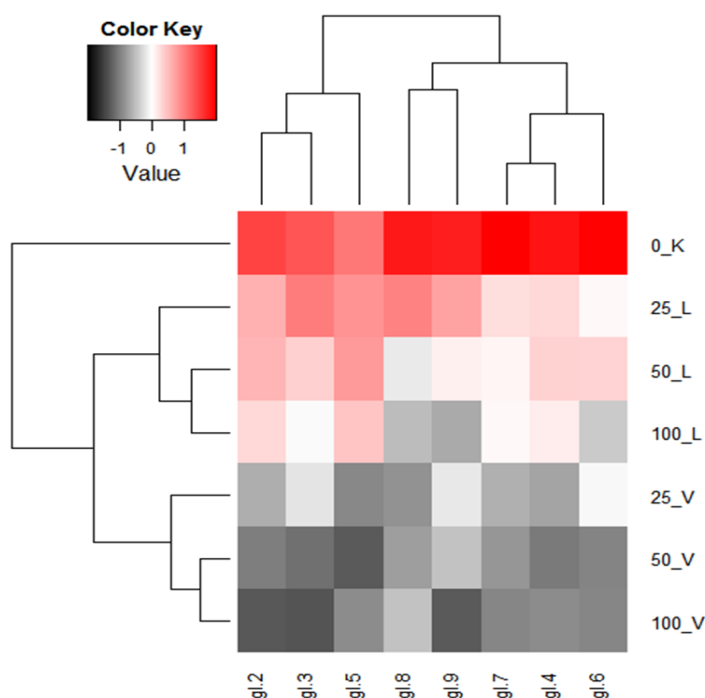
Slika 19: Površine rasti gliv na etanolnih ekstraktih pri različnih koncentracijah listov in vršičkov. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

Pri primerjavi odstotkov inhibicije rasti gliv pri različnih pogojih lahko vidimo, da je do kar 71-odstotne inhibicije rasti v primerjavi s kontrolo prišlo pri glivi *Botrytis sp.*, in sicer pri največji koncentraciji vršičkov (Slika 20). Do vsaj 40-odstotne inhibicije rasti je prišlo tudi pri glivah *Fusarium oxysporum*, *Epicoccum nigrum*, *Botrytis cinerea* in *Botrytis cinerea II*. Tudi pri ostalih glivah je prišlo do inhibicije rasti, vendar pa je bila ta manjša.



Slika 20: Odstotki inhibicije rasti gliv na gojiščih z etanolnimi ekstrakti navadne konoplje v primerjavi s kontrolo (100-odstotni etanol). Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije.

Na podlagi statistične analize, ki jo prikazuje Slika 21, smo se odločili, da nadaljnje poskuse izvajamo na treh glivah. Kot vidimo, se je 8 gliv razporedilo v 3 skupine, glede na rast na etanolnih ekstraktih listov in vršičkov navadne konoplje. Iz prve skupine smo za nadaljnje poskuse izbrali glivo *Fusarium oxysporum*, iz druge skupine smo izbrali glivo *Verticillium nonalfalfae*, iz zadnje skupine pa smo si izbrali glivo *Botrytis* sp.

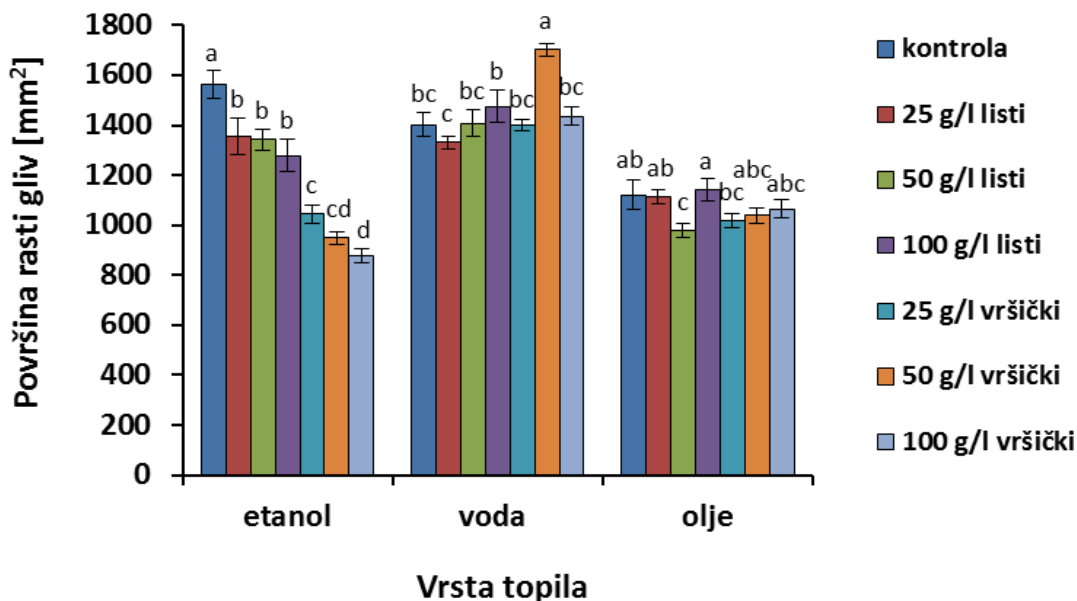


Slika 21: Statistična dvodimenzionalna analiza grozdov vpliva etanolnih ekstraktov na rast gliv (oznake gliv: gl.2=*Fusarium oxysporum*, gl.3=*Epicoccum nigrum*, gl.4=*Botrytis cinerea*, gl.5=*Botrytis cinerea* II, gl.6=*Alternaria alternata*, gl.7=*Botrytis* sp., gl.8=*Verticillium dahliae* in gl.9= *Verticillium nonalfalfae*).

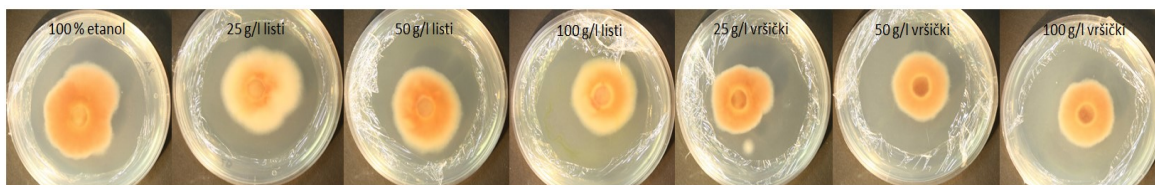
4.3.2 Rast glive *Fusarium oxysporum* na različnih vrstah ekstraktov in topil

Rezultati površinske rasti glive *Fusarium oxysporum* kažejo, da je na rast omenjene glive vplivala tudi izbira topila, s katerim smo pripravili različne vrste konopljinih ekstraktov. Povprečno je gliva prerastla največjo površino petrijevke z gojiščem na vodnih ekstraktih navadne konoplje, manjšo na etanolnih ekstraktih, najmanjšo pa na oljnih ekstraktih. Pri primerjavi rasti gliv na različnih ekstraktih istega topila ugotovimo, da so etanolni ekstrakti zelo zavirali rast, saj so med posameznimi izpostavitvami statistično značilne razlike med izpostavitvami (Slika 22). Najmanjšo površino je gliva prerastla na ekstraktu s koncentracijo vršičkov 100 g/l, največjo pa na kontroli, ki je bila samo topilo, tj. etanol (Slika 23). Vodni ekstrakti iz konoplje niso tako zavirali rasti glive *Fusarium oxysporum*, ki je najmanjšo površino prerastla na najmanjši koncentraciji listov, največjo pa na ekstraktu

iz vršičkov s koncentracijo 50 g/l. Na oljnih ekstraktih pa je gliva najmanj zrastle na listnem ekstraktu s koncentracijo 50 g/l.



Slika 22: Površine rasti glive *Fusarium oxysporum* na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

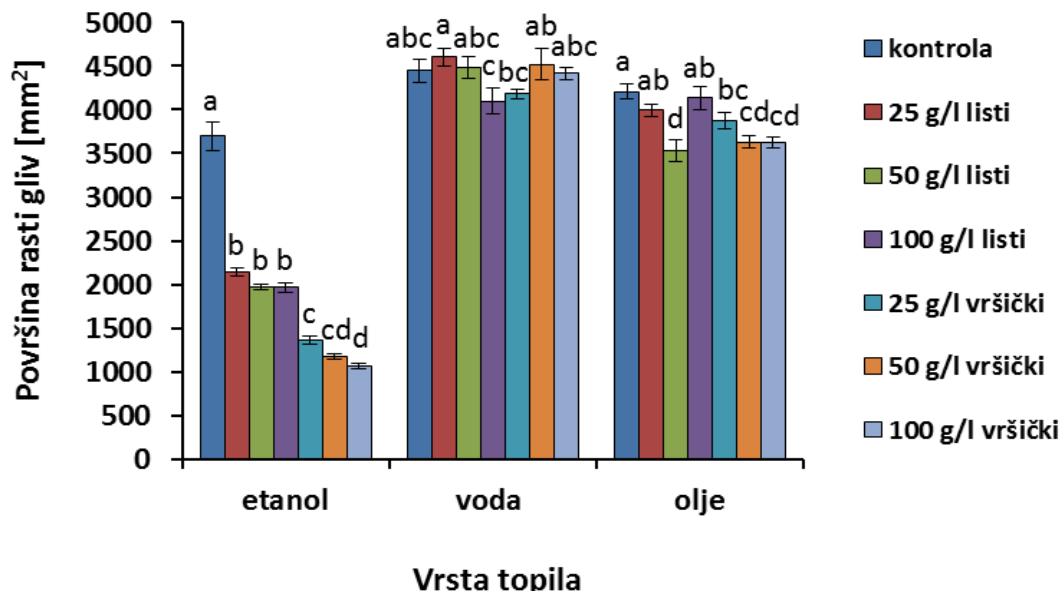


Slika 23: Rast glive *Fusarium oxysporum* na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.

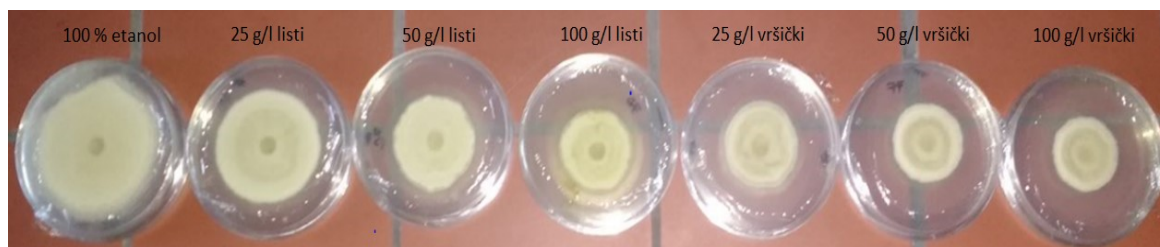
4.3.3 Rast glive *Botrytis* sp. na različnih vrstah ekstraktov in topil

Tudi pri glivi *Botrytis* sp. opazimo, da je izbira topila za pripravo ekstraktov vplivala na dinamiko njene rasti. Največje površine je gliva prerastle na gojiščih z vodnimi ekstrakti, manjše površine je dosegla na oljnih, najmanjšo površino pa je gliva prerastle na etanolnih ekstraktih navadne konoplje (Slika 24). Do velikih statistično značilnih razlik v rasti glive je prišlo znotraj različnih etanolnih ekstraktov navadne konoplje, saj je gliva najbolj rastla na kontroli, najmanjšo površino pa je prerastle na ekstraktu iz vršičkov s koncentracijo 100 g/l (Slika 25). Pri rasti glive na vodnih ekstraktih takih razlik nismo zaznali, še najmanjšo površino je gliva prerastle na listnem ekstraktu z največjo koncentracijo (100 g/l). Pri rasti glive *Botrytis* sp. na oljnih ekstraktih je prišlo do večjih razlik kot pri vodnih ekstraktih.

Gliva je prerastla največjo površino na kontroli (olje), najmanjšo pa listnem ekstraktu s koncentracijo 50 g/l.



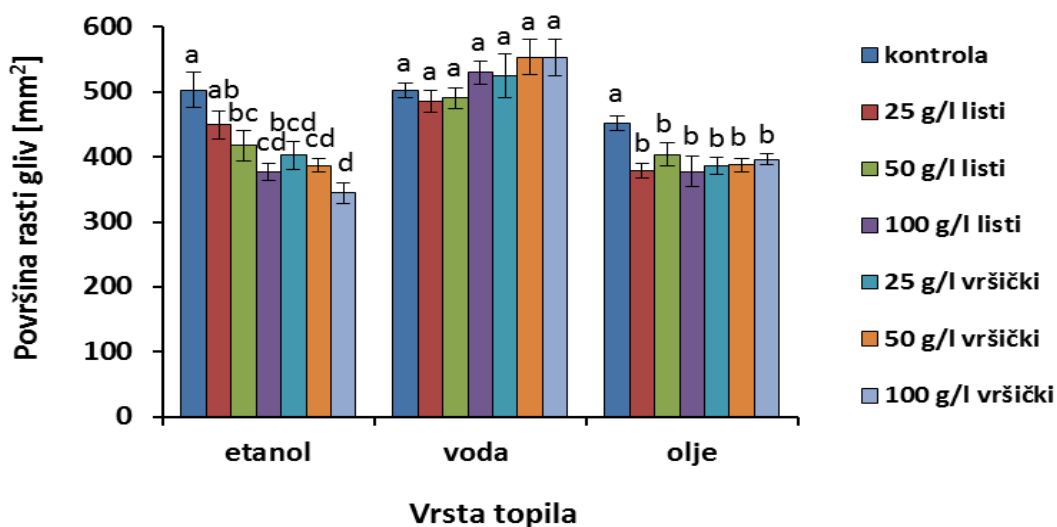
Slika 24: Površine rasti glive *Botrytis* sp. na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).



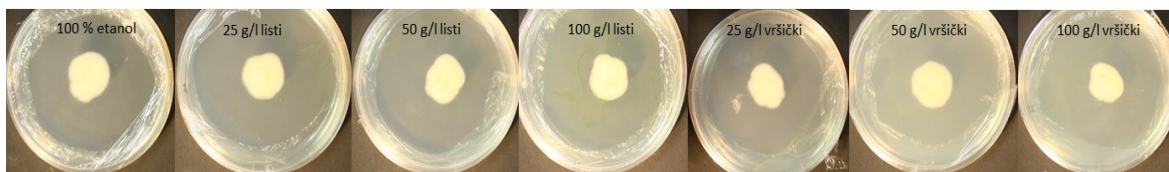
Slika 25: Rast glive *Botrytis* sp. na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.

4.3.4 Rast glive *Verticillium nonalfalfae* na različnih vrstah ekstraktov in topil

Tudi pri glivi *Verticillium nonalfalfae* vidimo, da ni le vrsta ekstrakta vplivala na rast glive, ampak tudi topilo, s katerim smo pripravili ekstrakte. Gliva je največje površine prerastla na gojiščih z vodnimi ekstrakti, manjše na etanolnih in najmanjše na gojiščih z oljnimi ekstrakti (Slika 26). Pri rasti glive na etanolnih ekstraktih vidimo velike statistično značilne razlike, največja rast je bila zabeležena na kontroli, najmanjša pa na ekstraktu s 100 g/l vršičkov (Slika 27). Med rastjo glive na različnih vodnih ekstraktih ni bilo opaženih statistično značilnih razlik, medtem ko pri rasti na oljnih ekstraktih statistično odstopa le površina gliv na gojišču s kontrolo, kjer je gliva prerastla največjo površino.



Slika 26: Površine rasti glive *Verticillium nonalfalfae* na različnih vrstah ekstraktov navadne konoplje, pripravljenih z različnimi topili. Meritve so bile izvedene po petih dneh od inokulacije. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko med rastjo gliv na različnih ekstraktih, pripravljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).



Slika 27: Rast glive *Verticillium nonalfalfae* na različnih vrstah etanolnih ekstraktov.

4.4 KORELACIJA MED POVRŠINO RASTI GLIV IN KONCENTRACIJO POSAMEZNEGA KANABINOIDA

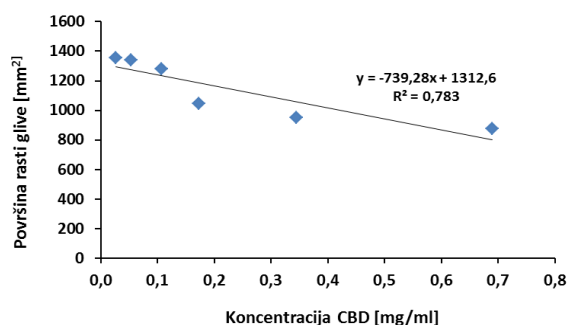
4.4.1 Etanolni ekstrakti

Da bi ugotovili, ali obstaja kakšna povezava med površino rasti gliv in koncentracijo posameznega kanabinoida, smo izračunali Pearsonove koeficiente korelacije, ki jih prikazuje Preglednica 2.

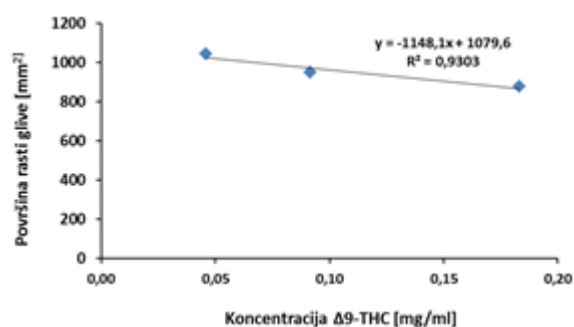
Pri glivi *Fusarium oxysporum* smo ugotovili, da obstaja negativna linearna povezava med površino rasti glive na gojišču in koncentracijo kanabidiola (Slika 28) ter Δ^9 -tetrahidrokanabinola (Slika 29), med drugimi kanabinoidi pa statistično značilnih povezav s površino nismo našli.

Preglednica 2: Pearsonovi koeficienti korelacije med površino rasti gliv in koncentracijo kanabinoidov v etanolnih ekstraktih. Zgornja vrednost predstavlja Pearsonov koeficient korelacije, spodnja pa statistično značilnost. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki kažejo na statistično značilne povezave med površino rasti glive in koncentracijo kanabinoida.

Vrsta glive / vrsta kanabinoida	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
CBD-A	-0,570 p = 0,237	-0,525 p = 0,285	-0,934 p = 0,006
CBD	-0,885 p = 0,019	-0,856 p = 0,030	-0,829 p = 0,041
Δ 9-THC	-0,912 p = 0,011	-0,888 p = 0,018	-0,764 p = 0,077
Δ 9-THC-A	0,111 p = 0,834	0,153 p = 0,773	-0,579 p = 0,229
CBC	0,111 p = 0,834	0,153 p = 0,773	-0,579 p = 0,229

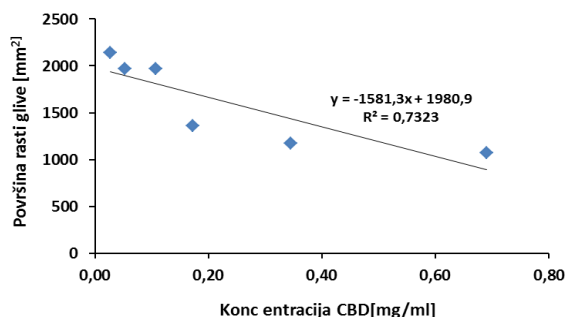


Slika 28: Korelacija med površino rasti glive *Fusarium oxysporum* in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.

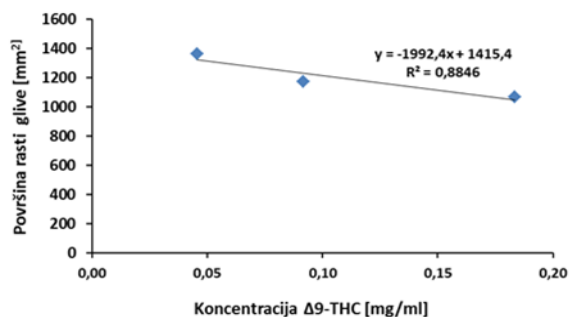


Slika 29: Korelacija med površino rasti glive *Fusarium oxysporum* in koncentracijo Δ 9-tetrahidrokanabinola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.

Pri glivi *Botrytis* sp. smo ugotovili, da tudi obstaja negativna linearna povezava med površino rasti glive in koncentracijo kanabidiola (Slika 30) ter Δ 9-tetrahidrokanabinola (Slika 31). Statistično značilnih povezav pri drugih kanabinoidih ni.

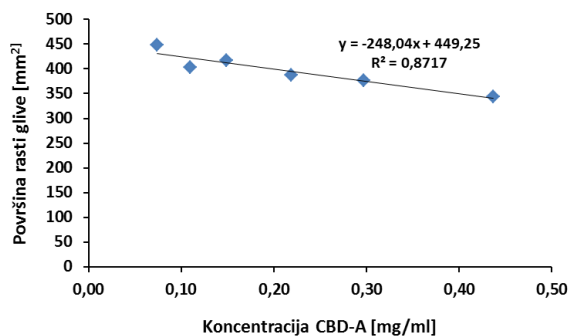


Slika 30: Korelacija med površino rasti glive *Botrytis* sp. in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.

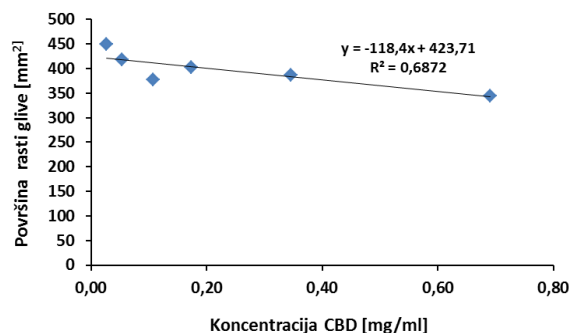


Slika 31: Korelacija med površino rasti glive *Botrytis* sp. in koncentracijo Δ 9-tetrahidrokanabinola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje.

Tudi pri glivi *Verticillium nonalfalfae* smo ugotovili, da obstaja negativna linearna povezanost med površino rasti glive in koncentracijo kanabidiolne kisline (Slika 32) ter kanabidiola (Slika 33). Povezav drugih kanabinoidov s površinsko rastjo glive ni.



Slika 32: Korelacija med površino rasti glive *Verticillium nonalfalfae* in koncentracijo kanabidiolne kisline v etanolnih ekstraktih navadne konoplje



Slika 33: Korelacija med površino rasti glive *Verticillium nonalfalfae* in koncentracijo kanabidiola v etanolnih ekstraktih navadne konoplje

4.4.2 Oljni ekstrakti

Tudi med koncentracijo kanabinoidov v oljnih ekstraktih navadne konoplje in površino rasti gliv na gojiščih s temi ekstrakti smo izračunali Pearsonove korelacijske koeficiente, a povezanosti rasti glive s koncentracijo kanabinoidov nismo odkrili (Preglednica 3).

