



Production du cannabis médical (Cannabis sativa L.) cultivé en hydroponie : impact de N, P et K sur la croissance, productivité et qualité

Mémoire

Camille Leblanc

Maîtrise en biologie végétale - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Résumé

Le cannabis médical et récréatif (*Cannabis sativa* L.) est une industrie en pleine expansion au Canada depuis sa légalisation en octobre 2018. Cependant, le peu de connaissance scientifique sur la fertilisation est un enjeu important pour les producteurs afin d'obtenir de meilleurs rendements et d'offrir un produit de qualité. Cela se traduit souvent par une fertilisation excessive ou non adaptée à cette espèce, ce qui impacte la qualité des produits et engendre des coûts plus élevés de production. Le but de cette étude était donc, dans un premier temps, de caractériser les taux de prélèvement des éléments nutritifs du *Cannabis sativa* lors de la phase de floraison et, dans un second temps, de déterminer pour un génotype l'effet de N, P et K sur la croissance, la productivité et la qualité des inflorescences. Pour ce faire, nous avons réalisé deux expériences. La première expérience s'est déroulée chez un producteur autorisé (IsoCanMed Inc.) utilisant des tours verticales aéroponiques et où deux doses de N (150 et 250 ppm) ont été comparées et l'absorption minérale des plantes caractérisée au cours de la phase de floraison, et ce, pour 2 cycles de production par niveau d'azote. La deuxième expérience s'est tenue dans une serre de l'Université Laval et a permis d'étudier les effets de cinq concentrations de P (25, 50, 100, 150 et 200 ppm) et deux concentrations de K (175 et 250 ppm) pour des plantes cultivées dans un système hydroponique en eau profonde. Nos résultats ont démontré qu'une concentration élevée en N (> 150 ppm) a entraîné une surcroissance des plantes (hauteur des plantes), a diminué la teneur en THC des inflorescences (-9,5%), mais a permis d'augmenter la biomasse florale (+29%) d'un des deux génotypes étudiés. Des concentrations supérieures à 25 ppm de P et 175 ppm de K n'ont toutefois pas amélioré la productivité et la qualité des inflorescences. Les résultats obtenus ainsi que la caractérisation des taux d'absorption des éléments nutritifs au cours du développement de la plante nous ont permis de suggérer une fertilisation de référence en N, P et K pour des plantes en phase de floraison et cultivées dans un système hydroponique. Il serait toutefois intéressant de poursuivre ces travaux avec un plus grand nombre de phénotypes et sous différentes conditions lumineuses.

Abstract

Drug-type cannabis (*Cannabis sativa* L.) in a booming industry following its legalization in Canada in 2018. However, few scientific studies on the optimal fertilization is a main challenge for producers who aim to harvest high yields with a high cannabinoid content. Thus, this often results in the overuse of fertilizers or not well adapted fertilization that impact the quality and the cost of production. Thus, the aim of this study was to characterize the nutrient plant uptake during the flowering phase and to determine the impact of N, P and K on growth, productivity, and quality of the inflorescence. The first experiment was done within a plant factory at a licensed producer (IsoCanMed Inc.) who uses vertical aeroponic towers. Two levels of N (150 and 250 ppm) were used in two cycles for each treatment to identify their impact on *Cannabis* and to characterize the nutrient uptake throughout the flowering phase. The second experiment was conducted in a greenhouse located at Laval University in order to test five (25, 50, 100, 150 and 200 ppm) and two (175 and 250 ppm) concentrations of P and K, respectively, by using a deep-water system. Based on our results, N fertilization above 150 ppm resulted in an overgrowth (plant height), a reduction in THC content in the inflorescences (-9.5%), but an improvement in floral biomass productivity (+29%) for one genotype. Concentrations above 25 ppm P and 175 ppm K, however, did not improve the productivity and the quality of the inflorescences. The results obtained as well as the characterization of the absorption rates of nutrients during the development of the plant allowed us to suggest a reference N, P and K fertilization for flowering plants grown in a hydroponic system. However, it would be interesting to continue this work with a larger number of phenotypes and under different light conditions.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	viii
Abréviations et définitions	x
Remerciement	xi
Avant-propos.....	xii
Introduction générale	1
1. Chapitre 1 : Revue de littérature	3
1.1 Cannabis.....	3
1.1.1 Le marché du cannabis médical	3
1.1.2 Les dimorphismes sexuels.....	5
1.1.3 La taxonomie du <i>Cannabis</i>	7
1.2 Composés bioactifs	9
1.2.1 Trichomes.....	9
1.2.2 Terpènes	12
1.2.3 Cannabinoïdes	15
1.2.4 Cycle de production	19
1.2.5 Méthode de production.....	20
1.3 La fertilisation N, P et K	21
1.3.1 Recommandation actuelle dans l'industrie.....	21
1.3.2 Impact sur la biomasse de la plante.....	22
1.3.3 Impact sur les cannabinoïdes.....	24
1.3.4 Impact sur les terpènes	25
1.4 Problématique de recherche	27
1.5 Hypothèses et objectifs.....	27
Chapitre 2 : Dynamic of the nutrient uptake by drug-type <i>Cannabis sativa</i> L. under two nitrogen concentrations during the flowering stage of plants cultivated in vertical aeroponic system	29
Résumé.....	29
Abstract	30
2.1 Introduction	31

2.2	Material and methods	33
2.2.1	Plant material: propagation and environmental growing conditions.....	33
2.2.2	Experimental design	34
2.3	Results	38
2.4	Discussion	51
2.5	Conclusion.....	54
Chapitre 3: Response of drug-type <i>Cannabis sativa</i> L. to P and K concentrations in a deep-water system.....		55
Résumé		55
Abstract		56
3.1	Introduction	57
3.2	Material and methods	59
3.2.1	Plant material: Propagation and environmental growing conditions.....	59
3.2.2	Experimental design.....	59
3.2.3	Physiological parameters.....	60
3.2.4	Inorganic mineral analysis.....	63
3.2.5	Statistics	63
3.3	Results	63
3.3.1	Plant development and yield	63
3.3.2	Inorganic mineral accumulation in tissues	67
3.3.3	Potency and terpenes	72
3.4	Discussion	75
3.4.1	Plant growth and development	75
3.4.2	Inorganic mineral accumulation.....	75
3.4.3	Potency	78
3.5	Conclusion.....	80
Conclusion générale		81
Bibliographie.....		83
Annexe 1		90
Annexe 2		91

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1. 1 Nombre de titulaires de licence fédérale par province en septembre 2020.....	4
Tableau 1. 2 Différences observées entre les deux groupes narcotiques de <i>Cannabis</i> selon la nomenclature utilisée par l'industrie.	9
Tableau 1. 3 Classification des terpènes selon le nombre d'unités isopréniques.	13
Tableau 1. 4 Propriétés pharmaceutiques des terpènes communément retrouvés chez le <i>Cannabis sativa</i>	14
Tableau 1. 5 Exemples, de concentrations en N, P et K pour différente phase du cycle de production de <i>C. sativa</i> selon les produits de deux fournisseurs.....	21

Chapitre 2

Table 2. 1 Flower mineral concentration of two drug-type <i>C. sativa</i> cultivars (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) cultivated in a vertical aeroponic system using two N concentrations. Data are means of n=2.....	41
Table 2. 2 Evolution of the leaf mineral concentration of two drug-type <i>C. sativa</i> genotypes (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) cultivated in a vertical aeroponic system using 140 mg N L ⁻¹ concentrations for 10 weeks. Data are means of n=2 (two trials; E5 and E6).	43
Table 2. 3 Growth parameters for two <i>C. sativa</i> genotypes, White Shark (WS) and Critical Orange Punch (COP), grown in vertical aeroponic towers with a N concentration of 150 and 250 mg L ⁻¹ (150 mg L ⁻¹ , n= 2 (WS) and n=5 (COP); 250 mg L ⁻¹ , n=4 (WS) and n=2 (COP))......	46
Table 2. 4 Averaged cannabinoid concentrations in the flowers of two drug-type <i>Cannabis sativa</i> (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) grown under two different N concentrations (150 mg L ⁻¹ , n= 2 [WS] and n=5 [COP]; 250 mg L ⁻¹ , n=4 [WS] and n=2 [COP]).	48
Table 2. 5 Average terpenoids proportionality found in the flowers of two <i>C. sativa</i> cultivars grown in aeroponic towers and treated with a high (250 mg L ⁻¹) and a low (150 mg L ⁻¹) N level in a hydroponic solution.....	49

Chapitre 3

Table 3. 1 P and K concentrations for each of the treatments.....	60
Table 3. 2 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L ⁻¹) and K (175 and 250 mg L ⁻¹) concentrations on plant biomass and yield of drug-type <i>C. sativa</i> White Shark after 80 days of growth (flowering stage) in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=8).....	64
Table 3. 3 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L ⁻¹) and K (175 and 250 mg L ⁻¹) concentrations on plant growth parameters of drug-type <i>C. sativa</i> White Shark after 80 days of growth (flowering stage) in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=8, except for water use efficiency with n=4).....	65

Table 3. 4 Evolution of the effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L ⁻¹) and K (175 and 250 mg L ⁻¹) concentrations on weekly growth parameters of drug-type <i>C. sativa</i> White Shark (flowering stage) grown for 12 weeks in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=4).	66
Table 3. 5 The impacts of phosphorus (25, 50, 100, 150, and 200 ppm) and potassium (175 and 250 ppm) concentrations on mineral accumulation in flower tissues of <i>C. sativa</i> White Shark harvested after 80 days of treatment in a deep-water system; variance analysis (n=7).	71
Table 3. 6 Cannabinoid potency of the flowers of <i>Cannabis sativa</i> White Shark harvested after 80 days of ten P x K treatments in a deep-water system in function; variance analysis (n = 3).	72
Table 3. 7 Main terpenes found in the flowers of <i>C. sativa</i> White Shark at concentrations of pharmaceutical interest (≥ 0.50 mg/g) and for the ten P x K treatments in the nutrient solution of a deep-water growing system (n=3).	74

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1. 1 Ventes mensuelles au détail des produits à base de cannabis au Canada deux ans suivant la légalisation en octobre 2018 (Compilation des données de Statistique Canada, 2020).....	5
Figure 1. 2 Dimorphismes sexuels entre les fleurs femelles et les fleurs mâles de <i>C. sativa</i> L. (OCS, 2021)...	6
Figure 1. 3 Illustration d'un calice et d'un trichome (OCS, 2021).	7
Figure 1. 4 Distribution géographique des six groupes domestiqués de <i>Cannabis</i> (Small, 2017).....	8
Figure 1. 5 Trichomes présents chez le <i>Cannabis</i> . A. Trichome unicellulaire simple ; B. Trichome cystolithique ; C. Trichome glandulaire sessile ; D. Trichome glandulaire capité ; E. Trichome bulbeux simple ; F. Trichome bulbeux complexe (Potter, 2009).....	10
Figure 1. 6 Schéma de la biosynthèse des cannabinoïdes et des terpènes chez <i>Cannabis sativa</i> L. selon les sentiers métaboliques de la voie du mévalonate (MEV) et du méthylérythriol phosphate (MEP) (Kovalchuk <i>et coll.</i> , 2020).....	17

Chapitre 2

Figure 2. 1 Diagram of the lighting system for one flowering aeroponic tower. A. The tower's front (side towards the hallway) was enlightened by a beam composed of three 315 W LEC lamps (blue rectangles) with reflectors and two 1000 W HPS lamps (orange circles) on each side between two tower rows for a total of 7 lamps. B. Lights positions when seen above the aeroponic towers.	34
Figure 2. 2 Evolution during the flowering stage (weeks 1 to 8) of the averaged daily N-NO ₃ , P-PO ₄ , K, Ca and Mg uptake per plant of <i>C. sativa</i> grown under 150 and 250 mg N L ⁻¹ nutrient concentrations. Plants were cultivated in an aeroponic vertical system. Data are means of n=2 for each treatment and n=4 for the averaged values. Different letters above the means represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).....	40
Figure 2. 3 Weekly evolution of the plant height and the number of nodes for White Shark (WS) and Critical Orange Punch (COP) grown under two concentrations of N (150 and 250 mg L ⁻¹) (150 mg L ⁻¹ , n=120 for WS and COP; 250 mg L ⁻¹ , n=65 for WS and n=130 for COP). Different letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05); Uppercase letters indicate the differences between WS; lowercase letters indicate the difference between COP; * indicates a significant difference between the two genotypes at 250 mg L ⁻¹	47
Figure 2. 4 Principal component analysis (PCA) of the terpenoids found in <i>C. sativa</i> grown in an aeroponic system based on the effect of two N levels with two cultivars (WS and COP) which suggest three groups of terpenes that are affected based on the cultivar and the N fertilization.	50

Chapitre 3

Figure 3. 1 Pictures displaying how the inflorescence was selected during the harvest. **A.** Representation of a mature plant at the harvest after 80 days of growth. To determine the apical inflorescences, we selected the height where the top leaves were located. The white line indicates where the apical inflorescence was harvested.

B. Representation of an inflorescence at the harvest with sugar leaves. Most inflorescence buds harvested consisted mainly of the apical floral raceme (full lined circle) and one axillary raceme (doted circles)..... 62

Figure 3. 2 The impacts of phosphorus (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and potassium (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on mineral accumulation in leaf tissues of *C. sativa* White Shark after 25 and 80 days of treatment in a deep-water system (25 days, n=4; 80 days, n=7). Different letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05); capital letters indicate the significant differences between the leaf content at 80 days, while lowercase letters indicate the leaf mineral content at 25 days; * indicates when there is a significant difference between the content at 25 and 80 days. 69

Abréviations et définitions

Définitions

Cannabis : Plante *Cannabis sativa* L. contenant plus de 0,3% de THC selon la réglementation canadienne et qui est cultivée pour ses fleurs à des fins récréatives ou médicales.

Chanvre industriel: Plante *Cannabis sativa* L. contenant moins de 0,3% de THC selon la réglementation canadienne et qui est cultivée pour ses graines, son huile et sa fibre.

Abréviations

ATP : Adénosine triphosphate

CCI : *Chlorophyll content index*

CBD : Cannabidiol

CBDA : Acide cannabidiolique

CBGA : Acide cannabigérolique

CBN : Cannabinol

CoA : Coenzyme A

COP : *Critical Orange Punch*

DM : *Dry matter*

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

FPP : Farnésyl-pyrophosphate

FR : *Flowering room*

G3P : Glycéraldéhyde-3-phosphate

GPP : Géranyl-pyrophosphate

IPP : Isopentényl-pyrophosphate

MEP : Voie du méthylérythritol phosphate

MEV : Voie du mévalonate

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OA : Acide olivetolique

THC : Δ -9-tétrahydrocannabinol

THCA : Acide tétrahydrocannabinolique

UV : Ultra-violet

WS : *White Shark*

Remerciement

Je tiens à remercier Martine Dorais, ma directrice de recherche, de m'avoir offert ce projet et du support que tu m'as offert. Merci de m'avoir encouragé et offert l'opportunité de participer à la rédaction du cours sur le cannabis pour l'Université Laval. En plus d'avoir découvert l'incroyable plante qu'est le cannabis, j'ai pu acquérir plusieurs connaissances et aptitudes qui me seront utiles dans la réalisation de mes prochains projets.

Merci à l'équipe, ou plutôt, la famille IsoCanMed Inc. pour m'avoir accueilli pendant 8 mois dans votre entreprise et de m'avoir fait confiance lors de la réalisation du projet. Je remercie tout particulièrement Erik Bertacchini, Nathalie Delisle et Juliano Bertacchini, ainsi que les employés que j'ai eu la chance de côtoyer quotidiennement.

Merci à An Nguyen pour ta précieuse aide lors des nombreuses manipulations et de tes conseils. Je suis grandement reconnaissante des manipulations que tu as dû réaliser pour moi lorsque j'ai commencé mon premier emploi en tant qu'agronome.

Merci à Annie Brégarde de m'avoir aidé pour mes analyses statistiques, graphiques et tableaux. Je te remercie de t'être libérée quelques soirées afin que l'on puisse discuter ensemble des résultats et des modifications à y apporter.

Merci à Charles-Félix qui est venu m'assister chez IsoCanMed et de ton support lorsque les temps étaient plus difficiles pendant le projet. Ta passion pour le cannabis est contagieuse et je te souhaite le meilleur pour tes prochains projets.

Merci aux étudiants faisant partie de l'équipe de Martine pour l'aide qui m'ont offerte lors du projet. Je n'oublierai pas les longues journées que nous avons dû cueillir et « *trimmer* » manuellement les fleurs lors de la récolte.

Merci à ma famille, mes parents, pour leur soutien émotionnel lors des bons et des mauvais moments. Vous avez suivi toutes les péripéties de mon projet.

Avant-propos

La réalisation de ce projet de maîtrise a été réalisée sous la direction de Martine Dorais dans le cadre d'un projet de R&D financé par le CRSNG et avec la collaboration d'IsoCanMed Inc., notre partenaire industriel. Ce mémoire de maîtrise est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre consiste en une revue de littérature afin de décrire dans un premier temps le cannabis médical dans son contexte anatomique, physiologique et politique. Une attention particulière a été apportée pour la description des trichomes et métabolites secondaires, soit les cannabinoïdes et les terpènes. Dans un deuxième temps, les effets de la fertilisation sur la productivité des plantes et leurs métabolites secondaires y ont été abordés. Il introduit aussi les hypothèses et les objectifs du projet de recherche. Les deux derniers chapitres ont été rédigés en anglais sous la forme d'articles scientifiques. Le premier article (chapitre 2) traite des essais qui ont été menés chez IsoCanMed Inc. afin de caractériser lors de leur phase de floraison les taux d'absorption minérale du cannabis soumis à deux concentrations d'azote et cultivés dans un système vertical aéroponique. Quant au second article (chapitre 3), il présente les résultats d'une expérience réalisée dans une serre de haute technologie (EVS-FSAA) de l'Université Laval avec un système de culture en eau profonde. Cette expérience avait pour but d'étudier les effets de différentes doses de P et K sur la croissance, la productivité et la qualité des inflorescences en termes de cannabinoïdes et de terpènes. Enfin, ce mémoire se termine par une discussion générale et perspective de recherche.

Introduction générale

Le *Cannabis sativa* L. est une plante controversée en raison de ses propriétés psychotropes qui ont mené à sa criminalisation au début du 20^e siècle. Malgré des effets secondaires importants chez certains jeunes (un jeune sur six; Richard Bélanger 2021), des publications scientifiques ont modifié peu à peu la perception négative qu'avait le cannabis face au public pour ces bienfaits notamment pour ces effets anti-inflammatoires, analgésiques, anti-anxiétés et anti-tumeurs (Morales *et coll.*, 2017). Afin de réduire la criminalité liée aux produits illicites du cannabis, un peu moins de 100 ans après sa criminalisation au Canada en 1923, le cannabis médical et récréatif est devenu légal au Canada en octobre 2018, ce qui en a fait le deuxième pays au monde, et le premier du G7, à le faire.

Cet évènement historique a suscité un vif engouement pour la culture de cette plante avec la création de plusieurs entreprises serricoles pour y faire la culture du cannabis. De fait, le nombre de titulaires de licence a quadruplé entre 2018 et 2020 (Statistique Canada, 2020). Cependant, sa criminalisation n'a pas permis de développer des pratiques culturelles commerciales optimales, bien qu'elle soit cultivée depuis 12 000 ans par l'Homme (Ren *et coll.*, 2022). La littérature scientifique actuelle étant limitée et principalement axée sur le chanvre (*C. sativa*) cultivé au champ pour ses graines, sa fibre et ses fleurs riches en cannabidiol (CBD), comparativement au cannabis récréatif qui est cultivé en serre ou en bâtiment (*plant factory*) pour ses fleurs avec une teneur élevée en Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC), le principal agent actif psychotrope. Conséquemment, les producteurs font face à un manque de connaissance scientifique sur la culture du *C. sativa* (Chouvy, 2019). Ceux-ci doivent donc aller chercher de l'information auprès de la littérature « grise » sans aucune approche scientifique, mais plutôt par des expériences empiriques personnelles effectuées sur de petites superficies et sous des conditions variables et clandestines. Plus précisément, la fertilisation est considérée comme étant un volet important, car les producteurs font souvent affaire avec des fournisseurs d'engrais qui vendent leurs produits à des prix élevés et qui ne répondent pas nécessairement aux besoins ponctuels de la plante au cours de son développement, ce qui mène à des pertes de productivité et à une hausse du coût de production (Yep *et coll.*, 2021).

Plusieurs producteurs de cannabis se tournent vers la production hydroponique hors sol, car elle amène une récolte plus homogène et plus productive (AlShrouf, 2017; Asaduzzamen *et coll.*, 2015; Chandra *et coll.*, 2014) tout en réduisant l'utilisation d'eau et d'engrais (Sambo *et coll.*, 2019). D'ailleurs, les producteurs sont tenus de superviser tous les intrants fournis aux plantes. Pour cette raison, certains utilisent des systèmes aéroponiques ou en eau profonde (*deep-water*) afin d'avoir un meilleur contrôle. Bien que ces systèmes de cultures soient reconnus pour offrir de

meilleurs rendements et de maximiser l'utilisation de l'espace, ils demandent une bonne maîtrise des principes de la fertilisation et des équilibres nutritionnels en fonction du développement de la plante.

Afin de mieux soutenir les producteurs pour une gestion optimale de leur fertilisation, nos efforts ont été mis sur les effets des trois principaux macronutriments, soit l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) sur le développement des plantes et leur productivité au niveau des fleurs et des composés actifs. La littérature actuelle est parfois contradictoire et principalement orientée vers les effets de l'azote chez le chanvre cultivé au champ. Peu d'études sur la fertilisation de *C. sativa* ont été réalisées dans le cannabis médical et dans un contexte commercial. Pour cette raison, nous avons étudié, chez un producteur cultivant dans un système aéroponique, les taux d'absorption des principaux éléments nutritifs (N, P, K, Ca et Mg) de deux génotypes lors de la floraison, et ce, sous deux concentrations d'azote. Par la suite, les effets de cinq concentrations de P et deux concentrations de K ont été étudiés dans un système de culture en eau profonde situé dans les serres de l'Université Laval afin d'étudier la courbe de réponse de la plante à P sous deux niveaux de K et ainsi déterminer le niveau optimal pour le développement des inflorescences et la synthèse des cannabinoïdes et des terpènes.

1. Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 Cannabis

Le *Cannabis sativa* L. est une plante herbacée annuelle de la famille des *Cannabaceae* provenant des régions tempérées du centre ou de l'ouest de l'Asie (Small, 2015). L'origine précise de la plante reste inconnue, car elle s'est rapidement distribuée en Eurasie en raison de sa capacité à s'adapter à différents climats tempérés et subtropicaux (Clarke et Merlin, 2013). Le *Cannabis* est l'une des plus anciennes plantes récoltées par l'Homme en raison de sa large distribution et de ses nombreuses fonctionnalités : sa fibre, ses graines, son huile et ses propriétés intoxicantes. Une étude récente indique que sa première utilisation remonterait à 12 000 ans (Ren *et coll.*, 2021). Sa fibre résistante permet la fabrication de divers objets, dont des vêtements, des cordes et du papier (Small, 2017). Le chanvre a été, jusqu'au 19^e siècle, l'une des principales sources de fibre en Occident. Alors que le chanvre prédominait en Europe, le cannabis médical ou récréatif était davantage présent en Asie et au Moyen-Orient pour des raisons religieuses et spirituelles (Clarke et Merlin, 2013 ; Small, 2015). Ce n'est qu'après la guerre française de 1798 à 1801 en Égypte et en Syrie que les connaissances sur les propriétés hallucinogènes de la plante ont été introduites et distribuées en Europe. Auparavant consommé par la classe pauvre et les minorités ethniques, le cannabis récréatif a augmenté en popularité aux États-Unis durant les années 1960, soit lors de la vague hippie. L'arrivée de cette drogue chez les jeunes Américains a engendré un resserrement important de son utilisation (Small, 2015).

1.1.1 Le marché du cannabis médical

Selon un rapport de l'Office des Nations unies contre la drogue et le crime (ONUDC) publié en 2020, le cannabis est la drogue la plus utilisée dans le monde. Il est estimé que 192 millions de personnes ont consommé du cannabis au moins une fois au courant de l'année 2018. La même année, 4 303 tonnes de cannabis sous forme de plantes et 1 307 tonnes de résines ont été saisies dans le monde. L'Amérique du Nord constitue le marché le plus important, avec 8,8% de la population qui aurait consommé du *Cannabis* au cours de la dernière année ; 4,7% de la population américaine de 18 ans et plus consommerait quotidiennement du cannabis. En comparaison, seulement 1% de la population adulte en Europe de l'Ouest et centrale serait des usagers quotidiens de cannabis.

Actuellement, seulement deux pays ont légalisé l'utilisation récréative et médicale du cannabis, soit l'Uruguay et le Canada. Cependant, plusieurs États américains ont aussi légalisé cette espèce, mais elle n'est pas encore reconnue légalement au niveau fédéral.

Au Canada, le cannabis a été légalisé le 17 octobre 2018. Depuis, le nombre de titulaires de licence de cannabis a environ quadruplé en passant de 120, en septembre 2018, à 499 en septembre 2020 (Statistique Canada, 2020). L'Ontario est la province comportant le plus de licences, avec plus du tiers des titulaires autorisés au Canada.

Tableau 1. 1 Nombre de titulaires de licence fédérale par province en septembre 2020.

Province	Nombre de titulaires de licence
Colombie-Britannique	121
Alberta	55
Saskatchewan	23
Manitoba	10
Ontario	193
Québec	56
Nouveau-Brunswick	11
Nouvelle-Écosse	22
Île-du-Prince-Édouard	3
Terre-Neuve-et-Labrador	5
Canada	499

Tiré de Statistique Canada (2020)

En 2019, 17% des Canadiens âgés de 15 ans et plus ont déclaré avoir consommé du cannabis durant cette période. Il s'agit d'une augmentation du taux de 2% depuis la légalisation au pays. Les provinces ayant les plus hauts taux de consommateurs sont le Nouveau-Brunswick (20%), Terre-Neuve-et-Labrador (21%) et la Nouvelle-Écosse (26%). Au Québec, la consommation est inférieure à la moyenne avec 12% des résidents. Malgré la légalisation, seulement 28% des consommateurs ont avoué avoir obtenu tout leur cannabis d'une source légale. Le pourcentage grimpe à 53% pour ceux ayant acheté du cannabis d'une source légale et illégale (Statistique Canada, 2019).

Les ventes mensuelles dans le secteur du détail au Canada sont en croissance. De fait, deux ans après la légalisation, les ventes mensuelles ont plus que sextuplé et sont passées de 42 millions \$ en octobre 2018 à 270 millions \$ en octobre 2020. 25,4% des ventes, d'octobre 2018 à octobre 2020, ont été réalisées en Ontario, suivies par l'Alberta (21,8%) et le Québec (20,1%) (Statistique Canada, 2020).

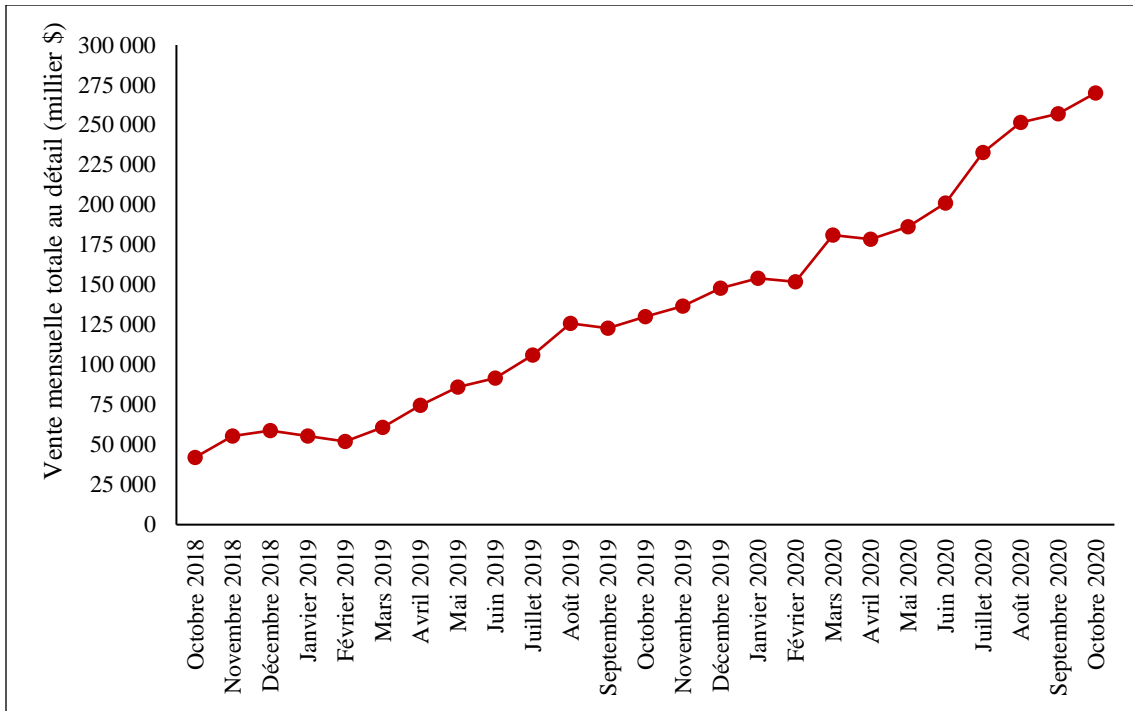


Figure 1. 1 Ventes mensuelles au détail des produits à base de cannabis au Canada deux ans suivant la légalisation en octobre 2018 (Compilation des données de Statistique Canada, 2020).

1.1.2 Les dimorphismes sexuels

Le *Cannabis sativa* L. est une plante dioïque, ce qui veut dire que les organes mâles et femelles sont situés sur des plantes différentes (Small, 2015). Les dimorphismes sexuels facilement visibles entre les deux sexes mènent à une sélection des sexes pour leurs différentes propriétés. Les plantes dites «mâles» sont généralement 10 à 15% plus hautes que les plantes «femelles» (Small, 2015), ce qui assure un meilleur relâchement du pollen par le vent (Potter, 2014). Leur apparence est plus délicate, plus mince et ces plantes mâles présentent moins d’embranchements que les plantes femelles (Small, 2015). Leur stature plus mince permet d’obtenir une densité de plantes plus élevée au champ. De plus, leurs entrenœuds sont moins nombreux et plus espacés en raison du plus faible taux d’embranchement. Cette caractéristique permet d’obtenir des fibres plus longues et de meilleures qualités. Ainsi, dans la culture du chanvre industriel, les plantes mâles sont davantage prisées pour la production de fibre (Small, 2016). Cependant, il est encore impossible de déterminer le sexe des graines avant le semis. En conséquence, des variétés de chanvre monoïques ont donc été développées afin d’obtenir une productivité régulière (Potter, 2014). Pour la production de cannabis récréatif ou médical, les plantes mâles sont rapidement éliminées, puisqu’ils produisent environ 20 fois moins de THC (Δ -9-tétrahydrocannabinol) que les plantes femelles (Small, 2015). De plus, lorsque les plantes femelles poussent en absence de pollen, elles allongent leur période de

floraison et produisent, par conséquent, de plus grosses inflorescences (Potter, 2014) avec une teneur en THC plus élevée (Potter *et coll.*, 2008).



Figure 1. 2 Dimorphismes sexuels entre les fleurs femelles et les fleurs mâles de *C. sativa* L. (OCS, 2021).

En raison de leur production importante en cannabinoïdes et en terpènes, ce sont les plantes femelles qui sont utilisées dans l'industrie du *Cannabis* médicinal ou récréatif. Les inflorescences sont des grappes de calices subsessiles nommés couramment « *buds* » dans l'industrie. Elles sont protégées par des bractées unifoliaires sur lesquelles les trichomes se forment. Les grappes de fleurs sont parfois tellement rapprochées qu'on dirait qu'elles ne forment qu'une seule grappe. On appelle ce regroupement un « *cola* ». Celui situé à la dominance apicale de la plante est appelé le « *cola* » principal (OCS, 2021). L'ovule se trouve au fond du calice. Le fruit du *Cannabis* est un akène. Deux très longs pistils sortent afin de capter le pollen par les papilles stigmatiques. Les stigmates sont blancs lors de leur émergence et deviennent brunâtres ou orangés lorsqu'ils deviennent trop matures pour recevoir le pollen (Small, 2016). Les petites feuilles se développant à l'intérieur des inflorescences (*colas*) sont appelées « *sugar leaf* » en raison de la présence abondante de trichomes qui donnent l'apparence de sucre saupoudré sur les feuilles.

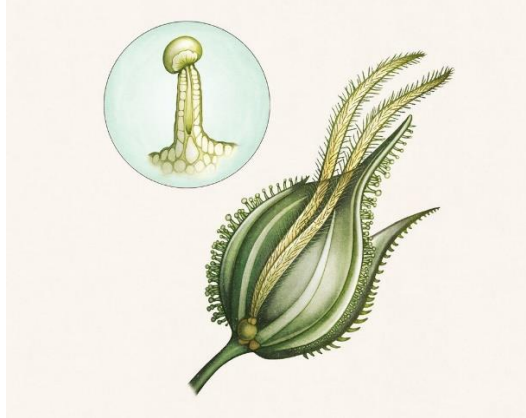


Figure 1. 3 Illustration d'un calice et d'un trichome (OCS, 2021).

Les plantes femelles qui sont cultivées sans la présence de mâles sont nommées «*sinsemilla*» qui provient de l'espagnol signifiant «sans graines». Elles représentent la majorité du cannabis illégal saisi aux États-Unis (ElSohly *et coll.*, 2016) et aux Royaume-Unis (Potter *et coll.*, 2008). Leur popularité provient du fait que ces plantes femelles contiennent les teneurs en THC les plus élevées (jusqu'à 23%) avec très peu de CBD, ce qui permet d'obtenir un effet psychoactif plus important (Potter *et coll.*, 2008).

1.1.3 La taxonomie du *Cannabis*

La nomenclature de *Cannabis sativa* L. est très controversée. Les taxonomistes et les biologistes ne s'entendent pas sur la classification du genre *Cannabis* et de ses espèces (McPartland et Guy, 2017). Certains favorisent le regroupement de toutes les plantes du genre *Cannabis* en une seule espèce *sativa* divisée en deux sous-espèces (chanvre et drogue), et à leur tour sous-divisées en deux variétés (sauvage et domestiqué) (Small et Cronquist, 1976). D'autres biologistes divisent le genre *Cannabis* en trois espèces : *C. sativa*, *C. indica* et *C. ruderalis* (Hillig, 2005). Récemment, quatre groupes ont été proposés selon leur utilisation et leur région de domestication (Small, 2017) :

1. Les plantes non narcotiques domestiquées pour la production de fibre et parfois pour ses graines oléagineuses en Europe et en Asie occidentale. Leur teneur en THC est faible et forte en CBD ;
2. Les plantes non narcotiques domestiquées pour la production de fibre et parfois pour ses graines oléagineuses en Asie orientale, particulièrement en Chine. Leur teneur en THC est faible à modérée et forte en CBD ;
3. Les plantes narcotiques domestiquées dans une large étendue de l'Asie du Centre-Sud pour une très haute teneur en THC exclusivement ;

4. Les plantes narcotiques domestiquées dans l'Asie du Sud, particulièrement en Afghanistan est les pays voisins. Leur teneur en THC et CBD est modérée.

Un cinquième et un sixième groupe sont d'ailleurs considérés pour représenter respectivement les plantes issues de l'hybridation entre les deux groupes fibreux (1 et 2) et les deux groupes narcotiques (3 et 4) (Small, 2017).

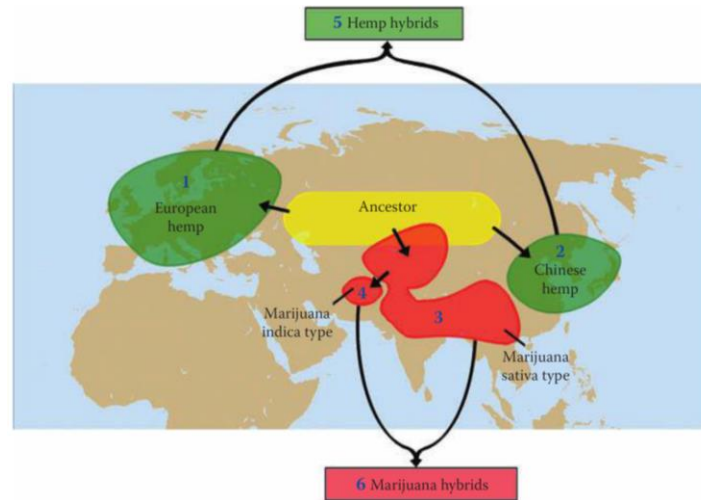


Figure 1. 4 Distribution géographique des six groupes domestiqués de *Cannabis* (Small, 2017).

La littérature taxonomique et populaire rend la différenciation entre les termes «*sativa*» et «*indica*» difficiles pour l'identification de ces plantes. Traditionnellement, les taxonomistes utilisent le terme «*sativa*» pour désigner les plantes non narcotiques, comme le chanvre, alors que le terme «*indica*» est utilisé pour les plantes narcotiques (Small, 2017). Cependant, au sein de l'industrie, les deux termes sont employés pour indiquer le potentiel toxicologique des plantes : les plantes de types «*sativa*» ayant un potentiel narcotique plus important (THC élevé et CBD inexistant ou faible) que les types «*indica*» (THC et CBD moyen) (McPartland et Guy, 2017 ; Small, 2017 ; Sawler *et coll.*, 2015).

Selon Sawler *et coll.* (2015), le *Cannabis* est hétérozygote et le nom du cultivar utilisé n'est donc pas une garantie d'une génétique unique. Ces auteurs ont en effet observé que dans 6 des 17 comparaisons effectuées (35%), les différents échantillons analysés étaient davantage génétiquement similaires à des échantillons portant un autre nom qu'aux échantillons issus d'un même cultivar. De plus, leur étude a démontré qu'il y avait une corrélation modérée entre l'héritage *sativa* et *indica* rapporté et l'analyse génétique de ces génotypes. Par exemple, le cultivar 'Jamaican Lambs Bread' considéré comme étant à 100% du *C. sativa*, était en fait un *C. indica* à 98%. En

somme, les pratiques et la reproduction clandestines mal organisées ont engendré des plantes homozygotes et incorrectement identifiées.

Tableau 1. 2 Différences observées entre les deux groupes narcotiques de *Cannabis* selon la nomenclature utilisée par l'industrie.

Caractéristiques	Groupe 3	Groupe 4
Terminologie	sativa	indica
Distribution	Asie du Sud	Afghanistan, Pakistan et Nord-Ouest indien
Climat	Semi-tropical	Fraîche et aride
Physiologie	Longs entrenœuds, peu denses, colas allongés	Entrenœuds courts, coniques, très denses, colas compacts
Maturation	Tardive	Hâtive
Hauteur	2-4 m	1-2 m
Foliole	Étroite	Large
Couleur	Vert pâle	Vert foncé
Arôme	Plaisant	Déplaisant
Teneur en THC	Forte	Moyenne
Teneur en CBD	Inexistant à faible	Moyenne
Effets psychologiques	Euphorique, énergique	Sédatif, relaxant

Adapté de Small (2017)

1.2 Composés bioactifs

Le *Cannabis* est une plante contenant une quantité impressionnante de composés phytochimiques (plus de 565 composés identifiés ; ElSohly *et coll.*, 2017). Environ 483 composés sont uniques au genre *Cannabis* (Brenneisen, 2007). Ainsi, on retrouve 120 cannabinoïdes, 140 terpènes, 25 phénols non-cannabinoïdes et 23 flavonoïdes (Booth *et coll.*, 2017 ; Andre *et coll.*, 2016 ; Clarke et Watson, 2007 ; ElSohly *et coll.*, 2005 ; ElSohly *et coll.*, 2017). Ces composés secondaires sont produits et entreposés dans des appendices appelés trichomes (Potter, 2014).

1.2.1 Trichomes

Les trichomes sont de fines excroissances ou appendices retrouvés sous différentes formes chez les plantes. Plus de 300 d'entre eux ont été décrits jusqu'à maintenant (Potter, 2014). Ces petits poils ou excroissances unicellulaires ou multicellulaires se forment sur l'épiderme des feuilles, des tiges et des organes reproducteurs. Ils agissent comme barrière protectrice contre différents stress abiotiques et biotiques, en outre contre les rayons UV, les herbivores, les variations de température, la sécheresse et les pathogènes (Xiao *et coll.*, 2017).

Chez le *C. sativa*, les trichomes sont la source principale de production de cannabinoïdes et de terpènes (Potter, 2014 ; Small, 2017). Ceux qui en produisent se situent dans les parties aériennes

de la plante, majoritairement sur les bractées et les feuilles à proximité des fleurs. On retrouve peu de cannabinoïdes dans les racines ou dans les graines. Les tiges contiennent environ 0,3% de THC. Les feuilles du bas en contiennent environ 1%, alors que celles du haut peuvent en contenir de 2 à 3%. Les fleurs représentent l'emplacement où la quantité de THC est la plus grande, soit jusqu'à 20% de la masse sèche (Potter, 2014) ou plus (nouveaux génotypes).

Les trichomes sont classifiés en deux catégories : les trichomes non glandulaires et les trichomes glandulaires. Le premier type est présent chez la majorité des plantes vasculaires alors que le deuxième type est présent chez 20 à 30% des plantes (Potter, 2014). On retrouve cinq formes de trichomes sur la plante femelle de *Cannabis*, soit deux non glandulaires et trois glandulaires. Seuls les trichomes glandulaires produisent des cannabinoïdes et des terpènes. Une forme supplémentaire située exclusivement sur les anthères a été observée sur les plantes mâles ; le trichome sessile anthérique (Potter, 2009).

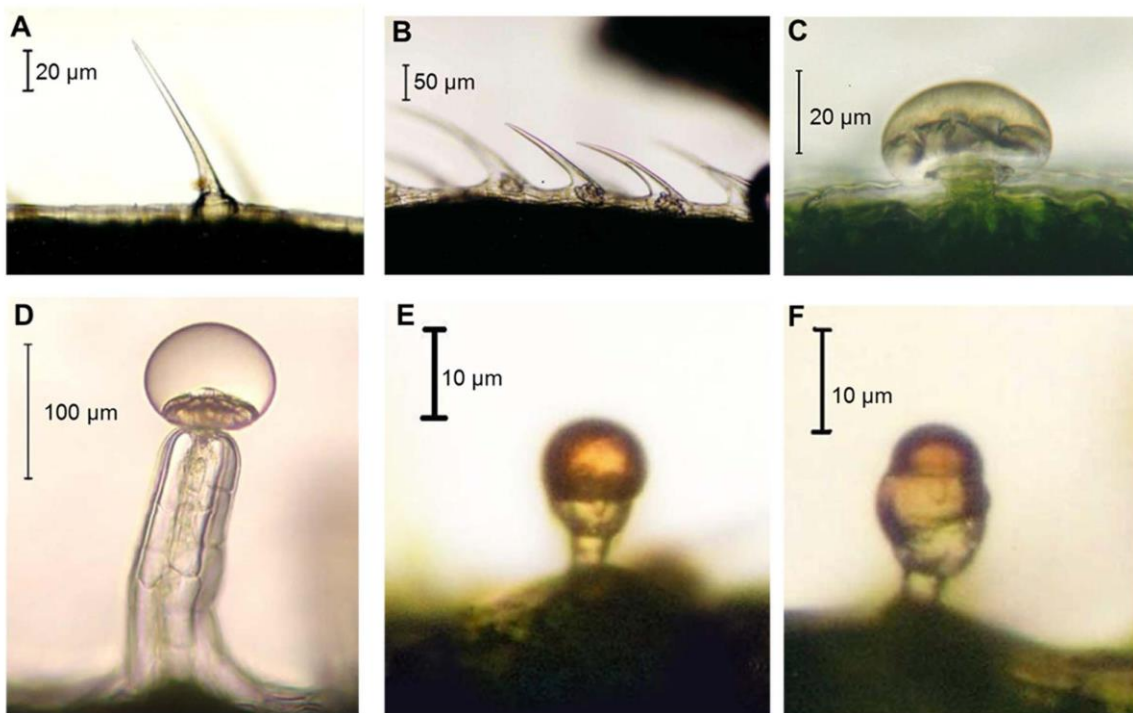


Figure 1. 5 Trichomes présents chez le *Cannabis*. **A.** Trichome unicellulaire simple ; **B.** Trichome cystolithique ; **C.** Trichome glandulaire sessile ; **D.** Trichome glandulaire capité ; **E.** Trichome bulbeux simple ; **F.** Trichome bulbeux complexe (Potter, 2009).

Trichome unicellulaire simple - Les trichomes unicellulaires simples se forment dès la sortie des cotylédons. Ils se développent en abondance sur la surface inférieure des feuilles et moins sur la surface supérieure (Potter, 2014). Ses poils pubescents permettraient de diminuer les pertes d'eau

et de réduire les dommages des températures extrêmes (Potter, 2014). Ils peuvent aussi servir de barrière physique aux insectes (Small, 2016).

Trichome cystolithique - Les trichomes cystolithiques sont d'abord observés sur la surface supérieure des premières vraies feuilles de *Cannabis*. À la base de ces trichomes se forme un cystolithe qui est une masse de cristaux de carbonate de calcium (Potter, 2014). Ces cristaux donnent une surface rugueuse aux feuilles et serviraient à prévenir les attaques d'herbivores sur les feuilles de la plante. Des cas de phytodermatoses et d'urticaires ont été observés chez des producteurs de *Cannabis*. Ceci pourrait être relié à une exposition des employés aux cystolithes et à l'acide oxalique en forte concentration sur le feuillage (Potter, 2014).

Trichome glandulaire sessile - Ce trichome est identifiable par sa tête aplatie et la présence de cellules sécrétrices à sa base. La tête est connectée aux cellules du mésophile par des cellules basales peu visibles (Potter, 2014). Ce trichome est retrouvé sur la surface inférieure des feuilles. Lorsque des sucres sont synthétisés dans les tissus du mésophile, certains sont dirigés vers les trichomes où ils seront transformés ensuite en cannabinoïdes et en terpènes par les glandes sécrétrices. Au-dessus de ces cellules se trouve une chambre appelée réservoir sécréteur dans laquelle les cannabinoïdes et les huiles essentielles sont entreposés (Potter, 2014). La fonction des trichomes glandulaires sessiles n'est pas connue, mais il a été suggéré qu'ils agiraient comme protection contre les prédateurs. Ces trichomes contiennent des sesquiterpènes qui donnent un goût amer réduisant l'appétence de la plante aux herbivores (Potter, 2014).

Trichome glandulaire capité - Les trichomes glandulaires capités sont les trichomes les plus importants quant à la production de cannabinoïdes et de terpènes. Ils sont deux fois plus gros que les trichomes glandulaires sessiles et peuvent contenir jusqu'à huit fois le volume de ceux-ci (Potter, 2014). On les retrouve abondamment sur les calices, les bractées, les bractéoles et les feuilles des inflorescences ; les plantes mâles en possédant très peu. En plus de produire une grande quantité de cannabinoïdes et de terpènes, ces trichomes sont un moyen de défense contre les prédateurs. En effet, les trichomes glandulaires capités produisent plus de monoterpènes que les trichomes sessiles et ceux-ci produisent un solvant adhésif, la résine, qui emprisonne les insectes. Ils sont donc incapables de se nourrir et de se reproduire. De plus, l'acide cannabigérolique et le THCA sont des cannabinoïdes qui peuvent provoquer l'apoptose des cellules d'insectes (Potter 2014).

Au départ, les trichomes glandulaires capités ont une tête translucide, mais qui devient de plus en plus blanc et opaque alors que les fleurs deviennent de plus en plus matures. À partir de la cinquième semaine de floraison, les trichomes commencent à prendre une couleur ambrée. Ce qui

provoque cette coloration est encore inconnu, mais il est suggéré par Potter (2009) qu'il puisse s'agir d'une réaction d'oxydation provoquée par l'entrée d'oxygène à partir de la cicatrice formée lorsque la tête du trichome se détache des cellules basales ou des coproduits formés dans le catabolisme des cellules sécrétrices. Plus la tête du trichome est ambrée et foncée, plus son contenu en THC tend à diminuer, alors que celui en CBD augmente (Potter, 2009).

Plusieurs producteurs de cannabis se réfèrent à la couleur des trichomes pour décider du moment approprié de la récolte. Certains préfèrent récolter lorsque la majorité des têtes sont blanches opaques, car il s'agirait du moment où le contenu en THC serait le plus fort. La majorité préfère récolter les inflorescences lorsque 30 à 50% des trichomes sont ambrés afin d'avoir un meilleur équilibre entre la teneur en THC et en CBD des trichomes. Selon des études réalisées par De Backer *et coll.* (2012) et Chandra *et coll.* (2009), la teneur en THC est la plus élevée vers la sixième et la septième semaine de floraison et diminue légèrement les semaines suivantes, alors que les trichomes deviennent plus foncés.

Trichome bulbeux - Les trichomes bulbeux sont les plus petits des trichomes glandulaires. On les retrouve sur toute la surface des parties aériennes de la plante. Ils sont connectés à l'épiderme par deux cellules. Celle du haut est plus large que celle du bas, ce qui leur confère une tête glandulaire sphérique ou, rarement, une tête multicompartimentée (Potter, 2014). Leur fonction exacte n'est pas encore connue, mais il est suggéré que les trichomes bulbeux alerteraient la plante lorsque des prédateurs sont présents. Lorsque les insectes se déplacent et arrachent ces trichomes, cela provoquerait le relâchement de produits chimiques signalant leur présence, ce qui engendrerait le développement de trichomes glanduleux plus gros et plus nombreux. Compte tenu de leur petite taille, ils ne participent pas activement à la production des métabolites secondaires de la plante (Potter, 2014).

1.2.2 Terpènes

Les terpènes font partie de composantes organiques les plus diverses dans le monde. Actuellement, environ plus de 30 000 terpènes ont été identifiés (Breitmaier, 2006 ; Ro, 2011). Les terpènes sont des composés volatils ayant plusieurs fonctions pour les plantes. Ils peuvent attirer les insectes lors de la pollinisation ou bien repousser les animaux herbivores pour les dissuader de les consommer. Certains sont aussi des régulateurs de croissance chez les plantes (Breitmaier, 2006). Bien que certains terpènes soient fondamentaux pour des processus physiologiques, la majorité d'entre eux sont des métabolites secondaires chez les espèces végétales, ce qui signifie qu'ils sont des composés non essentiels à la survie d'une plante (Ro, 2011). Les terpènes peuvent être facilement récupérés sous la forme d'huile essentielle par un processus de distillation (Breinneisen, 2007).

Le *Cannabis* contient environ 140 différents terpènes qui composent son odeur et sa saveur. De plus, ils offrent des effets bénéfiques sur la santé humaine, en outre, des effets anxiolytiques, antibactériens, anti-inflammatoires et sédatifs (Booth *et coll.*, 2017). Les terpènes auraient un effet d'entourage avec les cannabinoïdes, c'est-à-dire, un effet synergique entre les terpènes et les cannabinoïdes (Booth et Bohlmann, 2019 ; Russo, 2011).

Structure

Les terpènes sont des squelettes de carbones constitués d'unités isopréniques (C₅)_n que l'on appelle la règle de l'isoprène. Pour cette raison, les terpènes sont aussi parfois nommés «isoprénoïdes» (Breitmaier, 2006). Ces squelettes peuvent être sous la forme d'hydrocarbures linéaires ou cycliques avec des composés organiques (p. ex. alcool, aldéhyde, cétone, éther et ester) (Brenneisen, 2007). Les terpènes sont classifiés selon le nombre de répétitions d'unités isopréniques (Tableau 1.4).

Tableau 1. 3 Classification des terpènes selon le nombre d'unités isopréniques.

Type de terpène	Unité isoprénique (n)	Nombre de carbone
Hémiterpène (isoprène)	1	C ₅
Monoterpène	2	C ₁₀
Sesquiterpène	3	C ₁₅
Diterpène	4	C ₂₀
Sesterpène	5	C ₂₅
Triterpène	6	C ₃₀
Tétraterpène	8	C ₄₀

Réalisé à partir de Breitmaier (2006)

Chez le *C. sativa*, les terpènes les plus courants sont les monoterpènes, suivis par les sesquiterpènes (Brenneisen, 2007 ; Potter, 2009 ; Mudge *et coll.*, 2019 ; Russo, 2011). Dans une étude réalisée par Ross *et coll.* (1996), ils ont identifié la composition d'huiles essentielles de *Cannabis sativa* cultivés en serre. Les auteurs ont obtenu des concentrations en monoterpènes et en sesquiterpènes variant respectivement entre 62,0 à 92,5% et 6,8 à 35,6% du contenu total en terpènes. Le limonène, le linalol, le myrcène, le pinène et le terpinolène sont les composés monoterpéniques les plus couramment retrouvés dans le *Cannabis* (Andre *et coll.*, 2016 ; Brenneisen, 2007 ; Russ, 2011).

Quant aux sesquiterpènes, il s'agit de β -caryophyllène et d' α -humulène (Booth et Bohlmann, 2019 ; Mudge *et al.*, 2019). Cependant, la constitution en terpènes varie grandement selon les génotypes (Small, 2017) et d'un individu d'un même génotype à l'autre (Booth *et coll.*, 2017).

Puisque les terpènes sont des composés volatils, des pertes sont susceptibles de se produire pendant le séchage et l'entreposage du *Cannabis*. Par exemple, Ross et ElSohly (1996) ont remarqué que la majorité des pertes survenait durant la première semaine de séchage et qu'environ la moitié du β -myrcène s'évaporait après un entreposage de trois mois dans des sacs de papier. De plus, il y a une plus grande perte par volatilisation des monoterpènes que des sesquiterpènes en raison de leur masse moléculaire plus faible. Ces pertes de terpènes pourraient aussi affecter les propriétés psychologiques du cannabis selon le temps et les conditions d'entreposage.

Tableau 1. 4 Propriétés pharmaceutiques des terpènes communément retrouvés chez le *Cannabis sativa*.

Terpène	Propriétés pharmaceutiques
Limonène	Antidépresseur, immunostimulant et antibactérien
Linalol	Anxiolytique, sédatif, anesthésique local et anti-convulsant
β -Myrcène	Analgésique, anti-inflammatoire, sédatif et relaxant musculaire
α -Pinène	Anti-inflammatoire, antibactérien et bronchodilatateur
Terpinolène	Antioxydant ^{a,b} , sédatif ^c et antibactérien ^d
α -Humulène	Anti-inflammatoire ^{e,f} , antibactérien ^g et anticancéreux ^h
β -Caryophyllène	Anti-inflammatoire, protège la paroi gastro-intestinale et antipaludéen

Adapté de Russ (2011)

^a Turkez *et coll.* (2015) ; ^b Grassmann *et coll.* (2005) ; ^c Ito et Ito (2013) ; ^d Evrendilek (2015) ; ^e Fernandes *et coll.* (2007) ; ^f Medeiros *et al.* (2007) ; ^g Pichette *et coll.* (2006) ; ^h Legault *et coll.* (2002).

Biosynthèse

Ces composés lipidiques sont majoritairement produits dans les trichomes (Andre *et coll.*, 2016). De fait, les terpènes représentent moins de 1% de la biomasse en poids chez le *Cannabis*, alors qu'ils peuvent constituer plus de 10% du poids des trichomes (Russo, 2011). En général, il est possible de récolter 1,3 L d'huile essentielle par tonne fraîche d'inflorescence. Cela représenterait un rendement possible de 18 L/ha d'huile essentielle pour les productions sinsemilla et de 8 L/ha pour les productions pollinisées de cannabis médical (Brenneisen, 2007). À titre de comparaison, chez d'autres plantes médicinales, les rendements en huile essentielle peuvent atteindre 7.9, 8.3, 9.2 et 14.2 L/ha respectivement pour l'origan (*O. bastetanum* L.), le sage (*S. lavandadufolia* L.), le romarin (*S. rosmarinifolia* V.) et la lavande (*L. lanata* L.) (Zuazo *et coll.*, 2019).

Chez les plantes, il existe deux voies métaboliques afin de produire les terpènes : la voie du mévalonate (MEV) et la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) (Booth *et coll.*, 2017 ; Kovalchuk *et al.*, 2020). Ces deux processus se déroulent dans des endroits différents de la cellule végétale, mais ils permettent, ultimement, la synthèse de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) et de son isomère, le diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), qui sont les précurseurs des isoprènes. La voie du mévalonate (MEV) se déroule dans le cytosol des cellules comparativement à la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) qui se déroule dans les plastides. De plus, le MEV mène à la synthèse des sesquiterpènes et des triterpènes, alors que le MEP produit les mono-, di- et tétraterpènes. La figure 1.6 résume les deux voies métaboliques menant à la biosynthèse des principaux terpènes du *Cannabis*. Trois molécules d'acétyl-CoA sont nécessaires à la formation d'IPP qui sera ensuite isomérisé en DMAPP dans la voie du MEV. Une molécule de pyruvate et une autre de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) sont utilisées pour la synthèse d'IPP dans la voie du MEP. Par la suite, le DMAPP est condensé en plusieurs séquences avec l'IPP afin de produire du géranyl-pyrophosphate (GPP) par la voie du MEP et du farnésyl-pyrophosphate (FPP) par la voie du MEV. GPP et FPP sont, respectivement, les précurseurs des monoterpènes et des sesquiterpènes (Booth *et coll.*, 2017 ; Kovalchuk *et coll.*, 2020 ; Ro, 2011).

Selon Potter (2009), les sesquiterpènes sont majoritairement présents lors de la phase végétative du cannabis avec 74,1 à 80,9% des terpènes totaux. Après trois semaines de floraison, les monoterpènes augmentent fortement, puisque le ratio monoterpène/sesquiterpène passe de 19 à 26% à 61 à 68%. Par la suite, les taux restent relativement stables. Aizpurua-Olaizola *et coll.* (2016) sont arrivés à des observations similaires comme quoi le contenu en monoterpènes augmente pendant la floraison, alors que celui des sesquiterpènes reste relativement stable.

1.2.3 Cannabinoïdes

Ce qui attire plusieurs consommateurs vers le *Cannabis* est bien entendu sa capacité à synthétiser les cannabinoïdes qui sont les agents actifs les plus importants de cette espèce. Les deux cannabinoïdes les plus connus sont le THC et le CBD. Le *Cannabis sativa* L. produit une grande variété de ces composés ; 120 cannabinoïdes ont été identifiés (Booth et Bohlmann, 2019 ; Small, 2017). Le terme «cannabinoïdes» représente les composés terpénophénoliques à 21 atomes de carbone (C₂₁) auparavant retrouvés uniquement chez le *Cannabis sativa* L. avant la découverte de récepteurs à des cannabinoïdes endogènes (endocannabinoïdes). Pour cette raison, les cannabinoïdes retrouvés dans le *Cannabis* sont plutôt référés comme étant des «phytocannabinoïdes». Des molécules synthétiques ont aussi été reproduites (Brenneisen, 2007). Cependant, il est faux de croire que les phytocannabinoïdes sont uniquement retrouvés chez le

Cannabis. Des études rapportent que certains phytocannabinoïdes ont été détectés chez d'autres espèces végétales comme *Helichrysum*, *Radula* et *Glycyrrhiza foetida* Desf. Toutefois, le *Cannabis sativa* L. demeure de loin la plante ayant la plus forte concentration de ces métabolites secondaires (Small, 2017).

Biosynthèse

La biosynthèse des cannabinoïdes est étroitement reliée à celle des terpènes. C'est pour cette raison qu'ils sont majoritairement retrouvés dans les trichomes (Kovalchuk *et coll.*, 2020 ; Sirikantaramas et Taura, 2017 ; Stout *et coll.*, 2012). Les cannabinoïdes sont classés en deux types, soit celui des cannabinoïdes neutres et celui des cannabinoïdes acides qui contiennent un groupe carboxyle (-COOH). Majoritairement, le *Cannabis* produit et accumule les cannabinoïdes acides. Ceux-ci sont instables et sont facilement décarboxylés par la lumière ou la chaleur. Ainsi, les cannabinoïdes deviennent neutres pendant l'entreposage et lorsqu'ils sont chauffés (De Backer *et coll.*, 2012 ; Sirikantaramas et Taura, 2017). En étant sous leur forme acide, les cannabinoïdes, par exemple le THCA, la forme acide du THC, sont très toxiques pour les plantes, incluant le *Cannabis*. Pour cette raison, ces composés seraient synthétisés et entreposés dans les trichomes afin d'éviter des dommages à la plante (Sirikantaramas et Taura, 2017).

La biosynthèse des cannabinoïdes dépend de deux voies métaboliques différentes. La première est celle des polycétides découlant de la synthèse des acides gras dans la cellule. Un hexanoïl-CoA est obtenu par l'ajout d'une coenzyme A (CoA) à une molécule d'acide hexanoïque. Par la suite, il réagit avec trois molécules de mélanoyl-CoA afin de produire une molécule d'acide olivetolique (OA) avec l'aide d'une polycétide synthase (Stout *et coll.*, 2012). Cette dernière est l'un des précurseurs des cannabinoïdes. La deuxième voie métabolique impliquée est celle du MEP observée plus tôt pour la synthèse des terpènes. Le géranyl-pyrophosphate (GPP) produit pour être transformé en terpènes peut aussi subir une alkylation avec l'OA et la prényltransférase aromatique afin de produire une molécule d'acide cannabigérolique (CBGA). Le CBGA est le précurseur commun des cannabinoïdes, puisqu'il est intimement lié à la synthèse du THC, du CBD et du CBC. Le CBGA est transformé en ces cannabinoïdes par l'action de leur synthase respective (THCA synthase, CBDA synthase et CBCA synthase) et de réactions d'oxydoréduction (Kovalchuk *et coll.*, 2020 ; Sirikantaramas et Taura, 2017 ; Stout *et coll.*, 2012). La figure 1.6 résume les différents sentiers métaboliques menant à la biosynthèse des cannabinoïdes et des terpènes chez le *Cannabis sativa*.

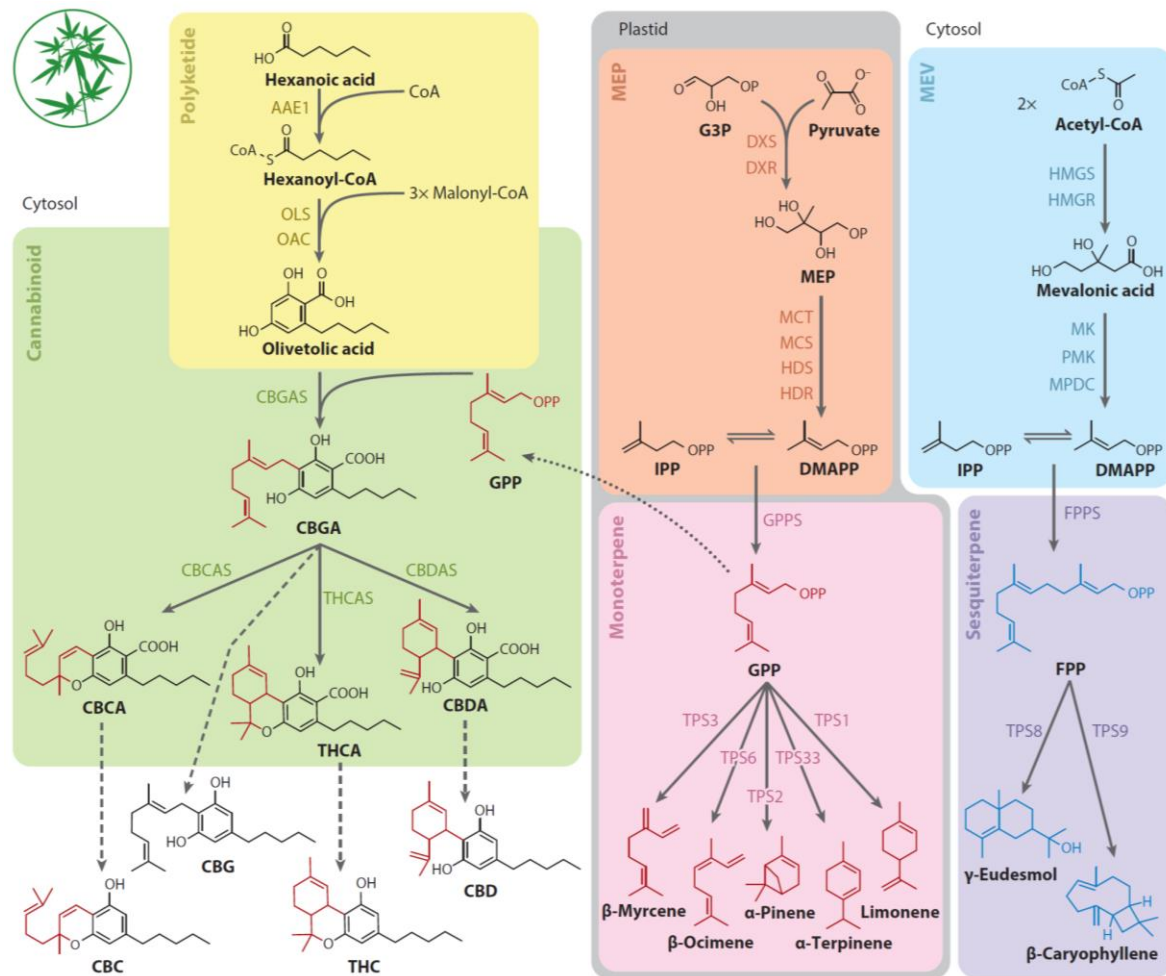


Figure 1. 6 Schéma de la biosynthèse des cannabinoïdes et des terpènes chez *Cannabis sativa* L. selon les sentiers métaboliques de la voie du mévalonate (MEV) et du méthylérythriol phosphate (MEP) (Kovalchuk *et coll.*, 2020).

Le THC

Le Δ -9-tétrahydrocannabinol aussi connu comme Δ^9 -THC ou simplement THC est le cannabinoïde le plus connu. Il s'agit du principal composé euphorisant et psychotrope. Toutefois, il possède aussi des effets anti-inflammatoires, analgésiques, stimulant l'appétit et antiémétique (Aizpurua-Olaizola *et coll.*, 2016). Cette molécule a été isolée et caractérisée pour la première fois par Raphael Mechoulam au milieu des années 1960 (Small, 2017). Sa concentration (>0,3%) détermine si une plante de *Cannabis sativa* est considérée comme étant une drogue ou du chanvre (Gouvernement du Canada, 2021). Le THC est retrouvé naturellement dans la plante sous forme acide, soit le THCA. Le THC est activé par l'action de la température (ex. : lorsqu'il est fumé ou cuisiné) qui permet la décarboxylation du THCA en THC (De Backer *et coll.*, 2012 ; Sirikantaramas et Taura, 2017). Pour cette raison, les étiquettes sur les produits en vente où la teneur en THC est inscrite

n'indiquent pas le contenu réel en THC, mais plutôt son *potentiel* en THC (Jikomes, 2017). Une des méthodes employées pour déterminer le potentiel en THC du *Cannabis* est de convertir la teneur en THCA en THC et d'y ajouter la teneur en THC déjà présente qui aurait pu être créée lors du séchage ou de l'entreposage du produit :

$$\%THC_{potentiel} = (0,877 * \%THCA) + \%THC$$

Le 0,877 dans l'équation représente le fait qu'un gramme de THCA contient 0,877 g de THC. Comme mentionné, cette méthode représente le potentiel total en THC et ne représente pas nécessairement ce qui est consommé par le consommateur, puisque ce n'est pas l'entièreté du THCA qui sera converti en THC lors de la combustion ou de la consommation. La méthode et le temps de combustion, ainsi que la température utilisée ont un impact sur l'efficacité de la conversion (Jikomes, 2017).

Lors de l'entreposage, le THC est graduellement converti en d'autres composés dont le cannabinoïde (CBN). Ce cannabinoïde aurait entre 10 et 25% des effets du THC. Pour cette raison, le pouvoir psychotique du *Cannabis* diminuerait durant l'entreposage. Une température élevée, l'humidité, la lumière et l'oxygène contribueraient à la dégradation des phytocannabinoïdes. Il est estimé qu'à une température ambiante de 22°C et en l'absence de lumière, le THC se décompose à un rythme de 6,9% par année. Ce taux diminue à 5,4% et à 3,8% par année lorsque les fleurs sont entreposées respectivement dans un réfrigérateur (4°C) ou dans un congélateur (-18°C) (Small, 2017). Potter (2009) a réalisé des essais pour déterminer l'évolution des cannabinoïdes et des terpènes lors de la floraison chez deux chimiotypes de *Cannabis* ; un avec une forte teneur en THC et l'autre en CBD. Il a observé que la quantité totale en cannabinoïdes est atteinte à la fin de la septième semaine de floraison (courte photopériode) et, que retarder la récolte à la huitième semaine, aurait peu d'impact quant à la composition en cannabinoïdes et terpènes pour les deux chimiotypes étudiés, soit un avec une haute teneur en THC et l'autre en CBD. Similairement, d'autres auteurs ont observé un patron similaire comme quoi, suivant l'atteinte du potentiel maximal en Δ^9 -THC, un plateau survenait (De Backet *et coll.*, 2012) suivi par une baisse de la teneur attribuée au début de la sénescence à la septième et à la treizième semaine de floraison pour Aizpurua-Olaizola *et coll.* (2016) et Chandra *et coll.* (2009), respectivement.

Le CBD

Le cannabidiol (CBD) est le second cannabinoïde le plus couramment retrouvé chez *Cannabis sativa*. Chez le cannabis récréatif et médical, le ratio THC/CBD peut varier grandement d'un cultivar/génotype à un autre. Les génotypes dits «*sativa*» ont généralement plus de CBD que les

«*indica*» dans lesquels il peut n’y avoir aucun CBD. Toutefois, sa présence reste inférieure à celle du THC. Par contre, il est très présent chez le chanvre, alors que le THC y est presque inexistant (Small, 2017). Le CBD est un agent non toxicologique du *Cannabis* et il est ainsi reconnu pour ses propriétés médicinales telles que ses effets anti-inflammatoires, analgésiques, anti-anxiétés et anti-tumeurs. Ceci fait de ce composé, un des phytocannabinoïdes les plus étudiés (Morales *et coll.*, 2017).