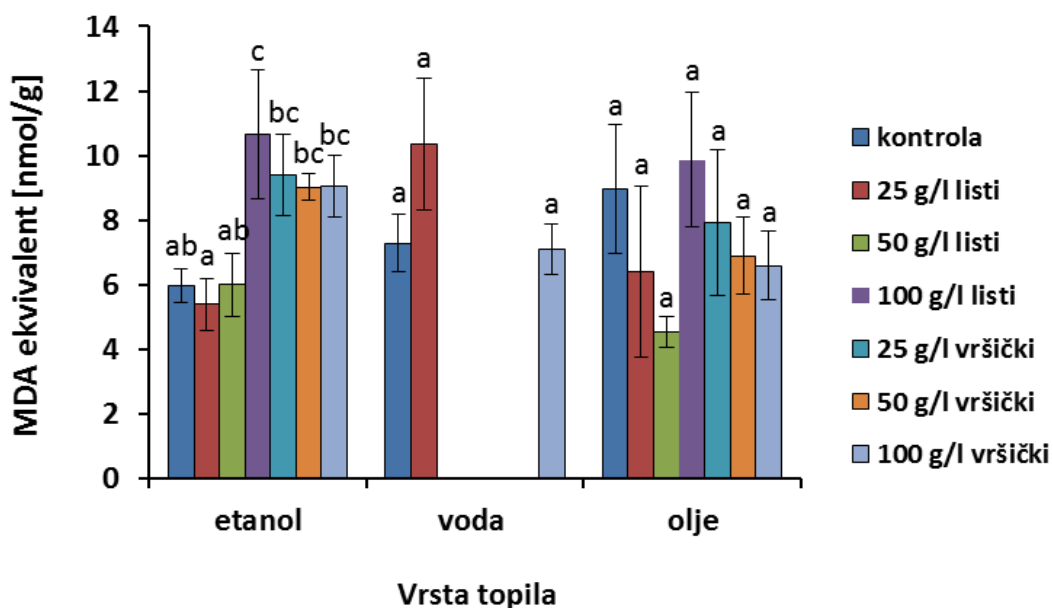
Preglednica 3: Pearsonovi koeficienti korelacije med površino rasti gliv in koncentracijo kanabinoidov v oljnih ekstraktih. Zgornja vrednost predstavlja Pearsonov koeficient korelacije, spodnja pa statistično značilnost.

Vrsta glive / vrsta kanabinoida	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
CBD-A	0,274 p = 0,600	-0,147 p = 0,781	0,181 p = 0,731
CBD	-0,005 p = 0,993	-0,424 p = 0,402	0,311 p = 0,549
Δ^9 -THC-A	-0,122 p = 0,819	-0,500 p = 0,313	0,334 p = 0,517
CBC	-0,062 p = 0,907	-0,464 p = 0,354	0,325 p = 0,530

4.5. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

4.5.1 *Fusarium oxysporum*

Rezultati testa kažejo, da so razlike v stopnji lipidne peroksidacije glive *Fusarium oxysporum* med posameznimi topili, s katerimi smo pripravili ekstrakte, in tudi med ekstrakti, narejenimi z istim topilom. Pri etanolnih ekstraktih smo tako največ malondialdehida izmerili v glivah, ki so rastle na gojiščih z listnim ekstraktom v koncentraciji 100 g/l, najmanj le tega pa smo izmerili pri glivah, rastlih na gojišču z najmanjšo koncentracijo listnega ekstrakta (Slika 34). Pri poskusu z vodnimi ekstrakti smo imeli težave, zato imamo podatke samo za glive, ki so rastle na dveh različnih ekstraktih in na kontroli. Med njimi ni statistično značilnih razlik. Tudi pri rasti glive *Fusarium oxysporum* na različnih oljnih ekstraktih ni bilo izmerjenih statistično značilnih razlik v stopnji lipidne peroksidacije.

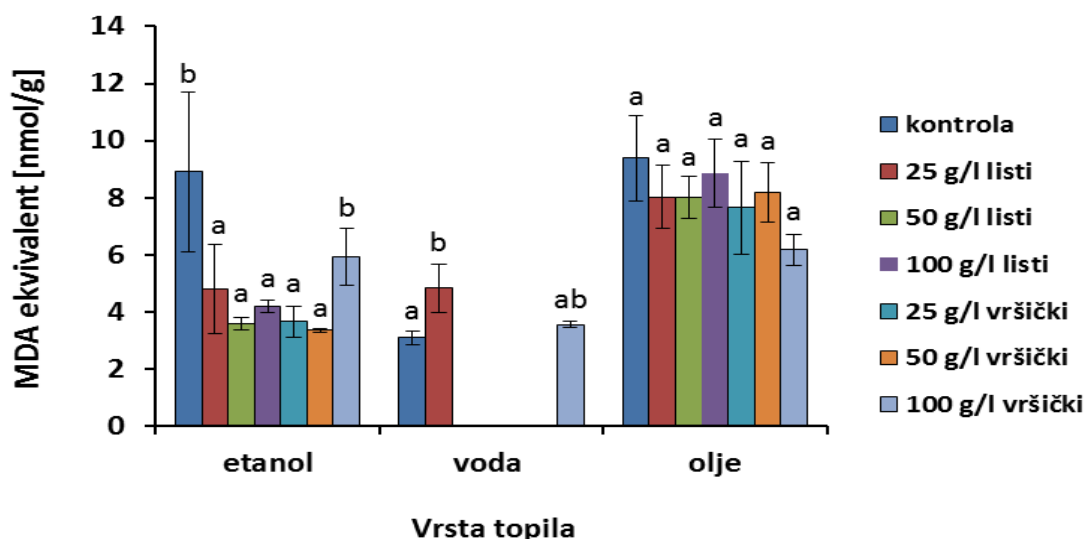


Slika 34: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi *Fusarium oxysporum*, rastli na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.5.2 *Botrytis* sp.

Rezultati lipidne peroksidacije glive *Botrytis* sp. kažejo, da je na koncentracijo malondialdehida (MDA) v glivi vplivala izbira topila in rastlinskega materiala za pripravo ekstraktov. Med glivami, ki so rastle na gojiščih z etanolnimi ekstrakti, statistično odstopajo kontrolna skupina in tiste, ki so rastle na najbolj koncentriranem ekstraktu iz vršičkov (Slika 35). Pri glivah, rastlih na vodnih ekstraktih, ni velikih razlik, še največ

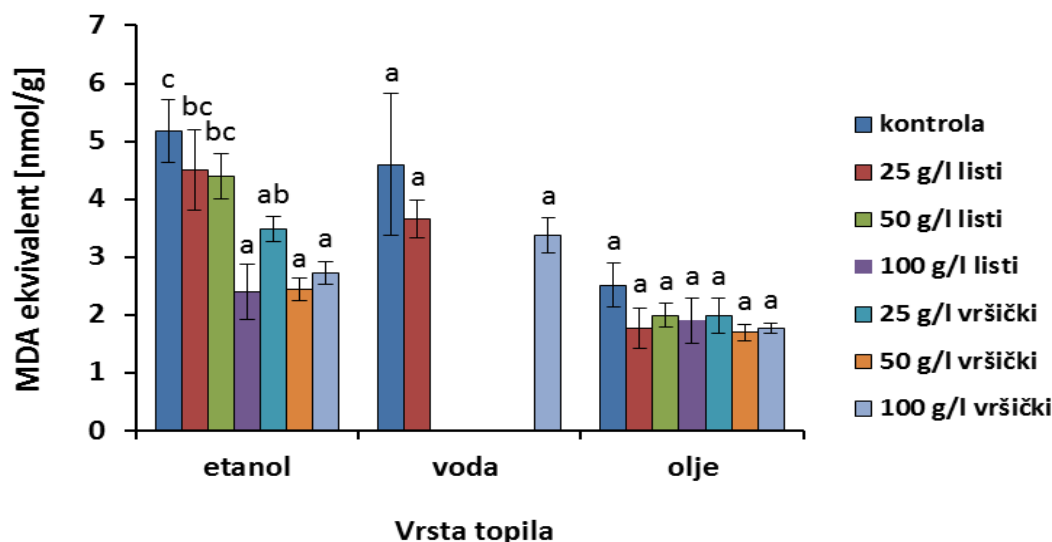
MDA je bilo izmerjenega v tistih, rastlih na ekstraktu z najnižjo koncentracijo listov. V stopnji lipidne peroksidacije gliv, rastlih na oljnih ekstraktih, pa nismo izmerili statistično značilnih razlik.



Slika 35: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi *Botrytis* sp., rastli na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.5.3 *Verticillium nonalfalfae*

Tudi pri glivi *Verticillium nonalfalfae* vidimo, da na stopnjo lipidne peroksidacije vplivata topilo za pripravo ekstrakta in tudi koncentracija konopljinca materiala v ekstraktu. Pri glivah, rastlih na etanolnih ekstraktih, smo največjo koncentracijo MDA izmerili pri kontrolni skupini gliv, najmanjšo pa pri glivah, rastlih na najbolj koncentriranih ekstraktih iz listov in vršičkov (Slika 36). Statistično značilnih razlik pa nismo opazili med glivami, ki so rastle na različnih vodnih ekstraktih, kakor tudi ne med glivami, ki so rastle na gojiščih z različnimi oljnimi ekstrakti navadne konoplje.



Slika 36: Koncentracija MDA ekvivalenta, izmerjena v analizirani glivi *Verticillium nonalfalfae*, rastle na različnih ekstraktih navadne konoplje, ki so bili pridobljeni z različnimi topili. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilno razliko v stopnji lipidne peroksidacije med glivami, ki so rastle na različnih ekstraktih, pridobljenih z istim topilom (ANOVA, Duncanov test, $p < 0,05$).

4.6 FTIR

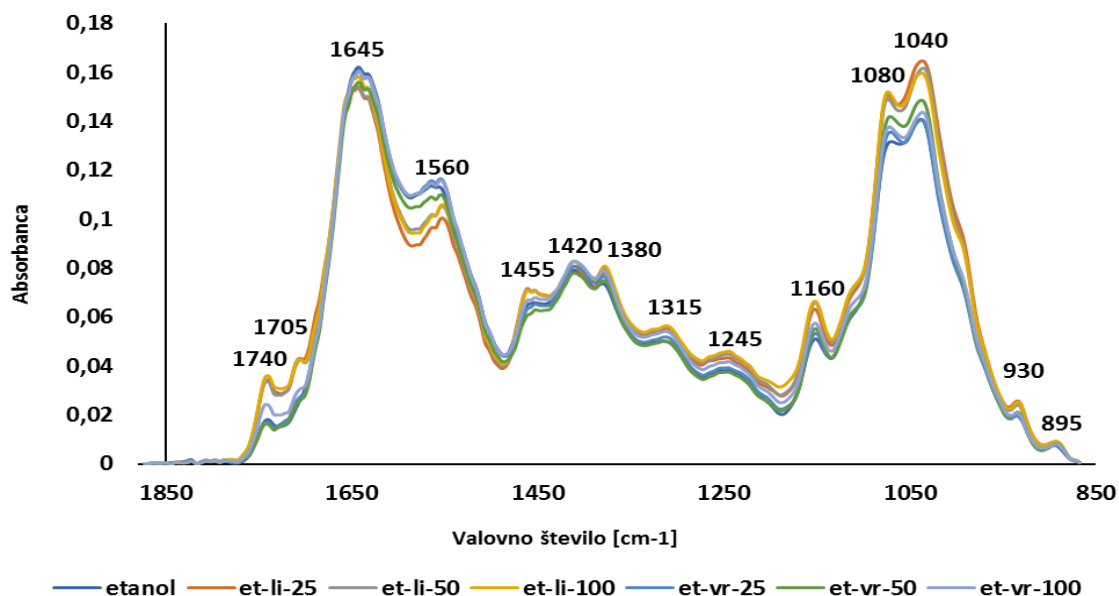
V nadaljevanju so prikazani povprečni in diferenčni povprečni FTIR spektri s poenotenim označevanjem posameznih vzorcev. Na vsakem grafu imamo izrisanih 7 vzorcev iste glive, ki je rastle na različnih ekstraktih navadne konoplje, pridobljenih z istim topilom. Kontrolni vzorec je izpisan s celotnim imenom topila, uporabljenega za ekstrakte. Pri vzorcih pa prvi dve črki pomenita topilo (ol = olje, vo = voda, et = etanol), naslednji dve črki označujeta, iz česa je bil ekstrakt narejen (li = listi, vr = vršički navadne konoplje), številke pa označujejo koncentracijo rastlinskega materiala v ekstraktu (25 g/l, 50 g/l, 100 g/l).

4.6.1 FTIR spektri glive *Fusarium oxysporum*

4.6.1.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Slika 37 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, ki je bila gojena na gojiščih z različnimi koncentracijami etanolnih ekstraktov navadne konoplje. Povečane vrhove gliv pri 1740 cm^{-1} in 1705 cm^{-1} , rastlih na listnih ekstraktih, lahko pripišemo nihanju estrskih skupin lipidov. Vrhova pri 1645 cm^{-1} in 1560 cm^{-1} ustrezata amidom in sta najvišja pri kontrolni skupini in glivah, rastlih na ekstraktih iz vršičkov. Tudi pri proteinskem vrhu pri 1420 cm^{-1} odstopa skupina gliv, rastla na najbolj koncentriranem listnem ekstraktu.

Vrhovi pri valovnih dolžinah 1455 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1315 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1380 cm^{-1} (hitin), 1245 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1160 cm^{-1} (ogljikovi hidrati), 1080 cm^{-1} (glikogen) so najbolj povečani pri glivah, rastlih na izvlečku iz listov s koncentracijo 100 g/l. Vrh ogljikovih hidratov pri 1040 cm^{-1} je najvišji pri glivah, izpostavljenih 25 g/l listnega ekstrakta.



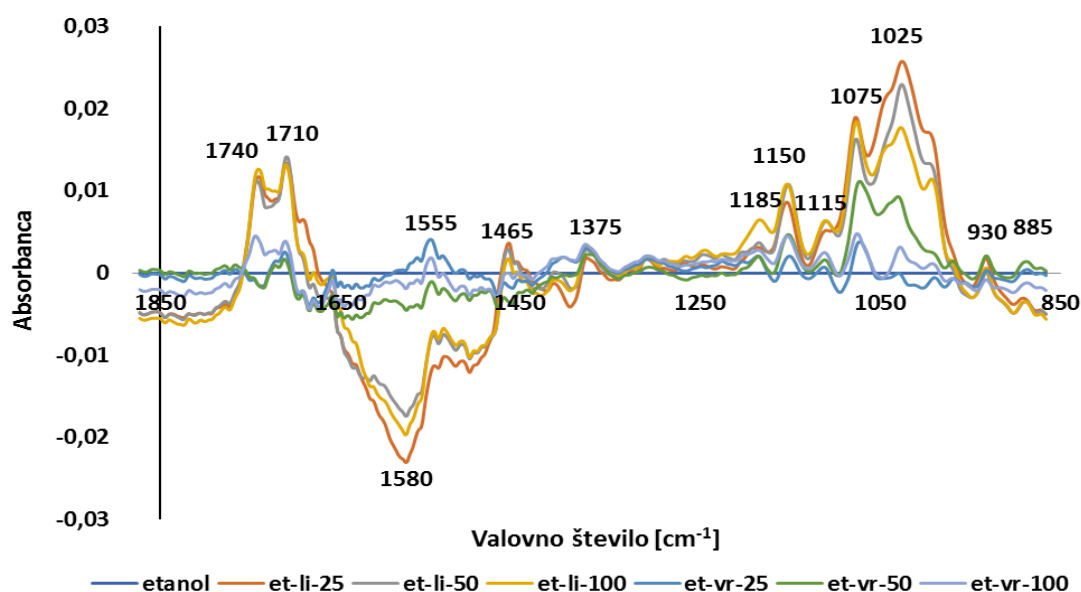
Slika 37: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.1.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Na Sliki 38 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*. Kot vidimo, je prišlo do velikih razlik med kontrolno skupino gliv in preostalimi, ki so bile gojene na različnih ekstraktih.

Vrhova pri valovnih dolžinah 1740 cm^{-1} in 1710 cm^{-1} (estrske skupine) sta povečana v primerjavi s kontrolo pri glivah, rastlih na listnih ekstraktih. Vrh pri 1555 cm^{-1} , ki označuje amide II, pa je pri vseh glivah, z izjemo tistih gojišč s koncentracijo listnega ekstrakta 25 g/l, zmanjšan v primerjavi s kontrolo. Dodatno je opažen vrh pri 1580 cm^{-1} (aromatski sistemi, nitro skupine), ki je pri večini gliv nižji od kontrole, sploh pri tistih, rastlih na listnih ekstraktih.

Pri ostalih vrhovih vidimo, da so le ti povečani v primerjavi s kontrolo, z izjemo proteinskega vrha (1420 cm^{-1}) pri glivah, rastlih na listnih ekstraktih. Pri vrhovih 1075 cm^{-1} (glikogen) in 1025 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) najbolj navzgor odstopajo glive, obravnavane z listnimi ekstrakti. Na splošno vidimo, da so glive, ki so rastle na gojiščih z listnimi ekstrakti, bolj odstopale od kontrole kot glive, ki so bile izpostavljene ekstraktom iz vršičkov.



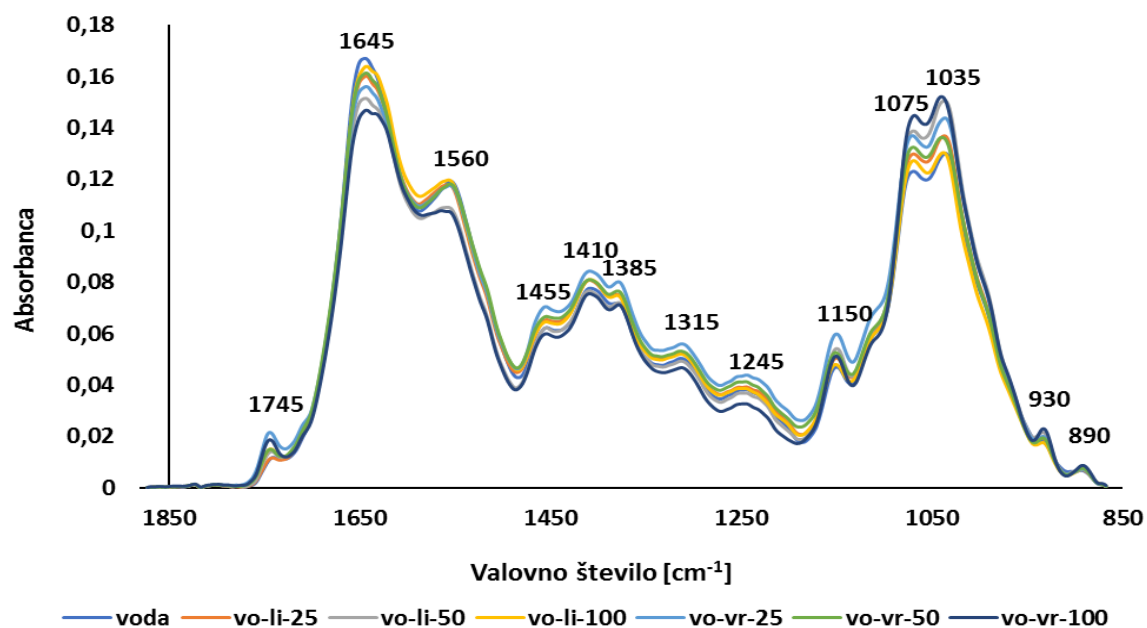
Slika 38: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.1.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Slika 39 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

Vrh pri 1745 cm^{-1} označuje estrske skupine lipidov in je najnižji pri glivah, izpostavljenih najnižji koncentraciji listnega ekstrakta. Vrhova 1645 cm^{-1} (amidi I) in 1560 cm^{-1} (amidi II) sta zmanjšana pri glivah, rastlih na ekstraktu s 100 g/l vršičkov, in tudi pri glivah, rastlih na ekstraktu s srednjo koncentracijo listov.

Vrhovi med 1455 cm^{-1} (karboksilne skupine) in 1150 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) so najvišji pri glivah, rastlih na vodnem ekstraktu s koncentracijo vršičkov 25 g/l , najnižji pa pri glivah, izpostavljenih najbolj koncentriranemu ekstraktu iz vršičkov. Prav slednje glive so dosegle najvišje vrednosti pri glikogenskem vrhu (1075 cm^{-1}), kakor tudi pri vrhu 1035 cm^{-1} (ogljikovi hidrati).

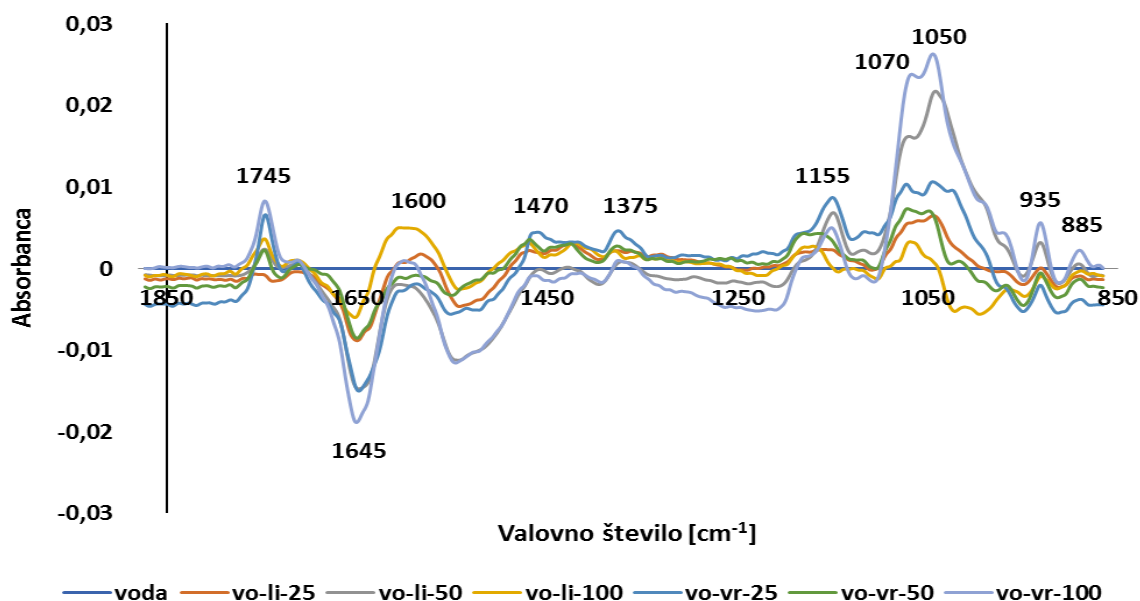


Slika 39: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.1.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Na Sliki 40 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje. Razlike med glivami, ki so rastle na konopljinih ekstraktih, in tistimi iz kontrolne skupine so opazne, saj so nekateri vrhovi večji, drugi pa manjši kot pri kontroli.

Estrski vrh (1745 cm^{-1}) je pri vseh izpostavitvah gliv povečan v primerjavi s kontrolo, z izjemo gliv, ki so bile izpostavljene najnižji koncentraciji listnega ekstrakta. Pojavil se je vrh pri 1600 cm^{-1} , ki označuje aromatske sisteme in je pri glivah, rastlih na ekstraktu s 100 g/l listov izrazito večji od kontrole, ostali pa manj odstopajo od kontrole. Naslednji vrhovi 1470 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin) in vrh ogljikovih hidratov (1155 cm^{-1}) so najvišji pri glivah, rastlih na najnižji koncentraciji vodnega ekstrakta iz vršičkov. Vrhova ogljikovih hidratov (1155 cm^{-1} in 1050 cm^{-1}) in glikogenski vrh (1070 cm^{-1}) so pri vseh izpostavitvah gliv višji od kontrole.



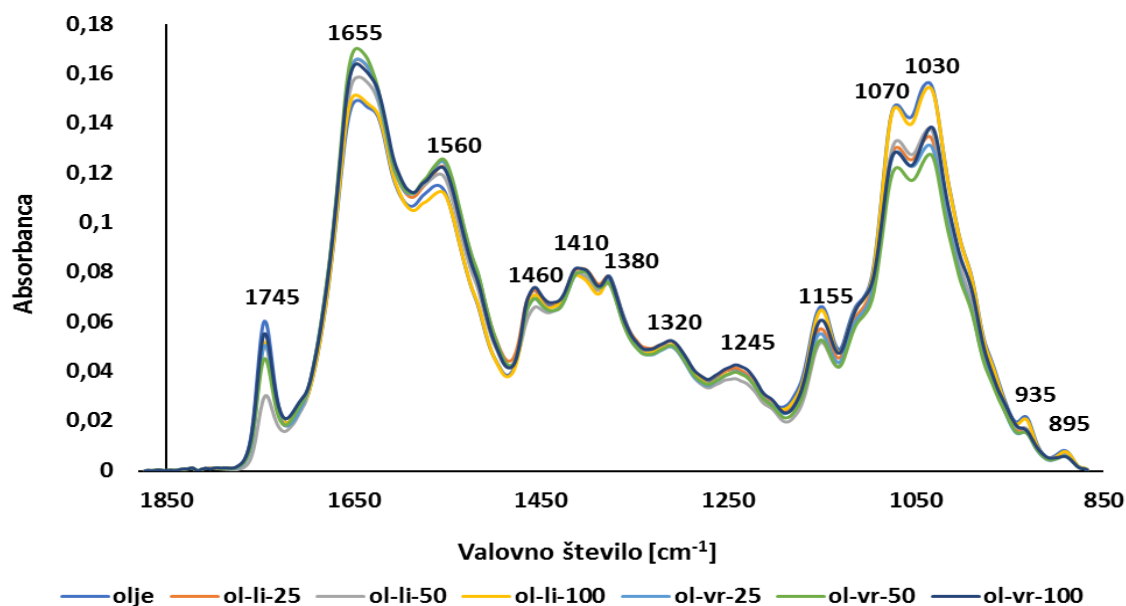
Slika 40: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.1.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Slika 41 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

Vrhovi pri 1745 cm^{-1} (estrske skupine lipidov) so si med različnimi obravnavanji precej podobni, nekoliko nižji je le pri glivah, rastlih na ekstraktu s koncentracijo listov 50 g/l , najvišji pa je pri kontroli. Naslednja vrhova, ki pripadata amidom I (1655 cm^{-1}) in amidom II (1560 cm^{-1}), sta najnižja pri kontroli in glivah, izpostavljenih listnemu ekstraktu s koncentracijo 100 g/l . Vrhovi v območju med 1460 cm^{-1} (karboksilne skupine) in 1245 cm^{-1} (nukleinske kisline) so precej enakih višin pri vseh izpostavitvah gliv, malenkost nižji so le nekateri vrhovi gliv, ki so bile obravnavane s srednjimi koncentracijami izvlečka iz listov.

Preostali vrhovi, ki označujejo ogljikove hidrate (1155 cm^{-1} in 1030 cm^{-1}) in glikogen (1070 cm^{-1}), so najvišji pri kontrolni skupini in glivah z gojišč z najvišjimi koncentracijami listnih ekstraktov. Najnižji pa so pri glivah, izpostavljenih srednjim koncentracijam izvlečkov iz vršičkov navadne konoplje.



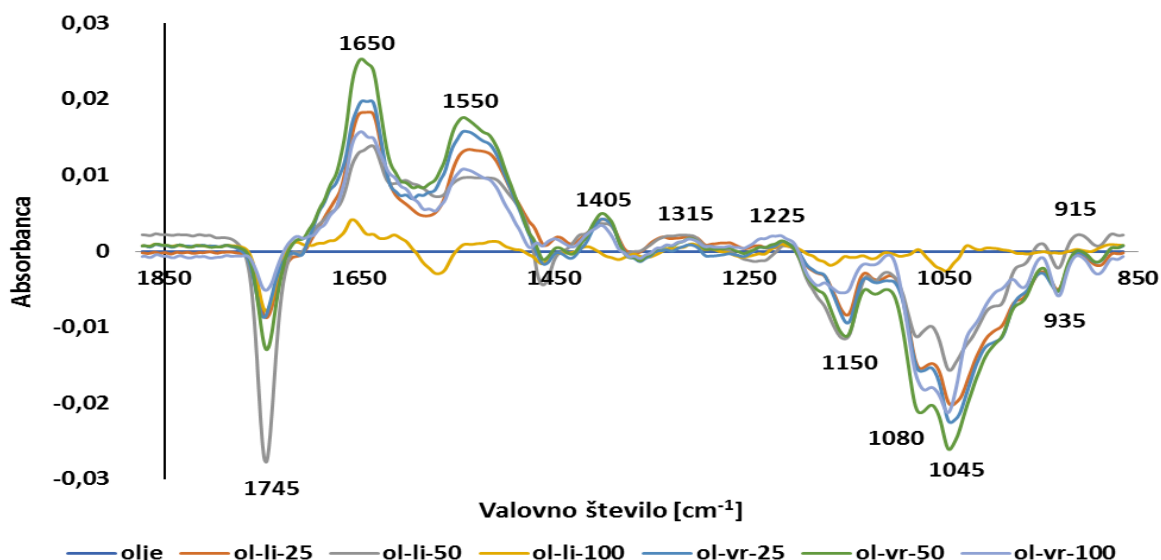
Slika 41: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.1.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Na Sliki 42 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje. Opazne so tako negativne kot pozitivne spremembe v velikosti vrhov v primerjavi s kontrolo.

Pri valovni dolžini 1745 cm^{-1} so vrhovi pri vseh obravnavanih glivah nižji od kontrole, še posebej nizek je vrh gliv, rastlih na srednjih koncentracijah listnega ekstrakta. Naslednji proteinski vrhovi pri 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} in 1405 cm^{-1} so povečani v primerjavi s kontrolo, kateri so pri teh in tudi vseh naslednjih vrhovih najbolj podobne glive, rastle na najvišjih koncentracijah listnega ekstrakta.

Naslednja vrhova pri 1315 cm^{-1} in 1225 cm^{-1} sta pri vseh izpostavitvah precej podobna kontroli. Vrhovi pri valovnih dolžinah 1150 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} in 1045 cm^{-1} so pri vseh obravnavanjih, z izjemo tistega s srednjo koncentracijo listnega ekstrakta, izrazito nižji od kontrole.



Slika 42: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Fusarium oxysporum*, gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

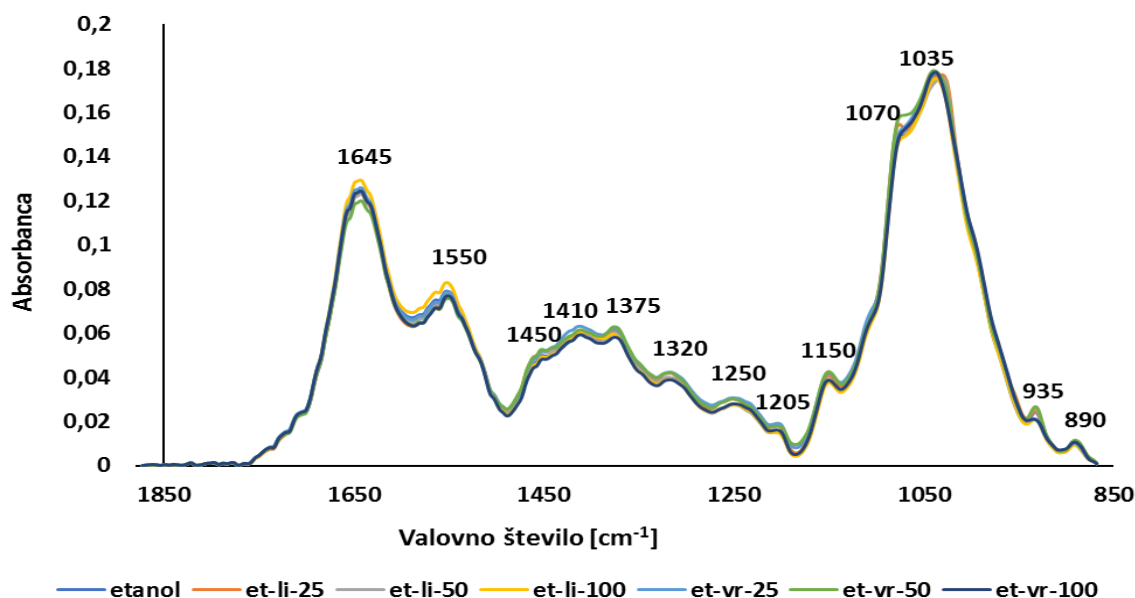
4.6.2 FTIR spektri glive *Botrytis* sp.

4.6.2.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Slika 43 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Amidna vrhova pri 1645 cm^{-1} in 1550 cm^{-1} sta pri vseh izpostavitvah precej podobno velika, malo sta povišana le pri glivah, rastlih na najvišjih koncentracijah listnih ekstraktov. Pri naslednjih vrhovih 1450 cm^{-1} in 1320 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1410 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin), 1250 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1205 cm^{-1} in 1150 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) ni opaznih velikih razlik med posameznimi obravnavanji, najvišje vrednosti so dosegale glive, izpostavljene etanolnim ekstraktom vršičkov nižjih dveh koncentracij.

Pri valovni dolžini 1070 cm^{-1} (glikogen) malenkost odstopajo glive, rastle na srednjih koncentracijah izvlečkov iz vršičkov. Vrh, ki označuje ogljikove hidrate (1035 cm^{-1}) je pri vseh izpostavitvah zelo podobnih višin.



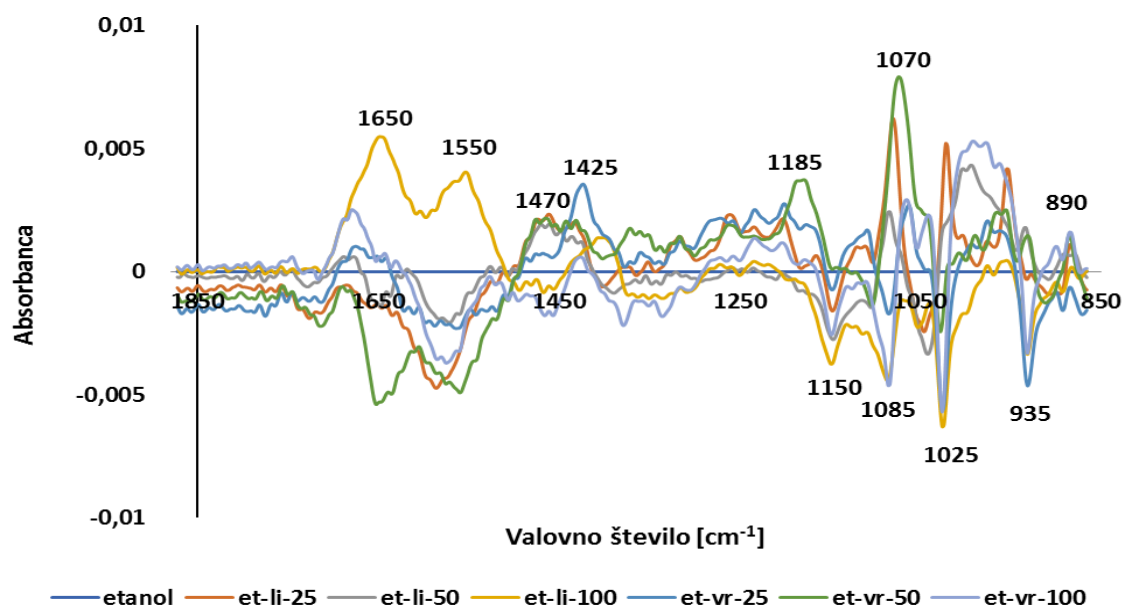
Slika 43: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.2.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Na Sliki 44 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje. V primerjavi glivnih obravnavanj s kontrolo so vidne zelo velike razlike v velikosti vrhov.

Vrhova pri 1650 cm^{-1} in 1550 cm^{-1} sta pri glivah, izpostavljenih listnemu ekstraktu s koncentracijo 100 g/l , precej višja od kontrole, medtem ko sta pri ostalih obravnavanjih nižja od kontrole, razen pri glivah, izpostavljenih 25 g/l in 100 g/l izvlečkov iz vršičkov, kjer je vrh 1650 cm^{-1} malo višji od kontrole. Vrhovi med valovnimi dolžinama 1470 cm^{-1} in 1185 cm^{-1} so višji od kontrole, razen pri glivah, rastlih na višjih dveh koncentracijah listnih ekstraktov in najnižji koncentraciji ekstrakta iz vršičkov. Pri valovnih dolžinah 1150 cm^{-1} in 1085 cm^{-1} so vrhovi zgoraj omenjenih izpostavitvev prav tako nižji od kontrole, medtem ko je pri 1070 cm^{-1} najvišji vrh gliv, rastlih na ploščah s 50 g/l ekstrakta iz vršičkov.

Pri 1025 cm^{-1} se je pojavil nov vrh, ki ustreza ogljikovim hidratom in je višji od kontrole pri glivah, izpostavljenih izvlečku iz listov s koncentracijo 25 g/l . Precej nižji kot kontrola pa je vrh pri obravnavanjih z najvišjo koncentracijo listnih ekstraktov ter pri vseh obravnavah z izvlečki iz vršičkov. Pojavil se je tudi nov vrh ogljikovih hidratov pri 980 cm^{-1} in je najvišji pri glivah, rastlih na koncentraciji ekstrakta iz listov 50 g/l , ter pri glivah, rastlih na najvišji koncentraciji izvlečka iz vršičkov.



Slika 44: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

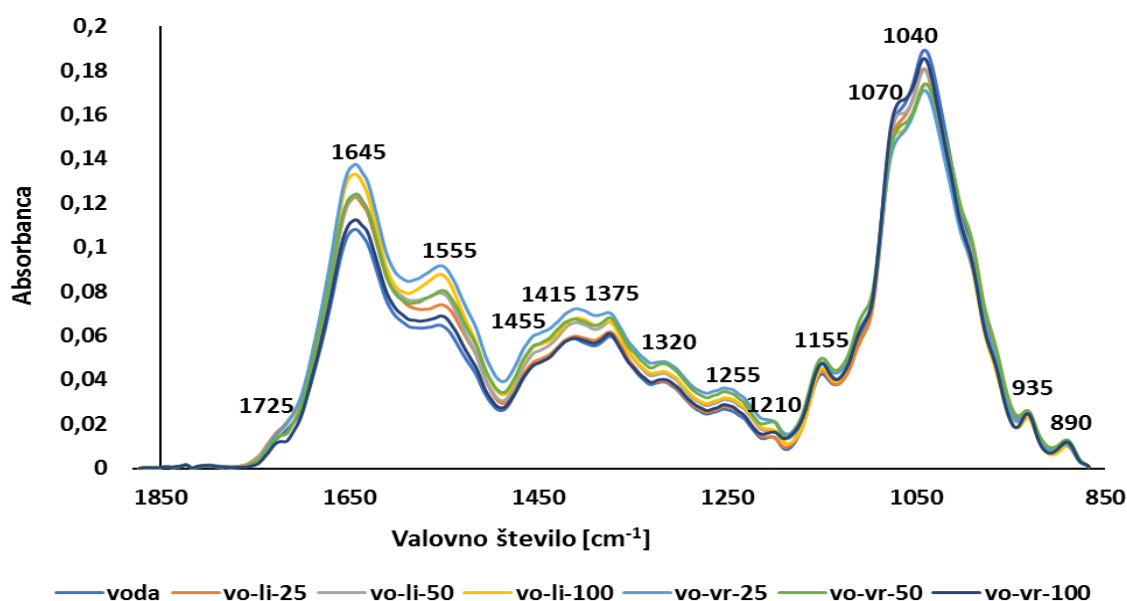
4.6.2.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Slika 45 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

Pri 1725 cm^{-1} se je pojavil nov vrh, ki lahko pripada karboksilnim estrom in je najnižji pri glivah, obravnavanih z najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov. Pri amidnih vrhovih (1645 cm^{-1} in 1555 cm^{-1}) je opazna zelo lepa razlika. Vrhovi vseh izpostavitvev so višji od kontrole, najbolj izstopata obravnavi z najvišjo koncentracijo listnih ekstraktov in najnižjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov.

Tudi pri vrhovih 1455 cm^{-1} in 1320 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1415 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin), 1255 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1210 cm^{-1} in 1155 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) je razvidno, da imamo nižje vrednosti pri kontroli, najbolj pa odstopata obravnavanji z najnižjo in srednjo koncentracijo ekstrakta iz vršičkov.

Kontrola in izpostavitve z izvlečkom iz vršičkov s koncentracijo 100 g/l pa sta dosegla najvišje vrhove pri 1070 cm^{-1} (glikogen) in 1040 cm^{-1} (ogljikovi hidrati).



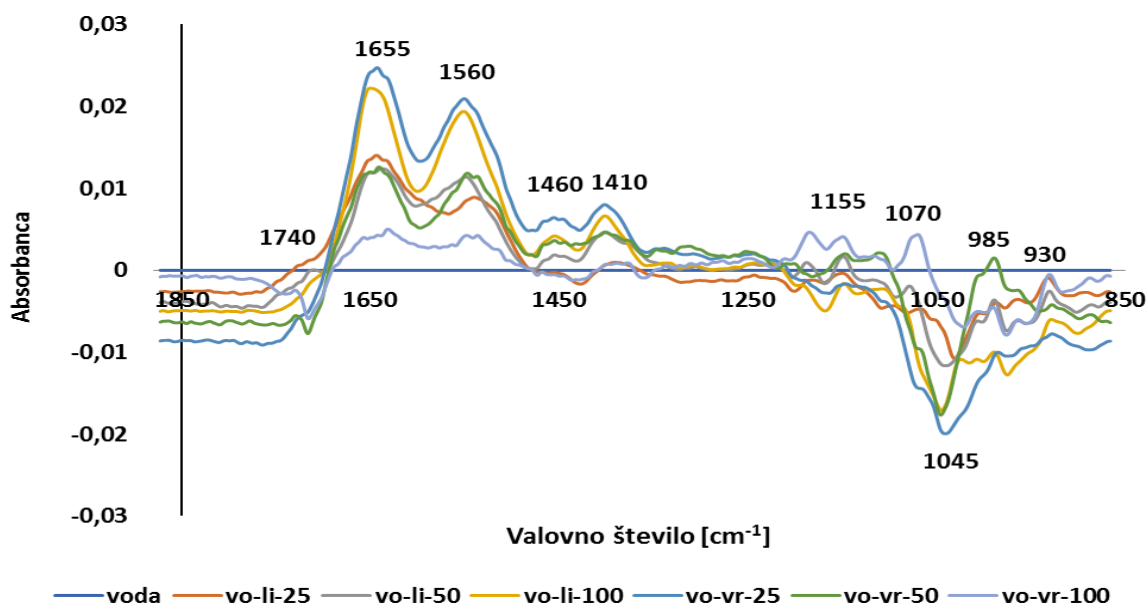
Slika 45: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.2.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Na Sliki 46 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje. Opazne so razlike, če primerjamo obravnavanja s kontrolo, razlike pa so tudi med posameznimi obravnavanji.

Pri valovni dolžini 1740 cm⁻¹ vidimo, da so vrhovi nižji v primerjavi s kontrolo. Obratno pa je pri valovnih dolžinah amidnega dela spektra (1655 cm⁻¹ in 1560 cm⁻¹), kjer so vrhovi vseh obravnavanj višji od kontrole. Najvišje vrednosti sta dosegla vrhova pri glivah, izpostavljenih najvišjim koncentracijam izvlečkov iz listov in najnižjim koncentracijam izvlečkov iz vršičkov. Podobno je tudi z vrhovoma 1460 cm⁻¹ in 1410 cm⁻¹, le da sta tukaj vrhova obravnavanj s 25 g/l listnega ekstrakta in 100 g/l izvlečka iz vršičkov na nivoju kontrole.

Edino obravnavanje, ki bistveno odstopa od kontrole pri 1155 cm⁻¹, je tisto, pri katerem je bila koncentracija vršičkov v izvlečku 100 g/l. Prav pri tem obravnavanju je opazeno tudi povečanje glikogenskega vrha pri 1070 cm⁻¹ v primerjavi s kontrolo, medtem ko imajo ostala obravnavanja manjše vrhove od kontrole. Najnižje vrhove opazimo pri obravnavanjih z najvišjo koncentracijo izvlečkov iz listov in pri obravnavanju z nižjima koncentracijama izvlečkov iz vršičkov. Pri 985 cm⁻¹ je vrh višji od kontrole edino pri glivah, rastlih na srednji koncentraciji izvlečka iz vršičkov, vrhovi ostalih obravnavanj pa so manjši.

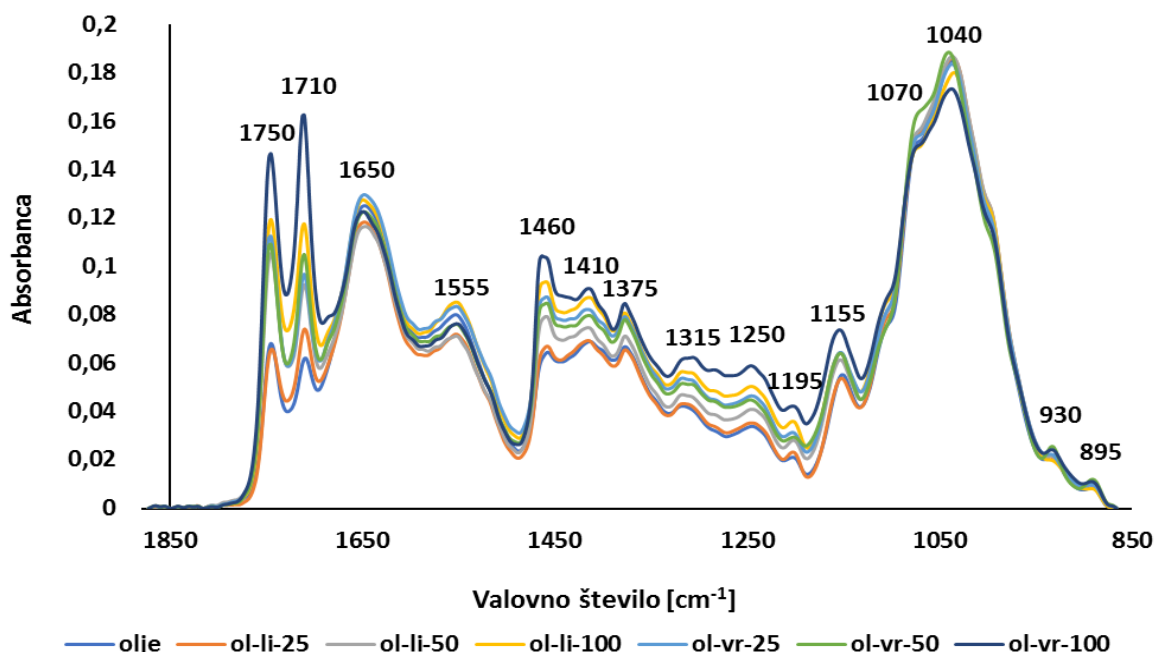


Slika 46: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.2.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Slika 47 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje. Hitro opazimo, da vrhova pri 1750 cm^{-1} in 1710 cm^{-1} (estrne skupine) zelo odstopata pri obravnavanju z najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov, najnižja vrhova pa sta pri kontroli. Vrhovi amidov I (1650 cm^{-1}) in amidov II (1555 cm^{-1}) so pri vseh obravnavanjih precej podobni, najnižji pa so pri obravnavanjih z nižjimi koncentracijami izvlečkov iz listov.

Najvišje vrhove pri valovnih dolžinah 1460 cm^{-1} in 1315 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1410 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin), 1250 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1195 cm^{-1} in 1155 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) imajo glive, obravnavane z najvišjimi koncentracijami izvlečkov vršičkov, medtem ko imata kontrola in obravnavanje z najnižjo vsebnostjo izvlečka iz konopljinih listov najnižje vrhove. Pri valovnih dolžinah 1070 cm^{-1} (glikogen) in 1040 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) imajo najnižje vrhove glive, izpostavljene 100 g/l izvlečka iz vršičkov, najvišje pa tiste, ki so rastle na 50 g/l izvlečka iz vršičkov.