1.2.4 Cycle de production

Le *Cannabis sativa* L. est une plante photopériodique dite à «jours courts» dont la floraison est initiée lorsque la longueur de la période d’éclairage est égale ou inférieure à 12 heures. Dans l’industrie, la période utilisée pour décrire une photopériode supérieure à 12 heures est nommée la «phase végétative» où l’objectif principal est le développement de la biomasse aérienne et racinaire avant l’initiation florale. La seconde phase, nommée la «phase générative» ou la «phase de floraison», se déroule lorsque la photopériode est inférieure ou égale à 12 heures. Il existe aussi des génotypes dits «à jours neutres» qui ne sont pas sensibles à la photopériode et qui vont déclencher automatiquement leur floraison après 3 ou 4 semaines de croissance. Majoritairement, ce sont les plantes photopériodiques qui sont utilisées en production en serre et en bâtiment, car elles permettent une plus grande flexibilité quant au moment du déclenchement de l’initiation florale.

Le bouturage est la technique de multiplication privilégiée par les producteurs de *C. sativa*, car elle amène plusieurs avantages : simple à réaliser, coût faible, accessible aux petites et grosses entreprises, rapidité de la multiplication, uniformité génétique et sexage (Goulet, 2018). L’objectif principal du bouturage est la formation de racines adventives sur une tige coupée à partir d’une plante donneuse appelée plante mère. Les plantes «femelles» sont privilégiée auprès des producteurs, car elles possèdent une teneur en THC et des rendements en biomasse florale supérieurs que les plantes «mâles». Pour cette raison, le bouturage est une technique permettant rapidement aux producteurs de s’assurer que les plantes qu’ils obtiendront seront toutes des femelles comparativement aux graines où il est encore impossible de distinguer les plantes femelles des plantes mâles avant le début de la floraison.

Environ 21 jours après le bouturage et lorsque les racines sont bien enracinées, les plantes sont transplantées pour débiter la phase végétative sous une photopériode d’environ 18 heures, parfois même 24 heures. La croissance végétative est privilégiée jusqu’à ce que la stature souhaitée soit atteinte pour initier la floraison. La phase de floraison est initiée trois ou quatre semaines après le début de la première phase. Cette phase se déroule sur environ 7 ou 8 semaines avant la récolte des inflorescences. Rapidement, les bourgeons floraux apparaissent vers la 3^e semaine de l’initiation

florale. Au même moment, lors des trois premières semaines de floraison, les plantes peuvent doubler de hauteur. Ce phénomène est appelé «allongement floral» ou «*flowering stretch*». Par la suite, la croissance est réduite. À la 3^e et 4^e semaine, les trichomes et les pistils commencent à apparaître sur les bourgeons. Les pistils sont longs et blancs. Lors de la 5^e et 6^e semaine, les fleurs prennent la majorité de leur biomasse pendant ces dernières semaines. Les pistils commencent à changer de couleur en passant du blanc à rouge brun. Il s'agit du début de la sénescence des pistils, ce qui indique qu'ils ne peuvent plus recevoir de pollen pour fertiliser la fleur.

Le moment pour récolter les fleurs de *Cannabis sativa* L. est principalement déterminé en fonction de la couleur des trichomes. Au départ, ceux-ci sont transparents avant de changer au blanc et, finalement, en une couleur ambrée. Lorsque les trichomes sont d'une couleur laiteuse, il s'agit du moment où le contenu en THC serait le plus élevé avant de descendre légèrement par la suite (De Backer *et coll.*, 2012 ; Aizpurua-Olaizola *et coll.*, 2016). Quant au CBD, sa concentration reste relativement similaire au cours de la floraison (Aizpurua-Olaizola *et coll.*, 2016). Il a été observé que le meilleur moment pour récolter les fleurs de *Cannabis* est lorsque les trichomes sont blancs afin d'obtenir une forte réaction cérébrale, soit un «*high*¹». Néanmoins, plusieurs producteurs préfèrent récolter lorsqu'environ 30 à 50% des trichomes sont ambrés. La raison est que les effets obtenus sont davantage au niveau du reste du corps («*stoned*» ou «*couchlock*»).

1.2.5 Méthode de production

Trois méthodes de production sont employées dans la production de *C. sativa*, soit la production au champ, en serre ou en bâtiment. La production au champ est en pleine croissance au Canada avec 2,7 millions de mètres carrés comparativement à 1,9 million de mètres carrés en serres en date de mars 2020 (Deschamps, 2020). La production intérieure ou en bâtiment (*plant factory*) reste la méthode la plus courante avec 42% des producteurs qui utiliseraient exclusivement cette méthode de production comparativement à 12% pour la production en serre et en champ (Simakis, 2020). De nombreux producteurs de cannabis possèdent des installations intérieures afin de maximiser la densité de plante par mètre carré. Il y est aussi possible de faire de la production verticale sur plusieurs étages successifs. D'ailleurs, les paramètres de croissance optimaux (lumière, température, CO₂, humidité) sont généralement plus stables et peuvent être facilement modifiés si des génotypes différents se succèdent. Du même fait, il est possible de travailler avec seulement des génotypes à jours courts, car le temps d'éclairage est contrôlé par un minuteur. La phase de

¹ La mention «*high*» désigne un état énergétique, euphorique, hallucinogène qui peut durer environ 3 à 4 heures. Certaines personnes peuvent aussi souffrir de paranoïa ou d'anxiété. À l'opposé, la mention «*stoned*» indique un état sédatif pendant lequel le corps devient lourd, somnolant et peu réactif.

floraison est déclenchée dès que les plantes ont atteint la stature désirée. Le contrôle des phases végétatives et génératrices offre un calendrier de production plus stable pour les producteurs qui peuvent ainsi prévoir les prochaines opérations et maintenir les chambres de production au maximum de sa capacité. En absence de soleil, le spectre de lumière peut être manipulé par l'éclairage artificiel afin d'obtenir la réponse physiologique désirée.

1.3 La fertilisation N, P et K

1.3.1 Recommandation actuelle dans l'industrie

Actuellement, plusieurs fournisseurs de produits fertilisants offrent des programmes hebdomadaires de fertilisation selon le stade de développement des plantes. Whipker *et coll.* (2021) ont démontré que les programmes de fertilisation peuvent grandement varier d'un fournisseur à un autre. Par exemple, lors du développement des inflorescences (semaines 6 à 10), le fournisseur A recommande une concentration de 52 mg L⁻¹ de phosphore comparativement à 196 mg L⁻¹ pour le fournisseur B pour la même période de développement.

Tableau 1. 5 Exemples, de concentrations en N, P et K pour différente phase du cycle de production de *C. sativa* selon les produits de deux fournisseurs.

	Fournisseur	Boutures	Phase végétale	Initiation florale	Floraison	Fin floraison
Semaine		1-2	3-4	5	6-10	11-12
N (mg L ⁻¹)	A	125	150	150	150	100
	B	75	150	150	150	25
	C	75-150	100-150	100-150	100-150	25
	D			57		
P (mg L ⁻¹)	A	22	52	196	52	93
	B	65	43	130	196	84
	C	150-300	65-100	300-450	300-450	200
	D	5	5	5	5	5
K (mg L ⁻¹)	A	118	217	250	217	357
	B	63	271	125	250	193
	C	75-150	215-325	200-300	200-300	230

Réalisé à partir de Whipker *et coll.* (2021)

Un autre fournisseur (fournisseur C), recommande la formulation suivante à partir de produits commerciaux : Boost (15-30-15) semaines 1 (75 mg N L⁻¹) à 4 (150 mg N L⁻¹) ; Grow (12-8-26) semaines 2 et 3 (100-150 mg N L⁻¹) ; Bloom (10-30-20) semaines 5 à 10 (100-150 mg N L⁻¹) ; Cal Kick (15-0-14) semaines 3 à 10 ; Finisher (4-31-37) semaines 11 à 14 (25 mg N L⁻¹ et 200 mg P₂O₅ L⁻¹). Un supplément de Ca et Mg est suggéré (Spike) selon les besoins. Le partenaire de cette étude, IsoCanMed Inc., utilise les produits de la compagnie Current Culture H₂O (CC®) (fournisseur D) pour la culture de leurs plantes mères produites en eau profonde. La solution recommandée par la

compagnie : 3 mg $\text{NH}_4\text{-N L}^{-1}$, 54 mg $\text{NO}_3\text{-N L}^{-1}$ (N total 57 mg L^{-1}), 5 mg $\text{P-PO}_4\text{L}^{-1}$, 49 mg Ca L^{-1} , 12 mg Mg L^{-1} , 9 mg $\text{S-SO}_4\text{L}^{-1}$, 9 mg Cl L^{-1} , 1 mg Na L^{-1} , 0,89 mg Fe L^{-1} , 0,02 mg Cu L^{-1} , 0,10 mg Mn L^{-1} , 0,03 mg Zn L^{-1} , pour un pH de 5,42 et une CE de 0,58 mS cm^{-1} . La concentration en éléments nutritifs de cette solution est inférieure à celle recommandée par Cervantes (2015) ou autres compagnies fournisseurs d'intrants, ainsi que pour la production maraîchère en serre. Par exemple, la teneur en NO_3 recommandée par Cervantes (2015) est de 4,6 fois supérieures à celle de CC® alors que celles du P et du K sont de 16 et 9 fois plus élevées, respectivement.

D'ailleurs, il existe une surabondance de littérature grise sur la fertilisation dans les médias en ligne. Plusieurs des produits annoncés rapportent des gains en productivité sans toutefois être basés sur une approche scientifique, mais plutôt sur des expériences rapportées par certaines personnes pratiquant la culture légale ou illégale du *Cannabis* sur de petites superficies de cultures et sous des conditions environnementales très variables.

1.3.2 Impact sur la biomasse de la plante

Le *C. sativa* est considéré comme étant une plante nitrophile, ce qui signifie qu'il préfère se trouver dans un milieu riche en azote (Small, 2017). Pour cette raison, plusieurs études ont été réalisées afin de mieux cibler les besoins élevés en azote de la plante. Par conséquent, plusieurs auteurs ont déterminé que l'azote avait un effet significatif sur le rendement en biomasse, ainsi que sur leur développement. Une fertilisation croissante en azote a entraîné une augmentation de la hauteur des plantes de chanvre et de cannabis (Caplan *et coll.*, 2017 ; Campiglia *et al.*, 2016 ; Aubin *et coll.*, 2015), ce qui n'est pas souhaitable, car cela nécessite des supports plus importants pour éviter la chute des plantes et peut rendre les tâches ouvrières plus difficiles, en plus de l'espace habituellement limité de certaines installations. Saloner et Bernstein (2020) ont aussi remarqué une corrélation positive entre la hauteur, le nombre de nœuds et le diamètre de la tige et la concentration en N utilisée (30, 80, 160, 240 et 320 mg L^{-1} N) pendant la phase végétative du cannabis médical. D'autre part, pour le cannabis médical, Caplan *et coll.* (2017) ont observé une biomasse florale plus élevée lors d'une augmentation de la fertilisation azotée de 57 à 283 mg L^{-1} .

Le phosphore fait partie des trois plus importants nutriments en termes de quantité pour soutenir le développement des plantes avec l'azote et le potassium. Parmi les trois, le phosphore est le nutriment qui est généralement absorbé en plus faible quantité chez les plantes en raison de l'immobilisation de P dans le sol (Maathuis, 2009). Néanmoins, son rôle est tout aussi important, car il permet de produire l'ATP, la source d'énergie pour plusieurs réactions biochimiques. De plus, il est un constituant des acides nucléiques qui composent le matériel génétique des cellules. Pour cette raison, on retrouve une plus grande proportion de P entreposé dans les organes reproducteurs

pour permettre le développement des embryons, la germination et la croissance des plantules (Maathuis, 2009). Par conséquent, un manque de P peut provoquer un retard dans la floraison, une diminution du nombre de fleurs et la formation limitée des graines (Hakwesford *et coll.*, 2012). Quant à la biomasse, Cockson *et coll.* (2020) a obtenu une augmentation de la hauteur, du diamètre et de la biomasse totale des plantes de cannabis médical avec une fertigation croissante de 3,75 à 30,0 mg P L⁻¹. Shiponi et Bernstein (2021) ont réalisé une étude avec des concentrations supérieures (5, 15, 30, 60 et 90 mg P L⁻¹) sur des plantes de cannabis médical en phase végétative. Leurs résultats indiquent qu'il n'y a pas de gain supplémentaire en biomasse totale lorsque les concentrations en P étaient supérieures à 30 mg L⁻¹.

Le potassium démontre aussi un effet positif sur la biomasse du *C. sativa*. En effet, Yep et Zheng (2021) ont observé une corrélation positive avec l'ajout aux effluents piscicoles d'une concentration en K (27, 38, 48 et 59 mg K L⁻¹) dans un système en aquaponie et le rendement en biomasse florale par plante chez le cannabis médical sans toutefois obtenir d'effet de K sur la croissance végétative. Par ailleurs, lors de la croissance végétative du *Cannabis*, la croissance et les paramètres physiologiques ont été influencés par la concentration en K (Saloner *et coll.*, 2019). En effet, ces auteurs ont effectué une étude sur l'impact de différentes concentrations en K (15, 60, 100, 175 et 240 mg L⁻¹) sur la hauteur, le nombre de nœuds, le diamètre et la biomasse auprès de deux génotypes ('Royal Medic' [RM] et 'Desert Queen' [DS]) avec deux chimiotypes différents ; RM ayant une teneur similaire en THC et CBD et DQ ayant une forte teneur en THC et faible en CBD. RM a vu sa croissance aérienne augmentée avec une hausse de K, alors que la biomasse des feuilles, tiges et racines a augmenté jusqu'à 175 mg L⁻¹, puis a diminué à 240 mg K L⁻¹. Dans le cas de DQ, ce génotype était moins sensible aux applications de K, mais la croissance aérienne et racinaire a augmenté avec K. La biomasse des trois organes a été au plus faible à 15 mg K L⁻¹ pour, ensuite, rester inchangée entre 60 et 175 mg L⁻¹ et significativement augmenter à 240 mg L⁻¹. Par contre, Coffman et Genter (1997) n'ont observé aucun effet significatif de l'accroissement de la fertilisation en K (0, 50 et 150 mg L⁻¹) sur la croissance des plantes tout comme Finnan et Burke (2013) suite à l'apport de différentes quantités de K (0, 60, 90, 120 et 150 kg K/ha) chez le chanvre cultivé au champ. Chez d'autres espèces cultivées pour la biomasse florale, l'apport en K a également mené à une augmentation du nombre de fleurs et des rendements: Loka *et coll.* (2018) pour le coton (*Gossypium hirsutum* L.) irrigué avec une solution riche en K comparativement à un témoin sans apport potassique et Azeezahmed *et coll.* (2016) auprès du chrysanthème (*Chrysanthemum morifolium*), alors que le nombre de fleurs par plante est passé de 77,7 à 153,4 pour une concentration de 60 et 260 mg K L⁻¹, respectivement, lors de la phase reproductive.

1.3.3 Impact sur les cannabinoïdes

Comme décrit précédemment, l'efficacité des plantes à produire des métabolites secondaires peut être influencée par la disponibilité de certains éléments nutritifs. Chez le *Cannabis*, le peu d'études effectuées jusqu'à ce jour sur la nutrition minérale ne permet pas de conclure sur l'effet de la fertilisation azotée sur la production de cannabinoïdes. Caplan *et coll.* (2017) ont comparé différentes concentrations de N (57 à 283 mg L⁻¹) pour le *Cannabis sativa* cultivé dans deux milieux de culture à base de fibre de coco et suggèrent qu'une augmentation de la concentration de l'azote entraîne un effet de dilution du THC, THCA et CBGA suite à une augmentation de la biomasse des plantes qui s'est traduite en une diminution de la teneur (%) de ces cannabinoïdes, malgré le fait qu'il n'y ait pas eu d'effet sur les rendements par plante (g/plante). Ces auteurs ont également observé que la concentration optimale en azote maximisant le rendement en fleurs et leur teneur en cannabinoïdes a varié selon le type de substrat utilisé. Celui-ci a été de 212 à 261 mg L⁻¹ N pour un substrat plus drainant et de 283 mg N L⁻¹ pour un substrat moins drainant. Un substrat plus drainant a permis une augmentation de la masse sèche des fleurs de 11 % et une augmentation de l'indice de croissance de 13 %. Celui-ci a aussi augmenté la concentration des fleurs en THC de 20 % alors que le rendement par plant (masse sèche des fleurs) en THC, en THCA et en acide cannabigérolique (CBGA) a augmenté respectivement de 57 %, 22 % et 20 % par rapport à un substrat moins drainant.

Puisque la production des terpènes et des cannabinoïdes est reliée par un précurseur commun, soit le géranyl-pyrophosphate (GPP) provenant du sentier métabolique des sesquiterpènes, il est possible que la synthèse des cannabinoïdes soit reliée à la disponibilité du P dans le milieu de croissance. Néanmoins, l'influence du phosphore dans la production des cannabinoïdes reste encore très peu connue. Coffman et Genther (1997) ont observé, avec des plants de cannabis cultivés en serre (pot 12 cm ; loam), que l'accroissement de la fertilisation en phosphore (0, 50 et 150 mg P L⁻¹) était positivement corrélé au rendement en fleurs et à leur teneur en THC, alors que la teneur en phosphore extractible était corrélée à leur concentration en CBD. Par ailleurs, Cockson *et coll.* (2020) n'ont pas observé d'effet d'une augmentation sur la production de cannabinoïdes au-delà de 11,25 mg P L⁻¹.

Coffman et Genther (1997) n'ont pas observé d'effet significatif d'une augmentation des apports en K (0, 50 et 150 mg L⁻¹) sur la teneur en cannabinoïdes des fleurs.

1.3.4 Impact sur les terpènes

L'azote est un élément pouvant impacter la synthèse des terpènes chez les végétaux. Chez les espèces possédant des structures d'entreposage, comme les trichomes pour le *Cannabis sativa*, la formation de métabolites ayant un squelette carboné dépend de la fixation du CO₂ et, par conséquent, de l'azote (Ormeno et Fernandez, 2012). De fortes concentrations en azote dans les feuilles sont associées à une plus forte activité photosynthétique et à une plus haute concentration en terpènes (Ormeno et Fernandez, 2012). Les espèces du genre *Pinus* produisent plusieurs terpènes et ont été la source de plusieurs études quant aux effets de la fertilisation sur ces composés. Similairement au *Cannabis*, *Pinus* produit une résine acide comprenant des composés volatils qui sont entreposés dans une structure, ici, les épines. McCullough et Kulman (1991) ont observé des effets positifs de la fertilisation azotée sur les monoterpènes. Par contre, Kainulainen *et coll.* (1996) n'ont observé aucun effet de la fertilisation azotée sur la concentration en monoterpènes, sauf sur le camphre qui a eu un effet positif lors de hautes concentrations en O₃. Pour d'autres espèces végétales, les effets de N sur les terpènes sont variables. Close *et coll.* (2004) ont eu des effets positifs de N en pépinière sur le contenu en terpènes de l'*Eucalyptus globules* et l'*Eucalyptus nitens*. Une fertilisation en KNO₃ et en Ca(NO₃)₂ a cependant eu un effet négatif sur le contenu en mono- et sesquiterpènes des feuilles d'*Heterotheca subaxillaris* Lam. (Mihaliak et Lincoln, 1985). Muzika *et coll.* (1989) ont également observé des effets négatifs d'une fertilisation élevée sur 4 des 10 terpènes étudiés chez *Abies grandies* (Gougl) Lindl. en réponse à une fertilisation élevée en N, alors qu'aucun effet n'a été observé à des concentrations plus faibles. D'ailleurs, des résultats mettent en évidence l'importance de faire la distinction entre les facteurs anatomiques, physiologiques et biochimiques afin de mieux comprendre la production des terpènes en relation avec la fertilisation (Ormeno et Fernandez, 2012). Par exemple, Bjorkman *et coll.* (1991) ont observé que les sols riches en azote favorisaient la formation de résine dans les épines de pins et que les concentrations en résine acide dans les épines étaient limitées par la grosseur des structures d'entreposage plutôt que par le substrat pour la synthèse de la résine. Dans une autre étude, la fertilisation en N a augmenté le nombre de conduites de résine dans les épines, alors que la concentration en terpènes a diminué (Kainulainen *et coll.*, 1996). Cela suggère que, malgré un nombre croissant de structures d'entreposage des plantes cultivées dans des sols enrichis, ces structures ont besoin d'être remplies afin d'observer un effet significatif de l'azote sur la concentration en terpènes. L'incapacité des plantes à les remplir au fur et à mesure que leur nombre croît pourrait être due au coût énergétique important nécessaire à la production des terpènes comparativement à d'autres métabolites secondaires (Gershenson, 1994 ; Ormeno et Fernandez, 2012).

Le phosphore est un autre élément qui aurait potentiellement un impact sur la production de terpènes. La synthèse des terpènes est considérée comme étant plus énergivore par gramme que la plupart des autres métabolites primaires et secondaires des plantes en raison de la réduction chimique importante (Gershenzon, 1994). Par exemple, Gershenzon (1994) évalue qu'il faut entre 1,99 et 3,54 grammes de glucose pour produire un gramme de terpène. Dans le sentier MEV, le phosphore est nécessaire pour la synthèse des composés impliqués dans la biosynthèse des terpènes, dont trois molécules d'acétyl-CoA ; trois, d'ATP et deux, de NADPH (Booth *et coll.*, 2017 ; Kovalchuk *et al.*, 2020). Compte tenu de l'énergie importante qui est nécessaire à la biosynthèse des terpènes dans les végétaux, plusieurs auteurs ont réalisé des recherches sur les effets d'apport en phosphore, sous forme de fertilisation, sur la synthèse de ces molécules. Résultats : les effets sont variables d'une espèce à une autre ou d'une expérience à une autre même s'il y avait une augmentation des taux de photosynthèse (Blanch *et coll.*, 2010 ; Cockson *et al.*, 2020 ; Ormeno et Fernandez, 2012 ; Sampedro *et coll.*, 2011).

1.4 Problématique de recherche

Actuellement, un des défis dont font face les producteurs de *C. sativa* est le manque de connaissance scientifique agronomique sur les méthodes de culture (Chouvy, 2019). En raison du peu d'information éprouvée sur la fertilisation, les producteurs utilisent souvent des quantités fertilisantes ne répondant pas aux besoins ponctuels de la plante au cours de son développement, ce qui mène à des pertes de productivité et à une hausse du coût de production (Yep *et coll.*, 2020). Le sujet de cette étude de maîtrise avait donc pour but la caractérisation des besoins nutritifs de la plante au cours de la phase de floraison et l'étude de l'impact de N, P et K chez le *Cannabis sativa* L. Les résultats de cette étude visent ainsi à aider les producteurs à mieux connaître la quantité de fertilisants à apporter et à moduler leurs apports de nutriments en fonction des besoins des plantes afin d'optimiser la productivité et la teneur des inflorescences en cannabinoïdes et terpènes. Le projet a été réalisé dans le contexte d'une production hydroponique. Cette méthode a été choisie, car elle est souvent employée au sein de la production de *Cannabis* médical (Jin *et al.*, 2019) et il a été reconnu que la culture hors-sol est un outil efficace pour les recherches en nutrition minérale (Asaduzzamen *et coll.*, 2015).

La première partie du projet a été réalisée chez IsoCanMed inc. (Louiseville, QC) un producteur autorisé de *Cannabis* médical. L'entreprise utilise un système de culture aéroponique verticale. Des essais ont été menés afin de mieux comprendre les besoins de *C. sativa* tout au long de la floraison et pour vérifier son comportement sous différentes concentrations d'azote. La seconde partie s'est déroulée dans les serres de la FSAA de l'Université Laval en utilisant un système de culture en eau profonde pour vérifier, cette fois, les effets de différentes concentrations en K et P.

1.5 Hypothèses et objectifs

Hypothèse 1

Le *C. sativa* est une plante à croissance indéterminée, ce qui veut dire que la plante continue de croître lorsqu'elle est en floraison. Toutefois, à mesure que la floraison progresse, la croissance du *Cannabis* est réduite et la longueur des entrenœuds diminue. C'est ce qui permet la formation de l'inflorescence principale (cola) (Spiter-Rimon *et coll.*, 2019). De plus, la plante subit une croissance très rapide trois ou quatre semaines après la réduction de la photopériode (~12 heures), induisant l'initiation florale. Les plantes peuvent alors doubler leur hauteur. Ce comportement est appelé la phase d'allongement floral («flowering stretch»). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les besoins nutritifs de la plante en N sont plus importants au début de la phase de floraison de

façon à soutenir l'allongement floral, alors que les besoins en P et K sont importants tout au long du développement des inflorescences et lors de la biosynthèse des cannabinoïdes et terpènes.

Objectif 1

Pour vérifier si les besoins nutritifs de la plante, notamment en azote, sont plus importants au cours des premières semaines de floraison, l'objectif de la première série d'expérimentations effectuée en milieu commercial a été de caractériser les taux de prélèvement en N, P, K, Ca et Mg de *C. sativa* tout au long de la phase générative (floraison), et ce, sous deux concentrations en azote.

Hypothèse 2

Compte tenu de l'importance de l'azote et du phosphore pour la formation de précurseurs lors de la biosynthèse des cannabinoïdes et des terpènes, on pourrait prétendre qu'une fertilisation riche en azote et en phosphore pourrait stimuler et faciliter la formation de ces composés secondaires chez *C. sativa*. De plus, le potassium pourrait avoir un impact sur les rendements comme il a déjà été observé par Yep et Zheng (2021) sur les inflorescences du cannabis et auprès d'autres espèces florales (Loka *et coll.*, 2018 ; Azeezahmed *et coll.*, 2016). Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'une augmentation de la fertilisation en N, P et K permettrait d'accroître la biomasse des inflorescences (productivité) et leur qualité.

Objectif 2

Déterminer les effets de différentes concentrations de N, P et K sur la croissance et productivité, ainsi que sur la composition des fleurs en cannabinoïdes et terpènes.

Objectif 3

Proposer une fertilisation de référence en N, P et K pour la phase de floraison du cannabis médical cultivé en hydroponie, permettant d'augmenter la productivité et le contenu des fleurs en cannabinoïdes et terpènes.

Chapitre 2 : Dynamic of the nutrient uptake by drug-type *Cannabis sativa* L. under two nitrogen concentrations during the flowering stage of plants cultivated in vertical aeroponic system

Résumé

La production de cannabis médical (*Cannabis sativa* L.) est une industrie en pleine expansion suivant sa légalisation au Canada en 2018. Par contre, le manque de connaissance scientifique sur la culture du *Cannabis* est un des principaux défis. Afin de mieux comprendre la nutrition minérale du *Cannabis* médical, nous avons testé deux concentrations d’N (150 et 250 mg L⁻¹) sur le développement, les rendements floraux, le contenu en cannabinoïdes et sur l’absorption minérale de N, P, K, Ca et Mg dans un système aéroponique vertical en bâtiment. Nous avons observé qu’une concentration élevée en N a induit une hausse des rendements floraux (+29%) chez un génotype, mais elle a diminué de 9,5% la teneur total en THC peut importe le génotype. L’absorption de N, K et Ca ont augmenté jusqu’à la 3^e semaine avant de diminuer. Quant à la demande en P, elle a augmenté jusqu’à la semaine 3 pour atteindre un plateau, alors que l’absorption de Mg a été constante tout au long de la floraison.

Abstract

Drug-type *Cannabis sativa* L. is a fast-growing industry following its legalization in Canada in 2018. However, the lack of scientific agronomic knowledge about *Cannabis* cultivation is one of the main challenges for the producers. To better understand the mineral nutrition of drug-type cannabis, we tested the impact of two N concentrations (150 and 250 mg L⁻¹) on the development of cannabis, their flower yields, the cannabinoid content and the nutrient uptake of N, P, K, Ca and Mg during the flowering phase in an indoor vertical aeroponic system. We observed that a higher N fertilization had a higher flower yield (+29%) for one genotype, but it reduced by 9.5% of the total THC content regardless of the genotype. The nutrient uptake of N, K and Ca increased at the beginning and decreased around the third week. On the other hand, P demand increased during the flowering phase until 3 weeks, and then reached a plateau, while Mg uptake was constant during the flowering phase.

2.1 Introduction

Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is an annual herbaceous plant cultivated since thousands of years for medical (Small, 2016) and recreational uses (Small, 2016; Clarke and Merlin, 2013; Hand *et al.*, 2016), and as a source of food and fibres (Saloner *et al.*, 2019). Drug-type *C. sativa* is described as the plant used primarily for its inflorescences capable of producing over 567 phytochemicals (ElSohly *et al.*, 2017) – 483 that are unique to this species (Brenneisen, 2007) – with cannabinoids like Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) as their most distinguished feature (Aizpura-Olaizola *et al.*, 2016). Several studies reported that cannabinoids and terpenes produced by *C. sativa* have numerous medical properties (Aizpura-Olaizola *et al.*, 2016; Brenneisen, 2007; Evrendilek, 2015; Fernandes *et al.*, 2007; Grassmann *et al.*, 2005; Ito and Ito, 2013; Legault *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2017; Pichette *et al.*, 2006; Russ, 2011). For this reason, *Cannabis* producers are facing an increasing demand for their products. As a matter of fact, data compiled from Statistique Canada (2020) show that monthly retail sales increased by 6.4 times two years after the legalization in Canada; Two hundred and seventy million dollars in retail sales in Canada in October 2020 against 24 million \$ in October 2018.

Following this strong demand by consumers and the high production cost associated with *Cannabis* cultivation compared to other greenhouse or indoor crops, producers face a lack of scientific agronomic knowledge to optimize their cultivation (Chouvy, 2019). In fact, few scientific literature about the plant nutrient uptake and the fertilization requirements of drug-type *C. sativa* have been published. Most of the mineral nutrition research performed until now were conducted with field-grown hemp (Aubin *et al.*, 2015; Campiglia *et al.*, 2016; Finnan and Burke, 2013; Vera *et al.*, 2009). However, it is not possible to affirm if hemp and drug-type *Cannabis* respond the same way regarding fertilization for biomass yield and potency. Moreover, the nutrient uptake by *C. sativa* is still unknown comparatively to other popular plant species grew in greenhouses (Lee *et al.*, 2017 [tomato]; Caruso *et al.*, 2011 [strawberry]; Hao and Papadopoulos, 2002 [tomato], Ropokis *et al.*, 2018 [sweet pepper]). Consequently, greenhouse or indoor producers using soilless and hydroponic growing systems often apply none-optimal nutrients or even more mineral fertilizers than required by the plant, which limit the productivity and increase production costs (Yep *et al.*, 2020). Moreover, inappropriate nutrient management may negatively impact the quality of their products, notably the cannabinoid as observed by Caplan *et al.* (2017) where a decrease in THC, Δ -9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) and cannabigerolic acid (CBGA) potency was observed at 284 mg N L⁻¹ compared with the studied lowest concentration of 57 mg N L⁻¹.

It has been reported that N fertilization has a positive impact on the height and shoot biomass of hemp (*Cannabis sativa* L.), a source of food and fibre, and drug-type *C. sativa*. In hemp, Campiglia *et al.* (2017) observed higher plant growth with a N supply of 100 kg N ha⁻¹ in the soil compared with 50 kg N ha⁻¹. Hemp biomass yield was also higher as N fertilization rates were increased; 1674 (control; 0 kg N ha⁻¹) to 4209 kg DM ha⁻¹ (200 kg N ha⁻¹) (Aubin *et al.*, 2015). For drug-type cannabis, the optimal plant growth for plants grown in a coir-based organic was observed at concentrations of 160 and 240 mg N L⁻¹, although root development was restricted at 240 mg L⁻¹ N, while flower yields were two times higher when increasing N fertilization from 57 to 283 mg N L⁻¹ (Caplan *et al.*, 2017). On the other hand, plants showed signs of N overdose at 320 mg N L⁻¹ with smaller plants and plant organs, and a dark-green colour. Saloner and Bernstein (2020) found that drug-type cannabis plants grown under a 18-h photoperiod and supplied with 30 mg N L⁻¹ showed signs of N deficiency, while a concentration of 80 mg N L⁻¹ restricted growth of the shoot and root and caused chlorosis on the older leaves.

During the last decades, hydroponic growing systems have become largely used for greenhouses and indoor crop production as it is the case now for commercial drug-type *C. sativa* (Jin *et al.*, 2019). Hydroponic cultivation is also a favourable choice towards an environment-friendly agriculture to reduce fertilizer and water uses and leaching losses (Sambo *et al.*, 2019). Also, many studies showed that hydroponic systems achieve uniform crops and better yields (AlShrouf, 2017; Asaduzzamen *et al.*, 2015; Chandra *et al.*, 2014). Furthermore, within the hydroponic growing systems available, aeroponic systems are facing an increased demand because of its use in the production of various fruits, vegetables, and medicinal plants (Kumari and Kumar, 2019; Lakhari *et al.*, 2020). This system is defined as “an enclosed air and water/nutrient ecosystem that fosters rapid plant growth with little water [...] and without soil or media” (Kumari and Kumar, 2019). Many key benefits can be attributed to the use of aeroponics: year-round cultivation, fast plant growth, better water and nutrient use efficiency and high yield (Kumari and Kumar, 2019; Lakhari *et al.*, 2020). To maximize the use of space, aeroponic systems can be used for vertical farming. This method of production can drastically increase yield per area. For example, in lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. “Little Gem”), yields were 13.8 times higher in vertical aeroponic system than conventional horizontal hydroponic system (Touliatos *et al.*, 2016). Interesting increases in yields were achieved in leafy greens and fruit crops when grown in aeroponic system as compared to those grown in the soil: basil (+19%), chard (+8%), red kale (+65%), parsley (+21%), bell pepper (+53%), cherry tomatoes (+53%), cucumber (+7%) and squash (+50%) (Chandra *et al.*, 2014).

Knowing the dynamic by which the nutrients are taken by the plant during its development is crucial to optimize the fertilization management, and then the productivity and the product quality of drug-type *C. sativa*. It also helps to avoid any over-fertilization, which is often observed at the commercial scale. One easy way to investigate the plant nutrient uptake throughout its developmental cycle is the use of a closed hydroponic system, which allowed the monitoring of the nutrient solution and then the calculation of the nutrient uptake by the plants (Lee *et al.*, 2017). Consequently, the aims of this experiment were (1) to characterize the dynamic of the nutrient uptake during the flowering stage of drug-type *Cannabis sativa* L. and (2) to determine the impact of two N-fertilization on the nutrient uptake, plant development, yield, and bioactive compounds. Our hypothesis was that the plant nutrient uptake is more important at the beginning of the flowering stage compared with the end of the flower development, and a higher N fertilization produces higher yields without negatively impacting the cannabinoids and terpenes content of the inflorescences.