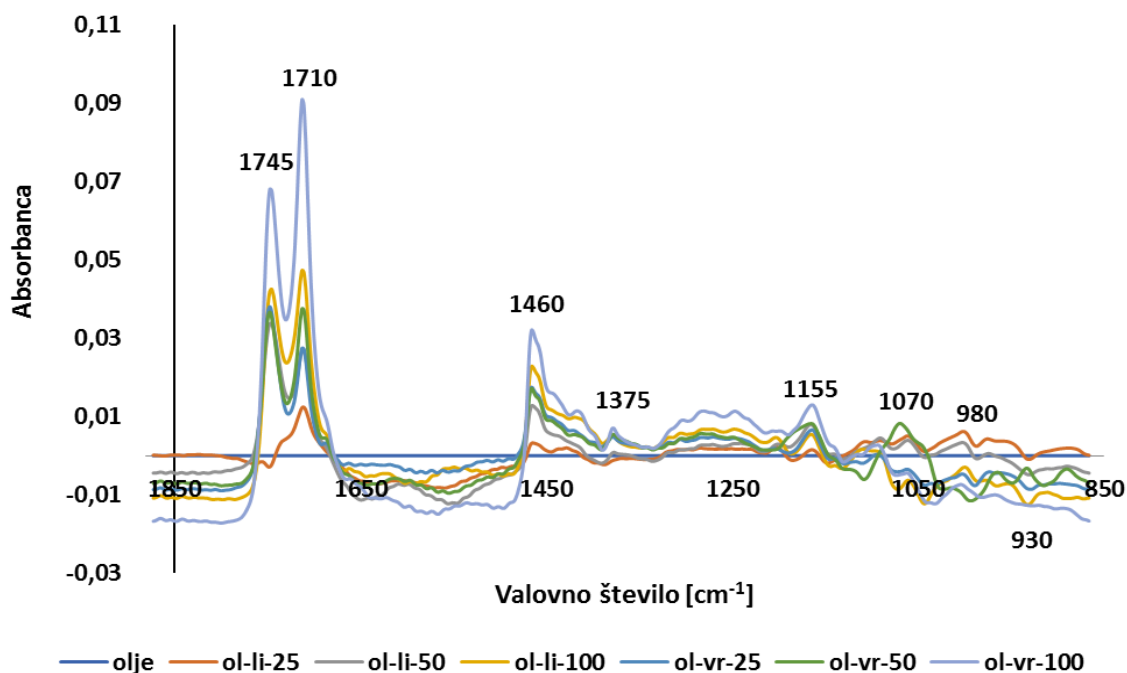
Slika 47: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.2.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Na Sliki 48 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje. Spekter kaže na to, da so vrhovi določenih obravnav znižani, drugi pa zvišani v primerjavi s kontrolo.

Vrhova estrskih skupin lipidov (1745 cm^{-1} in 1710 cm^{-1}) sta pri vseh izpostavitvah močno povečana v primerjavi s kontrolo. Najvišje vrhove imajo glive, izpostavljene največji količini izvlečka iz vršičkov, medtem ko je obravnava s 25 g/l izvlečka iz vršičkov v višini kontrole oz. ima malo povečan vrh pri 1710 cm^{-1} . Pri valovnih dolžinah 1460 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} in 1155 cm^{-1} pri večini obravnavanj opazimo povečanje absorbance, kontroli najbolj podobna izpostavitvev je pri teh vrhovih tista s koncentracijo listnega ekstrakta 25 g/l .

Pri 1070 cm^{-1} imajo višji vrh od kontrole glive, rastle na gojiščih z nižjima koncentracijama izvlečkov iz vršičkov, in glive, izpostavljene srednji koncentraciji ekstrakta iz vršičkov, ostale izpostavitve pa imajo vrhove nižje od kontrole.



Slika 48: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Botrytis* sp., gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

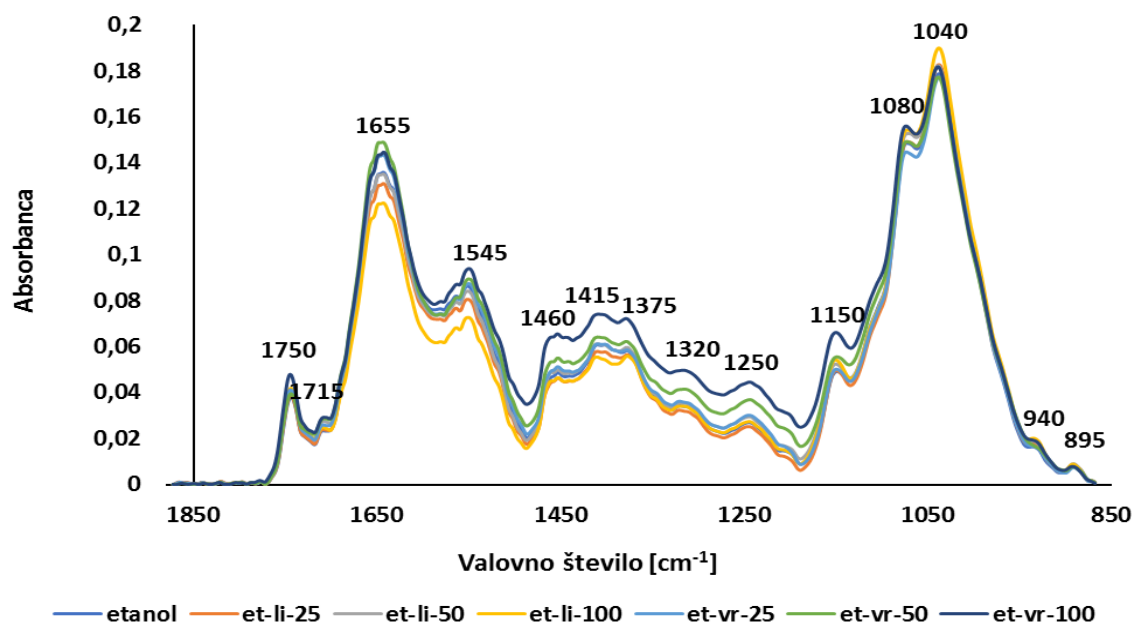
4.6.3 FTIR spektri glive *Verticillium nonalfalfae*

4.6.3.1 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Slika 49 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Vrh pri 1750 cm^{-1} (estrske skupine lipidov) je najvišji pri obravnavanju z največjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov, enako je z vrhom 1715 cm^{-1} , ki tudi označuje estrske skupine. Pri valovni dolžini amidov I (1655 cm^{-1}) ima najvišjo vrednost obravnava s 50 g/l izvlečka iz vršičkov, najnižjo pa obravnava z ekstraktom s 100 g/l listov. Pri amidnem II delu spektra (1545 cm^{-1}) in tudi pri valovnih dolžinah 1460 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1415 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin), 1320 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1250 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1150 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) so bili najvišji vrhovi izmerjeni pri glivah, rastlih na najvišjih koncentracijah ekstraktov iz vršičkov. Najnižji vrhovi pa so bili izmerjeni pri izpostavitvi z najnižjo koncentracijo listnega ekstrakta.

Vrh ogljikovih hidratov pri valovni dolžini 1040 cm^{-1} je najvišji pri obravnavanju z največjo koncentracijo izvlečka iz listov, medtem ko je pri 1080 cm^{-1} (glikogen) najvišji vrh pri izpostavitvi z najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov.



Slika 49: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

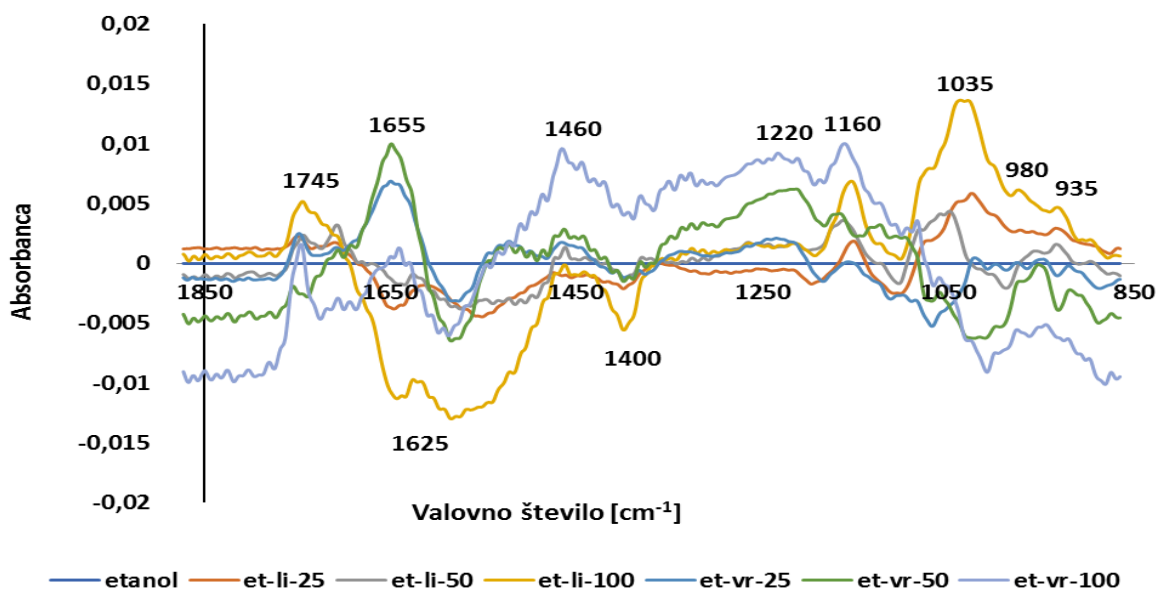
4.6.3.2 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na etanolnih ekstraktih

Na Sliki 50 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje. Vidimo očitne razlike med obravnavanji in kontrolo, razlike pa so tudi med samimi izpostavitvami.

Pri 1745 cm^{-1} so vrhovi izpostavitve večinoma malo višji od kontrole, najvišji pa je vrh pri glivah, rastlih na 100 g/l izvlečka iz listov. Vrhovi pri valovni dolžini 1655 cm^{-1} so višji od kontrole pri obravnavah z ekstrakti iz vršičkov, od kontrole pa so nižji vrhovi gliv, izpostavljenih listnim ekstraktom.

Pri 1460 cm^{-1} je najvišji vrh pri izpostavitvi z najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov, vrhovi ostalih obravnavanj pa so v bližini kontrole. Tudi pri delu spektra med 1460 cm^{-1} in 1220 cm^{-1} so najvišji vrhovi pri izpostavitvah z največjima koncentracijama ekstrakta iz vršičkov, vrhovi gliv, izpostavljenih najnižjim koncentracijam listnega ekstrakta, pa so nižji od kontrole. Tudi pri vrhu 1160 cm^{-1} se od kontrole najbolj razlikuje obravnava z najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov, sledi vrh obravnave z najvišjo koncentracijo listnega ekstrakta, kontroli enak pa je vrh izpostavitve s 25 g/l izvlečka iz vršičkov.

Obravnava z najvišjo koncentracijo listnega ekstrakta je imela najvišje vrhove pri valovnih dolžinah 1035 cm^{-1} in 980 cm^{-1} , od kontrole pa so navzdol najbolj odstopale glive, rastle na najvišjih koncentracijah ekstrakta iz vršičkov.



Slika 50: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

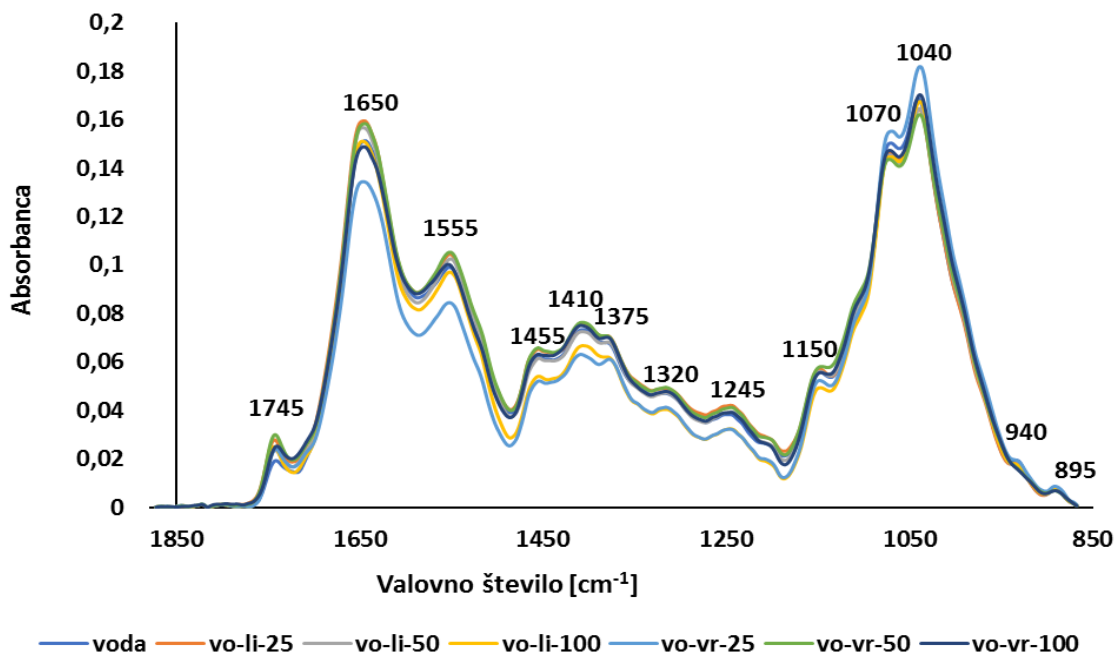
4.6.3.3 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Slika 51 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

Pri valovnih dolžinah 1745 cm^{-1} (estrske skupine lipidov), 1650 cm^{-1} (amidi I), 1555 cm^{-1} (amidi II) so bili na vodnih ekstraktih najvišji vrhovi obravnavanj s 25 g/l listnega ekstrakta in 50 g/l izvlečka iz vršičkov, najnižji pa so bili vrhovi pri obravnavanju z najnižjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov.

Izpostaviti z višjima koncentracijama izvlečka iz vršičkov in obravnava z najnižjo koncentracijo listnega ekstrakta so imeli najvišje vrhove pri valovnih dolžinah: 1455 cm^{-1} in 1320 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1410 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin), 1245 cm^{-1} (nukleinske kisline) in tudi pri 1150 cm^{-1} (ogljikovi hidrati). Pri teh valovnih dolžinah pa so imele najnižje vrhove glive, rastle na najvišji koncentraciji listnega ekstrakta in najnižji koncentraciji izvlečka iz vršičkov.

Vrhova, značilna za glikogen (1070 cm^{-1}) in ogljikove hidrate (1040 cm^{-1}) sta bila najvišja pri izpostavitvi z najnižjo koncentracijo ekstrakta iz vršičkov, med ostalimi obravnavanji pa ni bilo opaznih velikih razlik.



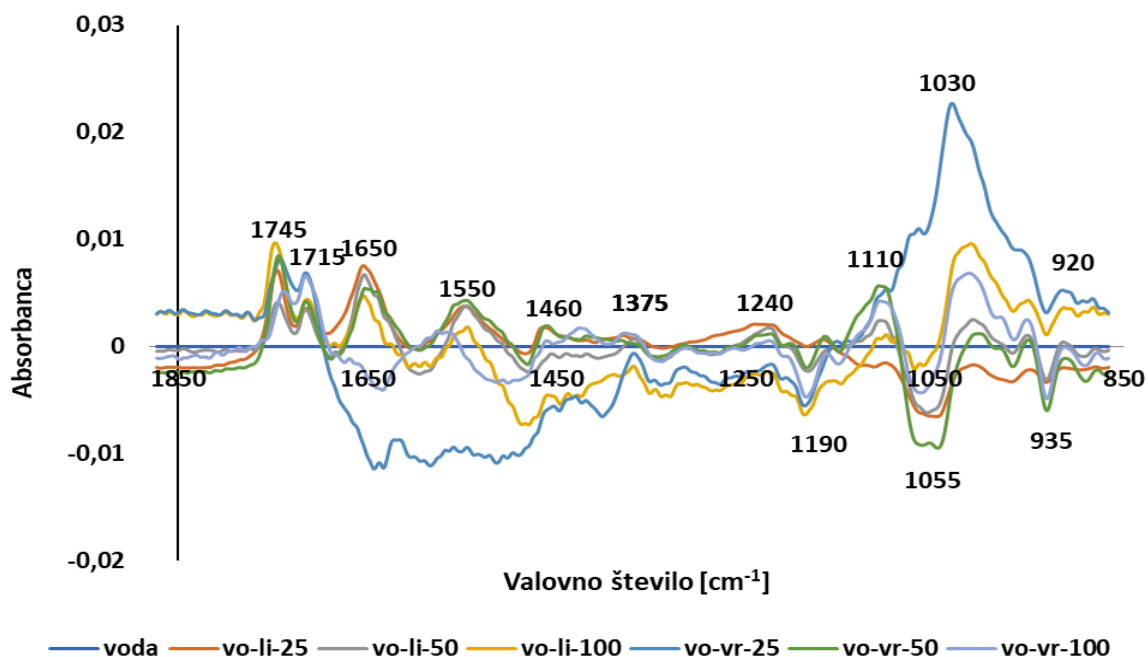
Slika 51: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.3.4 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na vodnih ekstraktih

Na Sliki 52 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje. Kot je razvidno s slike, so jasne razlike med kontrolo in izpostavitvami.

Vrhova pri valovnih dolžinah 1745 cm^{-1} in 1715 cm^{-1} sta pri vseh obravnavanjih višja od kontrole. Tudi amidni I vrh pri 1650 cm^{-1} je pri večini izpostavitve višji od kontrole, le pri obravnavanjih z najnižjo in najvišjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov je nižji od nje. Vrh pri 1550 cm^{-1} je pri vseh izpostavitvah, z izjemo tiste z najvišjo koncentracijo ekstrakta iz vršičkov, večji od kontrole. Vrhovi pri 1460 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} in pri 1240 cm^{-1} so pri obravnavanjih s 100 g/l listnega ekstrakta in 25 g/l izvlečka iz vršičkov manjši od kontrole, pri ostalih izpostavitvah pa so vrednosti enake ali pa malo višje od kontrole.

Pri 1110 cm^{-1} imajo vse obravnave, razen tiste z najnižjo koncentracijo listnega ekstrakta, višje vrhove kot kontrola. Enako se ponovi pri 1030 cm^{-1} , le da tu navzgor odstopa vrh obravnave s 25 g/l izvlečka iz vršičkov.



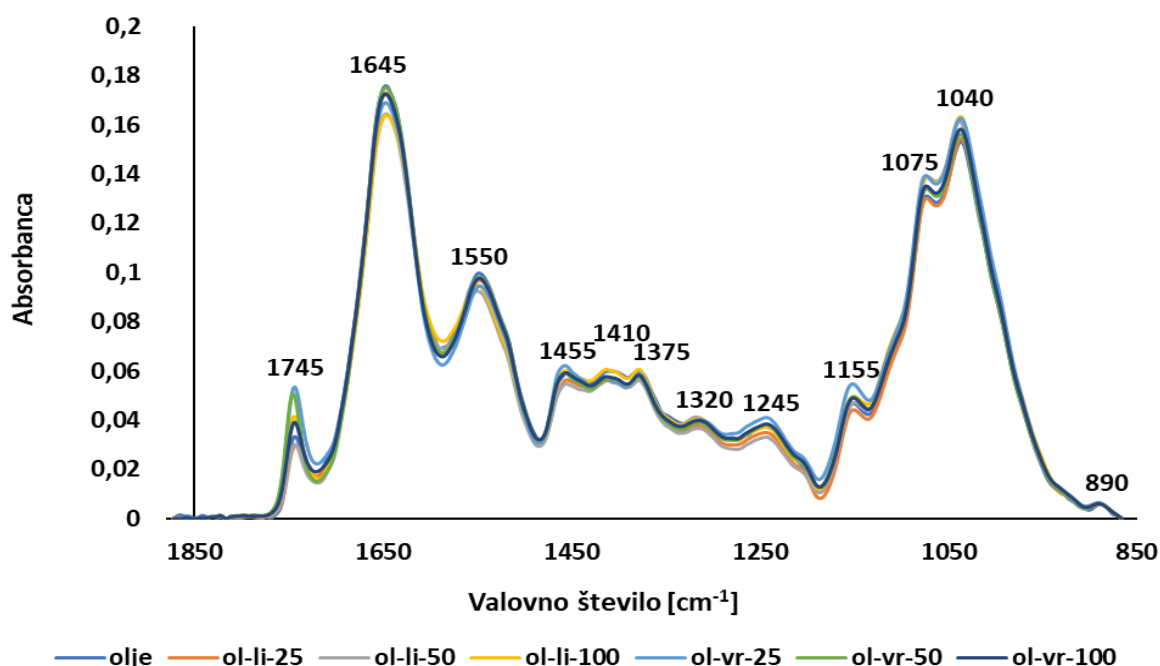
Slika 52: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.3.5 Povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Slika 53 prikazuje povprečne amidno-karbohidratne dele FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

Pri valovni dolžini 1745 cm^{-1} (estrške skupine lipidov) imata najvišja vrhova obravnavanji z nižjima koncentracijama izvlečkov iz vršičkov, najnižja vrhova pa sta pri dveh izpostavitvah z nižjima koncentracijama listnega ekstrakta. Pri amidnem I (1645 cm^{-1}) delu spektra imata najvišji vrh kontrola in obravnava s koncentracijo 50 g/l izvlečka iz vršičkov. Amidni II vrh (1550 cm^{-1}) je prav tako najvišji pri kontroli, pri ostalih izpostavitvah pa je le malenkost nižji.

Vrhovi pri 1455 cm^{-1} , 1320 cm^{-1} (karboksilne skupine), 1245 cm^{-1} (nukleinske kisline), 1155 cm^{-1} (ogljikovi hidrati) in 1075 cm^{-1} (glikogen) so najvišji pri glivah, rastlih na koncentraciji izvlečka iz vršičkov 25 g/l , najnižji pa pri obravnavah z nižjima koncentracijama listnih ekstraktov. Glive, izpostavljene 100 g/l listnega ekstrakta so imele najvišje vrhove pri 1410 cm^{-1} (proteini), 1375 cm^{-1} (hitin) in tudi pri valovni dolžini 1040 cm^{-1} (ogljikovi hidrati).



Slika 53: Povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje.

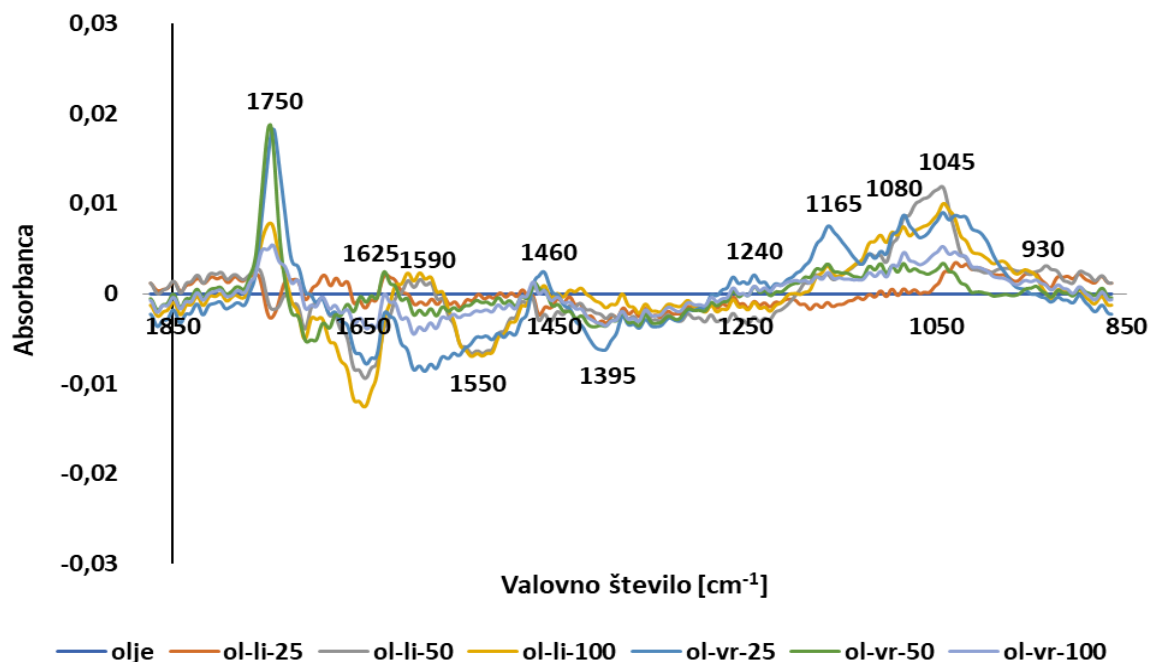
4.6.3.6 Diferenčni povprečni spektri glive, ki je bila gojena na oljnih ekstraktih

Na Sliki 54 so diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, ki je bila gojena na različnih koncentracijah oljnih ekstraktov navadne konoplje. Kot je razvidno s slike, se tudi tu izpostavitve razlikujejo od kontrole, razlike pa so tudi med posameznimi izpostavitvami.

Pri 1750 cm^{-1} imata obravnavanji z nižjima koncentracijama listnega ekstrakta nižja vrhova od kontrole, medtem ko so vrhovi ostalih izpostavitve nad nivojem kontrole. Vrh pri 1680 cm^{-1} je od kontrole višji le pri obravnavi s koncentracijo izvlečka iz listov 25 g/l , pri ostalih izpostavitvah pa je nižji. Amidni I vrh je pri vseh obravnavah pod nivojem kontrole, najbolj pa odstopa vrh gliv, rastlih na izvlečkih iz vršičkov s koncentracijo 100 g/l . Pri 1590 cm^{-1} se je pojavil nov vrh aromatskih sistemov, nitro in karboksilne skupine, ta je od kontrole višji le pri obravnavanju z višjima koncentracijama listnega ekstrakta, pri ostalih obravnavanjih pa so vrednosti nižje od kontrole. Vrh amidov II (1550 cm^{-1}) je nižji od kontrole pri vseh izpostavitvah. Obravnava s 25 g/l izvlečka iz vršičkov ima najvišji vrh pri valovni dolžini 1460 cm^{-1} , vrhovi ostalih izpostavitve pa so na tem mestu enaki kontroli ali malo nižji. V območju od 1405 cm^{-1} do 1240 cm^{-1} so vrhovi vseh obravnavanj nižji od kontrole.

Glive, rastle na 25 g/l izvlečka iz vršičkov, imajo pri valovnih dolžinah 1240 cm^{-1} in 1165 cm^{-1} ter 1080 cm^{-1} povišane vrhove v primerjavi z ostalimi izpostavitvami. Pri 1045 cm^{-1}

imajo vse izpostavitve višje vrednosti kot kontrola, najvišjo vrednost pa ima obravnava s srednjo koncentracijo listnega ekstrakta.



Slika 54: Diferenčni povprečni amidno-karbohidratni deli FTIR spektrov glive *Verticillium nonalfalfae*, gojene na različnih koncentracijah vodnih ekstraktov navadne konoplje.

4.6.4 Območja skupin molekul, detektiranih na FTIR spektrih

Pri analizi glivnih FTIR spektrov smo določili območja, na katerih se nahajajo točno določene molekule oz. funkcionalne skupine. Preglednica 4 prikazuje imena molekul, oznake in meje območij, kjer smo posamezne skupine molekul detektirali na amidno-karbohidratnem delu FTIR spektra.

Preglednica 4: Oznake in meje območij na FTIR spektru, kjer smo detektirali posamezne molekule in funkcionalne skupine (prirejeno po: Salman in sod., 2010; Regvar in sod., 2013).

Oznaka območja	Začetek območja [cm ⁻¹]	Konec območja [cm ⁻¹]	Skupina molekul / funkcionalnih skupin
R	990	1000	ogljikovi hidrati
P	1035	1040	ogljikovi hidrati
O	1075	1080	glikogen
N	1110	1115	ogljikovi hidrati
M	1150	1155	ogljikovi hidrati
L	1240	1245	nukleinske kisline
K	1315	1320	karboksilne skupine
J	1375	1380	hitin
I	1410	1415	proteini
H	1455	1460	karboksilne skupine
G	1515	1520	aromati
F	1550	1560	amidi II, aromati
E	1585	1590	aromatski sistemi, nitro skupine, karboksilne skupine
D	1620	1630	aromatski sistemi
C	1650	1660	amidi I
B	1680	1710	estrske skupine lipidov
A	1740	1745	estrske skupine lipidov

4.6.5 Diskriminantna analiza FTIR spektrov in glivnih površin

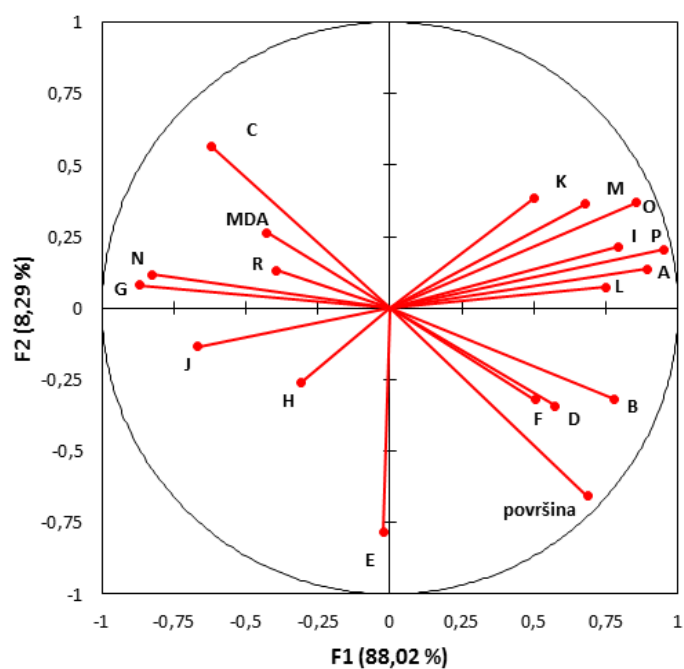
Diskriminanto analizo smo naredili posebej za vsako glivo pri vsakem pogoju. V nadaljevanju pa so prikazane samo diskriminantne analize vseh treh gliv, ko so rastle na etanolnih ekstraktih. Analize istih gliv, rastlih na vodnih in oljnih ekstraktih, nismo priložili, ker smo se osredotočili na ekstrakte, ki so najbolj zavirali rast gliv, in to so bili vsi etanolni ekstrakti. Vodni ekstrakti so bili pri tem precej neučinkoviti, nizko stopnjo inhibicije pa so kazali tudi oljni ekstrakti.

4.6.5.1 Diskriminantna analiza pri glivi *Fusarium oxysporum*

Grafikon korelacij FTIR trakov prikazuje, katere spremenljivke (FTIR trakovi, površina) najbolj vplivajo na razlike med vzorci. Po funkciji F1 se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrhovih P, A in O ter po znižanih vrhovih G, N in J. Po funkciji 2 pa se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrhovih C, K, O in po znižanih spremenljivkah E, površina in D. Funkciji F1 in F2 razložita kar 96,32 % razlik med vzorci (Preglednica 5, Slika 55).

Preglednica 5: Korelacije med funkcijama F1 in F2 ter spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive *Fusarium oxysporum*, rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Spremenljivka	F1	F2
R	-0,358	0,097
P	0,968	0,093
O	0,894	0,273
N	-0,798	0,193
M	0,711	0,329
L	0,726	0,157
K	0,556	0,284
J	-0,659	-0,178
I	0,816	0,114
H	-0,332	-0,293
G	-0,840	0,122
F	0,444	-0,291
E	-0,127	-0,762
D	0,502	-0,276
C	-0,531	0,582
B	0,735	-0,464
A	0,904	0,018



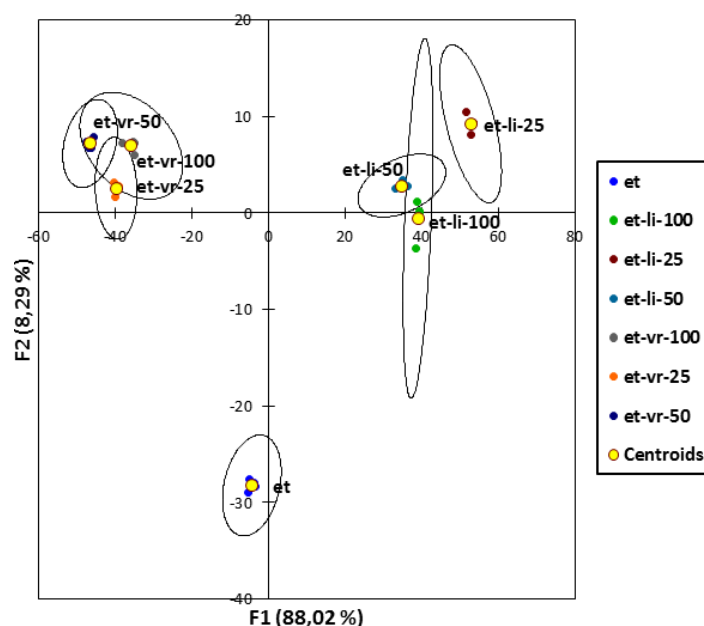
Slika 55: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive *Fusarium oxysporum*, rastli na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Da bi ugotovili, na katere skupine molekul imajo največji vpliv etanolni ekstrakti navadne konoplje pri glivi *Fusarium oxysporum*, smo naredili še korelacijsko statistično analizo (Preglednica 6). Pri povečani glivni rasti se je statistično značilno povečala višina vrhov B in D. V obratnem sorazmerju z glivno rastjo pa so višine vrhov C in G.

Preglednica 6: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive *Fusarium oxysporum*. Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.

Spremenljivke	R	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	površina	MDA
R	1,00	-0,44	-0,34	0,17	0,00	-0,31	-0,08	0,13	-0,14	-0,14	0,47	-0,35	-0,04	-0,62	0,46	-0,39	-0,28	-0,47	0,23
P	-0,44	1,00	0,88	-0,69	0,67	0,70	0,58	-0,72	0,78	-0,30	-0,87	0,45	-0,18	0,54	-0,54	0,65	0,87	0,55	-0,39
O	-0,34	0,88	1,00	-0,71	0,71	0,69	0,56	-0,58	0,75	-0,40	-0,70	0,22	-0,47	0,36	-0,29	0,55	0,84	0,35	-0,23
N	0,17	-0,69	-0,71	1,00	-0,73	-0,56	-0,45	0,59	-0,68	0,27	0,73	-0,47	-0,07	-0,59	0,55	-0,59	-0,70	-0,62	0,29
M	0,00	0,67	0,71	-0,73	1,00	0,60	0,80	-0,67	0,88	-0,62	-0,49	0,41	-0,20	0,31	-0,12	0,30	0,76	0,17	0,07
L	-0,31	0,70	0,69	-0,56	0,60	1,00	0,31	-0,60	0,70	-0,50	-0,58	0,39	-0,12	0,40	-0,34	0,54	0,79	0,35	0,10
K	-0,08	0,58	0,56	-0,45	0,80	0,31	1,00	-0,67	0,83	-0,57	-0,36	0,49	-0,13	0,20	-0,05	0,14	0,62	0,07	-0,06
J	0,13	-0,72	-0,58	0,59	-0,67	-0,60	-0,67	1,00	-0,73	0,44	0,72	-0,58	0,05	-0,43	0,42	-0,23	-0,63	-0,31	0,02
I	-0,14	0,78	0,75	-0,68	0,88	0,70	0,83	-0,73	1,00	-0,72	-0,56	0,57	-0,04	0,31	-0,25	0,49	0,91	0,33	-0,13
H	-0,14	-0,30	-0,40	0,27	-0,62	-0,50	-0,57	0,44	-0,72	1,00	0,04	-0,30	0,08	0,15	-0,26	-0,02	-0,60	0,11	-0,31
G	0,47	-0,87	-0,70	0,73	-0,49	-0,58	-0,36	0,72	-0,56	0,04	1,00	-0,62	-0,07	-0,78	0,82	-0,58	-0,66	-0,71	0,45
F	-0,35	0,45	0,22	-0,47	0,41	0,39	0,49	-0,58	0,57	-0,30	-0,62	1,00	0,61	0,67	-0,67	0,31	0,44	0,55	-0,18
E	-0,04	-0,18	-0,47	-0,07	-0,20	-0,12	-0,13	0,05	-0,04	0,08	-0,07	0,61	1,00	0,27	-0,47	0,17	-0,11	0,49	-0,22
D	-0,62	0,54	0,36	-0,59	0,31	0,40	0,20	-0,43	0,31	0,15	-0,78	0,67	0,27	1,00	-0,84	0,42	0,36	0,69	-0,27
C	0,46	-0,54	-0,29	0,55	-0,12	-0,34	-0,05	0,42	-0,25	-0,26	0,82	-0,67	-0,47	-0,84	1,00	-0,62	-0,34	-0,87	0,56
B	-0,39	0,65	0,55	-0,59	0,30	0,54	0,14	-0,23	0,49	-0,02	-0,58	0,31	0,17	0,42	-0,62	1,00	0,64	0,77	-0,58
A	-0,28	0,87	0,84	-0,70	0,76	0,79	0,62	-0,63	0,91	-0,60	-0,66	0,44	-0,11	0,36	-0,34	0,64	1,00	0,49	-0,28
površina	-0,47	0,55	0,35	-0,62	0,17	0,35	0,07	-0,31	0,33	0,11	-0,71	0,55	0,49	0,69	-0,87	0,77	0,49	1,00	-0,64
MDA	0,23	-0,39	-0,23	0,29	0,07	0,10	-0,06	0,02	-0,13	-0,31	0,45	-0,18	-0,22	-0,27	0,56	-0,58	-0,28	-0,64	1,00

Z upoštevanjem FTIR spektrov in glivnih površin lahko ugotovimo, da so se izpostavitve glive *Fusarium oxysporum* razdelile v 3 skupine. V prvo skupino sodijo izpostavitve z listnimi ekstrakti, v drugo izpostavitve z ekstrakti vršičkov, kontrola pa je ločena od obeh skupin (Slika 56).



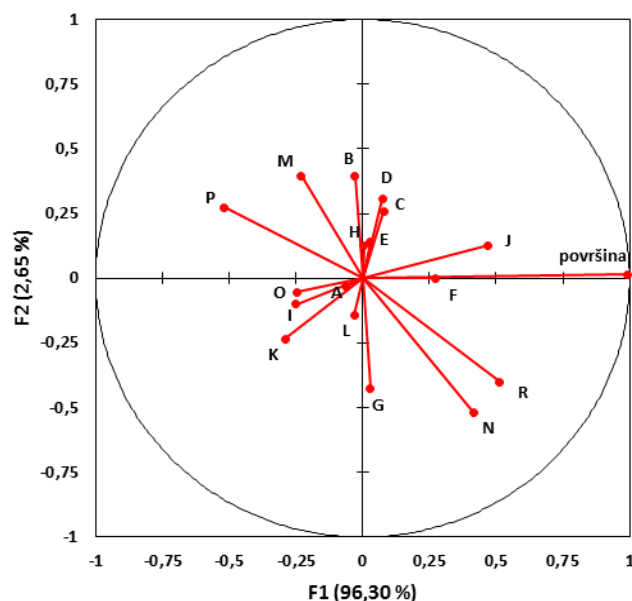
Slika 56: Razsevni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavitv pri glivi *Fusarium oxysporum*.

4.6.5.2 Diskriminantna analiza pri glivi *Botrytis* sp.

Grafikon korelacij FTIR trakov prikazuje, katere spremenljivke (FTIR trakovi, površina) najbolj vplivajo na razlike med vzorci. Po funkciji F1 se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrednostih površine in zvišanih vrhovih J in R ter po znižanih vrhovih P, K in I. Po funkciji F2 pa se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrhovih M, B, D in po znižanih spremenljivkah N, G in R. Funkciji F1 in F2 razložita kar 98,95 % razlik med vzorci, največji delež razlike pa je prispevala površina rasti gliv (Preglednica 7, Slika 57).

Preglednica 7: Korelacije med funkcijama F1 in F2 in spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive *Botrytis* sp., rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Spremenljivka	F1	F2
R	0,515	-0,400
P	-0,518	0,273
O	-0,247	-0,054
N	0,415	-0,517
M	-0,230	0,396
L	-0,032	-0,141
K	-0,290	-0,234
J	0,471	0,126
I	-0,249	-0,101
H	0,004	0,128
G	0,030	-0,426
F	0,273	0,000
E	0,029	0,142
D	0,074	0,309
C	0,078	0,260
B	-0,028	0,393
A	-0,062	-0,031
površina	0,993	0,015



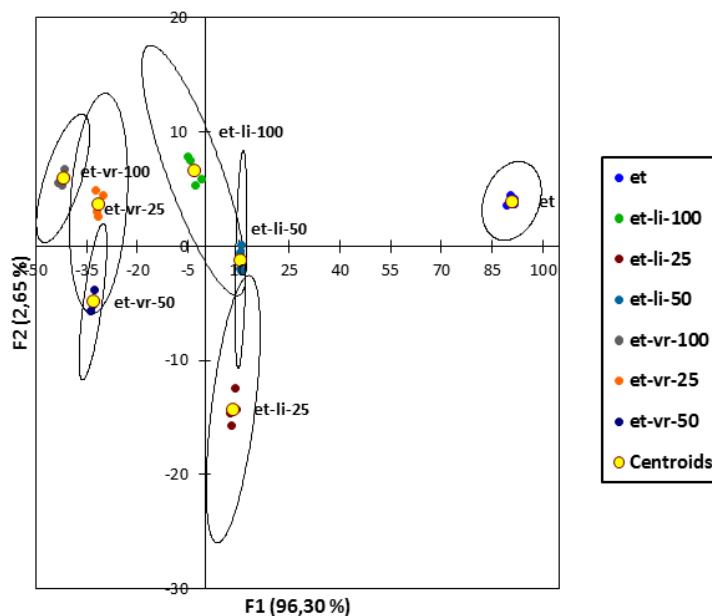
Slika 57: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive *Botrytis* sp., rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Ker smo želeli ugotoviti, na katere skupine molekul imajo največji vpliv etanolni ekstrakti navadne konoplje pri glivi *Botrytis* sp., smo naredili še multivariantno statistično analizo (Preglednica 8). Pri povečani glivni rasti se je statistično značilno povečala višina vrhov J in R. V obratnem sorazmerju z glivno rastjo pa so višine vrhov P in K.

Preglednica 8: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive *Botrytis* sp. Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.

Spremenljivke	R	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	površina
R	1,00	-0,52	-0,33	0,65	-0,55	0,02	0,06	0,10	-0,11	-0,17	0,32	0,13	-0,32	-0,11	-0,24	-0,37	-0,21	0,46
P	-0,52	1,00	0,35	-0,59	0,24	-0,16	-0,13	0,16	-0,22	0,27	-0,26	-0,52	0,03	0,13	0,10	0,01	-0,07	-0,53
O	-0,33	0,35	1,00	-0,74	0,53	-0,51	-0,29	0,30	-0,41	0,00	-0,24	-0,43	0,01	0,34	-0,07	0,26	-0,24	-0,24
N	0,65	-0,59	-0,74	1,00	-0,76	0,54	0,37	-0,21	0,36	0,02	0,46	0,39	0,02	-0,30	-0,09	-0,45	0,27	0,39
M	-0,55	0,24	0,53	-0,76	1,00	-0,33	-0,06	-0,01	-0,01	-0,04	-0,26	-0,16	0,07	0,38	-0,18	0,18	0,10	-0,21
L	0,02	-0,16	-0,51	0,54	-0,33	1,00	0,81	-0,58	0,86	0,57	0,30	0,49	0,49	-0,06	0,17	-0,34	0,82	-0,05
K	0,06	-0,13	-0,29	0,37	-0,06	0,81	1,00	-0,66	0,87	0,44	0,41	0,41	0,37	0,06	-0,01	-0,38	0,79	-0,31
J	0,10	0,16	0,30	-0,21	-0,01	-0,58	-0,66	1,00	-0,83	-0,08	0,10	-0,17	-0,02	0,26	0,29	0,39	-0,41	0,47
I	-0,11	-0,22	-0,41	0,36	-0,01	0,86	0,87	-0,83	1,00	0,32	0,22	0,47	0,39	-0,11	0,01	-0,31	0,79	-0,25
H	-0,17	0,27	0,00	0,02	-0,04	0,57	0,44	-0,08	0,32	1,00	-0,11	0,12	0,54	0,40	0,16	-0,15	0,53	-0,01
G	0,32	-0,26	-0,24	0,46	-0,26	0,30	0,41	0,10	0,22	-0,11	1,00	0,36	0,17	-0,05	0,25	0,01	0,39	0,00
F	0,13	-0,52	-0,43	0,39	-0,16	0,49	0,41	-0,17	0,47	0,12	0,36	1,00	0,07	-0,36	0,58	0,31	0,41	0,27
E	-0,32	0,03	0,01	0,02	0,07	0,49	0,37	-0,02	0,39	0,54	0,17	0,07	1,00	0,55	0,24	0,00	0,64	0,04
D	-0,11	0,13	0,34	-0,30	0,38	-0,06	0,06	0,26	-0,11	0,40	-0,05	-0,36	0,55	1,00	-0,23	-0,17	0,19	0,06
C	-0,24	0,10	-0,07	-0,09	-0,18	0,17	-0,01	0,29	0,01	0,16	0,25	0,58	0,24	-0,23	1,00	0,67	0,11	0,09
B	-0,37	0,01	0,26	-0,45	0,18	-0,34	-0,38	0,39	-0,31	-0,15	0,01	0,31	0,00	-0,17	0,67	1,00	-0,26	0,03
A	-0,21	-0,07	-0,24	0,27	0,10	0,82	0,79	-0,41	0,79	0,53	0,39	0,41	0,64	0,19	0,11	-0,26	1,00	-0,08
površina	0,46	-0,53	-0,24	0,39	-0,21	-0,05	-0,31	0,47	-0,25	-0,01	0,00	0,27	0,04	0,06	0,09	0,03	-0,08	1,00

Z upoštevanjem FTIR spektrov in površin rasti glive lahko ugotovimo, da so se obravnave glive *Botrytis* sp. razdelile v več skupin. V prvo skupino sodijo obravnave z ekstrakti iz vršičkov. V drugo skupino bi lahko združili obravnave z listnimi ekstrakti, čeprav niso tako skupaj kot izpostavitve z izvlečki iz vršičkov. Kontrola pa je ločena od obeh skupin ekstraktov navadne konoplje (Slika 58).



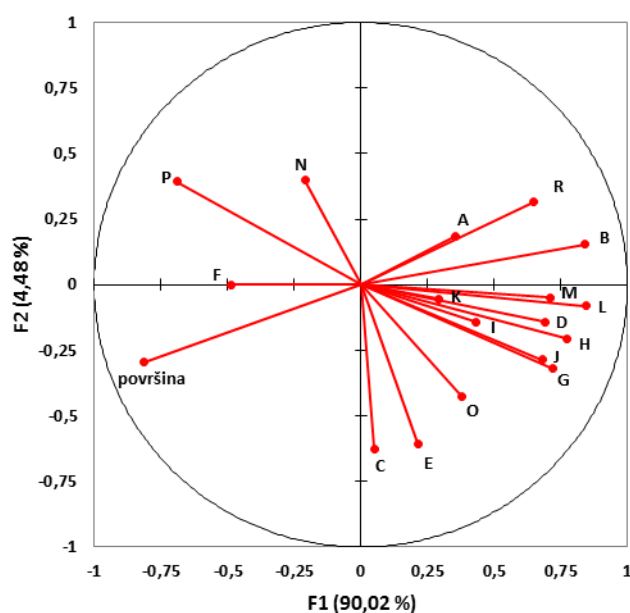
Slika 58: Razsewni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavitev pri glivi *Botrytis* sp.

4.6.5.3 Diskriminantna analiza pri glivi *Verticillium nonalfalfae*

Grafikon korelacij FTIR trakov prikazuje, katere spremenljivke (FTIR trakovi, površina) najbolj vplivajo na razlike med vzorci. Po funkciji F1 se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrhovih L B in H ter po znižanih vrednostih površin in vrhov P in F. Po funkciji F2 pa se vzorci najbolj razlikujejo po značilno zvišanih vrhovih N, P, R in po znižanih spremenljivkah C, E in O. Funkciji F1 in F2 razložita kar 94,50 % razlik med vzorci (Preglednica 9, slika 59).