2.2 Material and methods

2.2.1 Plant material: propagation and environmental growing conditions

This experiment was conducted at an indoor commercial growing facility (IsoCanMed inc., Louiseville, QC, Canada), with two *C. sativa* genotypes: ‘White Shark’ (WS) and ‘Critical Orange Punch’ (COP). Both genotypes have high-THC and low-CBD levels. Cuttings of around 20 cm in length and three leaves were taken from the mother plants (grown under a 16-h photoperiod) cultivated in a deep-water growing system (Current Culture H₂O, Fresno, CA, USA). Right after the cuttings were harvested, they were dipped into a 0.55% indole-3-butyric acid rooting gel (Rootech Clonage Gel, Technaflora, Mission, British Columbia, Canada), inserted into 5 cm diameter neoprene disks at half the cuttings’ length and placed in 1.2 m aeroponic growing towers that can accommodate 488 clones per tower (Green Diamond Aerosystem, Granby, QC, Canada). During the 3 to 4 weeks of vegetative growth, cuttings were exposed to a 16-h photoperiod, a temperature of 22-25°C, a relative humidity of 65-95% and a CO₂ concentration increasing from 350 to 800 ppm. After around 3 weeks, when roots were well developed, the plantlets were transferred to a flowering room (FR) and placed in 2.4 m aeroponic growing towers (Green Diamond Aerosystem, Granby, QC, Canada). The aeroponic octagonal towers had eight sides, each side having three vertical rows of eleven 5.1 cm holes (total of 264 per tower) where baskets, containing a single *Cannabis* plant with its neoprene disk per basket, were inserted within the tower holes. Inside, a PVC pipe, containing nozzles, was inserted in the middle to deliver fine droplets of the nutrient solution to the roots. The FR had 48 towers, for a total of 12,672 *Cannabis sativa* L.

plants. The nutrient solution used for the vegetative stage was as follows: N-NO₃ (231 mg L⁻¹), P (60 mg L⁻¹), K (290 mg L⁻¹), Ca (240 mg L⁻¹), Mg (80 mg L⁻¹), S-SO₄ (48 mg L⁻¹), Fe (1.0 mg L⁻¹), Mn (0.55 mg L⁻¹), Zn (0.33 mg L⁻¹), B (0.32 mg L⁻¹), Cu (0.05 mg L⁻¹) and Mo (0.05 mg L⁻¹). Because the towers were rotating on themselves with a rotation cycle of 60 seconds, lighting was adjusted to have the most uniform coverage around each tower (Figure 2.1). The average light intensity was 444 μmol m⁻² s⁻¹ and with an average light spectrum (UV: B: G: R: FR) of 1: 13: 36: 33: 11. When plants were kept on a vegetative stage (16-h photoperiod), day and night temperatures and the relative humidity were maintained at 24°C and 22 °C, and 70% and 75%, respectively. The CO₂ concentration during the day was maintained at 800 ppm. During the flowering stage (12-h photoperiod), the day and night temperatures were maintained at 21-23°C and 17-18°C, respectively. The relative humidity was fixed at 55% during the day and at 60-70% during the night. The FR were enriched during the day with CO₂ at concentrations ranging from 500 to 1500 ppm.

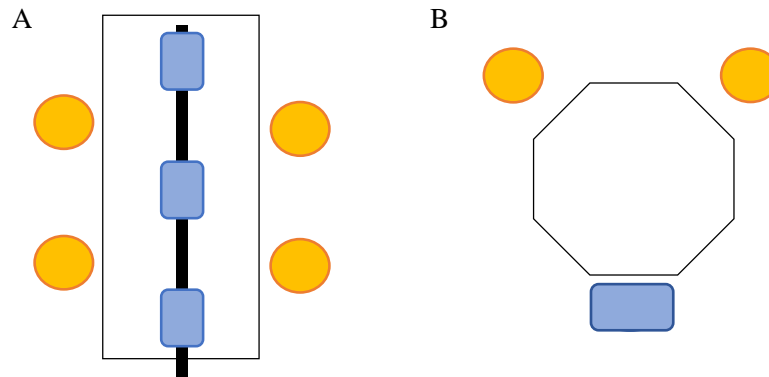


Figure 2. 1 Diagram of the lighting system for one flowering aeroponic tower. **A.** The tower's front (side towards the hallway) was enlightened by a beam composed of three 315 W LEC lamps (blue rectangles) with reflectors and two 1000 W HPS lamps (orange circles) on each side between two tower rows for a total of 7 lamps. **B.** Lights positions when seen above the aeroponic towers.

2.2.2 Experimental design

Selected N concentrations were based on commercial practices (personal communications) and scientific published studies (Coffman et Gentner, 1977; Caplan *et al.* 2017a,b); i.e. a N concentration during the flowering stage of 150 mg L⁻¹ and a higher N concentration of 250 mg L⁻¹. Four complete flowering experimental cycles of up to 12 weeks (E1, E2, E3 and E4) having 12,672 plants each, except for E3 and E4 having 11,880 plants (45 aeroponic towers instead of 48), were studied as two repetitive experiments per N concentration.

The other mineral nutrient concentrations for the four experiments (E1, E2, E3 and E4) were: P (50 mg L⁻¹), K (308 mg L⁻¹), Ca (236 mg L⁻¹), Mg (90 mg L⁻¹), S-SO₄ (131 mg L⁻¹), Fe (3 mg L⁻¹),

Mn (1.25 mg L⁻¹), Zn (0.5 mg L⁻¹), B (0.64 mg L⁻¹), Cu (0.05 mg L⁻¹) and Mo (0.05 mg L⁻¹). Because the experiment was performed in an indoor commercial facility, some of these nutrients may have been slightly adjusted in response to plant development. These slight modifications were considered in our mineral uptake calculations.

WS and COP were used at the same time to observe their different development with the same nutrient solution and growing conditions. Each cultivar represented half the FR capacity, except in E3 where only 5 aeroponic towers had WS, while the rest was COP. To evaluate the plant development of each genotype during the flowering stage and determine any effect of the plant position within the tower, along a vertical gradient, we used a randomized complete block design. Thus, half of the aeroponic towers (24 towers per FR) were selected and plants within five vertical subdivisions were randomly chosen for plant growth measurements.

The closed aeroponic system used had a 2,000 litres nutrient solution reservoir. Twice a day (at 8:00 and 16:00), the EC and water were manually adjusted, while the pH was controlled by a BlueLab® pH Controller (BlueLab®, New Zealand). Osmosis water was used for making the nutrient solution. Once a week, the nutrient solutions of the reservoir were completely changed to avoid nutrient imbalances and salt accumulation. The reservoir was cleaned and filled with new nutrient solution. During the last three to four days before harvest, only osmosed water was given to the plants, a commercial practice called “flushing”.

During two additional flowering cycles (E5 for COP and E6 for WS), the foliar nutrient content of the two genotypes was characterized in order to determine their nutrient leaf accumulation throughout flower development when a commercial nutrient solution for indoor hydroponic cultivation was used. In contrast to the first four trials, the vegetative growth of the plantlets was only one week for COP, while rooted WS cuttings were immediately transferred to the FR. The nutrient solution used was as follows: N-NO₃ (140 mg L⁻¹), P (25 mg L⁻¹), K (150 mg L⁻¹), Ca (140 mg L⁻¹), Mg (45 mg L⁻¹), S-SO₄ (45 mg L⁻¹), Fe (1.3 mg L⁻¹), Mn (0.6 mg L⁻¹), Zn (0.25 mg L⁻¹), B (0.32 mg L⁻¹), Cu (0.03 mg L⁻¹) and Mo (0.03 mg L⁻¹).

Plant measurement

Plant development and inflorescence yields. On a weekly basis, plant height and the number of nodes per plant were measured. Plant height was measured from the base of the neoprene to the apical meristem. One plant per experimental unit was used, ranging from 15 to 70 units per genotype and per trial (E1 and E2, n=60 for WS and COP; E3, n=15 [WS] and n=70 [COP]; E4, n=50 [WS] and n=60 [COP]). The producer harvested flowers as lots composed of a varied number

of plants; 150 mg N L⁻¹ trials had 5 lots COP (120, 1834, 3168, 4752 and 6072 plants) and 2 lots of WS (2112 et 5544 plants), and 250 mg N L⁻¹ trials had 2 lots COP (6348 et 7920 plants) and 4 lots of WS (1056, 2904, 3432 and 3696 plants). We used the total inflorescence weight of each lot and divided it by the respective total number of plants per lot to obtain the inflorescence yield per plant.

Plant nutrient uptake. Samples of the nutrient solution were taken from the reservoir before and after pH, EC and water adjustment that was done twice a day (at 8:00 and 16:00). The daily nutrient plant uptake was determined by using twice a day the nutrient load before and after the reservoir nutrient adjustments and by considering the number of plants. Thus, to determine the global nutrient plant uptake during the night, the last day evening's nutrient concentration after the nutrient adjustment (C_{PM2} ; mg L⁻¹) was multiplied by the reservoir volume (2,000 L) to get the nutrient load inside the reservoir. Then, this total nutrient load was subtracted with the remaining nutrient load determined by multiplying the nutrient concentration of the next morning (C_{AM1} ; mg L⁻¹) with the remaining reservoir volume (V_{AM} ; L). For the diurnal global nutrient plant uptake, a similar method was applied by using the nutrient concentration after the morning adjustment (C_{AM2} ; mg L⁻¹) multiplied by the reservoir volume (2000 L), and by subtracting the value of the remaining concentration before the evening adjustment (C_{PM1} ; mg L⁻¹) multiplied by the evening remaining volume (V_{PM} ; L), which correspond to the nutrient remaining load. The morning and evening nutrient uptake were then added and divided by the number of plants (n) in the FR to get the daily nutrient uptake per plant. The calculation was done with the following formula:

$$\frac{(C_{PM2} * 2,000L - C_{AM1} * V_{AM}) + (C_{AM2} * 2,000L - C_{PM1} * V_{PM})}{n}$$

Mineral solution analysis

The pH, EC and nutrient concentrations of the four daily collected samples of the nutrient solutions (50 mL per sample) were analyzed. The K, Ca, Na, Fe, Mn and Zn were measured by atomic absorption (Perkin-Elmer Corporation, 1982), Cl was measured by HPLC with conductivity detector (Waters 432 Conductivity Detector, Waters Chromatography Division, MA, USA) and N-NO₃ with a UV detector (Waters 996 PDA Detector, Waters Chromatography Division, MA, USA). P-PO₄ and N-NH₄ concentration were measured by colorimetric method (Murphy and Riley, 1962; Nkinge and Balance, 1982) using an Epoch 2 Microplate Spectrometer (BioTek Instruments, VT, USA).

Mineral leaf analysis

Every week, we randomly collected three samples of around 60 grams of leaves in E5 and E6. The leaves were then dried in an oven at 60 °C for three days and then ground. We pooled together the 3 samples and took two subsamples for the mineral analysis.

For the inflorescence mineral analysis of trials E1, E2, E3 and E4 we used 2 samples from each lot. Samples were dried at 60 °C for three days, roughly ground and stored in plastic bags. Then, subsamples of 1 g were placed in 7 mL plastic tubes with 5 small beads to finely grind and homogenize the plant material with the Bead Ruptor Elite (Omni International, Kennesaw, GA, USA). Total N and Mg were determined by Kjeldahl method using a block digester to colorimetrically dose these nutrients (Microplate Spectrophotometer, Biotek model 2) as described by Isaac and Johnson (1976). Mg was extracted with the same method and dosed using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer 3300, Uberlingen, Germany). The concentration of the other elements (K, Ca, Fe, Cu, Mn and Zn) was determined on pelleted dry powder samples (Carver Bench Top Laboratory Pellet Press, model 4350 L, Carver, Inc., IN, USA) by using an energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) portable spectrometer (Niton XL3t-955 GOLDD + Ultra Mining / Enviro XRF Analyzer, with Portable Test Stand, XL2/3, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) as described by Reidinger *et al.* (2012) and Margui and Hidalgo (2009).

Cannabinoid and terpene contents analysis

Cannabinoid and terpene contents were analyzed by an external laboratory (MS Pharma, Laval QC, Canada). The producer sent dry inflorescence samples to determine the potency, as required by Canadian laws for marketed cannabis products. The results for the terpenes represent the proportionality of one terpene within the totality of those detected.

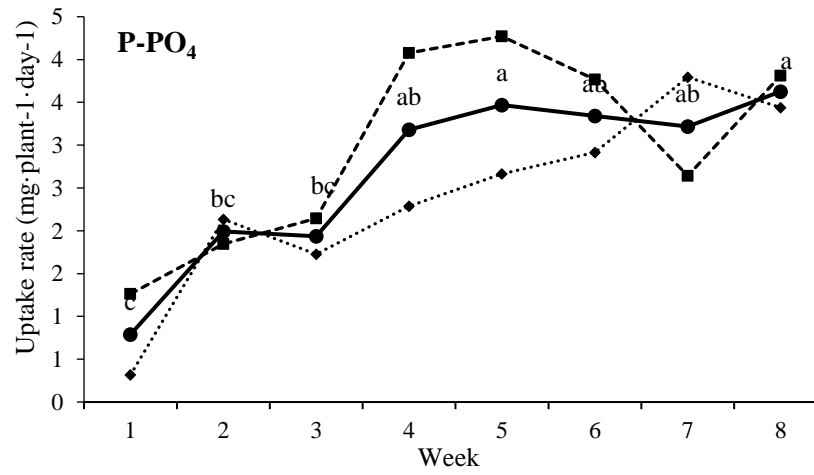
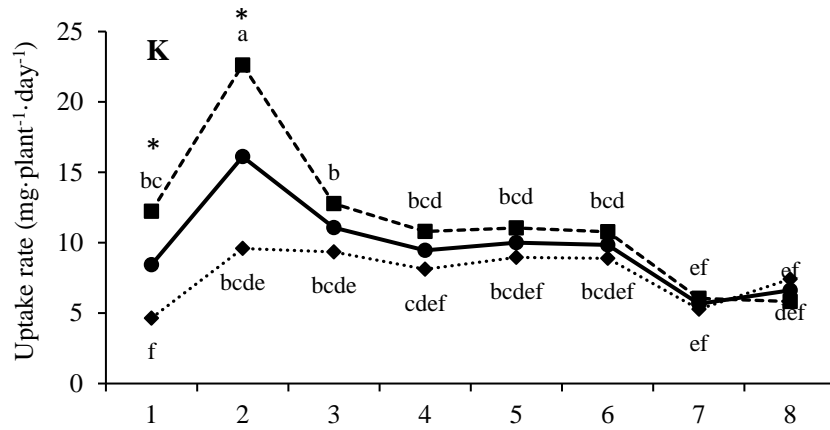
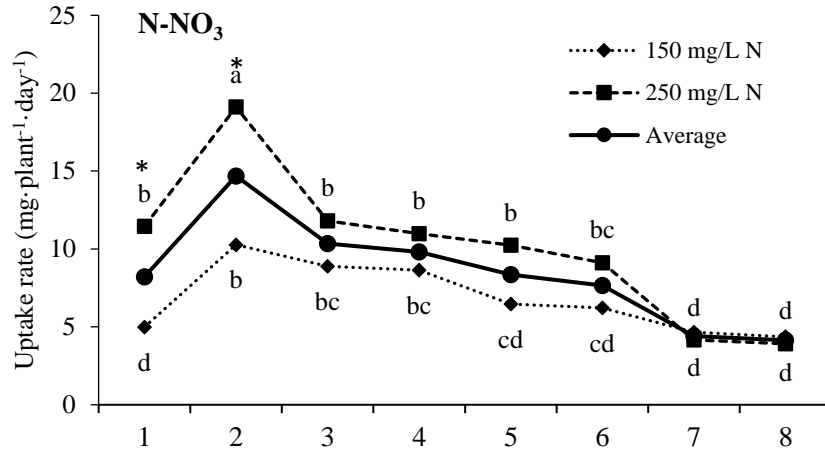
Statistical analysis

The MIXED procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute, 2013) was used with significance determined at $p \leq 0.05$. Data normality was tested using the Shapiro-Wilk statistic, and homogeneity of variance was assessed by examining the graphic distribution of residuals. The GROUP statement and transformation were used when necessary to achieve data homogeneity. Pairwise comparisons were made using protected Fisher's LSD (least significant difference). Principal component analysis was performed using the PRINQUAL procedure of SAS.

2.3 Results

Effect of the N concentration on the nutrient uptake of two genotypes

Our results of the averaged macronutrient daily uptake (N-NO₃, P-PO₄, K, Ca and Mg) clearly shown changes of this nutrient uptake throughout the development of the plants (Figure 2.2). Moreover, N-NO₃, K and Ca uptake was significantly affected by the N concentrations of the hydroponic solutions (N x Week interaction) in the first two weeks. Regardless of the genotypes and during the first two weeks, the N-NO₃, K and Ca uptake of plants grown at 150 mg N L⁻¹ was lower compared with plants grown at 250 mg N L⁻¹. Afterwards, the nutrient uptake gradually decreased and were similar for both N treatments. On the other hand, P-PO₄ uptake increased until week 4, and then reached a plateau at week 5. As for the Mg plant uptake, it increased from week 1 to week 2, and then remained relatively similar until the rest of the flowering stage.



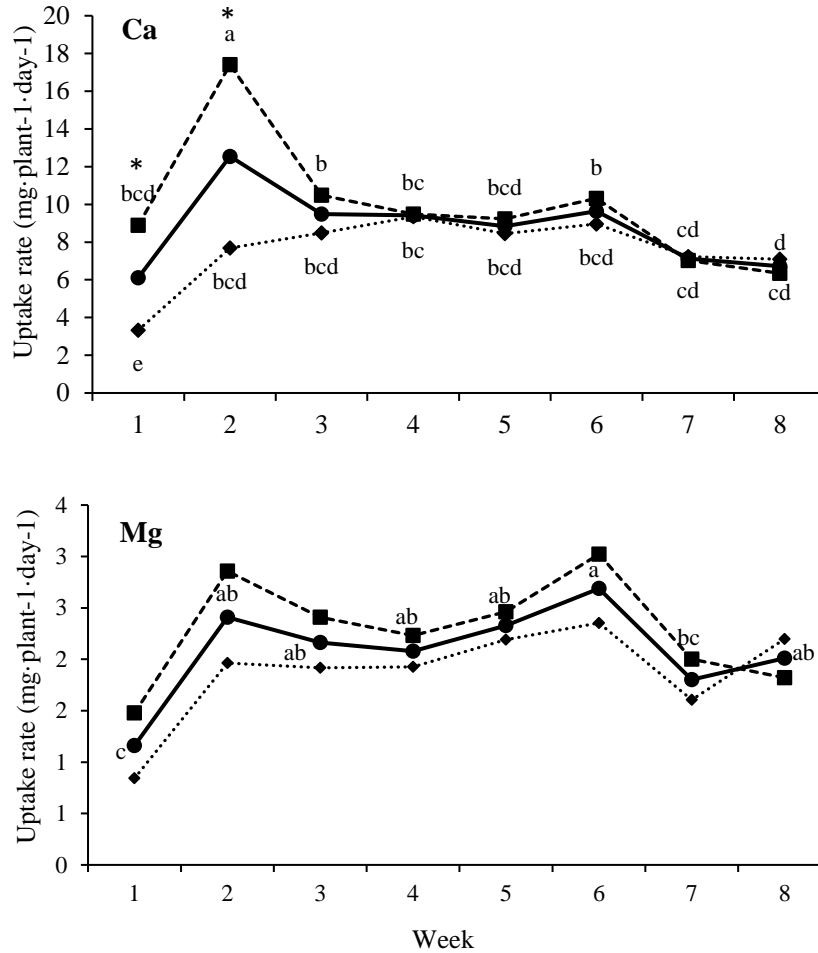


Figure 2. 2 Evolution during the flowering stage (weeks 1 to 8) of the averaged daily N-NO₃, P-PO₄, K, Ca and Mg uptake per plant of *C. sativa* grown under 150 (diamond dot) and 250 mg N L⁻¹ (square dot) nutrient concentrations. Plants were cultivated in an aeroponic vertical system. Data are means of n=2 for each treatment and n=4 for the averaged values. Different letters above the means represent significant differences between N treatments or the averaged N treatments when no treatment effect were observed (Mg and P-PO₄) by LSD protected by Fisher (P < 0.05). *indicated when significant different at P ≤ 0.05 between 150 and 250 mg N L⁻¹. The average curve (full line) was added to show that the uptake rate was significantly different the first two weeks for P and Mg despite the lack of difference in the uptake rate for the two treatments.

Effect of the N concentration on the leaves and flower mineral accumulation of the two genotypes

N treatments had a significant effect on N and Mg accumulation in the flowers, with an opposite impact for those two nutrients, while a significant interaction N x genotype treatment was observed for Mn (Table 2.1). Interestingly, flower nitrogen concentration was slightly higher (+7%; 43.1 mg g⁻¹ dry matter) when the N level in the hydroponic solution was at 150 mg N L⁻¹ compared with

250 mg N L⁻¹ (40.4 mg g⁻¹ dry matter), whereas Mg was higher at a 250 mg L⁻¹ N concentration (+11%) compared with 150 mg N L⁻¹ (7.1 vs 6.4 mg g⁻¹ DM). For Mn, COP had a higher flower Mn concentration than WS under an N-rich nutrient solution (250 mg L⁻¹), but under a lower N concentration (150 mg L⁻¹) an opposite effect was observed as the Mn flower concentration of WS was higher than COP.

The genotype also had an impact on N accumulation in the flowers; COP had 6% higher N flower concentration in the flowers than WS (42.9 vs 40.6 mg N g⁻¹ DM). On the other hand, regardless of the N treatments, the K flower concentration of WS was 13.8% higher than COP (36.3 vs 31.9 mg N g⁻¹ DM).

Table 2. 1 Flower mineral concentration of two drug-type *C. sativa* cultivars (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) cultivated in a vertical aeroponic system using two N concentrations. Data are means of n=2.

Élément	N concentrations		Cultivars		ANOVA		
	250 ppm	150 ppm	COP	WS	Taux N (N)	Cultivar (C)	N × C
	(mg g ⁻¹ DM)						
N	40.4 b ^z	43.1 a	42.9 a	40.6 b	*	*	n.s.
P	13.3	12.6	12.7	13.2	n.s.	n.s.	n.s.
K	34.9	33.3	31.9 b	36.3 a	n.s.	*	n.s.
Ca	13.7	13.1	13.4	13.4	n.s.	n.s.	n.s.
Mg	7.1 a	6.4 b	6.6	6.9	*	n.s.	n.s.
	(mg kg ⁻¹ DM)						
Cu	15.9	15.7	17.6	14.0	n.s.	n.s.	n.s.
Zn	187.7	177.0	186.4	178.3	n.s.	n.s.	n.s.
Fe	306.1	299.3	316.9	288.4	n.s.	n.s.	n.s.
Mn	253.2	284.4	270.1	267.5	n.s.	n.s.	**

^zLSD protected by Fisher (P<0.05); * indicated when significant different at P≤0.05; n.s., not significant.

During the flowering stage, the leaf mineral concentrations of both genotypes cultivated with the lower N concentration (~140 mg N L⁻¹) varied (significant interaction weeks x genotypes), but in a different way depending on the genotype, except for K where leaf concentration of both genotypes decreased from week 1 to week 3 and then stay relatively constant until harvest (Table 2.2). This means that the nutrient accumulation in the leaf is changing throughout the flowering stage and that the behaviour differs for COP and WS, except for K.

N and P leaf concentration started to decrease at week 3 for COP, and at week 4 and week 5 (WS) for N and P, respectively, corresponding to the formation of the inflorescences. On the other hand, the leaf Mg concentration of COP decreased only after 8 weeks, while its concentration gradually

increased for the WS until week 5, and then slightly decreased. On the opposite, Ca leaf concentration increased from weeks 1 to 5 (COP) and 6 (WS), and then reached a plateau.

For the leaf microelement concentrations, both genotypes had a different behaviour. For COP, the Zn and Mn leaf concentration increased during the flowering stage (by 2.8 times for Zn and 1.64 times for Mn), while the Fe leaf concentration increased up to week 6 (by 1.84 times), and then decreased (by 0.74 times). For WS, leaf Zn concentration was relatively constant until harvest, where its concentration increased by 24% compared at week 1. Leaf concentrations of Fe varied during the flowering stage, but no significant difference was observed between week 1 and week 10. A similar trend was observed for leaf Mn concentration, but its concentration at week 10 decreased by around 25%. Both Fe and Mn had a leaf peak concentration at week 3.

Table 2. 2 Evolution of the leaf mineral concentration of two drug-type *C. sativa* genotypes (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) cultivated in a vertical aeroponic system using 140 mg N L⁻¹ concentrations for 10 weeks. Data are means of n=2 (two trials; E5 and E6).

		N	P	K			Ca	Mg	Zn	Fe	Mn						
		mg g ⁻¹ DM						mg /kg DM									
Cultivar	COP	37.0	7.07	22.0	55.3	12.0	109.0	257	297								
	WS	35.6	6.77	21.3	53.7	13.5	77.6	444	403								
Week	1	45.2	7.85	26.8	b ^z	42.2	e	12.3	67.4	303	343						
	2	45.8	8.16	24.4	b	44.0	cde	12.6	67.0	197	224						
	3	38.6	7.23	19.3	cd	53.3	bcd	14.1	73.1	397	414						
	4	43.7	7.95	21.2	c	54.3	bc	13.2	81.6	287	337						
	5	35.0	6.16	17.2	d	58.7	ab	14.4	86.3	426	356						
	6	31.3	5.94	17.0	d	61.5	ab	13.1	99.8	428	367						
	8	28.4	5.61	18.4	d	65.9	a	12.5	111.3	381	371						
	10	27.3	5.55	17.6	d	67.5	a	12.7	131.8	337	351						
COP	1	47.2	a	8.23	a	27.1	b	39.9	c	13.0	a	61.3	ef	179	f	214	e
	2	46.1	a	8.28	a	23.8	b	43.2	bc	13.1	a	51.4	f	183	f	220	e
	3	39.6	b	7.35	b	20.0	cd	47.0	bc	13.5	a	70.9	e	219	e	265	d
	4	39.5	b	7.43	b	21.2	c	57.6	ab	13.5	a	91.1	d	296	bc	283	d
	5	35.6	c	6.17	c	16.4	d	63.4	a	13.1	a	101.7	d	313	ab	293	cd
	6	33.5	cd	6.02	c	17.8	d	67.3	a	12.9	a	123.2	c	330	a	371	a
	8	31.7	d	5.82	c	19.7	d	64.1	a	10.8	b	145.2	b	288	c	352	ab
	10	27.1	e	5.83	c	20.2	d	69.5	a	10.5	b	172.5	a	245	d	350	ab

Table 2.2 (Continued) Evolution of the leaf mineral concentration of two drug-type *C. sativa* genotypes (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) cultivated in a vertical aeroponic system using 140 mg N L⁻¹ concentrations for 10 weeks. Data are means of n=2 (two trials; E5 and E6).

WS	1	43.3	c	7.48	b	26.5	b	44.6	de	11.5	d	73.4	de	428	d	473	b	
	2	45.5	b	8.05	a	25.0	b	44.9	de	12.0	d	82.7	b	210	f	229	g	
	3	37.7	d	7.11	b	18.5	cd	59.6	abc	14.6	b	75.4	cde	574	a	564	a	
	4	48.0	a	8.48	a	21.2	c	50.9	cde	12.9	c	72.1	de	278	e	392	de	
	5	34.4	e	6.14	c	17.9	d	53.9	cd	15.8	a	70.9	e	538	ab	419	cd	
	6	29.1	f	5.87	c	16.3	d	55.7	bc	13.2	c	76.5	cd	526	b	363	ef	
	8	25.0	h	5.39	d	17.1	d	67.7	a	14.3	b	77.3	bcd	474	c	390	de	
	10	27.6	g	5.27	d	15.0	d	65.5	ab	14.9	b	91.2	a	429	d	352	f	
	ANOVA																	
	Cultivar (C)		0.004		0.004		0.166		0.315		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001	
Week (W)		<0.001		<0.001		<0.001		0.002		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		
C X W		<0.001		0.003		0.131		0.049		<0.001		<0.001		<0.001		<0.001		

^aDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).

Effect of the nitrogen concentration on growth parameters and flower yields of two genotypes

Significant simple effect of the N concentrations and cultivars were observed for the height of the plants (Figure 2.3A), while significant interactions between N X C were observed for the number of nodes per plant (Figure 2.3B) and the flower yield (Table 2.3). The N treatment had a strong impact on the plant height as plants of both genotypes were around 1.5 times taller under 250 mg N L⁻¹ compared with 150 mg N L⁻¹. While no significant difference was observed between the plant height of both genotypes at 150 mg N L⁻¹, from week 5 until week 10, WS submitted to 250 mg N L⁻¹ had a higher plant height than COP; WS was taller than COP with 59.5 cm compared to 51.3 cm for the latter. Under 150 mg N L⁻¹, plant height reached its maximum after 4 weeks of flowering stage for both genotypes, while the maximum plant height of WS was reached one week later, after 5 weeks, under 250 mg N L⁻¹. A same trend was observed for the number of nodes per plants as indicated in Figure 2.2B.

Increasing the N concentration from 150 to 250 mg L⁻¹ increased the dry inflorescence yield of WS by 29%, while no significant effect was observed for COP. Under lower N concentration, COP had a higher yield (+27%) than WS, while no significant difference was observed for plants grown at 250 mg N L⁻¹. COP grown with 150 mg N L⁻¹ had a similar yield than WS grown with 250 mg N L⁻¹, showing that the response to N is genotype dependent.

Table 2. 3 Growth parameters for two *C. sativa* genotypes, White Shark (WS) and Critical Orange Punch (COP), grown in vertical aeroponic towers with a N concentration of 150 and 250 mg L⁻¹ (150 mg L⁻¹, n= 2 (WS) and n=5 (COP); 250 mg L⁻¹, n=4 (WS) and n=2 (COP)).

Concentrations (mg N L ⁻¹)	Genotypes	Flower yields (dry g plant ⁻¹)	Height (cm)	Number of nodes (nb plant ⁻¹)			
150		3.96	29.0	b	10.7		
250		4.28	44.5	a	13.2		
	COP	4.24	35.4	b	11.7		
	WS	4.00	38.1	a	12.1		
150	COP	4.43	a ^z	32.3	e	10.8	c
	WS	3.50	b	33.8	de	10.6	c
250	COP	4.05	ab	51.3	bc	12.7	b
	WS	4.50	a	59.5	a	13.7	a
ANOVA							
N		n.s.		***		***	
Cultivar (C)		n.s.		**		n.s.	
N X C		*		n.s.		**	

^zDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05). * indicated when significant different at P≤0.05; **, at P<0.01; ***, at P<0.001; n.s, not significant.

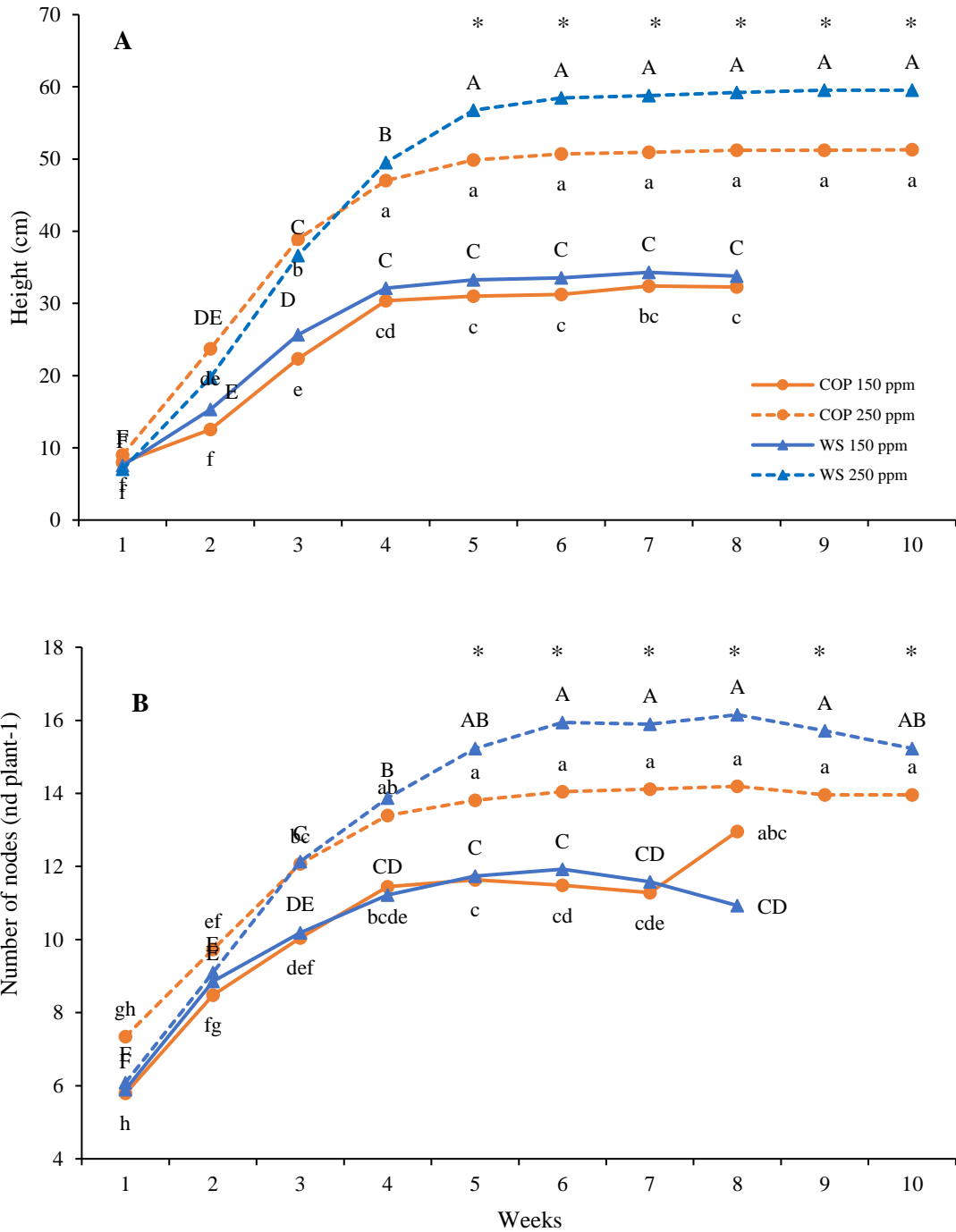


Figure 2.3 Weekly evolution of the plant height and the number of nodes for White Shark (WS) and Critical Orange Punch (COP) grown under two concentrations of N (150 and 250 mg L⁻¹) (150 mg L⁻¹, n=120 for WS and COP; 250 mg L⁻¹, n=65 for WS and n=130 for COP). Different letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05); Uppercase letters indicate the differences between WS; lowercase letters indicate the difference between COP; * indicates a significant difference between the two genotypes at 250 mg L⁻¹.

Effect of the N concentration on the cannabinoid and terpenoid content of two genotypes

Although no significant effect of N treatments on the inflorescence THCA concentration was observed, THCA already decarboxylated into Δ^9 -THC in the dried flowers was low, but significantly higher (2.21 times) under 250 mg N L⁻¹ compared with 150 mg N L⁻¹ (Table 2.4). On the other hand, the higher N concentration decreased the total THC potency of both genotypes by 9.5%. No significant difference was observed between both genotypes, except for the CBN content, which was 1.5 times higher for WS compared with COP.

Table 2. 4 Averaged cannabinoid concentrations in the flowers of two drug-type *Cannabis sativa* (WS, White Shark and Critical Orange Punch, COP) grown under two different N concentrations (150 mg L⁻¹, n= 2 [WS] and n=5 [COP]; 250 mg L⁻¹, n=4 [WS] and n=2 [COP]).

Cannabinoid	N Concentration		Cultivar		ANOVA		
	250 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹	COP	WS	N level (N)	Cultivar (C)	N × C
		(%)					
THCA	17.98	18.47	18.85	17.59	n.s.	n.s.	n.s.
Δ^9 -THC	0.31 a ^z	0.14 b	0.30	0.15	*	n.s.	n.s.
CBDA	0.28	0.02	0.10	0.20	n.s.	n.s.	n.s.
CBD	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-	-
CBDV	0.00	0.04	0.02	0.03	-	-	-
CBN	0.31	0.29	0.24 b	0.36 a	n.s.	**	n.s.
CBG	0.04	0.06	0.00	0.11	-	-	-
CBGA	0.35	0.57	0.41	0.51	n.s.	n.s.	n.s.
CBC	0.00	0.91	0.88	0.03	-	-	-
Total THC	16.13 b	17.66 a	16.92	16.86	*	n.s.	n.s.
Total CBD	0.25	0.03	0.10	0.18	n.s.	n.s.	n.s.

^zLSD protected by Fisher (P<0.05); * indicated when significant different at P≤0.05; **, at P<0.01 n.s., not significant.

As shown in Table 2.5, the distribution of the monoterpenes, the sesquiterpenes and the diterpenes in the flowers were similar in both genotypes as no significant difference or interaction was observed for the individual proportionality of terpenes. However, N had a significant impact on β -myrcene, caryophyll oxide, I-bomeol, α -bisabolol and *cis*- β -ocimen. For β -myrcene, caryophyll oxide and *cis*- β -ocimen, the 250 mg N L⁻¹ treatment increased their proportionality within the detected terpenes (by 3.2 to 25 times). The principal component analysis (PCA) performed on the effect of the genotypes and the N treatments on the terpenoids (Figure 2.4) showed that specific terpenes are related to a specific genotype under a high N concentration (two difference clusters), while other terpenes are related to both genotypes under a low N concentration (same cluster); the Principal Component 1 (PC₁) accounted for 49.21% of total variance whereas the Principal Component 2 (PC₂) accounted for 38.16%.

Table 2. 5 Average terpenoids proportionality found in the flowers of two *C. sativa* cultivars grown in aeroponic towers and treated with a high (250 mg L⁻¹) and a low (150 mg L⁻¹) N level in a hydroponic solution.

terpene	Concentration N		Cultivars		ANOVA			
	250 mg L ⁻¹	150 mg L ⁻¹	COP	WS	N	C	N × C	
			(%)					
% monoterpene	33.25	34.45	22.20	45.50	n.s.	n.s.	n.s.	
% sesquiterpene	65.88	53.75	66.50	53.13	n.s.	n.s.	n.s.	
% diterpene	0.00	0.29	0.29	0.00	-	-	-	
Caryophyllene	40.13	32.16	36.66	35.63	n.s.	n.s.	n.s.	
β-Eudesmol	5.13	2.00	4.50	2.63	n.s.	n.s.	n.s.	
β-Myrcene	7.88 a ^z	1.70 b	3.70	5.88	*	n.s.	n.s.	
o-Cymene	2.38	0.00	1.43	0.88	n.s.	n.s.	n.s.	
α-Pinene	3.25	26.20	6.95	22.50	n.s.	n.s.	n.s.	
Trans-Nerolidol	1.50	7.61	4.11	5.00	n.s.	n.s.	n.s.	
Caryophyllene oxidi	4.75 a	1.48 b	4.48	1.75	*	n.s.	n.s.	
L-α-Terpineo	0.75	2.37	1.62	1.50	n.s.	n.s.	n.s.	
Camphene	0.13	0.35	0.10	0.38	n.s.	n.s.	n.s.	
β-Pinene	1.00	0.00	0.00	1.00	-	-	-	
Pseudolimonen	1.67	0.00	0.00	1.67	-	-	-	
3-Carene	3.38	0.34	0.09	3.63	n.s.	n.s.	n.s.	
(+)-4-Carene	2.33	0.00	0.00	2.33	-	-	-	
D-Limonene	2.25	2.44	3.44	1.25	n.s.	n.s.	n.s.	
Trans-β-Ocimene	4.00	0.48	0.23	4.25	n.s.	n.s.	n.s.	
Gamma-Terpinen	0.33	0.43	0.29	0.50	-	-	-	
Linalool	6.00	1.85	6.85	1.00	n.s.	n.s.	n.s.	
I-bomeol	0.00 b	0.95 a	0.45	0.50	*	n.s.	n.s.	
Humulene	9.13	4.30	10.55	2.88	n.s.	n.s.	n.s.	
E-Nerolidol	1.88	0.52	0.77	1.63	n.s.	n.s.	n.s.	
Guaiol	0.25	1.37	0.87	0.75	n.s.	n.s.	n.s.	
α-Bisabolol	0.88 b	1.95 a	1.20	1.63	*	n.s.	n.s.	
Phytol	0.00	0.14	0.14	0.00	-	-	-	
Trans-Phytol	0.00	14.29	14.29	0.00	-	-	-	
Cis-β-Ocimen	1.25 a	0.05 b	0.80	0.50	*	n.s.	n.s.	
Isoterpinolen	0.25	0.01	0.01	0.25	n.s.		n.s.	
Total (%)	99.13	98.30	98.80	98.63	-	-	-	

^zLSD protected by Fisher (P<0.05); * indicated when significant different at P≤0.05; n.s, not significant.

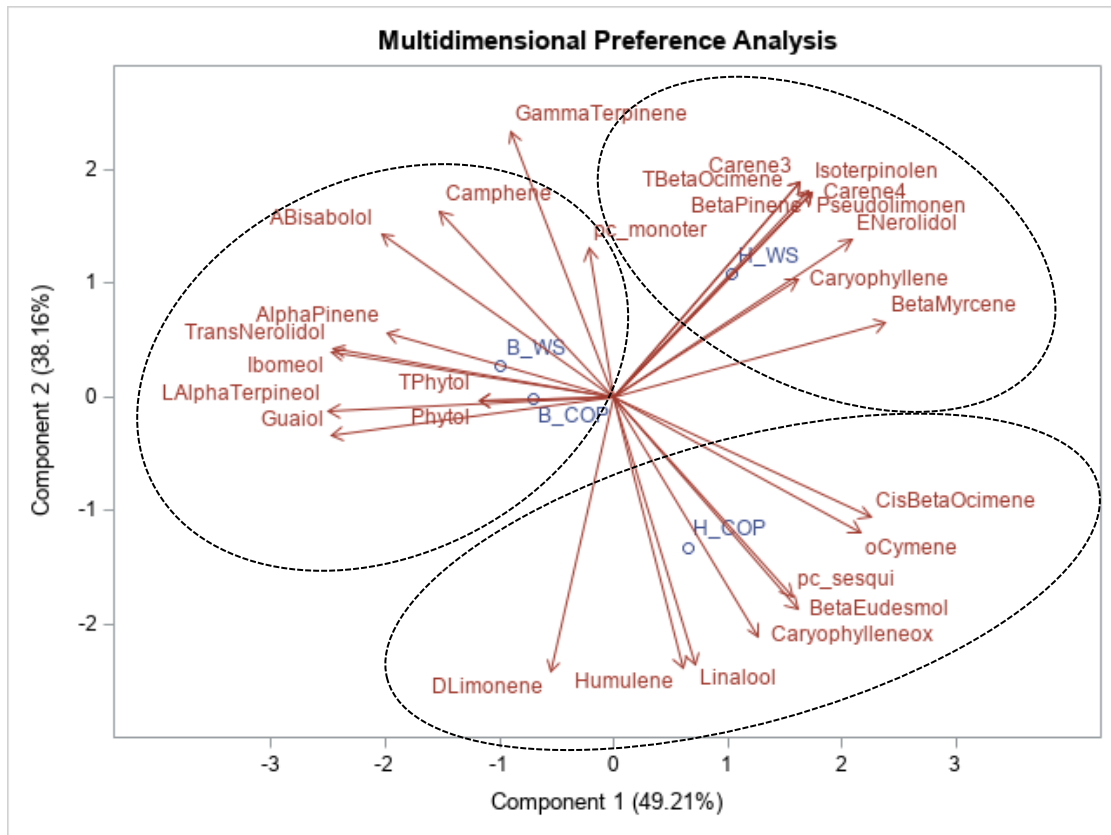


Figure 2. 4 Principal component analysis (PCA) of the terpenoids found in *C. sativa* grown in an aeroponic system based on the effect of two N levels with two cultivars (WS and COP) which suggest three groups of terpenes that are affected based on the cultivar and the N fertilization. The blue circle indicate the relation between the terpenes and the cultivar at two N concentrations: B_WS, WS at 150 mg L⁻¹; H_WS, WS at 250 mg L⁻¹; B_COP, COP at 150 mg L⁻¹; H_COP, COP at 250 mg L⁻¹.

2.4 Discussion

Nutrient accumulation in the leaves

Regardless of the plant genotype, we have observed that N accumulation in the flowers was lower when exposed to a higher N concentration in the hydroponic nutrient solution. This phenomenon was previously observed in the leaves of *C. sativa* and was associated to a dilution effect. The mineral accumulation of N in the leaves from weeks 1 to 5 and 6 for WS and COP are within the “survey range” of 33.0-47.6 mg kg⁻¹ of N described by Cockson *et al.* (2019). Afterwards, the N leaf content was lower than the range values. We did not see any N disorders that could have impacted their development. Also, interestingly, our results showed a similar pattern in both the nutrient uptake rates and the N concentrations in the leaves as both declined starting around week 3, which coincided with the end of the plant growth and the beginning of the apparition of the first flower buds. This is in agreement with Masclaux-Daubresse *et al.* (2010) and Tegeder and Masclaux-Daubresse (2017) who reported for some species that N uptake can drastically decrease between the vegetative and reproductive stages.

As observed under 140 mg N L⁻¹, P accumulation in the leaves decreased until reaching a plateau in week 5. At the same time, P uptake increased and became stable starting at week 4. This corresponds around the time that flower buds were rapidly growing and gaining weight. This reduction of P in the leaves and the increase in P uptake suggest that the flowers are a sink for P as it is directed from the leaves towards the flowers. The two main reasons explaining why flowers constitute a sink for P are the high energy demand for the biosynthesis of terpenes and cannabinoids in the trichomes and for the use of the reproductive organs. Phosphorus is an important nutrient for the biosynthesis of the secondary component such as terpenes and cannabinoids (Kovalchuk *et al.*, 2020; Sirikantaramas and Taura, 2017; Stout *et al.*, 2012). For *Cannabis sativa* L., the main location for the biosynthesis of terpenes and cannabinoids is the trichomes densely found on the flowers (Small, 2017; Potter, 2009). The biosynthesis of terpenes is considered as more energy consuming per gram than most primary and secondary metabolites found in the plants (Gershenzon, 1994).

K leaf accumulation was not affected by the genotype, but was decreasing after week 2 when the flowers were beginning to appear. Mattson and Lieth (2007) found a similar behaviour for K absorption rate. According to them, it increased simultaneously with the shoot elongation of hydroponically grown rose plants (*Rosa x hybrida* ‘Kardinal’) and decreased rapidly before harvest. This corresponds to an increase in K absorption during the vegetative stage and a decrease during the generative stage like we observed in *C. sativa*.

Ca distribution in the plants is highly associated to the leaf transpiration rate as Ca is a none mobile element transported via the xylem from the roots to the sink organs having a high transpiration rate (White, 2012). Leaves are the organs with the highest transpiration rate, so it is not surprising to have a higher concentration of Ca in this tissue compared with flowers. The increase in Ca leaf content could be a sign that transpiration rate also increased. The increase in Ca uptake at the beginning of the flowering phase can be due to the fact that Ca is an important structural component for the cell walls and membranes (Maathuis, 20019; Thor, 2019) and that, at the same time, the plants were rapidly growing and needed higher Ca content to support their fast growth.

Mg is a constituent of the chlorophyll molecule necessary for photosynthesis (Maathuis, 2009), explaining the reason why its content is higher in the leaves. The Mg content dynamic in the leaves, however, was different for both genotypes in the last weeks of flowering. Mg content in COP decreased in week 8, while for WS it was slightly increased. The different response by COP may be associated to the fungal infection by powdery mildew. Percival and Frase (2002) found that the leaf chlorophyll steadily declined when more than 25% of the leaf area of three woody plants (English oak, *Quercus robur*; hedgehog rose, *Rosa rugosa* 'rubra' and horse chestnut, *Aesculus hippocastanum*) was covered by mycelial growth. The reduction in leaf chlorophyll was probably associated with a decreasing Mg content in the leaves for COP caused by a heavy powdery mildew infection.

The micronutrients (Zn, Fe and Mn) were at levels many times over those measured in the leaves of *Cannabis sativa* L. by Cockson *et al.* (2019) and other authors such as Saloner *et al.* (2019), Saloner and Bernstein (2020) and Shiponi and Bernstein (2021). Zn and Fe accumulation in the leaf tissues were cultivar specific as COP and WS did not have a similar behaviour. At the highest, Zn content in the leaves of COP was 1.9 times over WS. On the other hand, WS was 2.6 times higher than COP in Fe leaf content at week 3. The Zn growing accumulation throughout the weeks by COP may also be a response to the powdery mildew like observed for Mg. Cabot *et al.* (2019) explained that Zn can be used as a defence mechanism against biotic stress by accumulating high Zn content in tissues that can be toxic for the pathogens. Zn leaf content was also considerably high for leaf tissues, but our results were similar to Bernstein *et al.* (2019) who had an average of 115 mg Zn L⁻¹ in the leaves. In contrast, their Fe (200-300 mg L⁻¹) content was more similar to our results in COP than in WS at the harvest. The Mn leaf content we obtained was 1.7 and 2.3 times higher than the content observed by Bernstein *et al.* (2019) (180-210 mg L⁻¹). The concentrations we used in our nutrient solutions were 7.5, 6.3 and 8.3 times higher in Fe, Mn and Zn, respectively, than

Bernstein *et al.* (2019). Even with higher exposure to these micronutrients, the leaves content was not excessively higher than those observed by the previous author.

Growing parameters and flower yields

The effect of N nutrient concentration on the growth parameters such as the plant height and the number of nodes was not much of a surprise since many studies already shown that high N fertilization has a major impact on the plant height and the shoot biomass of hemp and drug-type cannabis (Aubin *et al.*, 2010; Caplan *et al.*, 2017; Campiglia *et al.*, 2016; Saloner and Bernstein, 2020). However, our study has clearly shown that for two drug-type genotypes, plant height, and consequently the number of internodes, reached their maximal value after around 4 weeks (5 weeks for WS at 250 mg N L⁻¹) of the flowering stage. We have also observed a positive effect of N fertilization on flower yields, in favour of WS at 250 mg N L⁻¹ with a gain of 29% compared with 250 mg N L⁻¹, while no beneficial effect was observed for COP. A same trend was reported by Caplan *et al.* (2017) who observed twice the flower yields at their highest concentration (283 mg N L⁻¹) comparatively to their lowest level (57 mg N L⁻¹). These results indicate that the response to N by *C. sativa* vary in function of the genotype.

Potency

The results in cannabinoids did not indicate a significant effect of N fertilization for most of the cannabinoids analyzed, except for Δ 9-THC and total THC. N levels had a significant effect on the Δ 9-THC content in the flowers. Ours results showed that a higher N level, in our case 250 mg L⁻¹, stimulated *C. sativa* to naturally decarboxylated around twice more THCA into their acid form. COP was also more susceptible to have twice Δ 9-THC present in their flowers compared to WS. Furthermore, the fact that more Δ 9-THC was found lead to a slightly, but not significant, lower THCA content, which ultimately affected negatively the total THC potential with 16.1% (250 mg N L⁻¹) compared with 17.7% at 150 mg N L⁻¹. The low THC potential content for a high N fertilization is similar to the studies of Caplan *et al.* (2017) and Bocsa *et al.* (1997) showing that increasing N concentration may affect the cannabinoid content. The latter suggested that higher fertilization could produce a dilution effect on THC, THCA and CBGA without affecting the total cannabinoid yield per plant.

The impact of N fertilization on terpene biosynthesis was the subject of several studies based on the hypothesis that some plant species who possess storage structures, like trichomes, depend on CO₂ fixation and, consequently, on N for the biosynthesis of secondary metabolites (Ormeno and Fernandez, 2012). For the moment, no direct relationships were identified between fertilization and

terpene synthesis, and concluding results are often experiment-specific or contradictory (Bjorkman *et al.*, 1991; Blanch *et al.*, 2010; Cockson *et al.*, 2020; Kainulainen *et al.*, 1996; Ormeno and Fernandez, 2012; Sampedro *et al.*, 2011). In the present experiment, we also did not find any concluding significant trends regarding the N fertilization on the terpenoid biosynthesis in *Cannabis sativa*. Our results indicated that β -myrcene, caryophyllene oxide, I-bomeol, α -bisabolol and *cis*- β -ocimene content were influenced by the N fertilization concentration. More specifically, β -myrcene, caryophyllene oxide and *cis*- β -ocimene were 4.6, 3.2 and 25 times higher under 250 mg N L⁻¹, while I-bomeol, α -bisabolol were reduced, and the other terpenes were not impacted by N concentrations. Although no significant simple effect or interactions were observed for the genotype, our PCA (Figure 2.4) clearly indicated that the terpene response to N fertilization was depending on the genotype. We found that the proportion of some terpene was negatively affected only if *C. sativa* was under low N fertilization to the detriment of other terpenes that increase their proportion if N level was higher. Moreover, the terpenes positively affected by higher N was also based on the genotype.

2.5 Conclusion

This study has for the first time characterized during the flowering stage the daily of N, P, K, Ca and Mg uptake of the genotype WS and COP grown under a low and high N nutrient solutions, giving some guidelines to better define an optimal nutrient solution for hydroponic production of drug-type Cannabis. In fact, we found that there was an important switch in the nutriment uptake by *C. sativa* after week 2 of flowering stage, which correspond to the moment that the flowering stretching was decreasing, and the first flower buds were emerging. This means that different nutrient solutions could be adjusted to the changing uptake rate. In our results, the N, K and Ca uptake decreased, while P uptake increased until week 5 and stayed relatively high throughout the flowering development, while Mg reached a plateau at week 2. The N concentrations affected the plant N, K and Ca uptake during the first two weeks in response to the differences in the final plant development. Our results are in line with other studies reporting the impact of the N concentrations on plant yield and growth parameters. Despite the decrease in total THC content in the flowers (-9.5%) under the 250 mg N L⁻¹ treatment, the consequent increase in the dry flower yield in WS (+29%) still represents an interesting gain for the THC yield per plant. However, further studies are needed to identify the optimal N concentration as neither genotype responded similarly. Furthermore, the optimal N concentration also vary according to the growing system as a higher N level can result in higher and bigger plants, which could be difficult to work with in high density production growing systems as the one we have used in this study.

Chapitre 3: Response of drug-type *Cannabis sativa* L. to P and K concentrations in a deep-water system

Résumé

Le P et le K sont deux macronutriments importants, par contre le nombre d'études réalisées sur le *Cannabis sativa* L. médical et ces deux nutriments est faible. Afin de mieux comprendre leurs impacts sur le développement, les rendements floraux et la qualité en cannabinoïde et en terpène, nous avons testé cinq concentrations de P (25, 50, 100, 150, 200 mg L⁻¹) et deux de K (175 and 250 mg L⁻¹) dans un système en eau profonde. L'expérience s'est faite en blocs complètement aléatoires avec quatre répétitions en serre. Nos résultats indiquent que le P et le K n'ont pas eu d'impact sur les paramètres de productivité, les rendements floraux et la qualité. C'est pourquoi les producteurs de *Cannabis* médical n'ont pas à utiliser des concentrations supérieures à 25 et 175 mg L⁻¹ pour le P et le K respectivement, puisque ces niveaux étaient suffisants pour obtenir une croissance optimale.

Abstract

P and K are two important macronutrients, however, the number of studies done in drug-type *Cannabis sativa* L with them is limited. To better understand these two nutrients, we tested five P (25, 50, 100, 150, 200 mg L⁻¹) and two K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations during the flowering phase of plants cultivated in a deep-water system on one cultivar. The aim of this study was to identify the impact of P and K on the development of cannabis, the flower yields and the potency in cannabinoids and terpenes. The experimental design was randomized complete block with four replicates in a greenhouse. Our results indicate that P and K do not have an impact on productivity parameters, yields and potency. For this reason, cannabis producers do not need to use concentrations above 25 and 175 ppm for P and K, respectively, as those levels are sufficient for optimal growth and function.

3.1 Introduction

Cannabis sativa L. is an annual herbaceous plant cultivated since thousands of years for medical (Small, 2016) and recreational uses (Small, 2016; Clarke and Merlin, 2013; Hand *et al.*, 2016), and as a source of food and fibres (Saloner *et al.*, 2019). Drug-type *C. sativa* is described as the plant used primarily for its inflorescences capable of producing over 550 phytochemicals – 484 that are unique to this specie (Brenneisen, 2007) – with cannabinoids, like Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), as their most distinguished feature (Aizpura-Olaizola *et al.*, 2016). Indeed, some studies indicated that cannabinoids and terpenes produced by *C. sativa* have interesting medical properties (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2016; Brenneisen, 2007; Evrendilek, 2015; Fernandes *et al.*, 2007; Grassmann *et al.*, 2005; Ito and Ito, 2013; Legault *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2017; Pichette *et al.*, 2006; Russ, 2011). For this reason, *Cannabis* producers are facing a high demand for their products by consumers. As a matter of fact, data compiled from Statistique Canada (2020) showed that monthly retail sales increased 6.4 times two years after the legalization in Canada; two hundred and seventy million dollars in retail sales in Canada in October 2020 against 24 million \$ in October 2018. Following this strong demand by consumers and the high production cost associated with *Cannabis* cultivation compared to other greenhouse or indoor crops, producers face a lack of scientific agronomic knowledge to optimize their cultivation (Chouvy, 2019). In fact, few scientific literature about the plant nutrient uptake and the fertilization requirements of drug-type *C. sativa* have been published. A large number of the mineral nutrition studies performed until now were conducted with field-grown hemp (Aubin *et al.*, 2015; Campiglia *et al.*, 2016; Finnan and Burke, 2013; Vera *et al.*, 2009). However, it is not possible to affirm if hemp and drug-type *Cannabis* respond the same way regarding their fertilization management for the inflorescence biomass yield and potency. Consequently, greenhouse or indoor producers using soilless and hydroponic growing systems often apply none-optimal nutrients or even more mineral fertilizers than required by the plant, which therefore limit the productivity and increase production costs (Yep *et al.*, 2020). Moreover, inappropriate nutrient management may negatively impact the quality of their products, notably the cannabinoid content as observed by Caplan *et al.* (2017) where a decrease in THC, Δ -9-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) and cannabigerolic acid (CBGA) potency was obtained at 284 mg N L⁻¹ compared with the lowest concentration (57 mg N L⁻¹), which was attributed to a dilution effect. Similarly, we recently found that a higher N fertilization reduced the potential total THC concentration of two drug-type *Cannabis* genotypes (Chapiter 2). During the last decades, hydroponic growing systems have become commonly used for greenhouse and indoor crop production as it is the case now for commercial drug-type *C. sativa* (Jin *et al.*,

2019). Hydroponic cultivation is also a favourable choice towards an environmentally friendly agriculture to reduce fertilizer and water uses as well as leaching losses (Sambo *et al.*, 2019). Many studies have also shown that hydroponic growing systems achieved uniform crops and better yields (AlShrouf, 2017; Asaduzzamen *et al.*, 2015; Chandra *et al.*, 2014).

The most studied nutrient in *C. sativa* is N because of the nitrophilous characteristic of the plant (Small, 2017), which means that it thrives in nitrogen-rich soils. In fact, we observed in a previous study an increase of the inflorescence yield of the genotype White Shark with the increased N concentration (Chapter 2). Similar results were also reported by Caplan *et al.* (2017).

Many authors have tried to determine the effects of P in the biosynthesis of terpenes in other plant species. However, the effects obtained are often species dependent and varied according to the experimental conditions. The terpene biosynthesis is considered as one of the most energy demanding metabolic pathway, more than most of the primary and secondary metabolite biosynthesis pathways (Gershenson, 1994). *Cannabis sativa* L. produced mainly mono- and sesquiterpenes (Aizpurua-Olaizola, 2016; Potter, 2009), which are biosynthesized respectively in the methylerythritol 4-phosphate (MEP) and mevalonate (MEV) pathways (Booth *et al.*, 2017; Kovalchuk *et al.*, 2020). Both need phosphorus precursors such as acetyl-CoA and 3-phosphoglyceric acid (G3P). They also need ATPs and NADPHs, also phosphorus molecules, because of the many chemical reductions. Furthermore, cannabinoids biosynthesis is strongly connected to the geranyl pyrophosphate (GPP) formed within the MEV pathway, which is a precursor to cannabinoids and certain terpenes (Booth *et al.*, 2020; Coffman and Gentner, 1997; Kovalchuk *et al.*, 2020; Sirikantaramas and Taura, 2017; Stout *et al.*, 2012). In other words, cannabinoid and terpene biosynthesis pathways are related to phosphorus, which acts as an important energy supplier, via ATP, and as a component for precursors. As for K, most *C. sativa* studies were conducted with hemp and few on drug-type *Cannabis* during the flowering stage. Effects observed on K are different for hemp and drug-type *Cannabis*. Aubin *et al.* (2015) and Finnan and Burke (2013) did not find any significant impacts of K fertilization on hemp, whereas Coffman and Gentner (1977) and Saloner *et al.* (2019) found that *Cannabis* was positively responsive to additional K supply.

In complementarity of these works and because of the lack of scientific knowledge to determine optimal P and K concentrations for hydroponic production, we have studied in the present study, the plant response to P and K concentrations. Our hypothesis was that higher P and K concentrations can induce a higher potency and terpene production, and a better inflorescence yield. For this purpose, we aimed to determine the plant growth and development, yield and potency of

one genotype of drug-type *Cannabis* grown in a soilless hydroponic growing system and submitted to five P concentrations and two K concentration.

3.2 Material and methods

3.2.1 Plant material: Propagation and environmental growing conditions

The plantlets of the high-THC and low-CBD genotype White Shark (WS) were provided by IsoCanMed inc. (Louiseville, QC, Canada). The plantlets were made from cuttings of 20 cm in length and three leaves harvested from mother plants cultivated in a deep-water growing system (Current Culture H₂O, Fresno, CA, USA). Cuttings were dipped into a 0.55% indole-3-butyric acid rooting gel (Rootech Clonage Gel, Technaflora, Mission, British Columbia, Canada), inserted into 5 cm diameter neoprene disks at half the cuttings' length and putted in a 1,2 m aeroponic towers that each accommodated 488 clones (Green Diamond Aerosystem, Granby, QC, Canada). Cuttings were exposed to a 16 h photoperiod, a temperature of 22-25°C, relative humidity of 65-95% and a CO₂ level increasing from 350 to 800 ppm. After three weeks, 120 uniform plantlets were selected and transported to Laval University (Quebec, Canada) on November 16, 2020, and placed in a greenhouse compartment of 100 m². Three plantlets were placed in each of the forty 64 L sturdy storage totes turned into a deep-water container with a 3-holed 2' X 1,5' (61 cm X 46 cm) floating foam board. Holes had a 2" (5 cm) diameter where we inserted the neoprene with the plantlet. The roots were aerated with two 2" (5 cm) cylindrical oxygen stones. The oxygen stones were connected via 0.5 cm air tubes to a 35 W air oxygen pump with a 50 litres per minute air volume.

Upon their arrival, plantlets were immediately directed to the flowering stage with a 12 h photoperiod supplied with 1000 W light-emitting diodes providing a PPFD of 321 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the plant level. Because the greenhouse complex had other compartments with longer photoperiods, we covered the walls with an opaque plastic sheet to maintain a dark phase of 12 hours. However, due to light pollution during the dark phase, flower initiation only started three weeks after the start of the flowering stage. Temperature was 22.3 ± 0.2 °C and 18.6 ± 0.2 °C during the day and the night, respectively, while the relative humidity was 63.2 ± 0.5 %. The CO₂ was at the ambient concentration.

3.2.2 Experimental design

Ten different nutrient solutions of five P concentrations (25, 50, 100, 150 and 200 mg L⁻¹) and two K concentrations (175 and 250 mg L⁻¹) were studied within a randomized complete block design with four replications (Table 3.1) and three *C. sativa* plants in each experimental unit at the beginning with one harvested at the apparition of the first flower buds. The remaining nutrients

were similar in each treatment: N-NO₃⁻ (150 mg L⁻¹), Ca (150 mg L⁻¹), Mg (58 mg L⁻¹), EDDHA-Fe (3 mg L⁻¹), Mn (1.25 mg L⁻¹), Zn (0.5 mg L⁻¹), B (0.64 mg L⁻¹), Cu (0.05 mg L⁻¹) and Mo (0.05 ppm mg L⁻¹). P was supplemented as KH₂PO₄ for seven of the ten solutions, while H₃PO₄ was used to adjust the P concentration of treatments 7, 9 and 10. The K concentration was supplemented as KH₂PO₄ and K₂SO₄.

For the first 4 weeks of growth, the nutrient solutions were replaced every week, and then every two weeks because the nutrient solution analysis showed minor changes after one week. Treatment solutions were first prepared as stock solutions with a 1:100 concentration. They were diluted and adjusted at a pH of 6.0 with NaOH or H₂SO₄ before distributing to the 45 L experimental units. Surpluses were stored and used to fill up containers twice every week to maintain a nutrient solution volume of 45 L. Changes in the nutrient volume of each experimental unit were recorded.

Table 3. 1 P and K concentrations for each of the treatments.

Treatments	P concentration	K concentration
	mg L ⁻¹	
1	25	175
2	25	250
3	50	175
4	50	250
5	100	175
6	100	250
7	150	175
8	150	250
9	200	175
10	200	250

3.2.3 Physiological parameters

Plant development. Every week, plant height, plant growth index, number of nodes and stem diameter were measured. Plant height was measured from the base of the neoprene to the apical meristem. Growth index was measured using plant height, and two perpendicular canopy measurements with W₁ as the width parallel and W₂ as the width perpendicular to the central row. It was calculated according to Ruter (1992) [(height x W₁ x W₂) ÷ 300]. Growth index had been

previously used for *C. sativa* by Caplan *et al.* (2017) and Yep *et al.* (2020). Stem diameter was measured with an electronic digital caliper between the fourth and fifth nodes from the base of the plant. One plant per experimental unit was used every week for the measurements for a total of four plants per treatment (one per replicate).

Leaf chlorophyll content, photosynthetic performance, and water use efficiency. The leaf chlorophyll content index (CCI) was determined by using SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter (Spectrum Technologies, inc., Aurora, IL, USA). Leaf performance was measured with the Handy PEA+ (Hansatech Instruments, UK). This portable device can measure the Fv/Fm ratio representing the maximum quantum efficiency of the PSII as an indicator of stress. Fv/Fm ratio was measured by dark adapting leaf tissues for 30 minutes using detachable leaf clips. Afterwards, the fluorescence detector was attached to the leaf clips and measured the parameters before and after admitting a 650 nm wavelength up to $3500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at the sample surface. The measurements were made weekly in the middle of the centre leaflet of the most recent mature fan leaf on the main stem at one plant per experimental unit, except for the photosynthetic performance that started at the fourth week when plants were steadier.

Inflorescence yield and potency. Plants were harvested 80 days after the beginning of the flowering stage and inflorescences were manually wet trimmed. The apical bud (cola bud) was collected separately from the other buds for the analysis of the cannabinoids and terpenes content. It consisted mainly of the apical floral raceme and one axillary raceme. Fresh weights of the inflorescences were taken, and then stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the analysis of their potency and terpene content. To prevent cannabinoid and terpene loss by heat, the inflorescences were lyophilized and weighted. Apical inflorescence buds from the same experimental unit were paired up before their analysis. Sixty common terpenes were analyzed by an external services laboratory (PhytoChemia, Chicoutimi, QC, Canada). Cannabinoid potency was measured by the liquid chromatography-diode array detection (LC-DAD) method as described by Vaclavik *et al.* (2019). The other inflorescences were harvested and trimmed as previously described, placed in paper bags and weighted before and after drying at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 days. They were used for the inorganic mineral analysis. To determine the total inflorescence yield, we added the dry weights of the apical inflorescences and the other inflorescence buds.



Figure 3. 1 Pictures displaying how the inflorescence was selected during the harvest. **A.** Representation of a mature plant at the harvest after 80 days of growth. To determine the apical inflorescences, we selected the height where the top leaves were located. The white line indicates where the apical inflorescence was harvested. **B.** Representation of an inflorescence at the harvest with sugar leaves. Most inflorescence buds harvested consisted mainly of the apical floral raceme (full lined circle) and one axillary raceme (dotted circles).

Plant biomass and leaf area. Plant biomass was measured twice throughout the 80 days of experiment: at 25 and 80 days after the beginning of the treatments. At day 25, one plant per experimental unit was collected to measure plant organ biomass, while the remaining two plants were harvested at 80 days when flowers were mature. In both harvests, the roots, the stems and the leaves were weighted before and after 48 h drying at 60 °C in an oven. Leaf area was measured by using a LI-3100C Area Meter (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). At day 56, leaf pruning was performed on each plant as the commercial practice, and the leaf area and leaf fresh weight of the two plants per the experimental unit were measured. The dry weight of these pruning leaves was calculated based on the average water content in leaves of the final harvest (80 days). The total leaf area and dry biomass were calculated by the sum of the data obtained at the pruning and the final harvest (80 days).

3.2.4 Inorganic mineral analysis

For the analysis of inorganic mineral contents, we used plants that were harvested at days 25 and 80. Only leaves and inflorescences were analyzed. The dried samples were ground and stored in plastic bags. Then, subsamples of 1 g were placed in 7 mL plastic tubes with 5 small beads to finely grind and homogenize the plant material with the Bead Ruptor Elite (Omni International, Kennesaw, GA, USA). Total N and Mg were determined by Kjeldahl method using a block digester to colorimetrically dose these nutrients (Microplate Spectrophotometer, Biotek model 2) as described by Isaac and Johnson (1976). Mg was extracted with the same method and dosed using an atomic absorption spectrophotometer (Perkin-Elmer 3300, Uberlingen, Germany). The concentration of the other elements (K, Ca, Fe, Cu, Mn and Zn) was determined on pelleted dry samples (Carver Bench Top Laboratory Pellet Press, model 4350 L, Carver, Inc., IN, USA) by using an energy-dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) portable spectrometer (Niton XL3t-955 GOLDD + Ultra Mining / Enviro XRF Analyzer, with Portable Test Stand, XL2/3, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) as described by Reidingier *et al.* (2012) and Margui and Hidalgo. (2009).

3.2.5 Statistics

The MIXED procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute, 2013) was used with significance determined at $p \leq 0.05$. Data normality was tested using the Shapiro-Wilk statistic, and homogeneity of variance was assessed by examining the graphic distribution of residuals. The GROUP statement and transformation were used when necessary to achieve data homogeneity. Pairwise comparisons were made using protected Fisher's LSD (least significant difference). Principal component analysis was performed using the PRINQUAL procedure of SAS.