Preglednica 9: Korelacije med funkcijama F1 in F2 ter spremenljivkami (intenzitete trakov amidno-karbohidratnega dela FTIR spektra, površina rasti) vzorcev glive *Verticillium nonalfalfae*, rastle na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Spremenljivka	F1	F2
R	0,648	0,314
P	-0,690	0,393
O	0,380	-0,427
N	-0,208	0,397
M	0,709	-0,049
L	0,844	-0,080
K	0,292	-0,054
J	0,682	-0,285
I	0,431	-0,141
H	0,773	-0,205
G	0,723	-0,320
F	-0,487	0,000
E	0,215	-0,605
D	0,689	-0,142
C	0,050	-0,625
B	0,838	0,153
A	0,357	0,187
površina	-0,813	-0,296



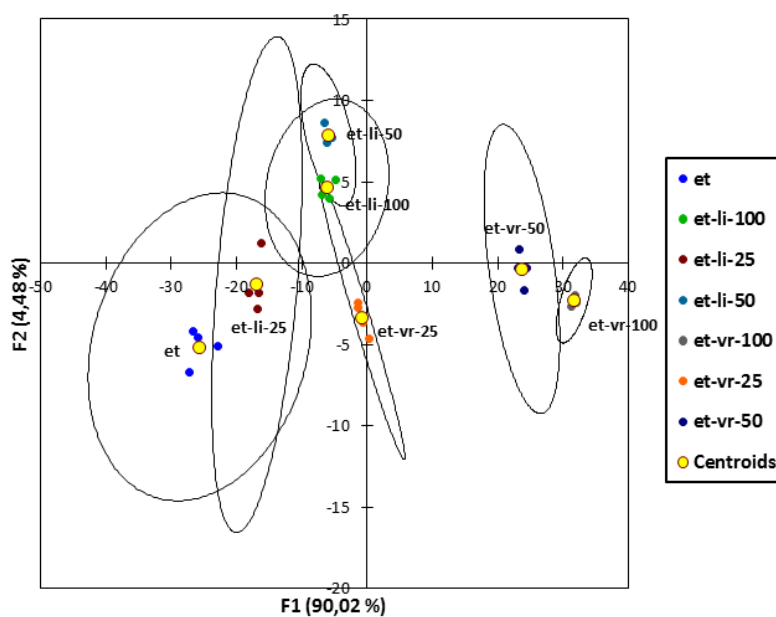
Slika 59: Grafikon korelacijskih spremenljivk (FTIR trakovi, površina rasti) v ravnini prvih dveh diskriminantnih spremenljivk, dobljenih pri diskriminantni analizi vzorcev glive *Verticillium nonalfalfae*, rastli na različnih koncentracijah etanolnih ekstraktov navadne konoplje.

Da bi ugotovili, na katere skupine molekul imajo največji vpliv etanolni ekstrakti navadne konoplje pri glivi *Verticillium nonalfalfae*, smo naredili še multivariantno statistično analizo (Preglednica 10). Pri povečani glivni rasti se je statistično značilno povečala višina vrhov F in P. V obratnem sorazmerju z glivno rastjo pa so višine vrhov R in B.

Preglednica 10: Korelacijska statistična analiza trakov amidno-karbohidratnega FTIR spektra in površine rasti glive *Verticillium nonalfalfae*. Prikazan je Pearsonov korelacijski koeficient.

Spremenljivke	R	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	površina
R	1,00	-0,43	-0,07	-0,20	0,49	0,40	0,36	0,23	0,15	0,41	0,39	-0,53	-0,20	0,28	-0,19	0,52	0,31	-0,86
P	-0,43	1,00	-0,51	0,37	-0,44	-0,65	-0,20	-0,62	-0,40	-0,58	-0,86	0,52	-0,66	-0,74	-0,45	-0,44	-0,04	0,36
O	-0,07	-0,51	1,00	-0,61	0,49	0,55	0,04	0,64	0,21	0,40	0,56	-0,43	0,59	0,20	-0,06	0,34	0,18	0,01
N	-0,20	0,37	-0,61	1,00	-0,15	-0,14	-0,01	-0,27	0,24	-0,22	-0,46	0,59	-0,32	0,00	-0,09	-0,01	0,19	0,11
M	0,49	-0,44	0,49	-0,15	1,00	0,80	0,42	0,77	0,69	0,71	0,40	-0,19	0,21	0,28	-0,31	0,76	0,68	-0,58
L	0,40	-0,65	0,55	-0,14	0,80	1,00	0,25	0,81	0,60	0,89	0,73	-0,40	0,50	0,62	-0,07	0,83	0,48	-0,56
K	0,36	-0,20	0,04	-0,01	0,42	0,25	1,00	0,08	0,32	0,40	-0,03	0,21	-0,08	-0,08	-0,03	0,54	0,39	-0,42
J	0,23	-0,62	0,64	-0,27	0,77	0,81	0,08	1,00	0,65	0,69	0,69	-0,35	0,56	0,64	0,07	0,64	0,43	-0,33
I	0,15	-0,40	0,21	0,24	0,69	0,60	0,32	0,65	1,00	0,50	0,31	0,17	0,38	0,48	0,14	0,56	0,68	-0,24
H	0,41	-0,58	0,40	-0,22	0,71	0,89	0,40	0,69	0,50	1,00	0,65	-0,33	0,45	0,56	0,04	0,76	0,33	-0,61
G	0,39	-0,86	0,56	-0,46	0,40	0,73	-0,03	0,69	0,31	0,65	1,00	-0,77	0,68	0,78	0,35	0,44	0,04	-0,38
F	-0,53	0,52	-0,43	0,59	-0,19	-0,40	0,21	-0,35	0,17	-0,33	-0,77	1,00	-0,30	-0,37	0,06	-0,18	0,06	0,40
E	-0,20	-0,66	0,59	-0,32	0,21	0,50	-0,08	0,56	0,38	0,45	0,68	-0,30	1,00	0,49	0,43	0,09	-0,07	0,21
D	0,28	-0,74	0,20	0,00	0,28	0,62	-0,08	0,64	0,48	0,56	0,78	-0,37	0,49	1,00	0,54	0,49	0,06	-0,35
C	-0,19	-0,45	-0,06	-0,09	-0,31	-0,07	-0,03	0,07	0,14	0,04	0,35	0,06	0,43	0,54	1,00	-0,17	-0,37	0,21
B	0,52	-0,44	0,34	-0,01	0,76	0,83	0,54	0,64	0,56	0,76	0,44	-0,18	0,09	0,49	-0,17	1,00	0,62	-0,71
A	0,31	-0,04	0,18	0,19	0,68	0,48	0,39	0,43	0,68	0,33	0,04	0,06	-0,07	0,06	-0,37	0,62	1,00	-0,38
površina	-0,86	0,36	0,01	0,11	-0,58	-0,56	-0,42	-0,33	-0,24	-0,61	-0,38	0,40	0,21	-0,35	0,21	-0,71	-0,38	1,00

Z upoštevanjem FTIR spektrov in površin rasti glive lahko ugotovimo, da so se izpostavitve glive *Verticillium nonalfalfae* niso tako lepo razdelile v skupine kot obravnave ostalih dveh gliv. V prvo skupino bi lahko uvrstili kontrolo in izpostavitve z najnižjo koncentracijo listnega ekstrakta. V naslednjo skupino sodita obravnavi z višjima koncentracijama izvlečkov iz listov. Prvima dvema skupinama je blizu še izpostavitve z najnižjo koncentracijo izvlečka iz vršičkov, medtem ko sta preostali dve obravnavi z izvlečki vršičkov precej oddaljeni od ostalih (Slika 60).



Slika 60: Razsewni grafikon, ki prikazuje razlikovanje posameznih izpostavit pri glivi *Verticillium nonalfalfae*.

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV TOPILA NA KONCENTRACIJO KANABINOIDOV V EKSTRAKTIH

V tej nalogi smo preverili, kako vpliva izbira topila na koncentracijo kanabinoidov v ekstraktih iz vršičkov in listov navadne konoplje ter kako ti ekstrakti vplivajo na rast gliv. Odločili smo se, da preverimo tri vrste topil: etanol, vodo in olje. Slednje smo izbrali zato, ker je bil eden izmed naših ciljev preveriti, kako bi lahko doma pripravljeni ekstrakti vplivali na rast gliv. Našteta topila se namreč nahajajo v veliki večini domov in bi lahko omogočila domačo pripravo ekstraktov za zatiranje glivičnih bolezni na rastlinah. Ugotovili smo, da so različna topila različno uspešna pri ekstrakciji kanabinoidov iz rastlinskega materiala. Za najmanj uspešno topilo se je izkazala voda, saj smo z njo uspeli ekstrahirati le kanabikromen, pa še to v precej manjši koncentraciji kot z ostalima dvema topiloma. Etanol in olje sta bila bistveno uspešnejša pri ekstrakciji kanabinoidov, saj smo z njima pridobili večje koncentracije teh sekundarnih metabolitov.

Z nobenim od ekstraktov nam ni uspelo ekstrahirati kanabigerola, kanabinola in Δ^8 -tetrahidrokanabinola (ali pa so bile njihove koncentracije pod mejo detekcije). To ni presenetljivo, saj je kanabigerolna kislina izhodiščna molekula, ključni intermediat, iz katerega s pretvorbami nastanejo preostali kanabinoidi. Zato je v rastlini težko najti večje količine CBG-A. Dejstvo, da v ekstraktih nismo zaznali kanabinola in Δ^8 -tetrahidrokanabinola, nam pove, da smo delali s svežim rastlinskim materialom, saj se ob staranju rastlinskega tkiva poveča količina kanabinola, v katerega se v procesu oksidacije pretvori tetrahidrokanabinol (Aizpurua-Olaizola in sod., 2016). Iz THC lahko nastane tudi Δ^8 -THC, ta pa se nato prav tako lahko pretvori v kanabinol, ki se torej lahko uporablja kot bioindikator starosti konopljinkega tkiva.

Največjo količino kanabidiolne kisline smo izmerili v etanolnem ekstraktu iz vršičkov, medtem ko smo največ kanabidiola izmerili v oljnem ekstraktu iz vršičkov. Prav slednji kanabinoid je bil količinsko najbolj zastopan, saj smo ga v oljnem ekstraktu izmerili v koncentraciji 1 mg/ml. Edini ekstrakt, v katerem smo izmerili Δ^9 -tetrahidrokanabinol, je bil etanolni ekstrakt iz vršičkov, medtem ko smo največje vrednosti Δ^9 -tetrahidrokanabinolne kisline in kanabikromena izmerili v oljnem ekstraktu iz vršičkov navadne konoplje. Pri vseh vrstah ekstraktov smo izmerili statistično značilno razliko med koncentracijo kanabinoidov v listih in vršičkih navadne konoplje. V vseh primerih smo večje vrednosti izmerili v ekstraktih vršičkov, kar je v skladu z ugotovitvami Głodowske in Łyszczowe (2016) ter Happyane in sod. (2013), ki navajajo, da največje koncentracije kanabinoidov vsebujejo smolnati izločki žleznih trihomov, ki se nahajajo na vršičkih konoplje.

S tem smo potrdili našo hipotezo, da bomo večje koncentracije kanabinoidov izmerili v ekstraktih iz vršičkov kot v listnih ekstraktih. Moramo pa delno zavrniti drugo hipotezo o vrsti kanabinoidov, ki smo jih pričakovali v ekstraktih, saj smo poleg pričakovanih kanabinoidov (kanabidiolna kislina, kanbidiol in kanabikromen) v ekstraktih izmerili še Δ^9 -tetrahidrokanabinol in Δ^9 -tetrahidrokanabinolno kislino. Pri primerjavi koncentracije kanabinoidov v frakciji po prvem in po drugem koraku ekstrakcije smo ugotovili, da s prvim korakom ekstrahiramo večino kanabinoidov in da se drugega koraka ne splača izvajati.

V neobdelani, sveži konoplji se kanabinoidi ponavadi nahajajo v obliki nestabilne kisline, nato pa se z neencimsko dekarboksilacijo pretvorijo v nevtralne oblike. Ta proces se dogaja znotraj rastline, v večji meri pa se zgodi, kadar je požeti rastlinski material izpostavljen svetlobi, toploti pri kajenju ali pa pri pečenju (Mechoulam in Ben-Shabat, 1999; Romano in Hazekamp, 2013; Wang in sod., 2016).

V sami magistrski nalogi smo primerjali tudi koncentracijo kanabinoidov v konoplji, ki je rastla na polju, in konoplji, ki smo jo vzgojili v laboratoriju. Koncentracije kanabinoidov so bile v konoplji s polja statistično značilno večje od koncentracije kanabinoidov v laboratorijski konoplji. Od vseh kanabinoidov, ki smo jih izmerili, je bilo v laboratorijski konoplji več le Δ^9 -tetrahidrokanabinolne kisline. Če pa primerjamo skupno koncentracijo Δ^9 -THC-A in Δ^9 -THC, pa je ta bistveno večja v konoplji s polja. To pomeni, da se je na polju veliko več Δ^9 -THC-A pretvorilo v aktivno obliko Δ^9 -THC, verjetno zaradi vpliva svetlobe in toplote. Večje koncentracije kanabinoidov v konoplji s polja so povsem v skladu s pričakovanji, saj je bila konoplja na polju bolj izpostavljena stresu, predvsem pa je imela na voljo več svetlobe in energije za sintezo kanabinoidov kot laboratorijska konoplja. Za sekundarne metabolite, kot so tudi kanabinoidi, je namreč značilno, da se sintetizirajo ob neugodnih razmerah, ob stresu. O tem piše tudi Pale (1999), ki je ob neugodnih razmerah za rast konoplje izmeril večjo tvorbo Δ^9 -tetrahidrokanabinola.

V magistrski nalogi smo tudi preverili vpliv avtoklaviranja na koncentracijo kanabinoidov v oljnih ekstraktih. Ugotovili smo, da avtoklaviranje ni imelo statističnega vpliva na koncentracijo kanabidiolne kisline in kanabidiola. To lahko pripišemo dejstvu, da 20 minut pri 121 °C ni dovolj, da bi prišlo do dekarboksilacije kanabidiolne kisline. Za dekarboksilacijo naj bi bila namreč potrebna višja temperatura, Romano in Hazekamp (2013) sta odkrila, da 30-minutno segrevanje pri 145 °C zadostuje za popolno pretvorbo Δ^9 -THC-A v Δ^9 -THC. Po avtoklaviranju se je nekoliko povečala koncentracija kanabikromena, pojavila pa se je tudi Δ^9 -THC-A. Do tega je lahko prišlo zaradi povečanja temperature, ta je morda vplivala na raztapljanje kanabinoidov, ki so pred avtoklaviranjem mogoče zavzemali obliko kristalov.

5.2 VPLIV EKSTRAKTOV NA RAST GLIV

Najprej smo preverjali, kako na glive delujejo etanolni ekstrakti. Izkazalo se je, da so ti ekstrakti zelo učinkoviti, saj so zmanjšali rast vseh osmih gliv, ki smo jih uporabili v tem poskusu. Bolj kot listni ekstrakti so bili pričakovani učinkoviti ekstrakti iz vršičkov, saj so ti vsebovali višje koncentracije kanabinoidov. Ekstrakti so najbolj zavirali rast glive *Botrytis* sp., saj je prišlo do 71-odstotne inhibicije rasti v primerjavi s kontrolo. Dobro so zavirali tudi rast gliv *Fusarium oxysporum*, *Epicoccum nigrum*, *Botrytis cinerea* in *Botrytis cinerea* II, medtem ko so nekoliko manj inhibirali rast gliv *Alternaria alternata*, *Verticillium dahliae* in *Verticillium nonalfalfae*. Glede na rezultate inhibicije glivne rasti etanolnih ekstraktov in povezanost gliv z našim okoljem smo potem podrobno testirali tri glive: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis* sp. in *Verticillium nonalfalfae*.

Gliva *Fusarium oxysporum* povzroča venenje in gnitje velikega števila gospodarsko pomembnih rastlin in je zaradi tega ena izmed najbolj škodljivih fitopatogenih gliv. Mi smo preverili, kako vplivajo konopljeni ekstrakti iz treh različnih topil na rast našega izolata glive *Fusarium oxysporum*. Najbolj učinkovito topilo za pripravo ekstraktov je bil etanol, saj nam je pri teh ekstraktih uspelo dobiti prek 40-odstotno inhibicijo rasti glive pri koncentraciji izvlečka iz vršičkov 100 g/l. Ti podatki se skladajo s študijo Tapwala in sod. (2011), kjer je navadna konoplja izmed petih rastlin najbolj zavirala rast glive *Fusarium oxysporum* s prek 40-odstotno inhibicijo, zanimivo pa je to, da so delali z vodnimi ekstrakti. Kot že rečeno, voda pri nas ni bila primerno topilo, saj nam z njo ni uspelo ekstrahirati skoraj nič kanabinoidov in posledično nismo dobili nobene omembe vredne inhibicije rasti glive *Fusarium oxysporum*. Pal in Kumar (2013) sta tudi preverjala vpliv različnih ekstraktov na rast te glive. Zelo dobro so rast inhibirali acetonski, etil acetatni in metanolni ekstrakti, pri slednjem je bila inhibicija kar 84-odstotna. Podobna inhibicija glive *Fusarium oxysporum* je bila opažena tudi pri acetonskem ekstraktu rastline *Ageratum conyzoides* (Pal in Kumar, 2013). Tudi zelo koncentrirani etanolni ekstrakti rastline *Rhus muelleri* so pokazali dobro inhibicijo rasti zgoraj omenjene glive (Jasso de Rodríguez in sod., 2015).

Naši oljni ekstrakti pa so že sami po sebi očitno zavirali rast glive, saj je na slednjih gliva dosegla najmanjše površine. Kljub veliki vsebnosti kanabinoidov v olju, pa očitno ti niso imeli neposrednega vpliva na rast gliv. Ena izmed možnosti je, da so se vezali na olje in tako niso bili v aktivni obliki ter direktni interakciji z glivo.

Gliva *Botrytis cinerea* okužuje številne rastlinske vrste, med drugim povzroča tudi sivo grozdno plesen. Naš izolat *Botrytis* sp. se je različno odzval na konopljne ekstrakte. Največjo inhibicijo rasti smo ponovno izmerili pri etanolnih ekstraktih, kjer je izvleček iz vršičkov v koncentraciji 100 g/l skoraj za $\frac{3}{4}$ zmanjšal rast glive v primerjavi s kontrolo. To je tudi naša največja izmerjena inhibicija rasti katere koli glive pri kakršnikoli vrsti

ekstrakta. Da gre za res veliko stopnjo inhibicije, nam pove tudi dejstvo, da so Choi in sod. (2004) večjo stopnjo inhibicije rasti glive *Botrytis cinerea* izmerili le pri treh vrstah rastlinskih ekstraktov izmed 57 testiranih rastlin. Popolnoma pa je rast glive zavrl ekstrakt rastline *Hyssopus officinalis* L. (Šesan in sod., 2015). Olje in voda se tako kot pri glivi *Fusarium oxysporum* nista izkazala kot topili, s katerima bi lahko pridobivali konopljine ekstrakte za zatiranje sive plesni.

Zadnja izmed testiranih gliv pa je bila *Verticillium nonalfalfae*, ki tudi v Sloveniji povzroča uvelost hmelja. Tudi pri tej glivi smo opazili, da so njeno rast najbolj zavirali etanolni ekstrakti. Najmanjšo površino je gliva dosegla na najvišji koncentraciji ekstrakta iz vršičkov. Inhibicija rasti pa je bila medtem manjša kot pri zgoraj omenjenih glivah, kar je mogoče povezati s tem, da *Verticillium* okužuje hmelj, ki spada v isto družino rastlin kot konoplja, kar pomeni, da sta si omenjeni rastlini do določene stopnje podobni in tako je gliva nanje lahko delno prilagojena. Pri inhibiciji rasti glive *Verticillium* sp. so bili dosti uspešnejši Al-Mughrabi in sod. (2001), saj so z nekaterimi oljčnimi ekstrakti popolnoma zavirali rast glive. Med posameznimi vodnimi ekstrakti ni opaznih razlik v priraščanju glive, kar nam ne pove le, da nam z vodo ni uspelo ekstahirati kanabinoidov, temveč tudi, da očitno nismo ekstrahirali nobenih drugih molekul, ki bi lahko zavirale rast glive. Hazekamp in sod. (2007) so proučevali koncentracijo THC in THC-A v čaju in ugotovili, da sta se tudi tam ta dva kanabinoida nahajala v zelo majhnih koncentracijah (med 0,01 in 0,043 mg/ml). Koncentraciji se nista povečali niti ob dodatku večje količine konoplje, kar nakazuje na nasičenost vodne raztopine že pri nizkih koncentracijah THC. Tudi olje se v našem poskusu ni izkazalo za učinkovito, saj se obravnave s konopljinimi ekstrakti le malo razlikujejo od kontrole. So pa vrednosti površin glive na oljnih ekstraktih manjše od le teh na vodnih ekstraktih, kar ponovno kaže na to, da olje že samo po sebi zavira rast gliv, medtem ko kanbinoidi, ki smo jih izmerili v ekstraktih, očitno ne pridejo do interakcije z glivo, kot se to očitno zgodi pri etanolu. Mogoče bi bilo bolje, če bi oljne ekstrakte dodali kar v gojišče pred samim avtoklaviranjem.

Pri vseh glivah smo največjo inhibicijo rasti dobili pri etanolnih ekstraktih. Očitno je etanol najprimernejše od testiranih topil, saj so poleg tega, da so imeli visoke vsebnosti kanabinoidov, etanolni ekstrakti dobro zavirali tudi rast gliv. Voda se v našem primeru sploh ni izkazala za učinkovito, mogoče bi bilo drugače, če bi liste in vršičke dalj časa pustili namočene v vodi. Olje se je izkazalo za primerno topilo za ekstrakcijo kanabinoidov, vendar pa v stiku z glivo ni prišlo do take inhibicije rasti kot pri etanolnih ekstraktih. Ob vsem tem moramo ovreči našo hipotezo, da bodo ekstrakti navadne konoplje zavirali rast vseh izbranih potencialno patogenih gliv. Dobro so rast zavirali le etanolni ekstrakti, oljni so to nalogo opravljali slabo, vodni pa prav posebej slabo. Torej je ob vrsti in koncentraciji ekstrakta zelo pomembno topilo, s katerim ekstrakte pripravljamo. Med koncentracijami kanabinoidov v oljnih ekstraktih in površino rasti glive nismo našli nobenih statistično značilnih korelacij, medtem ko smo pri etanolnih ekstraktih pri vsaki

glivi našli dve linearni povezanosti koncentracije kanabinoida z rastjo gliv. Z rastjo gliv *Fusarium oxysporum* in *Botrytis* sp. sta negativno korelirala koncentraciji kanabidiola in Δ^9 -tetrahidrokanbinola. To pomeni, da večja kot je bila koncentracija omenjenih spojin, manjšo površino sta glivi prerastli. Negativno linearno povezanost smo odkrili tudi med koncentracijo kanabidiolne kisline in kanabidiola z rastjo glive *Verticillium nonalfalfae*. Glede na to, da je vsem trem glivam skupno, da je njihova površina negativno korelirala s koncentracijo kanabidiola, lahko zaključimo, da je to ključni kanabinoid, ki je v naši poskusih zaviral rast gliv. V literaturi nismo našli podatkov o tem, kateri kanabinoid najbolj zavira rast gliv, znano pa je, da tako kanabidiol kot tudi tetrahidrokanbinol dobro inhibirata rast na meticilin odporne bakterije *Staphylococcus aureus* (Appendino in sod., 2008). Za nedvoumno potrditev našega zaključka pa bi bilo potrebno zastaviti nove poskuse, pri katerih bi namesto konopljinih ekstraktov uporabili posamezne čiste kanabinoide.

5.3 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Po pregledu rezultatov testov lipidne peroksidacije, s katerim smo določali koncentracijo sekundarnega produkta oksidacije maščobnih kislin, imenovanega malondialdehid, lahko vidimo, da smo prečakovane rezultate dobili le pri glivi *Fusarium oxysporum*, pri ostalih meritvah MDA pa je očitno prišlo do interference pri meritvah. Verjetno so druge glive vsebovale snovi, ki so vplivale na absorpcijo svetlobe vzorca, tako da lahko zaključimo, da uporabljena metoda v našem primeru ni bila najbolj primerna za merjenje stresa v glivah. Rezultati lipidne peroksidacije namreč niso v korelaciji s površino rasti gliv, saj bi pričakovali, da so bile glive, ki so prerastle najmanjšo površino, pod največjim oksidativnim stresom. Kovačec in sod. (2017) so namreč izmerili najvišjo koncentracijo MDA pri obravnavi glive *Alternaria alternata* z bakrovimi nanodelci, na katerih je gliva prerastla najmanjšo površino. To ne pomeni, da je s samo metodo v našem primeru kaj narobe, temveč pomeni to, da za naše teste ni bila optimalna metoda, saj nam z njo ni uspelo izmeriti statistično značilnega stresnega odziva gliv na različne koncentracije kanabinoidov v konopljinih ekstraktih. Tudi Dotan in sod. (2004) so potrdili, da oksidativnega stresa ne moremo univerzalno potrditi z eno metodo. Mogoče bi bilo za naše poskuse bolje, če bi merili stres prek peroksidacije proteinov, DNK poškodb, ali pa bi spremljali koncentracije reaktivnih kisikovih zvrsti in antioksidantov.

5.4 FTIR

S FTIR analizo smo želeli ugotoviti spremenjene biomolekularne profile v glivah, obravnavanih z različnimi ekstrakti. Ker so etanolni ekstrakti ekstrahirali največ različnih kanabinoidov in ker so ti ekstrakti najboljše od vseh zavirali rast proučevanih potencialno

patogenih gliv, smo se odločili, da se bomo pri razpravi osredotočili le na rast gliv na etanolnih ekstraktih.

Pri glivi *Fusarium oxysporum* smo s pomočjo diskriminantne analize ugotovili, da so na razlike med vzorci najbolj vplivali naslednji povišani vrhovi amidno-karbohidratnega dela spektra: vrh ogljikovih hidratov pri $1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$, vrh estrskih skupin lipidov ($1740\text{--}1745\text{ cm}^{-1}$) in glikogenski vrh ($10751\text{--}080\text{ cm}^{-1}$). Od značilno znižanih vrhov pa so najbolj odstopali: vrh aromатов ($1515\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$), vrh ogljikovih hidratov ($1110\text{--}1115\text{ cm}^{-1}$) in vrh hitina ($1375\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$). Razsevni grafikon nam je pokazal, da se glive izpostavljene sedmim različnim ekstraktom (6 in kontrola) razdelijo v tri skupine glede na vrhove FTIR spektra in površinsko rast. Ugotovili smo, da so bili odzivi gliv na različne koncentracije listnih ekstraktov podobni, tako da so na grafikonu vse tri obravnave z listnimi izvlečki skupaj. Glive so se podobno odzvale tudi na različne koncentracije ekstraktov iz vršičkov in tako so tudi tri obravnave z izvlečki vršičkov skupaj na grafikonu. V tretji skupini pa so glive na kontroli, njihov odziv je čisto drugačen od preostalih dveh skupin. Tako smo tudi z analizo FTIR spektra potrdili, da so se glive različno odzvale na konopljne ekstrakte iz listov in vršičkov, kar je seveda pričakovano, saj smo v njih izmerili različne koncentracije kanabinoidov, poleg tega pa smo opazili tudi statistično značilne razlike v površini rasti glive *Fusarium oxysporum* na omenjenih ekstraktih. Ugotovili pa smo tudi, da površina rasti glive pozitivno korelira z vrhovoma B (estrške skupine lipidov) in D (aromatski sistemi). Negativno je korelirala z vrhovoma C (amidi I) in G (aromati). To pomeni, da smo ob povečani glivni rasti izmerili večje količine lipidnih estrov in aromatskih molekul ter manjše količine amidov I in aromатов pri $1515\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$. Ekstrakti torej zavirajo sintezo komponent membrane in nekaterih aromatskih molekul, poveča pa se sinteza amidov in drugih aromatskih molekul.

Na razlike med vzorci glive *Botrytis* sp. so najbolj vplivali povišani vrhovi amidno karbohidratnega dela FTIR spektra: vrh hitina ($1375\text{--}1380\text{ cm}^{-1}$), vrh ogljikovi hidrati ($990\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). ter površina glive. Od statistično značilno znižanih vrhov pa so najbolj odstopali: ogljikovi hidrati ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$), nukleinske kisline (1240 cm^{-1}) in proteini ($1410\text{--}1415\text{ cm}^{-1}$). Z razsevnim grafikonom pa smo ugotovili, da se izpostavitve glive *Botrytis* sp. prav tako kot pri glivi *Fusarium oxysporum* ločijo v tri skupine, le da je tukaj ločitev nekoliko manj jasna. V prvi skupini so obravnave z ekstrakti iz vršičkov, v drugi obravnave z listnimi ekstrakti, kontrola pa je ločena od ostalih. Ta ločitev je v skladu s koncentracijami kanabinoidov v ekstraktih in s preraščeno površino glive na ekstraktih, saj smo v ekstraktih vršičkov izmerili več kanabinoidov kot v listnih ekstraktih in zato je gliva prerastla manjšo površino gojišč. Odkrili smo tudi, da površina rasti glive *Botrytis* sp. pozitivno korelira z vrhovoma J (hitin) in R (ogljikovi hidrati) ter negativno z vrhovoma P (ogljikovi hidrati) in K (karboksilne skupine). To pomeni, da so glive ob povečani rasti vsebovale več hitina ter ogljikovih hidratov ($990\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) in manj karboksilnih skupin ter ogljikovih hidratov ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$). Ekstrakti torej zavrejo sintezo strukturnih

komponent, kot je hitin, manjša je tudi sinteza dela polisaharidov. Ob zmanjšani rasti pa se sintetizira več karboksilnih kislin in ogljikovih hidratov ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$).

Rezultati kažejo, da na razlike med vzorci glive *Verticillium nonalfalfae* najbolj vplivajo povišani vrhovi nukleinskih kislin ($1240\text{--}1245\text{ cm}^{-1}$), estrskih skupin lipidov ($1680\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$), karboksilnih kislin ($1455\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$) ter značilno znižane vrednosti površin gliv in vrhov ogljikovih hidratov ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$) ter amidov II ($1550\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$). Z razsevnim grafikonom smo ugotovili, da med izpostavitvami glive *Verticillium nonalfalfae* ni tako značilnih razlik kot pri prejšnjih dveh glivah. To lahko razložimo s tem, da tudi razlike v površini niso bile tako velike pri tej glivi kot pri njenih predhodnicah, saj očitno etanolni ekstrakti navadne konoplje nimajo tako velikega vpliva na glivo *Verticillium nonalfalfae*. Podobni sta si kontrola in obravnava z najmanjšo koncentracijo izvlečka iz listov, skupaj sodita tudi obravnavi z večjima koncentracijama izvlečka iz listov. Izpostavitvi z večjima koncentracijama izvlečka iz vršičkov sta si podobni in precej oddaljeni od ostalih pogojev, medtem ko je obravnava s 25 g/l izvlečka iz vršičkov bližje listnim izpostavitvam kot tistim iz vršičkov. To pomeni, da med listnimi ekstrakti in tistimi iz vršičkov v koncentraciji 25 g/l ni tako velikih razlik, se pa od teh izpostavitvev razlikujejo glive, ki so rastle na najvišjih koncentracijah izvlečkov iz vršičkov. Kot zadnje pa smo ugotovili, da sta pri povišani površini glive *Verticillium nonalfalfae* povišana vrhova amidov II in ogljikovih hidratov ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$) ter znižana vrhova ogljikovih hidratov ($990\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$) in estrskih skupin lipidov ($1680\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$). Ekstrakti torej zavirajo sintezo proteinov in dela molekul ogljikovih hidratov ($1035\text{--}1040\text{ cm}^{-1}$), ki so glavni energijski viri v celici. Konopljni ekstrakti pa spodbudijo sintezo polisaharidov in estrov, ki so gradniki celične membrane.

Na podlagi vseh teh rezultatov lahko zaključimo, da se je vsaka gliva na etanolne konopljne ekstrakte odzvala drugače, saj so pri vsaki glivi druge biomolekule v korelaciji s površino rasti gliv. Prav tako lahko potrdimo, da je metoda FTIR primerna za take študije, kot je naša, saj smo videli, da so se izpostavitve gliv ločile tudi na podlagi FTIR spektrov. Teh rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami, saj na tem področju nismo našli takšnih, ki bi primerjale FTIR spektre gliv, rastlih na različnih rastlinskih ekstraktih.

6 SKLEPI

Ekstrakti iz vršičkov navadne konoplje vsebujejo višje koncentracije kanabinoidov kot pa listni ekstrakti te rastline.

Tvorba sekundarnih rastlinskih metabolitov, kamor sodijo kanabinoidi, je v naravi večja kot v laboratorijskih pogojih.

Izbira topila ima velik vpliv na koncentracijo kanabinoidov v konopljinih ekstraktih. Izmed vseh treh testiranih topil je najučinkovitejši etanol, saj smo v njem detektirali največ različnih kanbinoidov, poleg tega pa so etanolni ekstrakti najbolj zavirali rast gliv.

Največji vpliv na površino rasti gliv ima koncentracija kanabinoida v etanolnih ekstraktih.

Voda in olje se kot topila za pripravo ekstraktov nista izkazali primerni za uporabo pri zaviranju rasti omenjenih treh gliv.

Lipidna peroksidacija v našem primeru ni primeren test za spremljanje stresnega odziva glive na ekstrakte iz navadne konoplje.

FTIR metoda je primerna za razlikovanje posameznih izpostavit, saj smo na podlagi FTIR spektrov dobili podobne si skupine izpostavit. Te skupine pa se skladajo s površinami rasti gliv in s koncentracijami kanabinoidov v ekstraktih, na katerih so rastle glive.

Etanolni ekstrakti navadne konoplje kažejo potencial, da bi jih uporabljali kot naravno sredstvo za zatiranje glivičnih bolezni na rastlinah.

7 POVZETEK

Zaradi večanja porabe fitofarmaceutskih sredstev in razvoja odpornosti pri povzročiteljih rastlinskih bolezni smo poskusili preveriti, kako bi enostavni ekstrakti navadne konoplje zavirali rast potencialno patogenih gliv, ki povzročajo številne rastlinske bolezni in s tem velike izgube pridelkov. Z vsakim topilom (etanol, voda, olje) smo pripravili po šest različnih ekstraktov iz listov in vršičkov navadne konoplje, pomerili koncentracije kanabinoidov v ekstraktih, nanесли ekstrakte na gojišča ter preverili njihov vpliv na rast gliv *Fusarium oxysporum*, *Botrytis* sp. in *Verticillium nonalfalfae*. Ugotovili smo, da so etanolni in oljni ekstrakti vsebovali največje koncentracije kanabinoidov, v vodnih ekstraktih pa je bilo teh snovi zelo malo. V ekstraktih sta od kanabinoidov prevladovala kanabidiolna kislina in kanabidiol. Najbolj se je rast gliv zmanjšala na etanolnih ekstraktih, najmanjše površine v primerjavi s kontrolo pa so glive prerastle na etanolnem ekstraktu s koncentracijo vršičkov 100 g/l. Od testiranih gliv je omenjeni ekstrakt najbolj zaviral rast glive *Botrytis* sp., saj smo izmerili kar prek 70-odstotno inhibicijo rasti. Pri vseh treh glivah, rastlih na etanolnih ekstraktih, smo ugotovili, da površina rasti negativno korelira s koncentracijo kanabidola. Z metodo lipidne peroksidacije smo želeli meriti stres v glivah, vendar se ta metoda v našem primeru ni izkazala za primerno. S FTIR metodo pa smo želeli zaznati spremembe v biomolekularnem profilu celic. Ugotovili smo, katere molekule so pri glivah manj in katere bolj izražene ob zmanjšani rasti. Prav tako smo ugotovili, da se različne izpostavitve gliv med seboj razlikujejo. Na podlagi vseh rezultatov lahko zaključimo, da ekstrakti navadne konoplje kažejo potencial, ki ga je potrebno še dodatno proučiti in preizkusiti, preden bi lahko ti pripravki prišli na trg in nadomestili umetne sintetične pripravke za zatiranje glivičnih bolezni na rastlinah.

8 VIRI

- Aizpurua-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E., Schibano D., Simsir Y., Navarro P., Etxebarria N., Usobiaga A. 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* šlants from different chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79: 324-331
- Aktar M.W., Sengupta D., Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2: 1-12
- Ali E.M.M., Almagboul A.Z.I., Khogali S.M.E., Gergeir U.M.A. 2012. Antimicrobial Activity of *Cannabis sativa* L. *Chinese Medicine*, 3: 61-64
- Al-Mughrabi K.I., Aburjai T.A., Anfoka G.H., Shahrour W. 2001. Antifungal activity of olive cake extracts. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 240-244
- Amar M.B. 2006. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 1-25
- Appendino G., Gibbons S., Giana A., Pagani A., Grassi G., Stavri M., Smith E., Rahman M.M. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: A structure-activity Study. *Journal of Natural Products*, 71: 1427-1430
- Baša Česnik H., Gregorčič A., Velikonja Bolta Š., Kmecl V. 2006. Monitoring of pesticide residues in apples, lettuce and potato of the Slovene origin, 2001-04. *Food Additives and Contaminants*, 23:164-173
- Bedini S., Flamini G., Cosci F., Ascrizzi R., Benelli G., Conti B. 2016. *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* essential oils as novel control tools against the invasive mosquito *Aedes albopictus* and fresh water snail *Physella acuta*. *Industrial Crops and Products*, 85: 318-323
- Beketov M.A., Kefford B.J., Schäferc R.B., Liess M. 2013. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 11039-11043
- Bundschuh M., Elsaesser D., Stang C., Schultz R. 2016. Mitigation of fungicide pollution in detention ponds and vegetatedditches within a vine-growing area in Germany. *Ecological Engineering*, 89: 121-130
- Bolognesi C., Merlo F.D. 2011. Pesticides: Human health effects. *Encyclopedia of Environmental Health*, 2011: 438-453
- Caliman F.A., Robu B.M., Smaranda C., Pavel V.L., Gavrilescu M. 2011. Soil and groundwáter clean-up: benefits and limits of emerging technologies. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 13: 241-268
- Callaway J.C. 2004. Hempseed as a nutritional resource, an overview. *Euphytica*, 140: 65-72
- Chaber R., Łach K., Depciuch J., Szmuc K., Michalak E., Raciborska A., Koziorowska A., Cebulski J. 2017. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy of paraffin anddeparaffinnized bone tissue samples as a diagnostic tool for Ewing sarcoma of bones. *Infrared Physics & Technology*, 85: 364-371

- Choi G. J., Jang K. S., Kim J. S., Lee S.W., Cho J.Y., Cho K. Y., Kim J. C. 2004. In vivo antifungal activities of 57 plant extracts against six plant pathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 3: 184-191
- Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A., Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277: 1-10
- Chovanová R., Mikulášová M., Vaverková Š. 2013. In vitro antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Microbiology*, 2013: 1-7
- Clarke R.C. 2002. Field interview schedule and questionnaire for investigating cannabis use. *Journal of Industrial Hemp*, 7: 83-88
- Copping L. G., Menn J. J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56: 651-676
- Dellavalle P.D., Cabrera A., Alem D., Larrañaga P., Ferreira F., Rizza M.D. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria SPP*. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71: 231-239
- Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43: 200-227
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. 2007. *Botrytis*: biology, pathology and control. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (ur.). 1. izd. Nizozemska, Springer Netherlands: 428 str.
- Elliott M. 1989. The pyrethroids: Early discovery, recent advances and the future. *Pesticide Science*, 27: 337-351
- FAO. 2017. Codex Alimentarius, Italija, The food and agriculture organization. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/en/> (22. Nov. 2017)
- Francel L.J., 2001. The disease triangle: A plant pathological paradigm revisited. *Plant Health Instructor*, The American Phytopathological Society. <https://www.apsnet.org/edcenter/instcomm/TeachingArticles/Pages/DiseaseTriangle.aspx> (22. nov. 2017)
- FURS. Fitofarmacevtska sredstva <http://spletni2.furs.gov.si/FFS/FFSCD/CD/FFS/S/E/PINUS/OGRIOL.pdf> (5. jan 2018)
- Gariyban L., Avashia N. 2014. Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1-6
- Gavrilescu M. 2009. Emerging processes for soil and groundwater cleanup – Potential benefits and risks. *Environmental Engineering and Management Journal*, 8: 1293-1307
- Głodowska M., Łyszcz M. 2016. *Cannabis sativa* L. and its antimicrobial properties – A review. *Strona*, 1:77-82

- Happyana N., Agnolet S., Muntendam R., Van Dame A., Schneider B., Kayser O. 2013. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87: 51-59
- Harris C.A., Renfrew M.J., Woolridge M.W. Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Additives and Contaminants*, 18: 1124-1129
- Hazekamp A., Bastola K., Rashidi H., Bender J., Verpoorte R. 2007. Cannabis tea revisited: A systematic evaluation of the cannabinoid composition of cannabis tea. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 85-90
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. 199. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604-611
- Isling L.K., Boberg J., Jacobsen P.R., Mandrup K.R., Axelstad M., Christiansen S., Vinggaard A.M., Taxvig C., Kortenkamp A., Hass U. 2014. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disrupters. *Reproduction*, 147: 465-476
- James C. Global food security.
<http://www.bspp.org.uk/icpp98/4/1GF.html> (1.dec. 2017)
- Jasso de Rodríguez D., Trejo-González F.A., Rodríguez-García R., Díaz-Jimenez M.L.V., Sáenz-Galindo A., Hernández-Castillo F.D., Villarreal-Quintanilla J.A., Pena-Ramos F.M. 2015. Antifungal activity in vitro of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Industrial Crops and Products*, 75: 150-158
- KGZS. 2017. Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Slovenija, Hmeljarstvo.
<http://www.kgzs.si/gv/kmetijstvo/rastlinska-pridelava/hmeljarstvo.aspx> (1. dec. 2017).
- Khan S., Imran M., Imran M., Pindari N. 2017. Antimicrobial activity of various ethanolic plant extracts against pathogenic multi drug resistant *Candida spp.* *Bioinformation* 13: 67-72
- Konstantinidou-Doltsinis S., Markellou E., Kasselaki A.M., Fanouraki M. N., Koumaki C. M., Schmitt A., Liopa-Tsakalidis A., Malathrakakis N.E. 2006. Efficacy of Milsana®, a formulated plant extract from *Reynoutria sachalinensis*, against powdery mildew of tomato (*Leveillula taurica*). *BioControl*, 51: 375-392
- Kovačec E., Regvar M., van Elteren J.T., Arčon I., Papp T., Makovec D., Vogel-Mikuš K. 2017. Biotransformation of copper oxide nanoparticles by the pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Chemosphere*, 180: 178-185
- Kovačec E., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2018. Karakterizacija patogenih gliv, izoliranih iz ajde. Ljubljana, Biotehniška fakulteta (osebni vir, 5. jan. 2018)
- Kumar Pal G., Kumar B., Shahi S.K. 2013. Antifungal activity of some common weed extracts against seedborne phytopathogenic fungi *Alternaria spp.* *International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences*, 3: 6-14
- Lammoglia S.K., Kennedy M.C., Barriuso E., Alletto L., Justes E., Munier-Jolain N., Mamy L. 2017. Assessing human health risks from pesticide use in conventional and

- innovative cropping systems with the BROWSE model. *Environment International*, 105: 66-78
- Lambert D. M., Fowler C. J. 2005 "The end cannabinoids system drug targets lead compounds and potential therapeutic application. *Journal of Medicinal Chemistry*, 16: 59-87
- Leadbeater A.J. 2014. Plant health management: Fungicides and Antibiotics. V: *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Van Alfen N.K. (ur.). London. Elsevier: 408-424
- Lecomte C., Alabouvette C., Edel-Hermann V., Robert F., Steinberg C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, 101: 17-30
- Martin K.J., Rygielwicz P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 5: 28-39
- McDougall P. 2016 The Cost of New agrochemical product discovery, development and registration in 1995, 2000, 2005-8 and 2010 to 2014. R&D expenditure in 2014 and expectations for 2019. CropLife America and the European Crop Protection Association
<https://www.croplifeamerica.org/resource/phillips-mcdougall-the-cost-of-new-agrochemical-product-discovery-development-and-registration-in-1995-2000-2005-8-and-2010-to-2014/> (22. nov 2017)
- McGrath M.T. 2004. What are Fungicides. The Plant Health Instructor, The American Phytopathological Society.
<https://www.apsnet.org/about/Pages/default.aspx> (22.nov. 2017)
- Mechoulam R., Ben-Shabat S. 1999. From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Natural Product Reports*, 16: 131-143
- Milevoj L. 1989. Buckwheat diseases. *Fagopyrum*, 9: 31-40
- Miller L.M., Bourassa M.W., Smith R.J. 2013. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828: 2339-2346
- Mohammad A.R. 2017. Canical.
<https://www.cannical.com/cannabis-101/cannabinoids/> (3.dec. 2017)
- Morillo E., Villaverde J. 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586: 576-597
- Mukhtar T. Kayanib M.Z., Hussain M.A. 2013. Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. *Industrial Crops and Products*, 42: 447- 453
- Nasrullah, Suliman, Rahman K., Ikram M., Nisar M., Khan I. 2012. Screening of antibacterial activity of medicinal plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 14: 25-29
- Naz R., Ayub H., Nawaz S., Islam Z.U.I., Yasmin T., Bano A., Wakeel A., Zia S., Roberts T.H. 2017. Antimicrobial activity, toxicity and antiinflammatory potential of

- methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *Complementary and Alternative Medicine*, 17: 1-13
- Nissen L., Zatta A., Stefanini I., Grandi S., Sgorbati B., Biavati B., Monti A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81: 413-419
- Niti C., Sunita S., Kamlesh K., Rakesh K. 2013. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17: 88-105
- Oates L., Cohen M., Braun L., Schembri A., Taskova R. 2014. Reduction in urinary organophosphate pesticide metabolites in adults after a week-long organic diet. *Environmental Research*, 132: 105–111
- Pal G.K., Kumar B. 2013. Antifungal activity of some common weed extracts against wiltcausing fungi, *Fusarium oxysporum*. *Current Discovery*, 2: 62-67
- Pal G.K., Kumar B., Shahi S.K. 2013. Antifungal activity of some common weed extracts against phytopathogenic fungi *Alternaria* spp. *International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences*, 3: 6-14
- Panebianco A., Castello I., Cirvilleri G., Perrone G., Epifani F., Ferrara M., Polizzi G., Walters D.R., Vitale A. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection*, 77: 65-73
- Pate D.W. 1999. The phytochemistry of Cannabis: its ecological and evolutionary implications. V: *Advances in hemp research*. Ranalli P. (ur.). New York, Haworth Press: 21–42
- Perrier X., De Langhe E., Donohue M., Lentfer C., Vrydaghs L., Bakry F., Carreel F., Hippolyte I., Horry J.-P., Jenny C., Lebot V., Risterucci A.M., Tomekpe K., Doutrelepont H., Ball T., Manwaring J., de Maret P., Denham T. 2011. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 11311–11318
- Ploetz R.C. 2015. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4*. *Crop Protection*, 73: 7-15
- Poročilo urada za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin o rezultatih uradnega vzorčenja ostankov pesticidov v živilih v letu 2015. 2016. Ljubljana, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: 7 str.
- Poulsen M.E., Andersen J.H. 2003. Results from the monitoring of pesticide residues in fruit and vegetables on the Danish market, 2000-01. *Food Additives and Contaminants*, 20: 742-757
- Progar V., Jakše J., Štajner N., Radišek S., Javornik B., Berne S. 2017. Comparative transcriptional analysis of hop responses to infection with *Verticillium nonalfalfae*. *Plant Cell Reports*, 36: 1599–1613
- Radišek S., Jakše J., Javornik B. 2006. Genetic variability and virulence among *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 301–314