3.3 Results

3.3.1 Plant development and yield

After 25 days, when the flower buds first started to appear, all treatments had similar biomass for leaves, roots and shoots and growing parameters based on the absence of significant effect (Annexe 2.1). Similarly, after 80 days of growth, no significant effect of the studied treatments were observed for the flower, leaf, root and shoot dry biomass (Table 3.2). However, the interaction P x K for the total biomass was significant at $P = 0.058$ which might suggest an interaction between P and K. The statistical analysis of this interaction showed that at 100 mg P L^{-1} , the total biomass per plant followed the increase of K level in the nutrient solution (Annexe 2.2).

As for the plant organ biomass, after 80 days of growth we haven't observed significant effect of the P and K treatments or any N x K interaction on the morphological parameters such as growth

index, CCI, Fv/Fm, number of leaves and water use efficiency (Table 3.3). However, the total leaf area of plants grown under 250 mg K L⁻¹ was 60% higher compared with plants grown under 175 mg K L⁻¹: at 175 mg K L⁻¹, the leaf area was 6,878 cm³ plant⁻¹, while it increased to 11,015 cm³ plant⁻¹ at 250 mg K L⁻¹. Similarly, at p=0.077 stem diameter of plants grown under 250 mg K L⁻¹ was slightly higher (+7%) compared with plants grown under 175 mg K L⁻¹. The Fv/Fm ratios were all > 0.8, which indicate that the plants were not under stress.

Table 3. 2 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on plant biomass and yield of drug-type *C. sativa* White Shark after 80 days of growth (flowering stage) in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=8).

		Total plant biomass	Flower yields	Leaf biomass	Root biomass	Shoot biomass
(g DM plant ⁻¹)						
P	25	163.7	27.90	106.88	12.62	16.97
	50	157.9	25.64	106.73	11.01	16.01
	100	164.3	26.35	108.59	10.92	17.29
	150	158.2	28.67	101.20	11.28	17.30
	200	158.2	27.88	101.82	11.62	17.64
K	175	157.3	26.89	103.27	11.14	16.72
	250	163.6	27.69	106.82	11.86	17.36
ANOVA						
P		0.947	0.853	0.890	0.653	0.900
K		0.421	0.672	0.527	0.282	0.556
P × K		0.058	0.742	0.239	0.378	0.071

As expecting, significant week effect was observed for all studied weekly growth parameters (Table 3.4). Plants grew significantly every week until week 8 before reaching a plateau. They grew rapidly between the weeks 4 and 8 by more than doubling their height (38.0 cm to 82.4 cm). This fast growing can be associated to the “flowering stretch” often observed shortly after the first flowers appeared, at week 3 in our study. The other growth parameters (growth index and stem diameter) reached a plateau at around the same time; the final height was reached at weeks 8 and 9. The growth index decreased in week 9 due to the pruning that reduced the plant width and consequently its value. The number of nodes and the chlorophyll content index (CCI) increased until weeks 9 and 11, respectively. Significant P x K interactions were observed for the weekly measured plant height and the number of nodes, while this interaction was significant at p=0,054 for the shoot diameter. The highest plant height and stem diameter were observed for plants grown

with 100 mg P L⁻¹ and 250 mg K L⁻¹, while the lowest one was observed under 175 mg P L⁻¹ and 250 mg K L⁻¹. Few differences were observed between the other treatments. A similar trend was observed for the number of nodes.

Table 3. 3 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on plant growth parameters of drug-type *C. sativa* White Shark after 80 days of growth (flowering stage) in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=8, except for water use efficiency with n=4).

		Growth index	Shoot diameter (mm)	CCI	Fv/Fm	Foliar area (cm ² plant ⁻¹)		Number of leaves (Nb plant ⁻¹)	Water use efficiency (g L ⁻¹ plant ⁻¹)
P	25	1683.6	13.7	61.2	0.819	7734		295	1.32
	50	1644.2	13.5	60.9	0.822	7353		296	1.29
	100	1570.9	12.4	62.9	0.819	12796		305	1.22
	150	1699.8	13.9	61.5	0.818	6841		272	1.29
	200	1769.1	12.8	62.5	0.821	10036		294	1.30
K	175	1696.2	12.8	61.8	0.820	6878	b ^z	277	1.25
	250	1650.8	13.7	61.8	0.819	11015	a	308	1.31
ANOVA									
P		0.878	0.354	0.385	0.799	0.281		0.986	0.869
K		0.707	0.077	0.974	0.661	0.013		0.398	0.306
P × K		0.412	0.586	0.255	0.599	0.218		0.944	0.267

^zDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).

For the chlorophyll content index (CCI), a P and K effects were observed (Table 3.4). The leaf CCI was highest for plants grown with 200 mg P L⁻¹, and the lowest for plants grown under 50 mg P L⁻¹, while CCI was higher for plants grown at 175 mg K L⁻¹ compared with 250 mg K L⁻¹.

Table 3. 4 Evolution of the effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on weekly growth parameters of drug-type *C. sativa* White Shark (flowering stage) grown for 12 weeks in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=4).

Week	Height		Growth index		Number of nodes		Stem diameter		CCI	
	(cm)				(Nb plant ⁻¹)		(mm)			
1	8.2	h ^z	4.1	h					41.5	ef
2	13.2	g	15.6	g	8.2	h	2.9	g	31.9	g
3	24.4	f	77.2	f	11.0	g	4.4	f	40.1	f
4	38.0	e	195.8	e	13.1	f	5.4	e	43.3	e
5	51.3	d	453.1	d	15.5	e	9.1	d	48.2	d
6	66.2	c	948.2	c	17.5	d	10.1	c	48.2	d
7	75.2	b	1337.5	b	20.0	c	11.1	b	51.3	d
8	82.4	ab	1805.5	a	21.8	b	12.2	ab	55.7	c
9	86.3	a	1539.2	ab	22.9	ab	13.0	a	59.2	b
10	88.1	a	1637.5	ab	23.6	a	12.9	a	60.6	ab
11	88.4	a	1642.9	ab	24.1	a	13.3	a	63.5	a
12	87.7	a	1683.5	ab					61.8	ab
P	K									
25	175	62.6	ab	1017.4	18.3	a	9.9	ab	51.5	
	250	61.6	ab	1018.5	17.8	ab	9.8	abc	50.3	
50	175	62.0	abc	1013.7	18.1	ab	9.6	abcde	49.7	
	250	61.1	bcd	998.5	17.6	abc	9.3	bcde	49.3	
100	175	59.8	cd	914.9	17.5	bc	8.9	de	50.3	
	250	62.7	a	993.0	18.4	a	10.1	a	50.5	
150	175	61.1	abcd	1062.1	17.9	ab	9.6	cde	50.6	
	250	60.5	abcd	998.2	17.5	bc	9.6	abcd	49.9	
200	175	59.5	d	909.0	17.0	c	8.8	e	51.6	
	250	63.1	abcd	1079.5	17.7	abc	9.4	abcde	50.7	
ANOVA										
P		0.090		0.281	0.092		0.071		0.005	
K		0.135		0.176	0.854		0.032		0.040	
P × K		0.045		0.458	0.016		0.054		0.662	
Week (W)		<0.001		<0.001	<0.001		<0.001		<0.001	
P × W		0.302		0.478	0.936		0.968		0.992	
K × W		0.969		0.989	0.769		0.796		0.403	
P × K × W		0.985		0.982	0.773		0.987		0.989	

^zLSD protected by Fisher ($P < 0.05$); values with the same letter indicates significance while value with different letters indicate statistically significant results.

3.3.2 Inorganic mineral accumulation in tissues

Significant effects were observed in the mineral leaf content of N, K, Ca, Mg, Zn, Fe and Mn of 25 and 80 days treated plants grown in different P x K concentrations (Figure 3.2). In the case of N and K, for all P x K treatments, the leaf N and K content decreased from the first apparition of the flower buds to the final inflorescence harvest. N leaf content decreased by an average of 47%. On the opposite, the Ca, Mg, Zn, Fe and Mn leaf content increased respectively by 1.36, 1.05, 1.7, 2.8 and 2.3 times from 25 to 80 days treated plants.

The inorganic mineral content in the flowers and in the leaves at 80 days were significantly different for each P x K treatment, except for the K content which was only different at the lowest K treatment (175 mg L⁻¹) (Annexe 2.3). The mineral content of N, P, Mg and Zn in the inflorescences were higher than the content measured in the leaves. In contrast, K, Ca, Fe and Mn content was higher in the leaves at 80 days.

N and K leaf content was similar for each P x K treatment at 25 days, while significant P x K interactions were observed at 80 days (Figure 3.2). Under 250 mg K L⁻¹, N leaf content decreased with P concentrations as it ranged from 37.6 g kg⁻¹ DM at 25 mg L⁻¹ P to 34.4 g kg⁻¹ DM at 200 mg L⁻¹ P. For K leaf content under 175 mg K L⁻¹, it increased from 100 mg P L⁻¹ to 150 and 200 mg P L⁻¹, while under 250 mg K L⁻¹ no impact of P concentrations was observed.

P and Mg leaf content varied according to P x K treatments at 25 and 80 days. At 25 days, under 175 mg K L⁻¹, P leaf content was higher at 100 mg P L⁻¹ compared with 50 mg L⁻¹ P. At 80 days, P leaf content at 200 mg P L⁻¹ decreased with K increased. For the Mg leaf content at 25 days, the lowest leaf Mg content was found for the 150 mg P L⁻¹ and 175 mg K L⁻¹ treatment; no difference between the other treatment was observed. At 80 days, Mg leaf content was significantly reduced when K fertilization increased to 250 mg L⁻¹ at lower P concentrations (25 and 50 mg P L⁻¹), but it increased at 150 mg P L⁻¹.

Mn leaf content was affected by a P x K interaction only at 25 days. At 175 mg K L⁻¹, it decreased as P concentration increased from 25 to 200 mg P L⁻¹. Mn leaf content ranged from 657 at 25 mg P L⁻¹ to 479 mg kg⁻¹ DM at 150 mg P L⁻¹. Mn content remained similar at 250 mg K L⁻¹ no matter the P concentrations.

The Ca accumulation in the leaves at both dates was significantly affected by the K concentration of the nutrient solution as its leaf content decreased when K concentration was increased. The average Ca content at 25 and 80 days decreased by an average of 5.4% between the 175 and 250 mg K L⁻¹ treatments (Annexe 2.4).

In the inflorescences, N, K and Mg content was significantly affected by P x K (Table 3.5). No effect of P and K concentrations was found for the flower accumulation of P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn and Cl. At 175 mg K L⁻¹, N flower content decreased with the increase of P concentrations from 50 to 150 mg P L⁻¹. As for K flower content, no difference was observed, except a lower concentration observed with 250 mg K L⁻¹ and 150 mg P L⁻¹ compared with the other P x K treatments. The lowest flower Mg contents were observed at the highest P concentrations of 200 mg P L⁻¹ and at 150 mg P L⁻¹ and 175 mg K L⁻¹ treatment, while the highest Mg flower content was observed the lower P concentration of 25 mg P L⁻¹ and lower K of 175 mg L⁻¹.

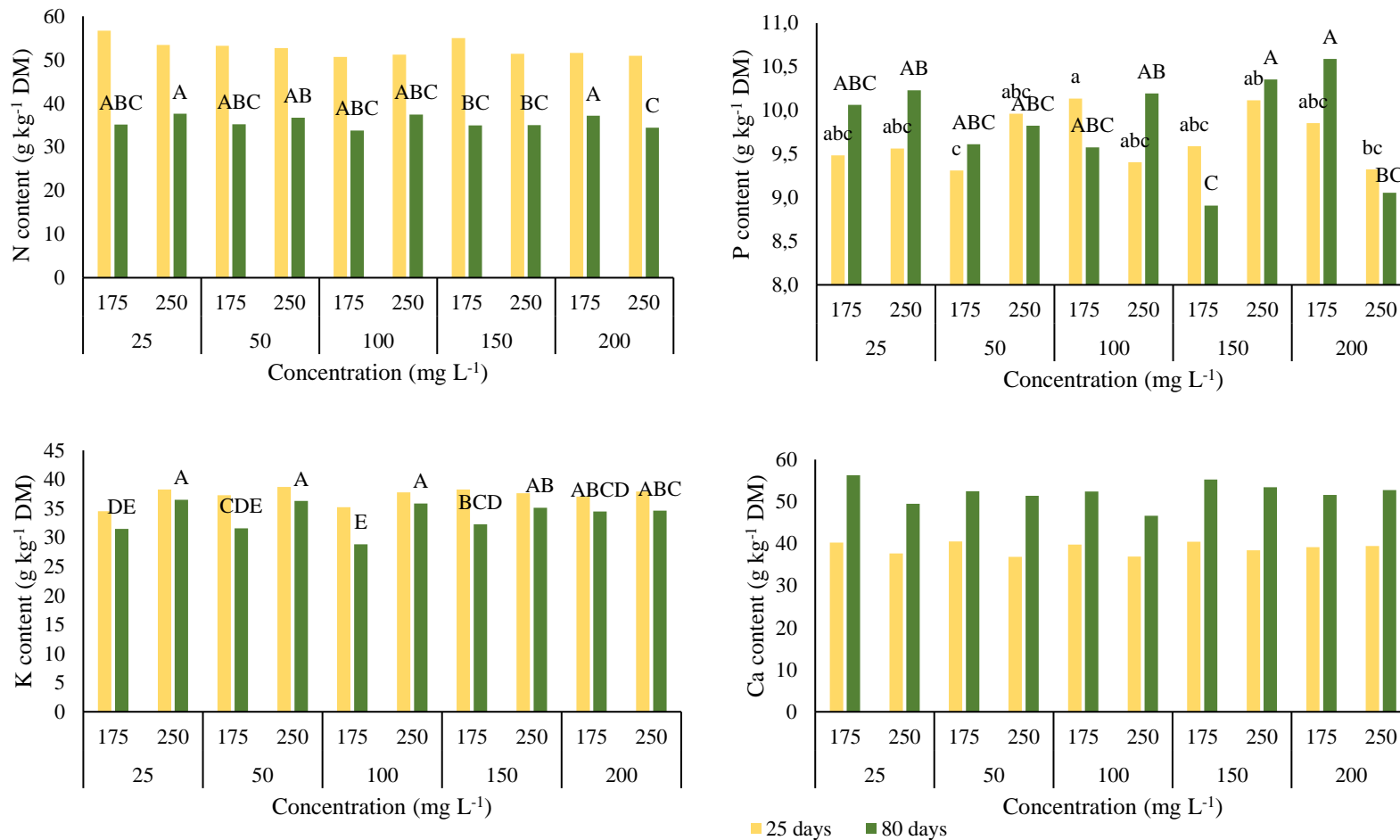


Figure 3. 2 The impacts of phosphorus (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and potassium (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on mineral accumulation in leaf tissues of *C. sativa* White Shark after 25 and 80 days of treatment in a deep-water system (25 days, n=4; 80 days, n=7). Different letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05); capital letters indicate the significant differences between the leaf content at 80 days, while lowercase letters indicate the leaf mineral content at 25 days; * indicates when there is a significant difference between the content at 25 and 80 days.

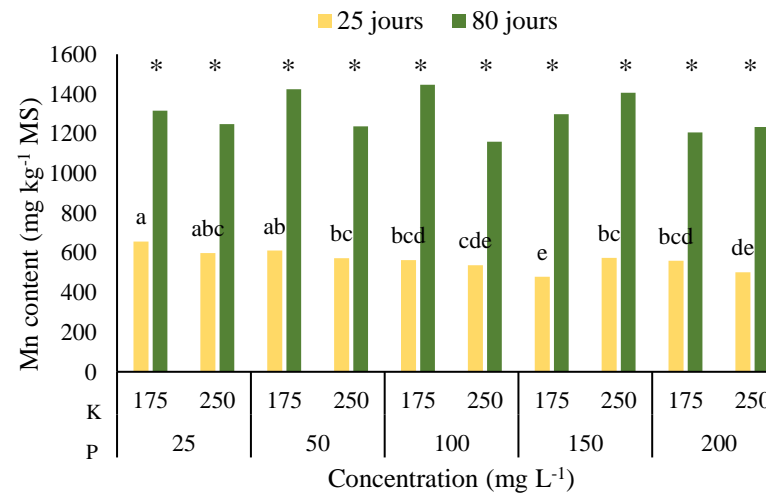
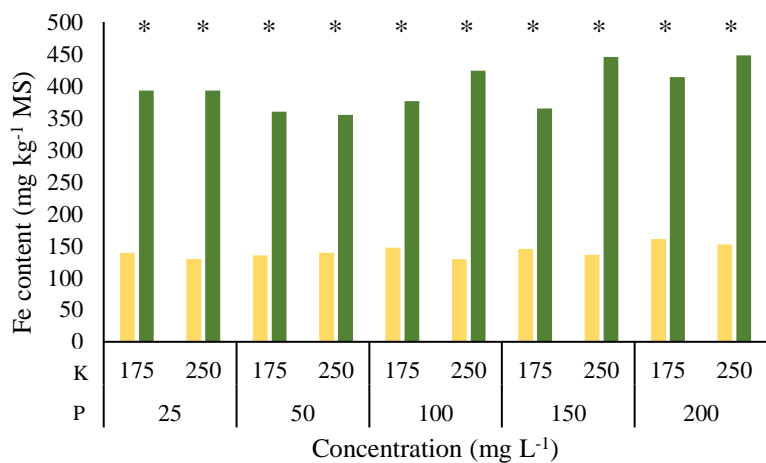
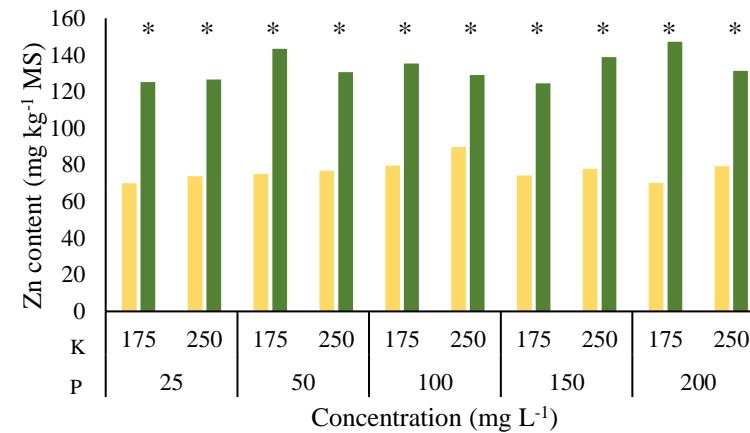
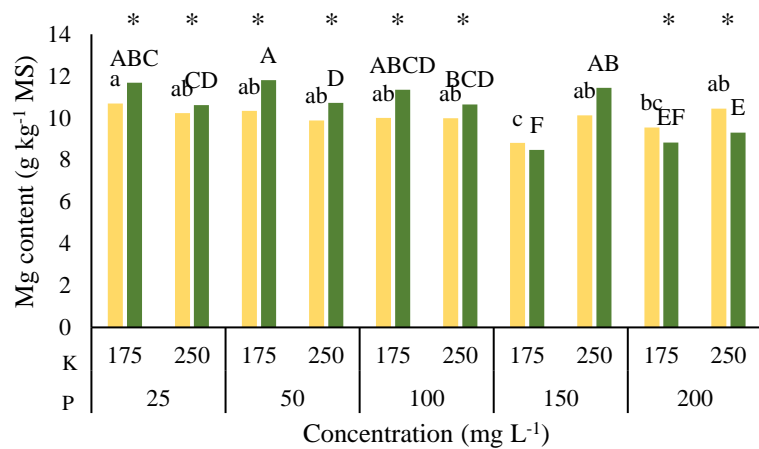


Figure 3.2 (Continued) The impacts of phosphorus (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and potassium (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on mineral accumulation in leaf tissues of *C. sativa* White Shark after 25 and 80 days of treatment in a deep-water system (25 days, n=4; 80 days, n=7). Different letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05); capital letters indicate the significant differences between the leaf content at 80 days, while lowercase letters indicate the leaf mineral content at 25 days; * indicates when there is a significant difference between the content at 25 and 80 days.

Table 3. 5 The impacts of phosphorus (25, 50, 100, 150, and 200 ppm) and potassium (175 and 250 ppm) concentrations on mineral accumulation in flower tissues of *C. sativa* White Shark harvested after 80 days of treatment in a deep-water system; variance analysis (n=7).

		Flower nutrient content												
P	K	g kg ⁻¹ DM						mg kg ⁻¹ DM						
		N	P	K	Ca	Mg	Cl	Zn	Cu	Fe	Mn			
25		44.7	13.4	34.4	13.3	6.70	1.30	161.1	16.8	265.5	466.7			
50		43.8	13.5	35.7	12.6	6.55	1.40	170.9	15.8	286.9	453.3			
100		43.8	13.4	35.7	12.9	6.94	1.43	165.2	17.8	292.1	454.2			
150		44.5	13.4	34.3	13.1	6.02	1.34	163.3	16.2	275.7	438.0			
200		44.9	13.4	35.8	12.7	5.99	1.41	169.1	16.4	296.2	415.0			
	175	44.4	13.3	34.8	13.1	6.38	1.40	166.8	16.5	283.3	450.5			
	250	44.4	13.5	35.6	12.8	6.50	1.35	165.0	16.7	283.2	440.4			
25	175	45.3	ab	13.3	33.5	bc	13.8	7.32	a	1.29	161.2	16.3	271.8	471.3
	250	44.2	bcd	13.5	35.3	ab	12.8	6.08	def	1.30	161.1	17.3	259.2	462.2
50	175	43.8	d	13.4	35.2	abc	12.9	6.43	cde	1.42	173.1	15.6	286.4	477.5
	250	43.8	d	13.5	36.2	a	12.3	6.66	bcd	1.38	168.7	16.0	287.5	429.2
100	175	43.2	d	13.2	35.0	abc	13.3	6.59	abcdef	1.48	166.4	17.6	289.7	469.4
	250	44.4	abcd	13.6	36.4	a	12.5	7.30	ab	1.39	164.0	18.1	294.5	438.9
150	175	43.9	cd	13.4	35.5	ab	13.1	5.46	g	1.42	163.3	16.0	287.9	430.7
	250	45.1	abc	13.3	33.2	c	13.2	6.59	bc	1.26	163.4	16.3	263.5	445.3
200	175	45.6	a	13.2	34.8	abc	12.5	6.09	ef	1.41	170.2	17.1	280.9	403.6
	250	44.3	abcd	13.5	36.8	a	12.9	5.89	f	1.41	168.0	15.7	311.4	426.4
ANOVA														
P		0.052		0.995	0.103		0.229	<0.001		0.193	0.698	0.290	0.575	0.270
K		0.995		0.209	0.108		0.116	0.348		0.219	0.712	0.806	0.991	0.512
P × K		0.019		0.847	0.031		0.255	<0.001		0.705	0.998	0.801	0.742	0.550

^aDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).

3.3.3 Potency and terpenes

Six cannabinoids were detected from the flower samples (THCA, Δ^9 -THC, CBDA, CBGA, CBG, CBC) (Table 4.6). No significant effect of the P x K concentrations were observed for any analyzed cannabinoids. The total potency was ranging from 14.08 to 16.24 % THC and was around 0.05 % for CBD. The concentration of the other cannabinoids ranged from 1.20 to 1.36 %, 0.10 to 0.11 % and 0.14 to 0.15 % for CBGA, CBG and CBC, respectively.

Table 3. 6 Cannabinoid potency of the flowers of *Cannabis sativa* White Shark harvested after 80 days of ten P x K treatments in a deep-water system in function; variance analysis (n = 3).

P	K	THCA	Δ^9 -THC	CBDA	CBD	CBGA	CBG	CBC	Total THC	Total CBD
mg L ⁻¹	mg L ⁻¹	%								
25		17.01	0.09	0.06	0.00	1.20	0.10	0.15	15.01	0.05
50		16.03	0.09	0.05	0.00	1.22	0.10	0.14	14.15	0.05
100		17.05	0.09	0.06	0.00	1.24	0.10	0.15	15.04	0.05
150		17.54	0.10	0.06	0.00	1.32	0.11	0.15	15.48	0.05
200		17.27	0.10	0.06	0.00	1.30	0.10	0.15	15.25	0.05
	175	16.83	0.09	0.06	0.00	1.25	0.10	0.15	14.85	0.05
	250	17.13	0.09	0.06	0.00	1.26	0.10	0.15	15.12	0.05
25	175	16.45	0.09	0.06	0.00	1.18	0.10	0.15	14.51	0.05
	250	17.58	0.10	0.05	0.00	1.21	0.11	0.15	15.51	0.05
50	175	16.11	0.09	0.05	0.00	1.21	0.10	0.14	14.22	0.05
	250	15.95	0.09	0.05	0.00	1.23	0.09	0.14	14.08	0.05
100	175	16.95	0.09	0.06	0.00	1.21	0.10	0.15	14.96	0.05
	250	17.15	0.08	0.06	0.00	1.27	0.11	0.15	15.12	0.05
150	175	16.67	0.10	0.06	0.00	1.36	0.10	0.14	14.72	0.05
	250	18.41	0.09	0.06	0.00	1.29	0.11	0.16	16.24	0.05
200	175	17.97	0.10	0.06	0.00	1.30	0.11	0.16	15.85	0.05
	250	16.58	0.10	0.06	0.00	1.30	0.09	0.14	14.64	0.05
ANOVA										
P		0.794	0.625	0.311	-	0.189	0.943	0.817	0.796	0.311
K		0.704	0.959	0.572	-	0.898	0.717	0.671	0.705	0.572
P x K		0.760	0.840	0.983	-	0.840	0.491	0.571	0.767	0.983

A principal component analysis or PCA was performed for the flower cannabinoid content (Annexe 2.5) for the individual P and K concentrations. The results obtained indicated that the Principal

Component 1 (PC₁) accounted for 77.07% of total variance whereas the Principal Component 2 (PC₂) accounted for 15.74%. The K concentrations did not have an impact since the two K concentrations were located in the middle of the graphic. However, an effect was observed for P concentrations. All cannabinoids tended towards the stronger P concentrations (150 and 200 mg P L⁻¹). One group, composed of THCA, CBG, CBGA, CBC, CBDA, total THC potency and total CBD potency, was strongly related to 150 mg P L⁻¹. The second group was composed only of Δ⁹-THC and was related to 200 mg P L⁻¹. Furthermore, we performed another PCA for the cannabinoids (Annexe 2.6) based on P and K interaction. The results indicated that the PC₁ accounted for 61.45% of total variance and the PC₂, for 22.25%. Once again, we observed that high P levels have a stronger positive impact on cannabinoids. Three groups were observed. The total THC potency was positively correlated to 150 ppm P and 250 ppm K whereas it was related to 200 mg P L⁻¹ and 175 mg K L⁻¹ for the total CBD potency. In contrast, Δ⁹-THC seemed more correlated to 150 mg P L⁻¹ than 200 mg P L⁻¹ from the first PCA (Annexe 2.5).

For the inflorescence terpene content, the average terpene concentration was 19.6 mg/g. Seventy-four percent of the terpenes were sesquiterpenes followed at 25% by the monoterpenes, while the remaining 1% were diterpenes (data not show). Because we did the analysis for the identification of 60 common terpenes for *C. sativa*, we have chosen to focus on those having more than 0.50 mg g⁻¹, which was the concentration threshold identified by Russ (1998) for pharmacological metabolites of interest. This resulted in 11 terpenes that were near or above 0.50 mg g⁻¹ (Table 4.8). They represented 72% of the total terpene content. The β-caryophyllene was the terpene found at the highest concentrations with an average of 2.64 mg g⁻¹, followed by germacrene B, selina-3,7(11)-diene and α-pinene with 2.45, 1.72 and 1.50 mg g⁻¹, respectively. The β-caryophyllene, germacrene B, (E)-nerolidol, α-humulene, selina-3,7(11)-diene and selina-4(15),7(11)-diene are sesquiterpenes. Limonene, myrcene, pinene (α and β) and γ-elemene are monoterpenes. Significant P X K interactions were found for three terpenes: (E)-nerolidol (P=0.027), germacrene B (P=0.042) and γ-elemene (P=0.034). However, the principal effect was due to the treatment 50 mg P L⁻¹ x 175 mg K L⁻¹ where their content was much lower than the other treatments. The other terpenes that were identified in the flowers can be found in Annexe 2.7. A third PCA was done on terpenes over 0.50 mg g⁻¹ and their correlation with the treatments (Annexe 2.8). PC₁ accounted for 68.25% of the total variance and PC₂ for 16.16%. Myrcene and limonene seemed to be related to the 200 mg P L⁻¹ x 175 mg K L⁻¹) and α-pinene with 150 mg P L⁻¹ X 250 mg K L⁻¹ treatment, while the remaining terpenes hardly can be associated with any treatment.

Table 3. 7 Main terpenes found in the flowers of *C. sativa* White Shark at concentrations of pharmaceutical interest (≥ 0.50 mg/g) and for the ten P x K treatments in the nutrient solution of a deep-water growing system (n=3).

P	K	mg g ⁻¹ DM																				
		(E)-Nerolidol	Germacrene B	Limonene	Myrcene	Selina-3,7(11)-diene	Selina-4(15),7(11)-diene	α -Humulene	α -Pinene	β -Caryophyllene	β -Pinene	γ -Elemene										
25		0.46	2.41	0.49	1.24	1.69	1.24	0.68	1.54	2.60	0.63	1.04										
50		0.44	2.23	0.44	1.09	1.62	1.18	0.65	1.46	2.49	0.58	0.96										
100		0.47	2.52	0.47	1.23	1.69	1.23	0.68	1.45	2.59	0.59	1.09										
150		0.49	2.64	0.47	1.10	1.75	1.30	0.74	1.69	2.80	0.65	1.16										
200		0.49	2.46	0.47	1.24	1.84	1.37	0.71	1.36	2.70	0.57	1.07										
	175	0.46	2.41	0.46	1.16	1.69	1.24	0.68	1.48	2.57	0.59	1.04										
	250	0.48	2.50	0.48	1.20	1.75	1.29	0.71	1.53	2.71	0.62	1.08										
25	175	0.49	ab	2.48	ab	0.45	1.12	1.68	1.27	0.71	1.53	2.71	0.63	1.07	ab							
25	250	0.42	bc	2.33	bc	0.53	1.37	1.70	1.22	0.65	1.55	2.49	0.64	1.00	bc							
50	175	0.37	c	1.88	c	0.41	1.04	1.43	1.03	0.57	1.37	2.17	0.53	0.81	c							
50	250	0.50	ab	2.59	ab	0.47	1.13	1.81	1.33	0.73	1.54	2.80	0.63	1.11	ab							
100	175	0.45	abc	2.51	bc	0.49	1.24	1.65	1.20	0.66	1.45	2.49	0.59	1.08	ab							
100	250	0.49	ab	2.54	ab	0.46	1.21	1.72	1.27	0.71	1.45	2.70	0.60	1.10	ab							
150	175	0.47	ab	2.48	ab	0.47	1.07	1.71	1.24	0.69	1.65	2.60	0.63	1.09	ab							
150	250	0.52	a	2.81	ab	0.47	1.13	1.78	1.37	0.79	1.74	3.00	0.67	1.23	a							
200	175	0.51	ab	2.68	a	0.50	1.31	1.95	1.47	0.76	1.38	2.86	0.59	1.17	ab							
200	250	0.46	abc	2.23	ab	0.45	1.17	1.73	1.27	0.67	1.35	2.55	0.56	0.98	bc							
ANOVA																						
P		0.421		0.263		0.893		0.802		0.679		0.476		0.623		0.248		0.661		0.415		0.139
K		0.313		0.413		0.614		0.674		0.524		0.484		0.367		0.590		0.312		0.364		0.423
P x K		0.027		0.042		0.663		0.833		0.426		0.257		0.160		0.964		0.186		0.793		0.034

^aDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).

3.4 Discussion

3.4.1 Plant growth and development

Cannabis sativa L. (White Shark) growth and yields were not significantly affected by the concentration of P and K. These biomass results for the effect of K converged to those obtained by Finnan and Burke (2013) and Aubin *et al.* (2015) in hemp and Yep and Zheng (2021) for drug-type cannabis, but they were different from Saloner *et al.* (2019) where K, at higher levels, produced larger plants at the vegetative stage.

P concentrations were also tested in drug-type *C. sativa* by Shiponi and Bernstein (2021) and Cockson *et al.* (2020) and their concentrations used in the nutrient solution were considerably smaller than ours. Shiponi and Bernstein (2021) also stated that starting at 30 mg L⁻¹ P, biomass accumulation was unaffected by further increase. Cockson *et al.* (2020) also reached its highest plants and inflorescence yields at 22.5 and 30.0 mg P L⁻¹, which may indicate that the minimum P concentration for optimal growth and development for *C. sativa* could be around 30 mg P L⁻¹. As our lowest concentration was 25 ppm P, this may explain the lack of effects observed in our study for growth parameters and flower yields.

3.4.2 Inorganic mineral accumulation

We found that N content in the leaves were higher in the plants that were harvested at 25 days than those harvested at the end of the experiment, so at 80 days. Our results are similar to those obtained in **Chapitre 2** where the N leaf content in the leaves decreased through the flowering phase (Annexe 1) following the decrease in N uptake from the roots. Furthermore, the decrease of N in the leaves was done at the detriment of the flowers where N accumulation in the tissue was higher with 44.4 g kg⁻¹ DM compared to an average of 35.8 g kg⁻¹ DM in the leaves harvested at the same time. This is similar to Bernstein *et al.* (2019) who also obtained greater N content in the inflorescences (40-50 mg g⁻¹) than in the leaves (20-30 mg g⁻¹). Our results also suggest that flowers could become a sink for N due to the high energy demand for the biosynthesis of cannabinoids and terpenes which are known for being one of the most energy-consuming metabolites to synthesis (Gershenzon, 1994). Tegeder and Masclaux-Daubresse (2017) also reported that, during the reproductive phase in annual plants, reproductive organs are major N sinks. The continued rise in chlorophyll content index (CCI) until week 11 can also indicate an increase in the chlorophyll content in the leaves (Fritschi and Ray, 2007; Xiong *et al.*, 2015) even though the N leaf content had decreased. Saloner and Bernstein (2020) found that N supply up to 160 mg L⁻¹ for *C. sativa* led to a positive response in N leaf content, chlorophyll concentration and photosynthesis and that further supplies did not increase photosynthesis. Thus, we would expect the N leaf content to also

increase, but our results indicate otherwise as it decreased between the harvest at 25 and 80 days. The decline could be explained by a dilution effect since the N content in the plant is not uniform as the distribution of N within a canopy is favoured in the top canopy leaves because of the higher light intensities (Hikosaka, 2014). This was also the height that the CCI measurements were taken. For example, at 25 days, the canopy was less dense and light interception was more homogeneous while, at 80 days, the canopy was denser and N distribution could be more heterogeneous. The mix between the canopy levels can have lowered the averaged N content in the leaves measured even if the CCI increased at the top canopy level as N content is favoured in the top canopy for photosynthesis.