- Regvar M., Eichert D., Kaulich B., Gianoncelli A., Pongrac P., Vogel-Mikuš K. 2013. Biochemical characterization of cell types within leaves of metal-hyperaccumulating *Noccaea praecox* (Brassicaceae). *Plant and soil*, 373: 157–171
- Romanazzi G., Feliziani E. 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). V: Postharvest Decay. 1 izd. Bautista-Baños S. (ur.). ZDA, Elsevier: 131-146
- Romano L.L., Hazekamp A. 2013. Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids*, 1: 1-11
- Salman A., Tsrer L., Pomerantz A., Moreh R., Mordechai S., Huleihel M. 2010. FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. *Spectroscopy*, 24: 261–267
- Şesan T.E., Enache E., Iacomì B.M., Oprea M., Oancea F., Iacomì C. 2015. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus*, 14: 29-43
- Shahat A.A., Mahmoud E.A., Al-Mishari A.A., Alsaid M.S. 2017. Antimicrobial activities of some Saudi Arabian herbal plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14: 161-165
- Sheeba E. 2010. Antibacterial Activity of *Solanum surattense* Burm F. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology, 6: 1-4
- Shukla K.P., Singh N.K., Sharma S. 2010. Bioremediation: Developments, current practices and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 3: 1-20
- Skovgaard M., Renjel Encinas S., Chresten Jensen O., Hinge Andersen J., Condarco G., Jørs E. 2017. Pesticide residues in commercial lettuce, onion, and potato samples from Bolivia—A threat to public health?. *Environmental Health Insights*, 11: 1-8
- Smith B.C. 2011. Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy. 2. izd. Boca Raton, London, New York, CRC Pres: 198 str.
- Staats M., Van Baarlen P., van Kan J.A.L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 333–346
- Steenackers B., De Cooman L., De Vos D. 2015. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food Chemistry*, 72: 742–756
- Strange R.N. 2003. Introduction to plant pathology. Chichester, Wiley: 464 str.
- Strange R.N. Scott P.R. 2005. Plant disease: A Threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 3: 83-116
- SURS. 2017a. Statistični urad RS, Slovenija, Bilanca proizvodnje in potrošnje vina. http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1563407S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/12_prehranske_bilance/01_15634_trzne_bilance/&lang=2 (1. Dec, 2017)
- SURS. 2017b. Statistični urad RS, Slovenija, Prodaja pesticidov. http://pxweb.stat.si/pxweb/Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/07_reproduk_material/02_15172_prodaja_pesticidov/02_15172_prodaja_pesticidov.asp (22. Nov. 2017)

- Tandon C., Mathur P. 2017. Antimicrobial efficacy of *Cannabis sativa* L. (Bhang): A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 44: 94-100
- Tapwall A., Nisha, Garg S., Gautam N., Kumar R. 2011. In vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54: 1093-1098
- Thammana M. 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5: 22-28
- Töppner K., Hansen D., Herbig E. HPLC: Analysis the role of ultrapure water. Nemčija. Sartorius AG.
<http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis> (9. dec, 2017)
- Ullah N., Parveen A., Bano R., Zulfiqar I., Maryam M., Jabeen S., Liaqat A., Ahmad S. 2016. In vitro and in vivo protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6: 660-667
- UVHVVR. 2017. Fitofarmacevtska sredstva, Slovenija, Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.
http://www.uvhvvr.gov.si/si/delovna_podrocja/fitofarmacevtska_sredstva/ (22. Nov. 2017)
- Wang M., Wang Y.H., Avula B., Radwan M.M., Wanas A.S., van Antwerp J., Parcher J.F., ElSohly M.A., Khan I.A. 2016. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: A novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1: 262-271
- Wikimedia Commons. *Cannabis sativa*.
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cannabis_sativa_plant_%284%29.JPG (8. dec, 2017)
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., van Kan J.A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 5: 561-580
- Yang C., Hamel C., Vujanovic V., Gan Y. 2011. Fungicide: Modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology*, 2011: 1-8
- Yates S.R., McConnell L.L., Hapeman C.J., Papiernik S.K., Gao S., Trabue S.L. 2011. Managing agricultural emissions to the atmosphere: State of the science, fate and mitigation and identifying research gaps. *Journal of Environmental Quality*, 40: 1347-1358
- Ye M., Beach J., Martin J.W., Senthilselvan A. 2017. Pesticide exposures and respiratory health in general populations. *Journal of Environmental Sciences*, 51: 361-370
- Yılmaz M., Ozic C., Gok I. 2012. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. V: *Gel Electrophoresis - Principles and basics*. Magdeldin S. (ur.). Rijeka, InTech: 34-40
- Zuardi A.W. 2006. History of Cannabis as a medicine: a review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 28: 153-157

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Katarini Vogel Mikuš, za vso pomoč in nasvete, ki mi jih je dala tekom izdelave naloge. Zahvaljujem se ji tudi za ves trud in delo, ki ga je vložila v to magistrsko nalogo ter za izjemno odzivnost in dosegljivost.

Za učenje laboratorijskih tehnik, nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge se zahvaljujem dr. Evi Kovačec.

Za karakterizacijo ekstraktov se zahvaljujem prof. dr. Samu Kreftu in dr. Evi Tavčar Benković s Fakultete za farmacijo. Za FTIR analize se zahvaljujem prof. dr. Jožetu Grdadolniku s Kemijskega inštituta.

Za pregled magistrske naloge in nasvete pri oblikovanju končnega dela se zahvaljujem prof. dr. Franciju Acu Celarju.

Najlepša hvala mladi raziskovalki Anji Kavčič za vso pomoč, nasvete in motiviranje ob izdelavi praktičnega dela magistrske naloge.

Za pomoč pri laboratorijskem delu, nasvete in spodbudne besede se zahvaljujem Tanji Murn.

Hvala tudi Mileni Kubelj za tehnične napotke pri izvajanju poskusov in doc. dr. Matevžu Likarju za navodila pri izvedbi molekularnega dela naloge.

Za pomoč pri izvajanju praktičnega dela magistrske naloge se iskreno zahvaljujem tudi Špeli Mikec, Edini Iljazović, Katji ter Mojci Jamnik.

Za vso razumevanje ter prilagajanje dela se zahvaljujem tudi dr. Nataši Mehle in prof. dr. Maji Ravnikar z Nacionalnega inštituta za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo.

Hvala vsem prijateljem, ki so me spremljali tekom celotnega študija in mi popestrili študijske dneve.

Na koncu pa se zahvaljujem tudi svoji družini, ki mi je omogočila študij ter mi vseskozi stala ob strani. Hvala za vso podporo, potrpljenje in razumevanje tekom študija, brez vas mi ne bi uspelo.

PRILOGA A

Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z etanolnimi ekstrakti.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea II</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis sp.</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
kontrola	1615,69	2509,17	2312,73	1681,84	530,77	3305,43	380,70	601,26
	1349,37	2370,35	2583,99	2205,55	574,44	3733,62	421,91	634,19
	1741,27	2577,42	2709,62	1875,64	712,93	3728,82	395,59	457,14
	1643,93	2405,02	2826,17	2867,59	579,50	3357,92	458,64	425,33
	1670,52	2445,17	2785,03	2158,24	739,84	3066,02	350,82	525,00
	1547,33	2423,28	2851,45	2243,24	900,47	3784,50	462,66	455,37
	1307,97	2354,40	2710,30	1797,16	780,76	4262,32	561,86	456,03
	1629,78	2505,43	2856,39	2425,37	652,09	4340,00	450,05	469,27
25 g/l listi	1273,36	2428,80	1791,15	1994,29	528,60	1988,53	517,13	568,08
	1553,73	2288,67	2001,75	1931,97	446,21	2188,26	321,41	416,24
	1203,13	2226,54	1715,17	2108,27	510,83	1984,32	350,29	436,85
	1342,73	2544,33	1740,08	1869,42	470,68	2139,05	369,73	396,68
	1622,87	2161,65	1773,07	2087,38	415,96	2288,31	406,93	390,26
	1155,63	2144,15	1883,13	1649,22	629,46	2176,47	402,30	472,68
	1091,45	2371,02	1651,26	1935,13	666,74	2018,73	387,13	501,85
	1588,04	2210,75	1713,47	1964,90	520,69	2349,35	407,40	409,87
50 g/l listi	1356,77	2016,67	1798,39	1859,86	421,57	2011,46	361,85	411,27
	1334,09	1990,36	1619,28	1862,15	444,57	2004,74	361,67	514,29
	1237,39	1840,28	1870,15	1969,28	511,55	1953,26	302,79	337,51
	1381,72	2016,89	1589,38	2020,44	539,22	2076,50	399,65	512,48
	1457,18	1881,97	1880,58	1930,85	792,77	2021,18	326,49	349,79
	1179,55	2039,73	1857,72	2234,83	618,56	1912,78	328,23	421,93
	1523,79	1948,84	1937,49	1718,21	575,76	1818,78	289,20	414,63
	1266,96	1980,46	1904,98	1805,95	474,53	1937,49	344,32	379,20
100 g/l listi	1064,84	1587,79	1727,28	1764,69	412,40	1803,16	267,43	379,23
	1132,26	1656,35	1526,45	1763,23	588,47	1839,73	365,78	381,16
	1107,42	1759,48	1496,13	1779,49	496,57	1811,01	327,28	338,69
	1171,29	1793,01	1558,87	1779,49	387,77	2154,85	272,26	368,25
	1312,50	1976,37	1692,67	1703,00	565,12	2093,20	448,48	342,80
	1462,90	1664,43	1926,78	1720,58	540,46	1857,89	274,49	429,68
	1401,32	1804,46	1821,51	1719,59	457,82	2067,52	367,19	429,10
	1577,85	1822,44	1704,40	1804,34	433,00	2092,57	247,93	344,97
25 g/l vršički	1107,29	1521,25	1066,60	1376,49	520,96	1396,18	318,24	395,86
	1131,75	1982,77	1145,01	1091,44	534,95	1250,43	373,66	345,75
	1128,34	1561,95	1221,89	1032,13	562,61	1454,39	352,87	351,82
	1010,34	1488,31	1159,15	846,39	504,14	1203,10	235,56	377,50
	908,32	1582,94	1211,75	895,69	485,23	1430,18	208,91	509,26
	884,84	1774,97	1206,74	1199,50	389,79	1490,90	287,00	443,24
	1098,95	1689,17	1120,85	1200,15	527,91	1174,12	387,41	341,99
	1078,72	1737,96	1187,89	935,55	597,21	1498,34	281,91	454,21
50 g/l vršički	1049,76	1230,46	821,23	1119,51	413,56	1359,03	359,90	368,44
	918,13	1162,02	989,73	816,41	396,67	1040,66	321,89	437,26
	1052,40	1274,90	1058,88	953,17	424,19	1149,47	321,99	401,47
	900,21	1203,49	738,19	857,86	404,32	1216,34	321,36	392,28
	954,12	1133,72	826,76	829,33	445,24	1235,54	239,06	358,29
	909,99	1231,74	1185,17	908,05	467,64	1098,01	313,56	367,57
	867,71	1329,12	1044,11	909,87	438,22	1082,14	306,25	414,94
	942,64	1097,74	1085,50	774,03	523,38	1224,29	298,71	355,22
100 g/l vršički	813,63	1231,55	1206,40	1221,04	446,95	957,43	305,00	300,58
	816,47	1092,74	1129,86	1006,11	375,89	1118,54	410,24	397,76
	803,61	1075,92	950,39	1043,23	486,35	1126,31	327,22	415,78
	913,93	1218,92	851,78	951,50	401,79	1165,08	304,82	320,71
	915,12	1214,70	1084,90	1085,94	431,79	914,71	380,02	381,50
	837,60	1094,96	1270,05	1222,81	409,52	1117,02	303,52	325,33
	904,82	940,38	1075,57	1130,29	420,28	1099,14	220,96	313,83
	1013,95	895,36	889,95	1050,91	551,35	1055,43	336,61	299,57

PRILOGA B

Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z vodnimi ekstrakti.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
kontrola	1438,63	4522,95	515,56
	1389,19	4691,44	463,71
	1277,58	4067,22	520,55
	1324,55	4803,43	458,89
	1709,75	4310,82	536,14
	1348,26	4178,67	478,62
	1413,40	3964,28	510,35
	1310,17	5022,23	537,06
25 g/l listi	1304,21	5091,89	545,08
	1266,17	4450,53	447,92
	1339,53	4216,56	519,34
	1482,03	4650,27	454,07
	1309,77	4408,37	489,48
	1337,42	4680,01	471,00
	1275,20	4832,18	410,01
	1328,22	4486,64	543,23
50 g/l listi	1285,82	4880,49	552,30
	1236,90	4304,78	411,24
	1381,90	4550,56	500,67
	1471,18	4958,16	483,50
	1389,83	4411,98	553,85
	1640,70	4477,74	472,93
	1577,94	4425,81	483,58
	1282,49	3822,21	464,99
100 g/l listi	1193,02	4071,62	467,01
	1613,42	3582,95	485,70
	1397,21	3562,14	545,88
	1803,85	4609,04	592,43
	1478,36	4104,85	471,25
	1424,99	4732,92	583,69
	1386,67	4162,66	539,15
	1505,60	3957,02	554,74
25 g/l vršički	1331,42	4270,35	473,89
	1335,08	4022,97	453,71
	1449,62	4034,36	449,04
	1455,24	4415,27	427,05
	1320,48	4072,56	676,20
	1406,88	4157,33	492,40
	1456,95	4420,11	599,79
	1443,83	4054,77	623,51
50 g/l vršički	1680,00	4657,50	618,50
	1787,90	4022,87	487,93
	1600,37	3542,65	588,83
	1712,48	4727,80	487,69
	1618,16	5149,73	569,41
	1655,18	4658,87	687,21
	1808,89	4755,62	524,76
	1748,49	4641,97	464,93
100 g/l vršički	1303,32	4729,46	460,27
	1467,18	4240,26	513,60
	1460,28	4088,36	514,36
	1471,27	4444,90	639,37
	1454,21	4522,15	466,42
	1337,47	4318,61	607,35
	1381,92	4428,18	678,75
	1618,97	4582,45	542,00

PRILOGA C

Preglednica rezultatov površinske rasti gliv [mm²] na gojiščih z oljnimi ekstrakti.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Verticillium nonalfalfae</i>
kontrola	1051,22	3917,13	447,44
	1197,79	4089,62	469,73
	1495,30	3926,77	456,11
	1031,00	4382,72	433,10
	971,07	4546,93	479,55
	1183,94	4077,92	480,96
	1052,36	4494,98	456,71
	990,83	4229,85	391,09
25 g/l listi	995,08	4201,18	334,33
	1118,87	3875,99	363,96
	1149,43	3596,21	366,55
	1230,29	4074,89	417,83
	1180,76	4123,89	352,68
	1046,99	4013,59	418,34
	1144,57	4134,56	396,57
	1048,02	3952,83	378,29
50 g/l listi	1063,29	3195,84	391,97
	1077,74	3044,80	509,88
	1043,84	3721,95	359,95
	976,42	3495,33	385,42
	914,65	3534,77	375,86
	872,98	3342,37	431,09
	900,11	3976,10	359,38
	966,69	3943,05	418,28
100 g/l listi	906,75	3922,59	529,77
	1275,38	3850,12	322,46
	1141,69	4282,96	348,98
	1104,74	3668,89	318,17
	1145,19	3944,09	353,04
	1277,30	4482,60	373,00
	1204,12	4765,63	396,58
	1080,74	4150,86	377,47
25 g/l vršički	1144,31	3754,58	342,30
	999,02	3473,51	351,36
	1111,37	3771,04	355,83
	942,60	3951,41	446,04
	953,69	4283,03	420,35
	961,18	4131,67	392,88
	1029,88	3937,18	378,45
	1003,58	3723,60	401,82
50 g/l vršički	1054,71	3529,48	388,39
	1030,99	3558,40	332,60
	1153,16	3527,51	364,49
	1010,56	3478,85	393,44
	1085,72	3855,72	401,18
	941,35	3588,33	387,57
	906,48	3971,74	424,61
	1133,47	3545,56	405,22
100 g/l vršički	1044,99	3658,78	387,16
	940,23	3730,24	356,73
	956,04	3938,60	389,17
	1204,13	3539,41	386,69
	1234,53	3605,23	397,22
	1075,78	3680,99	413,18
	1054,43	3449,62	444,74
	1005,28	3382,84	394,52

PRILOGA Č

Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z etanolnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Botrytis</i> sp.			<i>Verticillium nonalfalfae</i>		
Absorbanca	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm
kontrola	0,121	0,047	0,004	0,440	0,118	0,005	0,109	0,037	0,003
	0,100	0,042	0,003	0,134	0,039	0,006	0,112	0,039	0,002
	0,138	0,063	0,006	0,130	0,038	0,004	0,124	0,056	0,018
	0,116	0,044	0,002	0,580	0,131	0,004	0,295	0,063	0,002
25 g/l listi	0,055	0,031	0,004	0,100	0,028	0,000	0,113	0,037	0,004
	0,106	0,071	0,030	0,331	0,085	0,005	0,106	0,028	0,001
	0,106	0,075	0,024	0,083	0,022	0,001	0,131	0,082	0,034
	0,097	0,066	0,033	0,117	0,034	0,003	0,122	0,037	0,003
50 g/l listi	0,087	0,027	0,001	0,088	0,027	0,002	0,108	0,043	0,005
	0,158	0,072	0,011	0,109	0,033	0,003	0,135	0,068	0,029
	0,112	0,054	0,004	0,134	0,035	0,002	0,100	0,028	0,001
	0,128	0,054	0,003	0,110	0,036	0,003	0,167	0,090	0,054
100 g/l listi	0,335	0,144	0,016	0,141	0,053	0,020	0,060	0,016	0,001
	0,152	0,068	0,005	0,153	0,046	0,006	0,088	0,029	0,001
	0,141	0,067	0,006	0,119	0,042	0,006	0,058	0,013	-0,001
	0,146	0,087	0,014	0,101	0,034	0,003	0,080	0,025	0,003
25 g/l vršički	0,179	0,095	0,010	0,073	0,020	0,001	0,093	0,030	0,001
	0,139	0,059	0,008	0,100	0,033	0,002	0,093	0,028	0,001
	0,169	0,086	0,008	0,096	0,033	0,003	0,122	0,057	0,032
	0,143	0,067	0,008	0,134	0,045	0,005	0,095	0,034	0,002
50 g/l vršički	0,176	0,087	0,014	0,116	0,034	0,004	0,073	0,020	0,001
	0,154	0,077	0,008	0,114	0,029	0,002	0,064	0,019	0,003
	0,151	0,078	0,009	0,094	0,031	0,004	0,073	0,023	0,001
	0,154	0,067	0,007	0,091	0,029	0,001	0,089	0,026	0,002
100 g/l vršički	0,170	0,060	0,006	0,261	0,078	0,003	0,086	0,027	0,003
	0,197	0,104	0,034	0,129	0,043	0,003	0,079	0,024	0,004
	0,201	0,101	0,013	0,204	0,120	0,076	0,079	0,027	0,003
	0,237	0,082	0,007	0,109	0,036	0,003	0,067	0,022	0,002

PRILOGA D

Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z vodnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Botrytis</i> sp.			<i>Verticillium nonalfalfae</i>		
	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm
kontrola	0,149	0,076	0,01	0,093	0,026	0,002	0,229	0,216	0,207
	0,162	0,073	0,007	0,191	0,035	0,003	0,278	0,135	0,091
	0,099	0,045	0,003	0,065	0,022	0,002	0,35	0,191	0,135
	0,115	0,051	0,006	0,078	0,03	0,003	0,295	0,157	0,116
25 g/l listi	0,322	0,169	0,117	0,214	0,112	0,086	0,147	0,047	0,021
	0,334	0,116	0,013	0,243	0,049	0,005	0,169	0,06	0,031
	0,226	0,064	0,004	0,186	0,044	0,004	0,238	0,095	0,056
	0,402	0,147	0,032	0,238	0,091	0,034	0,189	0,073	0,039
100 g/l vršički	0,207	0,067	0,007	0,133	0,033	0,005	0,187	0,066	0,034
	0,236	0,082	0,009	0,171	0,036	0,002	0,207	0,091	0,056
	0,242	0,128	0,078	0,163	0,034	0,002	0,097	0,044	0,022
	0,143	0,052	0,01	0,215	0,041	0,003	0,161	0,051	0,024

PRILOGA E

Preglednica absorbanc, izmerjenih pri vzorcih gliv, ki so rastle na gojiščih z oljnimi ekstrakti. Omenjene absorbance smo uporabili za izračun koncentracije malondialdehida, ki je pokazatelj stopnje lipidne peroksidacije.

Vrsta ekstrakta/ime glive	<i>Fusarium oxysporum</i>			<i>Botrytis</i> sp.			<i>Verticillium nonalfalfae</i>		
Absorbanca	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm	A 440 nm	A 532 nm	A 660 nm
kontrola	0,071	0,040	0,000	0,142	0,060	0,005	0,062	0,022	0,001
	0,095	0,082	0,003	0,158	0,086	0,010	0,059	0,022	0,003
	0,067	0,038	0,001	0,066	0,030	0,002	0,083	0,026	0,001
	0,096	0,089	0,004	0,235	0,129	0,031	0,047	0,012	0,000
25 g/l listi	0,065	0,034	0,003	0,144	0,065	0,006	0,077	0,013	0,001
	0,081	0,093	0,003	0,213	0,171	0,128	0,122	0,020	0,001
	0,044	0,019	-0,002	0,101	0,052	0,007	0,062	0,019	0,000
	0,036	0,026	0,000	0,129	0,057	0,005	0,038	0,011	0,001
50 g/l listi	0,100	0,037	0,001	0,199	0,060	0,006	0,144	0,021	0,001
	0,126	0,030	0,002	0,253	0,079	0,007	0,149	0,023	0,001
	0,149	0,041	0,001	0,217	0,070	0,007	0,104	0,024	0,002
	0,164	0,051	0,008	0,191	0,060	0,006	0,054	0,013	0,000
100 g/l listi	0,096	0,038	0,002	0,178	0,069	0,006	0,043	0,010	0,000
	0,165	0,084	0,025	0,130	0,047	0,003	0,049	0,011	0,000
	0,167	0,117	0,012	0,211	0,087	0,009	0,066	0,020	0,002
	0,147	0,095	0,009	0,230	0,111	0,021	0,101	0,026	0,002
25 g/l vršički	0,070	0,040	0,001	0,146	0,054	0,004	0,066	0,024	0,002
	0,144	0,108	0,006	0,193	0,077	0,008	0,048	0,014	0,000
	0,084	0,045	0,000	0,167	0,080	0,006	0,050	0,012	-0,001
	0,129	0,048	0,007	0,069	0,023	0,000	0,052	0,014	0,000
50 g/l vršički	0,078	0,063	0,002	0,137	0,069	0,006	0,041	0,012	0,001
	0,050	0,034	0,002	0,151	0,063	0,006	0,042	0,013	0,000
	0,064	0,044	0,003	0,181	0,084	0,008	0,043	0,014	0,001
	0,089	0,060	0,003	0,100	0,044	0,004	0,046	0,016	0,000
100 g/l vršički	0,168	0,149	0,097	0,093	0,040	0,003	0,054	0,015	0,000
	0,093	0,051	0,002	0,110	0,050	0,008	0,041	0,013	0,001
	0,230	0,241	0,182	0,133	0,054	0,004	0,050	0,018	0,003
	0,048	0,030	0,005	0,133	0,064	0,007	0,048	0,015	0,001