The accumulation of P in the leaves was similar in the harvests at 25 and 80 days. On other hands, we found 37% more P in the inflorescences similarly to Bernstein and al. (2019a) who also obtained higher P content in the inflorescences of *C. sativa* than in the leaves. This could be due to the fact that is an important nutrient for the biosynthesis of the secondary component such as terpenes and cannabinoids (Kovalchuk *et al.*, 2020; Sirikantaramas et Taura, 2017; Stout *et al.*, 2012). For *Cannabis sativa* L., the main location for the biosynthesis of terpenes and cannabinoids is the trichomes densely found on the flowers (Small, 2017; Potter, 2009). The biosynthesis of terpenes is considered as more energy consuming per gram than most primary and secondary metabolites found in the plants (Gershenzon, 1994). The P leaf content was around 2 and 4.5 times higher than the concentrations observed by Cockson *et al.* (2019a) and Shiponi and Bernstein (2021) respectively. The latter has the highest P concentrations (up to 90 mg P L⁻¹) tested in *C. sativa* that we found at the moment of the redaction. Comparatively, Bernstein *et al.* (2019a) (5-10 g P kg⁻¹) and Yep and Zheng (2021) (6.3-7.7 g P kg⁻¹) observed similar leaf P contents to our concentrations (9.84 g kg⁻¹) in *C. sativa* plants. All of these published studies were conducted in hydroponic systems, including organic substrate and aquaponic. Interestingly, in **Chapitre 2**, we also used White Shark in our aeroponic commercial experiment, and the P leaf content observed at week 10 was lower (5.27 g kg⁻¹) than the ones observed in this study, and was more similar to the contents reported by Cockson *et al.* (2019a). The differences in P leaf content could be associated with the different environmental conditions (light intensity, temperature, humidity, etc.).

As for K accumulation, its leaf accumulation was lower at 80 days than 25 days. This compartment was similar to the one observed in **Chapitre 2** where K uptake by the roots and K leaf content decreased after the end of the plant growth in week 3. The K concentration in the leaves (33.7 g kg⁻¹) at 80 days was higher than those observed by Cockson *et al.* (2019) (26.5 to 28.2 g K kg⁻¹) in the vegetative phase, and Bernstein *et al.* (2019a) (18 to 20 g K kg⁻¹) and Yep and Zheng (2021) (16.9

to 30.0 g K kg⁻¹) in the flowering stage. The highest K concentrations tested by the mentioned authors were lower than our lowest K treatment (175 mg K L⁻¹) with 150 mg K L⁻¹ for both Cockson *et al.* (2019) and Yep and Zheng (2021). This can suggest that K concentrations in the leaves increased as K supply to the roots are increasing. In fact, our results indicated that K content was significantly influenced by the K concentration resulting in an increase from 31.7 g kg⁻¹ at 175 mg K L⁻¹ to 35.7 g kg⁻¹ at 250 mg K L⁻¹ at 80 days. In Figure 3.2, at 80 days, K leaf content was higher at 250 mg K L⁻¹ from 25 to 100 mg P L⁻¹. Furthermore, Saloner *et al.* (2019) also obtained a significantly positive response to the K leaf content, during the vegetative phase of *C. sativa*, with K supply increasing from 15, 60, 100, 175 to 240 mg K L⁻¹. Therefore, the increase in K leaf content and the absence of an impact on the plant development by K fertilization support the notion that *C. sativa* is subject to “luxury consumption” of K – the ability of the plant to absorb more K in its tissues than the optimal level necessary for its growth and function – as it was observed by Finnan and Burke (2013) and Saloner *et al.* (2019).

The leaf Ca content at 80 days was 36% higher than its content at 25 days of growth, which might be due to a higher transpiration rate as Ca transportation from the roots to the leaves is highly related to transpiration rates (White, 2012). Ca concentrations were 4-5 times higher in the leaves than in the flowers similarly to what was previously observed in **Chapitre 2**. Leaves are the organ with the highest transpiration rate, so it is not surprising to find a higher concentration of Ca in the leaves than in the flowers. In addition to this, Ca leaf content was reduced when under the 250 mg L⁻¹ K treatment at the plant growth stage (25 days) and flowering stage (80 days) by an average of 5% (Annexe 2.4). This could be related to the osmotic competition between the two cations to the advantage of K against Ca for root uptake (Saloner *et al.*, 2019).

The Mg content in the leaves at 25 and 80 days were different in all treatments, excepted at 150 mg L⁻¹, with an average increase of 5%. It can be attributed to the growing photosynthetic activity measured by CCI and foliar area. Mg is a component of the chlorophyll found for photosynthesis and it accumulates easier in organs with higher rates such as leaves (Bernstein *et al.*, 2019). Our results also indicated that Mg accumulation was significantly influenced by the level of P and K in the nutrient solution. The Mg content in the leaves at day 80 was lower under higher P and K concentrations. It can be explained by two reasons: (1) Mg uptake by the roots can be blocked when the concentration of P is too high (Dorais, 2021); (2) like Ca, Mg is a cation that is subjected to the competition between the other cations for their root uptake (Saloner *et al.*, 2019). Hence, its uptake was reduced when K concentration in the nutrient solution was rising.

The micronutrient contents (Cu, Zn, Fe and Mn) were different from the levels observed in our first article (Chapitre 2). At day 80, their leaf contents were around twice higher than the first harvest at 25 days for Zn, Fe and Mn, and above the content observed with other authors (Cockson *et al.*, 2019), but Zn leaf contents were close to the levels observed by Yep and Zheng (2021). It should be noted that the micronutrient concentrations in the present study were the double of the concentrations used by the latter authors. This suggests that *C. sativa* could easily accumulate those nutrients if their level in the nutrient solution or in the soil is high. For instance, hemp (*Cannabis sativa* L.) was also identified as a hyperaccumulator (Asad *et al.*, 2015; Citterio *et al.*, 2003; Galic *et al.*, 2019; Girdhar *et al.*, 2014; Linger *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2010). A hyperaccumulator is a plant that can accumulate high concentrations of heavy metals (As, Cd, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn, etc.) in its tissues without altering its development. The results of Eboh and Thomas (2005) found that Mn levels were the highest among the other heavy metal studied in *C. sativa* which could explain why the leaf content observed was at 1297 mg kg⁻¹. Fe and Mn contents were higher in the leaves than in the flowers. The high presence of Fe in the leaves can be associated to the fact that 80% of Fe is found in the chloroplasts (Hänsch and Mendel, 2009). Cu was only detectable in the flowers and it could be due to its function as a reducing or oxidizing agent (Hänsch and Mendel, 2009) for the numerous oxidation-reduction reactions in the biosynthesis of terpenes in the flowers (Gershenzon, 1994).

3.4.3 Potency

Our present study did not find any significant effects of P and K concentrations on the biosynthesis of cannabinoids in *C. sativa* White Shark. Our cannabinoids results confirmed the *sativa* characteristics of White Shark having a high TCH content of and a low CBD content (Small, 2017). The lack of effects of P concentration did not relate to Coffman and Gentner (1977) who found that the THC content was significantly higher in the substrate mixed with 150 mg P L⁻¹ comparatively to the original substrate without P fertilization. On the other hand, Bernstein *et al.* (2019b) did not find that P fertilization affected the inflorescence cannabinoid concentration. For the moment, no actual relationships were identified between fertilization and terpene synthesis in plants and concluding results are often experiment-specific or contradictory (Bjorkman *et al.*, 1991; Blanch *et al.*, 2010; Cockson *et al.*, 2020; Kainulainen *et al.*, 1996; Ormeno and Fernandez, 2012; Sampedro *et al.*, 2011).

Our results in the terpene content of the White Shark inflorescences showed that the eleven main terpenes represented 74% of the total concentration. Seventy-four percent of the terpenes were sesquiterpenes and 25% were monoterpenes. This did not relate to Brenneisen (2007), Potter

(2009), Mudge *et al.* (2019), Russ (1996) and Russo (2011) who claimed that the most dominating terpenes found in *C. sativa* are the monoterpenes. In **Chapitre 2**, sesquiterpenes were also the dominating terpenoids with 53% of the total content in WS against 46% for the monoterpenes. This could be due to the genotype used and the growing or storage conditions as monoterpenes are more susceptible to volatilization than sesquiterpenes (Small 2017; Booth *et al.*, 2017; Ross and ElSohly, 1996). The β -caryophyllene was the main sesquiterpene, and overall terpene, observed in the flowers. Booth et Bohlmann (2019), Mudge *et al.* (2019) and Sommano *et al.* (2020) also reported that this terpene is the most common sesquiterpene found in *C. sativa*. As for the monoterpenes, Andre *et al.* (2016), Brenneisen (2007) and Russo (2011) indicated that the most commons are limonene, linalool, myrcene, pinene and terpinolene. Out of them, three were found at concentration above 0.50 mg g⁻¹: limonene, myrcene and pinene. The latter had the highest inflorescence content observed. Like with cannabinoids, we did not observe any significant effect of the treatments for the individual terpene.

From the eleven main terpenes identified, three sesquiterpenes were significantly affected by P x K treatments: (E)-nerolidol, germacrene B and γ -elemene. Out of the three, nerolidol is the most documented. It is present in various plants with a floral odour where it plays an active role in the defence system of some plants (Chang *et al.*, 2016). The same authors also reported that it possesses antimicrobial, anti-biofilm, antioxidant, anti-parasitic, anti-inflammatory and anti-cancer properties. It is frequently used in cosmetics and in the food industry as a flavour enhancer. The β -elemene, an isomer of γ -elemene, is well known for its anti-cancer activity against a variety of cell lines (Jiang *et al.*, 2017). The main effect observed for the three sesquiterpenes was a decrease of their content in the inflorescences under 50 mg P L⁻¹ and 175 mg K L⁻¹. We cannot explain why there was a sudden decrease at this precise treatment, while the others have similar content. Interestingly, the PCA obtained for the terpenes and the treatments (Annexe 2) also indicated that terpenes were strongly opposed to this treatment and that most of the remaining terpenes were not related to a particular treatment, while being strongly connected together.

The biosynthesis of cannabinoid and terpenoids are related to the plastidial methylerythritol phosphate (MEP) pathway which produces geranyl diphosphate (GPP), the precursor for monoterpenes and cannabinoids, from pyruvate via many intermediary steps that require P as an important energy supplier and as a component for precursors (Booth *et al.*, 2020; Coffman and Gentner, 1997; Gershenson, 1994; Kovalchuk *et al.*, 2020; Sirikantaramas and Taura, 2017; Sommano *et al.*, 2020; Stout *et al.*, 2012). Thus, limiting P availability could have limited P resources to the MEP pathway as claimed by Cockson *et al.* (2020). They also found that the

limiting P level for the pathway was below $11.25 \text{ mg P L}^{-1}$ and that a higher concentration did not result in higher cannabinoid and terpene content. Since our P concentrations were above $11.25 \text{ mg P L}^{-1}$, this could explain the absence of response observed for the P concentration treatments and for the biosynthesis of cannabinoid and terpenes.

3.5 Conclusion

In contrast with our hypothesis, we did not observe any higher cannabinoid and terpene content in the inflorescences of plants submitted to higher P and K concentrations. Only three main terpenes were affected by P x K concentrations; the $50 \text{ mg P L}^{-1} \times 175 \text{ mg K L}^{-1}$ treatment reduced their content. Furthermore, P and K concentrations did not significantly improve the studied plant growth parameters and flower yield, except for the leaf area under 250 mg K L^{-1} . Overall, our results suggest that for a deep-water hydroponic growing system, relatively low concentrations of P and K at 25 mg L^{-1} and 175 mg L^{-1} , respectively, were sufficient to support an optimal plant development and yield. However, these levels may vary according to the genotype and the light growing condition, as our experiment was conducted with only one genotype and under relatively low light conditions.

Conclusion générale

La présente étude a permis de caractériser pour des plantes en phase de floraison le prélèvement des éléments nutritifs de deux génotypes de *C. sativa* grâce à l'utilisation d'un système aéroponique en circuit fermé. Un des autres effets intéressants observés lors de cette étude est le changement de comportement dans les taux de prélèvements des nutriments à la suite de la fin de la croissance végétale (*flower stretching*) des plantes et l'apparition des premiers bourgeons floraux. À notre connaissance, aucune étude n'avait caractérisé à ce jour les fluctuations des taux de prélèvement des éléments nutritifs au cours des 8 à 10 semaines de floraison du *Cannabis sativa* à haute teneur en THC. Nous avons ainsi démontré que l'absorption de N, K et Ca diminuent à partir de la 2^e semaine de floraison, alors que celui du P et de Mg a augmenté jusqu'à la semaine 5 et 2, respectivement, avant d'atteindre un plateau. Cela invalide partiellement notre première hypothèse voulant que les besoins en N soient plus importants au début de la phase de floraison, alors que ceux en K et en P sont élevés tout au long de la floraison. En fait, les besoins en P et K n'ont pas été constants tout au long de la floraison. Alors que les besoins en P, mesurés par les taux d'absorption de la plante, ont augmenté jusqu'à la semaine 5 de floraison, les besoins en K ont diminué à partir de la semaine 2 de floraison. À partir de ces résultats, il serait intéressant de vérifier ultérieurement comment ajuster les concentrations de ces nutriments selon les taux de prélèvement, et ce, pour différents génotypes et différentes conditions lumineuses puisque nos expériences ont été conduites sous des intensités lumineuses relativement faibles par rapport aux intensités lumineuses que l'on peut retrouver dans l'industrie du cannabis. Il faudrait par la suite valider ces résultats pour différents systèmes de culture hydroponique (avec et sans substrats).

Les paramètres de croissance étudiés ont seulement été affectés par la fertilisation azotée. Le traitement de 250 mg N L⁻¹ a permis de produire des plantes plus hautes et avec un plus grand nombre de nœuds. D'autre part, une fertilisation azotée élevée a permis d'augmenter de 29% le rendement en fleurs du génotype White Shark, alors qu'aucun effet n'a été observé pour le rendement du génotype Critical Orange Punch. L'effet sur le rendement varie donc selon le génotype. Toutefois, indépendamment du génotype, une concentration de 250 mg N L⁻¹ a réduit de 9,5% la teneur des inflorescences en THC total par rapport à une concentration de 150 mg N L⁻¹. Ces observations sont similaires à ce qui avait déjà été rapporté par d'autres auteurs pour le *C. sativa* cultivé avec des substrats organiques ou autres systèmes de culture avec substrat ou en aquaponie. Par ailleurs, des concentrations élevées en P et K n'ont eu aucun effet bénéfique sur le rendement, exprimé par la biomasse des fleurs, la teneur en cannabinoïdes des inflorescences et la majorité des terpènes. Seuls trois terpènes ont bénéficié d'une concentration élevée en azote (β -

myrcène, caryophyllène et *Cis*- β -Ocimène) alors que pour le P et K, nos résultats ne sont pas concluants. À la suite de ces résultats, notre seconde hypothèse voulant qu'une augmentation des concentrations en N, P et K dans la solution nutritive permette d'augmenter le rendement et la teneur en cannabinoïde et en terpènes des fleurs de *Cannabis sativa* à haute teneur en THC a été partiellement validée pour l'azote (pour le rendement d'un génotype), mais a été invalidée pour le K et P.

Compte tenu du fait que la fertilisation élevée en azote sur les rendements floraux est liée au génotype et qu'elle est généralement associée à une baisse de la teneur en THC, une fertilisation relativement faible en N serait à privilégier, bien que pour certains génotypes comme le White Shark, une fertilisation de 250 mg L⁻¹ N serait à favoriser. Par ailleurs, une surcroissance des plantes peut subvenir sous une fertilisation élevée en azote, ce qui peut rendre les tâches ouvrières plus difficiles dans des productions à fortes densités. D'autre part, le manque de réponse aux différentes concentrations de P et de K des plantes suggère que les concentrations les plus faibles étudiées étaient probablement suffisantes pour soutenir la croissance des plantes et le développement des fleurs. Par ailleurs, nos résultats ont démontré que les concentrations de N, P et K pourraient être modulées dans le temps afin de répondre aux taux d'absorption de la plante durant sa phase de floraison. Ainsi, les concentrations d'azote et de K pourraient être abaissées à partir de la 3^e semaine de floraison, alors que la concentration en P pourrait être augmentée. De nouveaux seuils minimums devront toutefois être déterminés.

Bibliographie

- Ahmad, I., Asif, M., Amjad, A. et Ahmad, S. 2011. Fertilization enhances growth, yield, and xanthophyll contents of marigold. *Turk J. Agric. For.*, 35 : 641-648
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Ozturk, E., Schibano, D., Sirmsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N. et Usobiaga, A. 2016. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79 : 324-331
- Andre, C., Hausman, J.-F. et Guerriero, G. 2016. *Cannabis sativa* : The plant of the thousand and one molecule. *Frontiers in Plant Science*, 7:19
- Asaduzzaman, M., Saifullah, M., Mollick, A., Hossain, M., Halim, G. et Asao, T. 2015. Influence of soiless culture substrate on improvement of yield and produce quality of horticultural crops. *IntechOpen*
- Aubin, M.-P., Seguin, P., Vanasse, A., Tremblay, G., Mustafa, A. et Charron, J.-B. 2015. Industrial hemp response to nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization. *Crop, Forage & Turfgrass Management*, 1:1:1-10
- Azeezahmed, S., Dubey, R., Kukal, S. et Sethi, V. 2016. Effect of different nitrogen-potassium concentrations on growth and flowering of chrysanthemum in a drip hydroponic system. *Journal of Plant Nutrition*, 39:13:1891-1898
- Bélangier, R. 2021. Note de cours dans *Culture du cannabis* (PLG-3102). Département de phytologie, Université Laval
- Bernstein, N., Gorelick, J. et Koch, S. 2019a. Interplay between chemistry and morphology in medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops & Products*, 129:185-194
- Bernstein, N., Gorelick, J., Zerahia, R. et Koch, S. 2019b. Impact of N, P, K and humic acid supplementation on the chemical profile of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Front. Plant. Sci.*, 10: 736
- Bjorkman, C., Larsson, S. et Gref, R. 1991. Effects of nitrogen fertilization on pine needle chemistry and sawfly performance. *Oecologia*, 86:2:202-209
- Bócsa, I., P. Máthé, and L. Hangyel 1997. Effect of nitrogen on tetrahydrocannabinol (THC) content in hemp (*Cannabis sativa* L.) leaves at different positions. *Journal of the International Hemp Association* 4(2): 78 -79
- Booth, J. et Bohlmann, J. 2019. Terpenes in *Cannabis sativa* – From plant to genome to humans. *Plant Science*, 284:67-72
- Booth, J., Page, J. et Bohlmann, J. 2017. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PLoS ONE*, 12:3:1-20
- Brenneisen, R. 2007. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. Dans *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids* par ElSohly, M., Humana Press Inc, Totowa, New Jersey
- Cervantes, J. 2015. The cannabis encyclopedia: The definitive guide to cultivation and consumption of medical marijuana. G. F. Van Patten Publishing, USA, 594 pages
- Cabot, Catalina, Martos, S., Llugany, M., Gallego, B., Tolrà, R. et Poschenrieder, C. 2019. A role for zinc in plant defence against pathogens and herbivores. *Front. Plant Sci.*, 10 : 1171

- Campiglia, E., Radicetti, E. et Mancinelli, R. 2017. Plant density and nitrogen fertilization affect agronomic performance of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) in Mediterranean environment. *Industrial Crop & Products*, 100: 246-254
- Caplan, D., Dixon, M. et Zheng, Y. 2017. Optimal rate of organic fertilizer during the flowering stage for *Cannabis* grown in two coir-based substrates. *HortScience*, 52:12:1796-1803
- Caruso, G., Villari, G., Melchionna, G. et Conti, S. 2011. Effects of cultural cycles and nutrient solutions on plant growth, yield and fruit quality of alpine strawberry (*Fragaria vesca* L.) grown in hydroponics. *Scientia Horticulturae*, 129 : 479-485
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M., ElSohly, M. et Khan, I. 2014. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 253875
- Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. et ElSohly, M. 2009. Assessment of cannabinoids content in micropropagated plants of *Cannabis sativa* and their comparison with conventionally propagated plants and mother plant during developmental stages of growth. *Plant Med.*, 76: 743-750
- Chang, W.-K., Tan, L., Chan, K.-G., Lee, L.-H. et Goh, B.-H. 2016. Nerolidol : A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules*, 21: 529
- Chouvy, P.-A. 2019. Illegal cannabis cultivation in the world, and as a subject in academic research. *EchoGéo*. 48: 17556
- Citterio, S., Santagostino, A., Fumagalli, P., Prato, N., Ranalli, P. et Sgorbati, S. 2003. Heavy metal tolerance and accumulation of Cd, Cr and Ni by *Cannabis sativa* L. *Plant and Soil*, 256: 243-252
- Clarke, R. et Watson, D. 2007. *Cannabis* and natural *Cannabis* medicines. Dans *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids* par ElSohly, M., Humana Press Inc, Totowa, New Jersey
- Close, D.C., McArthur, C., Pietrzykowski, E., Fitzgerald, H. et Paterson, S. 2004. Evaluating effects of nursery and post-planting nutrient regimes on leaf chemistry and browsing of eucalypt seedlings in plantations. *Forest Ecol. Manag.*, 200(1-3):101-112
- Cockson, P., Landis, H., Smith, T., Hicks, K. et Whipker, B. 2019. Characterization of nutrient disorders of *Cannabis sativa*. *Appl. Sci.*, 9: 4432
- Cockson, P., Schroeder-Moreno, M., Veazie, P., Barajas, G., Logan, D., Davis, M. et Whipker, B. 2020. Impact of phosphorus on *Cannabis sativa* reproduction, cannabinoids, and terpenes. *Appl. Sci.*, 10:7875
- Coffman, C. et Gentner, W. 1977. Responses of greenhouse-grown *Cannabis sativa* L. to nitrogen, phosphorus, and potassium. *Agronomy Journal*, 69: 832-836
- Dangi, S.P., Aryal, K., Magar, P., Bhattarai, S., Shrestha, D., Gyawali, S. et Basnet, M. 2019. Study on effect of phosphorus on growth and flowering of marigold (*Tagetes Erecta*). *JOJ Wildl. Biodivers.*, 1:5: 555571
- De Backer, B., Maebe, K., Verstraete, A. et Charlier, C. 2012. Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type *Cannabis* cuttings and seedlings during growth of plants. *J. Forensic Sci.*, 57: 4: 918-922
- Deschamps, T. 2020. Des producteurs de cannabis se tournent vers la culture en champ. *La Presse*. [en ligne]. <https://www.lapresse.ca/affaires/entreprises/2020-07-05/des-producteurs-de-Cannabis-se-tournent-vers-la-culture-en-champ.php><https://www.lapresse.ca/affaires/entreprises/2020-07-05/des-producteurs-de-Cannabis-se-tournent-vers-la-culture-en-champ.php>

[05/des-producteurs-de-Cannabis-se-tournent-vers-la-culture-en-champ.php](#) (consultée le 13 juillet 2020)

Dorais, M. 2020. Notes de cours dans *Cultures en serres* (PLG-3207). Département de phytologie, Université Laval

Eboh, L.O. et Thomas, B. 2005. Analysis of heavy metal content in cannabis leaf and seed cultivated in southern part of Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4:5:349-351

ElSohly, M., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S. et Church, J. C. 2016. Changes in *Cannabis* potency over the last 2 decades (1995-2014): Analysis of current data in the United States. *Biological Psychiatry*, 79:613-619

ElSohly, M.A., Radwan, M.M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A., 2017. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. Dans : *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*, (éds) Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J.i. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-36.

Evrendilek, G. 2015. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 202: 35-41

Fernandes, E., Passos, G., Medeiros, R., da Cunha, F., Ferreira, J., Campos, M., Pianowski, L. et Calixto, J. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, 569 : 228-236

Finnan, J. et Burke, B. 2013. Potassium fertilization of hemp (*Cannabis sativa*). *Industrial Crops and Products*, 41: 419-422

Fritschi, F. et Ray, J. 2007. Soybean leaf nitrogen, chlorophyll content, and chlorophyll *a/b* ratio. *Photosynthetica*, 45: 1: 92-98

Galic, M., Percin, A., Zgorelec, Z. et Kisic, I. 2019. Evaluation of heavy metals accumulation potential of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 20:2:700-711

Gershenson, J. 1994. Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20:6:1281-1328

Girdhar, M., Sharma, N., Rehman, H., Kumar, A. et Mohan, A. 2014. Comparative assessment for hyperaccumulatory and phytoremediation capacity of three wild weeds. *3 Biotech*, 4:549-589

Goulet, C. 2018. Notes de cours dans *Multiplication des végétaux* (PLG-2302). Département de phytologie, Université Laval.

Gouvernement du Canada. 2021. Loi sur le cannabis (L.C. 2018, ch. 16). [En ligne]. <https://laws-lois.justice.gc.ca/fra/lois/c-24.5/> (page consultée le 17 juillet 2021)

Grassmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R. et Elstner, E. F. 2005. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with alpha-tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine*, 12: 416-423

Hao, X. et Papadopoulos, A. P. 2002. Growth, photosynthesis and productivity of greenhouse tomato cultivated in open or closed rockwool systems. *Can. J. Plant Sci.*, 82: 771-780

Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Moller, I. et White, P. 2012. Functions of Macronutrients. Dans *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants 3rd Edition*, (éd) Marschner, P. Academic Press, 651 pages (135-189)

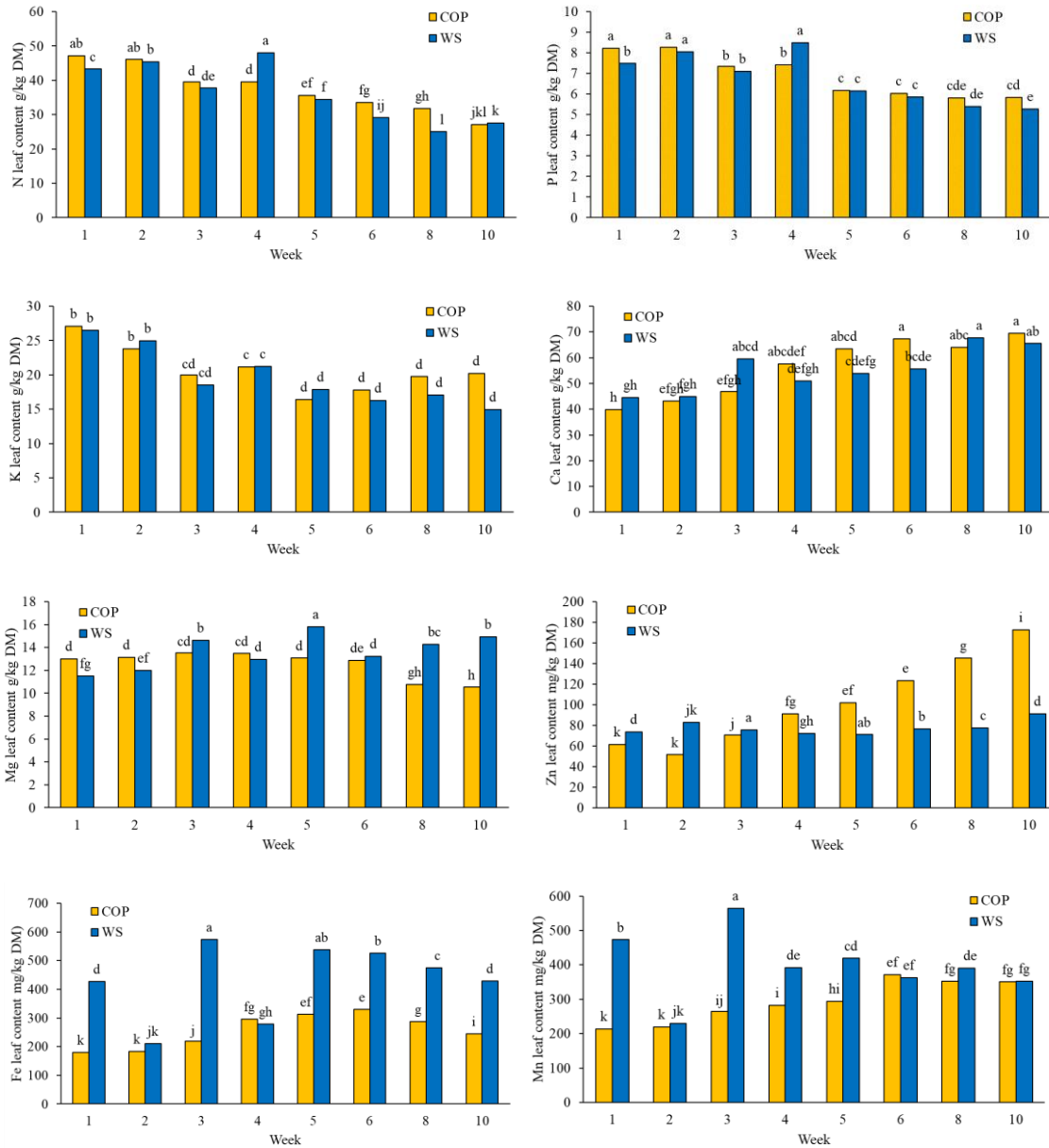
- Hikosaka, K. 2014. Optimal nitrogen distribution within a leaf canopy under direct and diffuse light. *Plant, Cell & Environment*, 37: 9: 2077-2085
- Hillig, K. W. 2005. Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 161-180
- Isaac, R. et Johnson, W. 1976. Determination of total nitrogen in plant tissue, using a block digester. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 59: 1: 98-100
- Ito, K. et Ito, M. 2013. The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure-activity relationships. *The Japanese Society of Pharmacognosy*, 67: 833-837
- Jiang, Z., Jacob, J., Loganathachetti, D., Nainangu, P. et Chen, B. 2017. B-Elemene : Mechanistic studies on cancer cell interaction and its chemosensitization effect. *Front. Pharmacol.*, 8: 105
- Jikomes, N. 2017. How Assess THC and CBD levels in cannabis strains and products. [En ligne] <https://www.leafly.com/news/science-tech/how-to-assess-thc-cbd-levels-in-cannabis-strains-products> (page consultée le 7 avril 2020)
- Kainulainen, P., Holopainen, J., Palomaki, V et Holopainen, T. 1996. Effects of nitrogen fertilization on secondary chemistry and ectomycorrhizal state of Scots pine seedlings and on growth of grey pine aphid. *J. Chem. Ecol.*, 22: 4: 617-636
- Kovalchuk, I., Pellino, M., Rigault, P., van Velzen, R., Ebersbach, J., Ashnest, J., Mau, M., Schranz, M., Alcorn, J., Laprairie, R., McKay, J., Burbridge, C., Schneider, D., Vergara, D., Kane, N. et Sharbel, T. 2020. The genomics of *Cannabis* and its close relatives. *Annual Review of Plant Biology*, 71: 20: 1-27
- Kumari, R. et Kumar, R. 2019. Aeroponics : A review on modern agriculture technology. *Indian Farmer*, 6: 4: 286-292
- Lakhiar, I., Gao, J., Syed, T., Chandio, F., Tunio, M., Ahmad, F. et Solangi, K. 2020. Overview of the aeroponic agriculture – An emerging technology for global food security. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, 13: 1: 1-10
- Lee, J., Rahman, A., Azam, H., Kim, H. et Kwon, M. 2017. Characterizing nutrient uptake kinetics for efficient crop production during *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* Alef. Growth in a closed indoor hydroponic system. *PLoS ONE*, 12: 5: e0177041
- Legault, J., Dahl, W., Bebiton, E., Pichette, A. et Madelmont, J.-C. 2002. Antitumor activity of *Balsam* fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. *Plant Medica*, 69: 5: 402-407
- Loka, D., Oosterhuis, D., Baxevanos, D., Vlachostergios, D. et Hu, W. 2018. How potassium deficiency alters flower bud retention on cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Agronomy and Soil Science*, 65: 4: 521-536
- Maathuis, F. JM. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 250-258.
- Malik, R., Husain, S. et Nazir. I. 2010. Heavy metal contamination and accumulation in soil and wild plant species from industrial area of Islamabad, Pakistan. *Park. J. Bot.*, 42: 1: 291-301
- Margui, E. et Hidalgo, Q. 2009. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *Trends in Analytical Chemistry*, 28: 3: 362-372
- Mattson, N. and Lietch, J. 2007. Modeling macronutrient absorption of hydroponically grown cut flower roses. *Acta. Hort.*, 751: 129-136

- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L. et Suzuki, A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105: 7: 1141-1167
- McCullough, D.G. et Kulman, H.M. 1991. Effects of nitrogen fertilization on young jack pine (*Pinus banksiana*) and on its suitability as a host of Jack pine budworm (*Choristoneura pinus pinus*) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. J. Forest Res.*, 21: 10: 1447-1458
- McPartland, J. M. et Guy, G. W. 2017. Models of *Cannabis* taxonomy, cultural bias, and conflicts between scientific and vernacular name. *The Botanical Review*, 83: 327-381
- Medeiros, R., Passos, G., Vitor, C., Koepp, J., Mazzuco, T., Pianowski, L., Campos, M. et Calixto, J. 2007. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, 151: 618-627
- Mihaliak, C.A., et Lincoln, D.E. 1985. Growth pattern and carbon allocation to volatile organic compounds. *Bioscience*, 47: 6: 373-383
- Mudge, E., Brown, P. et Murch, S. 2019. The terroir of cannabis: Terpene metabolomics as a tool to understand *Cannabis sativa* selections. *Plant Med*, 85: 781-796
- Muzika, R., Pregitzer, K. et Hanover, J. 1989. Changes in terpene production following nitrogen fertilization of grand fir (*Abies grandis* (Dougl.) Lindl.) seedlings. *Oecologia*, 80: 485-489
- Morales, P., Hurst, D. P. et Reggio, P. H. 2017. Molecular targets of the phytocannabinoids: A complex picture. Dans *Phytocannabinoids*, (éds) Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S. et Kobayashi, J.. Springer Nature, 131 pages (103-130)
- OCS. 2021. L'ABC du *Cannabis* : La plante de cannabis. [En ligne]. [La plante de Cannabis | Ontario Cannabis Store \(ocs.ca\)](https://www.ocs.ca/) (consultée le 17 juillet 2021)
- ONUDC. 2020. World Drug Report 2020. [En ligne]. <https://wdr.unodc.org/wdr2020/> (consultée le 9 octobre 2020)
- Osemwota, I., Omueti, J. et Ogboghodo, A. 2007. Effect of calcium/magnesium ratio in soil on magnesium availability, yield, and yield components of maize. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38 : 2849-2860
- Pichette, A., Larouche, P.-L., Lebrun, M. et Legault, J. 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil, *Phytotherapy Research*, 20: 5: 371-373
- Potter, D. 2009. The propagation, characterization, and optimization of *Cannabis sativa* L. as a phytopharmaceutical. Thèse de doctorat.
- Potter, D. 2014. *Cannabis* Horticulture. Dans *Handbook of Cannabis*, (éd) Pertwee. Oxford University Press, 785 pages (65-88)
- Potter, D. J., Clark, P. et Brown, M. B. 2008. Potency of Δ^9 -THC and other cannabinoids in *Cannabis* in England in 2005: Implications for psychoactivity and pharmacology, *Journal of Forensic Sciences*, 53: 1: 90-94
- Reidinger, S., Ramsey, M. et Hartley, S. 2012. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. *New Phytol.*, 195: 3: 699-706
- Ren, G., Zhang, X., Ridout, K., Serrano-Serrano, M., Yang, Y., Liu, A., Ravikanth, G., Nawaz, M., Mumtaz, A., Salamin, N. et Fumagalli, L. 2022. Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances*, 7: 1-12

- Ro, D.-K. 2011. Terpenoid Biosynthesis. Dans *Plant metabolism and biotechnology*, 1st Edition, edit. Ashihara, H., Crozier, A. C. et Komamine, A. John Wiley & Sons, 404 pages (217-240)
- Ropokis, A., Ntatsi, G., Kittas, C., Katsoulas, N. et Savvas, D. 2018. Impact of cultivar and grafting on nutrient and water uptake by sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) grown hydroponically under Mediterranean climatic conditions. *Front. Plant Sci.*, 9: 1244
- Ross, S. et ElSohly, M. 1996. The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 59: 49-51
- Russo, E. 2011. Taming THC : potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 163: 7: 1344-1364
- Sirikantaramas, S. et Taura, F. 2017. Cannabinoids: Biosynthesis and biotechnological applications. Dans *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, (éds) Chandra, S., Lata, H. et ElSohly, M. Springer Nature, 474 pages (183-206)
- Saloner, A. et Bernstein, N. 2021. Response of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) to nitrogen supply under long photoperiod. *Front. Plant Sci.*, 11: 572293
- Saloner, A., Sacks, M. et Bernstein, N. 2019. Response of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes to K supply under long photoperiod. *Front. Plant Sci.*, 10: 1369
- Santé Canada. 2016. Comprendre le nouveau Règlement sur l'accès au cannabis à des fins médicales. [En ligne]. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/medicaments-et-produits-sante/comprendre-nouveau-reglement-sur-acces-au-Cannabis-fins-medicales.html> (consultée le 7 février 2020)
- Santé Canada. 2017. Enquête canadienne sur le tabac, l'alcool et les drogues (ECTAD) : sommaire des résultats pour 2017. [En ligne]. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/enquete-canadienne-tabac-alcool-et-drogues/sommaire-2017.html#a3> (consultée le 5 février 2020)
- Sommano, S., Chittasupho, C. Ruksiriwanich, W. et Jantrawut, P. 2020. The cannabis terpenes. *Molecules*, 25: 5792
- Shiponi, S. et Bernstein, N. 2021. Response of medical cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes to P supply under long photoperiod: Functional phenotyping and the ionome. *Industrial Crop & Products*, 161: 113154
- Simakis, M. 2020. Indoors, greenhouses or outdoors: Where are cannabis cultivators growing? *Cannabis Business Times*. [En ligne]. <https://www.Cannabisbusinesstimes.com/article/Cannabis-cultivation-facility-trends-industry-research/> (page consultée le 24 juillet 2020)
- Statistiques Canada. 2019. Enquête nationale sur le cannabis, troisième trimestre de 2019. [En ligne]. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/191030/dq191030a-fra.htm> (consultée le 5 février 2020)
- Statistique Canada. 2020. Centre de statistique sur le cannabis. [En ligne]. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/13-610-x/Cannabis-fra.htm> (consultée le 2 octobre 2020)
- Sawler, J., Stout, J. M., Gardner, K. M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., Page, J. et Myles, S. 2015. The genetic structure of marijuana and hemp. *PLoS ONE*, 10: 8: 1-9
- Small, E. 2017. *Cannabis: A complete guide*. CRC Press, Boca Raton, FL. 597 pages
- Small, E. et Cronquist, A. 1976. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon*, 25: 4: 405-435

- Stout, J., Boubakir, Z., Ambrose, S., Purves, R. et Page, J. 2012. The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *The Plant Journal*, 71: 353-365
- Szcerba, M., Britto, D. et Kronzucker, H. 2008. K⁺ transport in plants: Physiology and molecular biology. *Journal of Plant Physiology*, 166: 447-466
- Tegeder, M. et Masclaux-Daubresse, C. 2017. Source and sink mechanisms of nitrogen transport and use. *New Phytologist*, 217: 35-53
- Thor, K. 2019. Calcium – Nutrient and Messenger. *Front. Plant Sci.*, 10 : 440
- Touliatos, D. Dodd, I. et McAinsh, M. 2016. Vertical farming increases lettuce yield per unit area compared to conventional horizontal hydroponics. *Food and Energy Security*, 5: 3: 184-191
- Turkez, H., Geyikoglu, F. et Cetin, D. 2015. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro. *Cytotechnology*, 67: 3: 409-418
- Vaclavik, L., Benes, F., Fenclova, M., Hricko, J., Krmela, A., Svobodova, V., Hajslova, J. et Mastovska, K. 2019. Quantitation of cannabinoids in *Cannabis* dried plant materials, concentrates, and oils using liquid chromatography-diode array detection technique with optimal mass spectrometry detection: single-laboratory validation study, first action 2018.11. *J. AOAC Int.*, 102: 6: 1822-1833
- Vera, C. L., Malhi, S. S., Phelps, S. M., May, W. E. et Johnson, E. N. 2009. N, P, and S fertilization effects on industrial hemp in Saskatchewan. *Can. J. Plant Sci.*, 90: 179-184
- Whipker, B., Cockson, P., Veazie, P., Logan, D. et Owen, W. 2021. How does your cannabis fertilizer recipe compare? *Cannabis Business Times*. [En ligne]. [Put Your Fertilizer Program to the Test - Cannabis Business Times](#) (consultée le 31 juillet 2021)
- White, P. 2012. Functions of Macronutrients. Dans *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants 3rd Edition*, (éd) Marschner, P. Academic Press, 651 pages (49-69)
- Xiao, K., Mao, X., Lin, Y., Xu, H., Zhu, Y., Cai, Q., Xie, H. et Zhang, J. (2017). Trichomes, a functional diversity phenotype in plant. *Mol Biol*, 6: 1
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., Peng, S. et Huang, J. 2015. SPAD-base leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific Reports*, 5: 13389
- Yep, B. et Zheng, Y. 2021. Potassium and micronutrient fertilizer addition in a mock aquaponic system for drug-type *Cannabis sativa* L. cultivation. *Can. J. Plant Sci.*, 101: 341-352
- Zuazo, V., Rodriguez, B., Ruiz, B., Sacristan, P., Tavira, S. et Garcia-Tejero, I. 2019. Response of essential-oil yield of aromatic and medicinal plants to different harvesting strategies. *Com. Sci.*, 10: 4: 429-437

Annexe 1



A1. 1 Accumulation of inorganic mineral in the leaves of two cultivars of *C. sativa* (WS and COP) taken weekly in the first 6 weeks and very two weeks afterwards until week 10 in vertical aeroponic towers (n=2). Different small letters represent significant differences between contents by LSD protected by Fisher (P<0.05).

Annexe 2

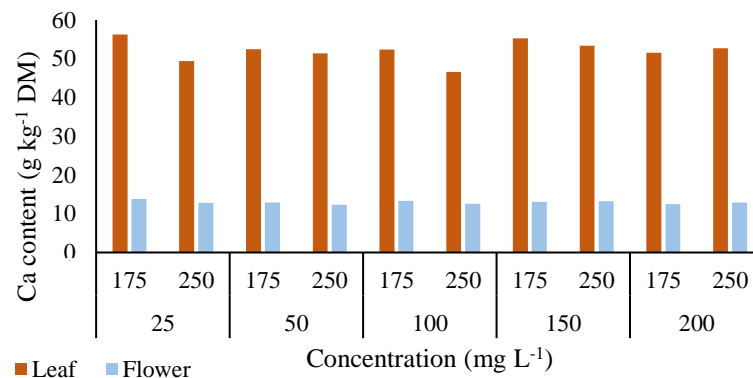
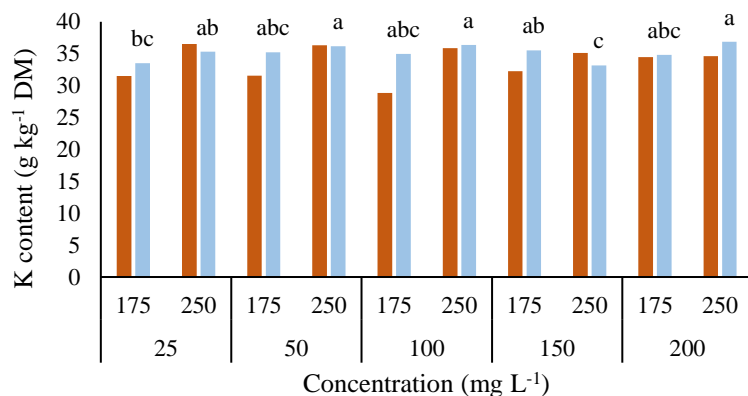
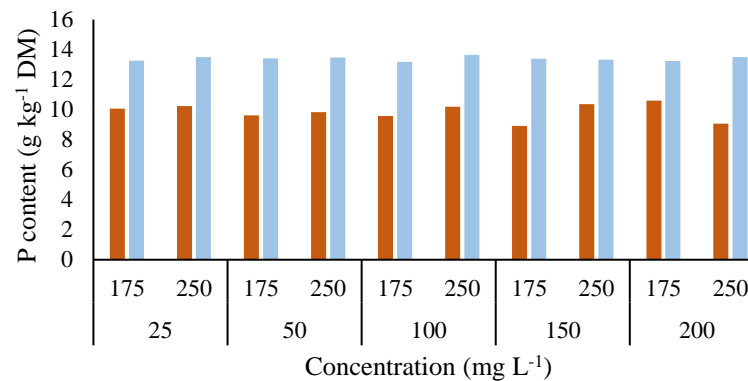
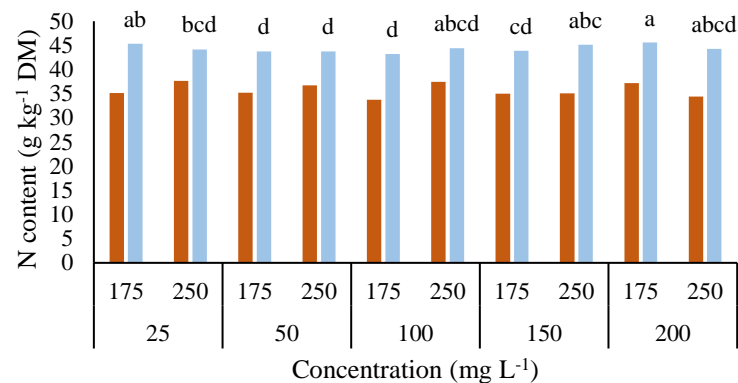
A2. 1 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on plant growth parameters of drug-type *C. sativa* White Shark at 25 days of growth (vegetative stage) in a deep-water system; variance analysis (data are means of n=4).

		Total biomass	Leaf biomass	Root biomass	Shoot biomass	Number of leaves	Leaf area
		(g DM plant ⁻¹)				(Nb plant ⁻¹)	(cm ³ plant ⁻¹)
P	25	6.42	3.87	1.09	1.47	55.3	1178
	50	6.93	4.16	1.28	1.50	53.8	1217
	100	5.89	3.74	0.89	1.27	48.0	1094
	150	6.12	3.79	0.98	1.36	52.0	1150
	200	7.03	4.27	1.20	1.56	54.6	1302
K	175	6.47	3.94	1.09	1.43	53.5	1182
	250	6.49	3.99	1.08	1.43	52.0	1194
25	175	5.76	3.49	0.99	1.29	54.3	1042
	250	7.09	4.26	1.19	1.64	56.3	1313
50	175	7.23	4.35	1.22	1.66	53.0	1324
	250	6.64	3.96	1.34	1.34	54.5	1110
100	175	6.29	3.96	0.95	1.38	53.5	1134
	250	5.50	3.52	0.83	1.16	42.5	1054
150	175	5.71	3.56	0.90	1.25	51.3	1094
	250	6.53	4.02	1.05	1.47	52.8	1205
200	175	7.36	4.37	1.39	1.60	55.3	1316
	250	6.71	4.18	1.00	1.53	54.0	1289
ANOVA							
P		0.698	0.847	0.311	0.714	0.484	0.791
K		0.968	0.911	0.941	0.962	0.604	0.910
P × K		0.711	0.768	0.561	0.543	0.541	0.667

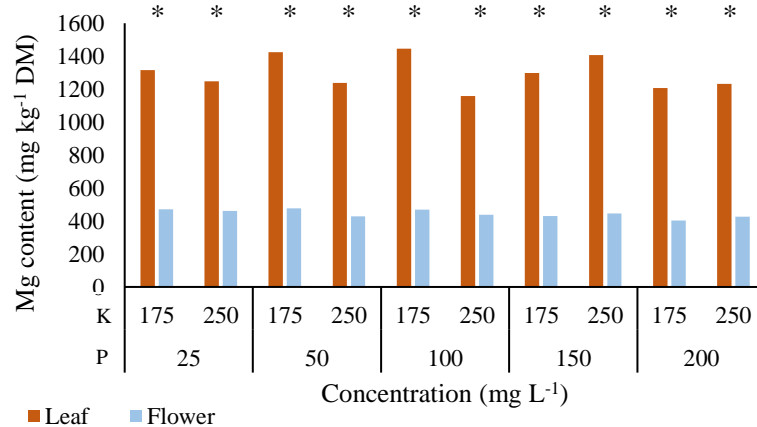
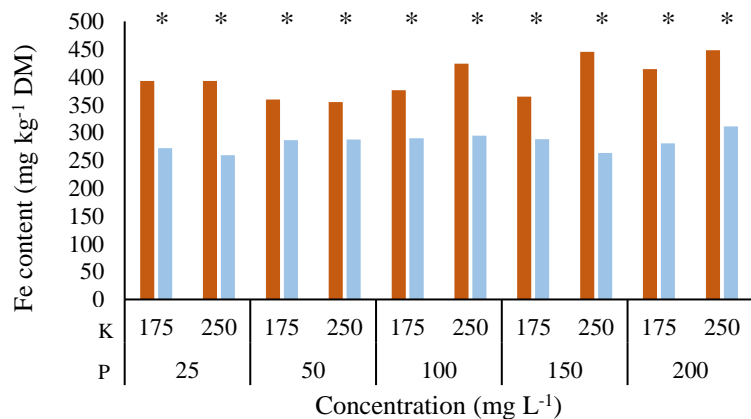
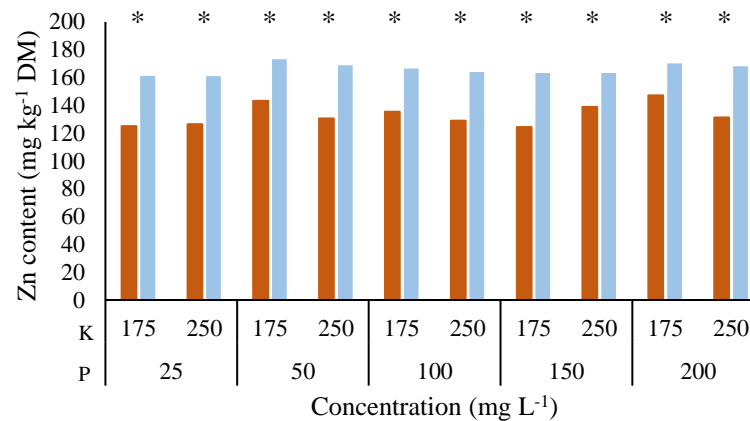
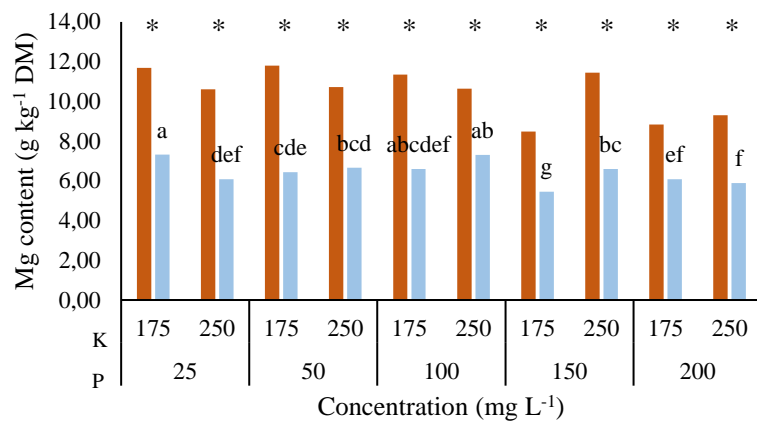
A2. 2 Effects of P (25, 50, 100, 150, and 200 mg L⁻¹) and K (175 and 250 mg L⁻¹) concentrations on the total biomass of *C. sativa* White Shark at the harvest after 80 days of growth (flowering stage) in a deep-water growing system (data are means of n=8).

P	K	Total biomass (g DM plant ⁻¹)	
25	175	168.4	ab ^z
	250	158.9	ab
50	175	164.9	ab
	250	151.0	b
100	175	144.4	b
	250	184.1	a
150	175	158.1	ab
	250	158.4	ab
200	175	150.8	ab
	250	165.6	ab

^zDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).



A2. 3 Comparison in the inorganic mineral content in the flowers and in the leaves of drug-type *C. sativa* WS plants grown in a deep-water system at the final destructive harvest at 80 days under different concentrations of P and K (n=7). Values with the same letter indicates significance while value with different letters indicate statistically significant results; * indicates that there is a significant difference between the content in the flowers and in the leaves.

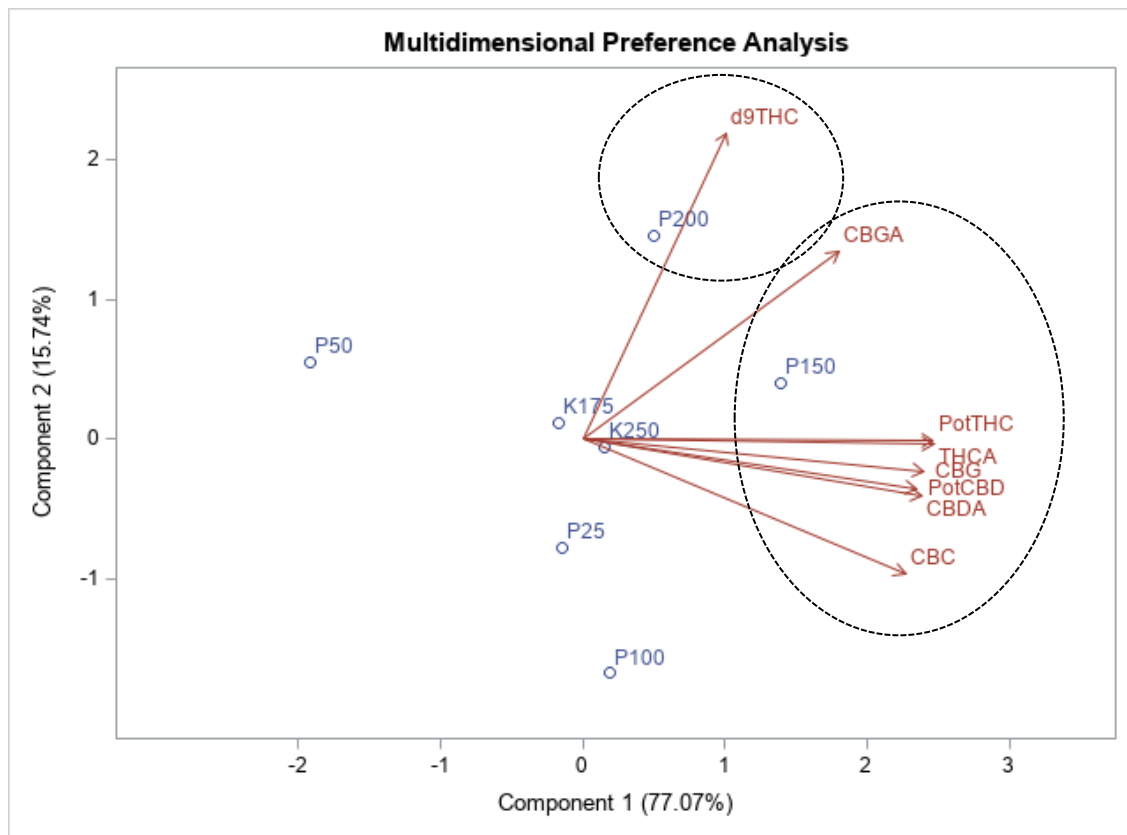


A2. 3 (Continued) Comparison in the inorganic mineral content in the flowers and in the leaves of drug-type *C. sativa* WS plants grown in a deep-water system at the final destructive harvest at 80 days under different concentrations of P and K (n=7). Values with the same letter indicates significance while value with different letters indicate statistically significant results; * indicates that there is a significant difference between the content in the flowers and in the leaves.

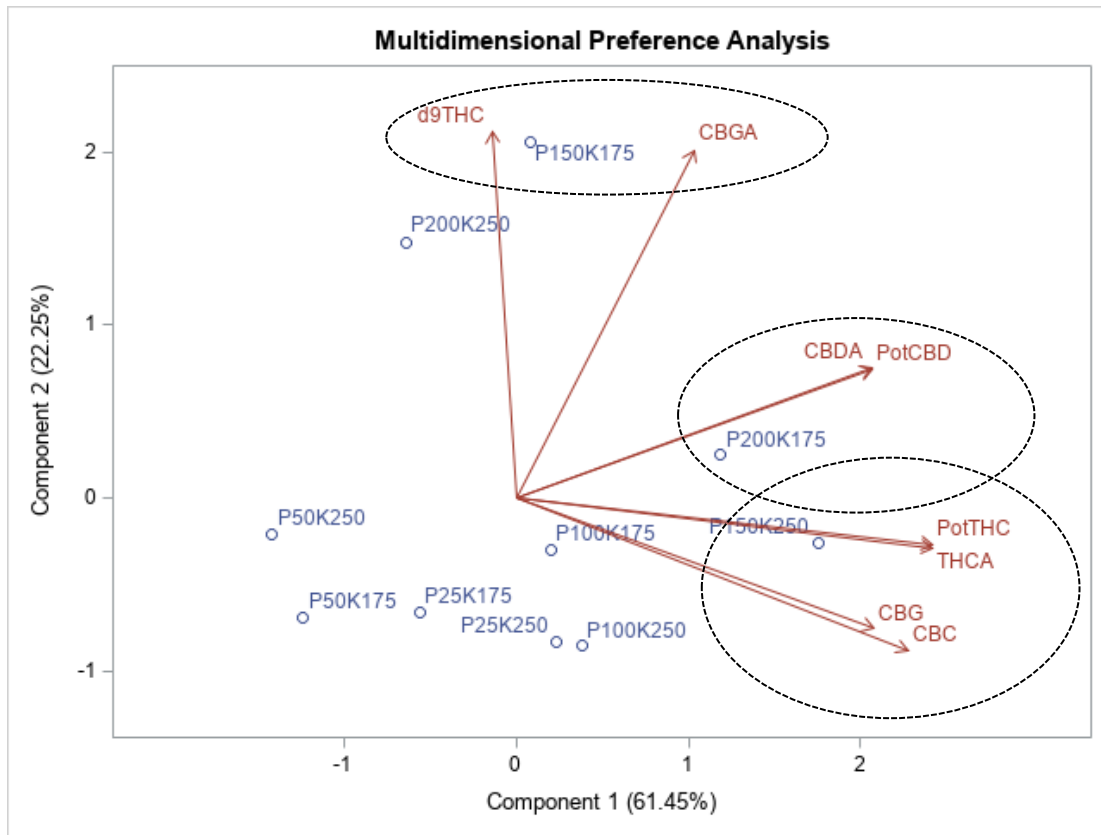
A2. 4 Single interaction between the K concentration in the nutrient solution of a deep-water growing system and the Ca leaf content of the White Shark genotype of *C. sativa* WS at 25 (vegetative phase) and 80 days (flowering stage) (data are means of n=4).

K concentration (mg L ⁻¹)	Ca leaf content (g kg ⁻¹)	
	25 days	80 days
150	40.0 a ^z	53.6 a
250	37.9 b	50.7 b
ANOVA		
K	0.002	0.040

^zDifferent small letters represent significant differences between treatments by LSD protected by Fisher (P<0.05).



A2. 5 Principal component analysis of the *C. sativa* flower potency based on the individual concentrations of P and K in a deep-water system.



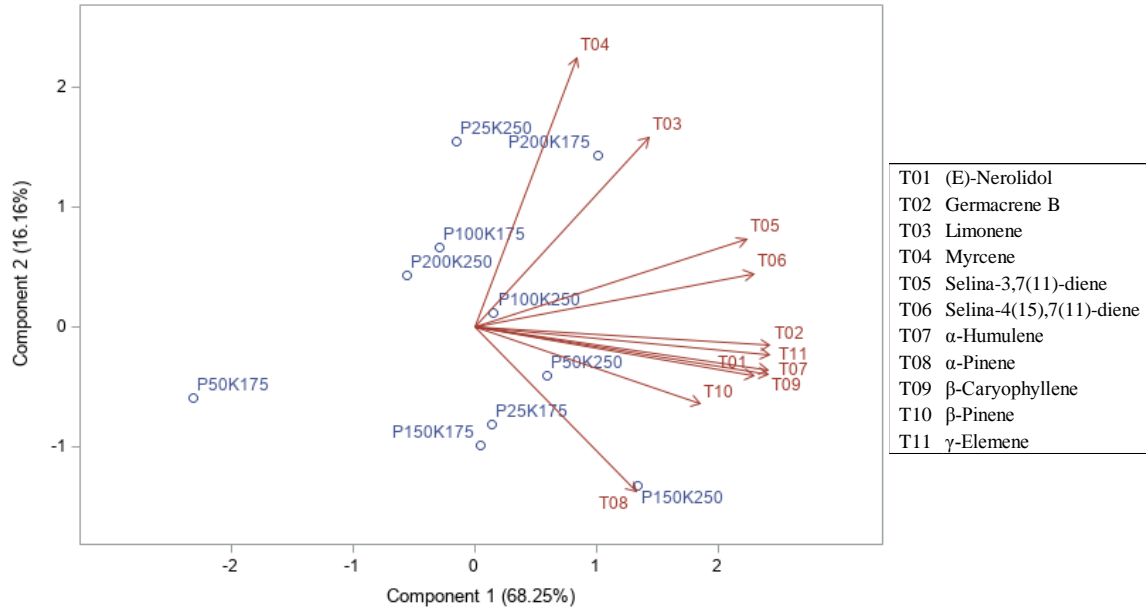
A2. 6 Principal component analysis of the *C. sativa* flower potency based on the P X K interaction in a deep-water system.

A2. 7 Average and standard deviation of the terpene flower content for *C. sativa* under different concentrations of P and K in a deep-water system.

P K	25		50		100		150		200	
	175	250	175	250	175	250	175	250	175	250
	(mg g ⁻¹ MS)									
Terpènes totaux	19.670 (0.972)	19.147 (1.708)	16.194 (1.181)	20.282 (1.353)	19.299 (0.564)	19.832 (0.62)	19.642 (1.564)	21.602 (1.797)	21.232 (2.488)	18.749 (1.27)
Sesquiterpènes	14.526 (1.049)	13.715 (1.102)	11.732 (0.812)	15.157 (1.075)	14.140 (0.377)	14.746 (0.157)	14.471 (0.713)	16.095 (1.131)	15.975 (1.807)	13.933 (0.812)
Monoterpènes	4.799 (0.315)	5.126 (0.606)	4.219 (0.334)	4.808 (0.406)	4.786 (0.501)	4.785 (0.446)	4.875 (0.881)	5.115 (0.763)	4.922 (0.753)	4.543 (0.426)
Diterpènes	0.261 (0.031)	0.193 (0.049)	0.155 (0.042)	0.240 (0.029)	0.244 (0.076)	0.203 (0.028)	0.208 (0.035)	0.264 (0.058)	0.249 (0.051)	0.188 (0.029)
Total terpènes > 0.05 mg g ⁻¹ MS	14.824 (0.771)	14.535 (1.388)	12.159 (1.043)	15.373 (1.153)	14.440 (0.547)	14.957 (0.638)	14.797 (1.365)	16.411 (1.464)	16.024 (1.916)	14.082 (1.123)
(3E,6E)- α -Farnesene	0.231 (0.022)	0.223 (0.023)	0.180 (0.013)	0.239 (0.024)	0.232 (0.011)	0.231 (0.005)	0.221 (0.015)	0.241 (0.02)	0.273 (0.046)	0.216 (0.02)
(3Z)-Caryophylla-3,8(13)-dien-5 β -ol	0.014 (0.001)	0.011 (0.004)	0.013 (0.001)	0.010 (0.002)	0.012 (0.002)	0.015 (0.001)	0.016 (0.002)	0.011 (0.002)	0.013 (0.003)	0.013 (0.003)
(E)-Nerolidol	0.492 (0.06)	0.420 (0.03)	0.372 (0.016)	0.505 (0.022)	0.453 (0.013)	0.493 (0.017)	0.469 (0.009)	0.517 (0.03)	0.509 (0.061)	0.462 (0.008)
(E)- α -Bisabolene	0.108 (0.007)	0.106 (0.003)	0.096 (0.009)	0.109 (0.009)	0.117 (0.005)	0.110 (0.001)	0.111 (0.011)	0.117 (0.008)	0.116 (0.017)	0.103 (0.003)
(E)- β -Farnesene	0.119 (0.008)	0.122 (0.004)	0.106 (0.006)	0.127 (0.015)	0.129 (0.005)	0.128 (0.005)	0.124 (0.011)	0.132 (0.013)	0.137 (0.023)	0.113 (0.003)
(E)- β -Ocimene	0.034 (0.005)	0.043 (0.006)	0.037 (0.006)	0.035 (0.004)	0.041 (0.008)	0.037 (0.008)	0.039 (0.011)	0.039 (0.009)	0.040 (0.01)	0.038 (0.009)
1,8-Cineole	0.024 (0.002)	0.031 (0.005)	0.035 (0.007)	0.028 (0.001)	0.032 (0.004)	0.025 (0.002)	0.033 (0.003)	0.027 (0)	0.028 (0.002)	0.030 (0.006)
10-epi- γ -Eudesmol	0.022 (0.002)	0.018 (0.005)	0.019 (0.002)	0.017 (0.003)	0.021 (0.003)	0.019 (0)	0.020 (0.01)	0.017 (0.003)	0.023 (0.007)	0.023 (0.005)
allo-Aromadendrene	0.017 (0.002)	0.021 (0.002)	0.019 (0.003)	0.021 (0.002)	0.022 (0.001)	0.017 (0.001)	0.020 (0.001)	0.019 (0.003)	0.016 (0.002)	0.021 (0.001)
Aromadendrane-4,10-diol	0.046 (0.005)	0.035 (0.002)	0.034 (0.003)	0.041 (0.008)	0.044 (0.006)	0.049 (0.008)	0.043 (0.005)	0.043 (0.004)	0.045 (0.006)	0.038 (0.006)
Borneol	0.067 (0.003)	0.062 (0.009)	0.051 (0.004)	0.069 (0.004)	0.064 (0.006)	0.067 (0.001)	0.068 (0.006)	0.070 (0.005)	0.073 (0.006)	0.064 (0.004)
Bulnesol	0.014 (0.012)	0.003 (0.003)	0.003 (0.003)	0.003 (0.003)	0.011 (0.007)	0.000 (0)	0.013 (0.008)	0.010 (0.01)	0.000 (0)	0.013 (0.009)
Camphene	0.057 (0.003)	0.060 (0.008)	0.050 (0.003)	0.060 (0.007)	0.052 (0.004)	0.056 (0.003)	0.056 (0.007)	0.060 (0.008)	0.056 (0.005)	0.051 (0.001)
Camphene hydrate	0.010 (0)	0.008 (0.001)	0.008 (0)	0.011 (0.001)	0.009 (0.001)	0.009 (0)	0.010 (0.001)	0.010 (0.001)	0.010 (0.001)	0.009 (0)
Caryophyllene oxide	0.090 (0.009)	0.070 (0.009)	0.075 (0.019)	0.077 (0.012)	0.082 (0.019)	0.087 (0.017)	0.084 (0.018)	0.077 (0.001)	0.078 (0.013)	0.078 (0.016)
cis-Pinene hydrate	0.031 (0.001)	0.028 (0.005)	0.025 (0.002)	0.034 (0.004)	0.030 (0.003)	0.031 (0.001)	0.031 (0.003)	0.032 (0.002)	0.033 (0.003)	0.029 (0.002)
cis-Sabinene hydrate	0.018 (0.002)	0.018 (0.001)	0.018 (0.002)	0.019 (0.001)	0.019 (0)	0.018 (0.001)	0.021 (0.002)	0.021 (0.001)	0.019 (0.001)	0.018 (0.002)
Citronellol	0.004 (0.001)	0.004 (0.002)	0.004 (0.002)	0.004 (0.001)	0.004 (0.001)	0.004 (0.001)	0.003 (0.001)	0.005 (0)	0.005 (0.001)	0.003 (0.002)
endo-Fenchol	0.192 (0.006)	0.181 (0.026)	0.142 (0.017)	0.130 (0.057)	0.176 (0.02)	0.185 (0.003)	0.187 (0.026)	0.193 (0.018)	0.204 (0.024)	0.177 (0.019)
Eremophila-1(10),7(11)-diene	0.252 (0.021)	0.248 (0.016)	0.208 (0.011)	0.265 (0.018)	0.245 (0.015)	0.255 (0.002)	0.256 (0.003)	0.273 (0.024)	0.288 (0.034)	0.252 (0.011)
Eudesma-5,7(11)-diene	0.156 (0.016)	0.146 (0.02)	0.129 (0.012)	0.158 (0.013)	0.151 (0.012)	0.160 (0.004)	0.152 (0.013)	0.170 (0.012)	0.169 (0.014)	0.149 (0.014)
Fenchone	0.023 (0.001)	0.025 (0.002)	0.023 (0.001)	0.024 (0.003)	0.022 (0.002)	0.024 (0)	0.020 (0.001)	0.022 (0.001)	0.026 (0.003)	0.022 (0.001)
Geraniol	0.005 (0.001)	0.005 (0.001)	0.002 (0.002)	0.005 (0)	0.004 (0.001)	0.005 (0)	0.005 (0.001)	0.004 (0.001)	0.005 (0.001)	0.005 (0)
Germacrene B	2.481 (0.267)	2.330 (0.248)	1.879 (0.166)	2.590 (0.2)	2.510 (0.071)	2.540 (0.051)	2.479 (0.256)	2.810 (0.137)	2.679 (0.24)	2.231 (0.181)
Guaiol	0.005 (0.001)	0.005 (0.001)	0.004 (0.002)	0.009 (0.004)	0.008 (0.004)	0.007 (0)	0.009 (0.003)	0.005 (0)	0.007 (0.001)	0.004 (0.001)
Hexanol	0.013 (0.001)	0.009 (0.001)	0.012 (0.002)	0.012 (0.001)	0.012 (0.001)	0.011 (0.002)	0.012 (0.001)	0.013 (0)	0.011 (0.002)	0.012 (0.001)
Hexyl hexanoate	0.010 (0.001)	0.009 (0.001)	0.007 (0.001)	0.009 (0.002)	0.010 (0.001)	0.010 (0)	0.009 (0.002)	0.011 (0.001)	0.010 (0.002)	0.008 (0.001)
Humulene epoxide II	0.022 (0.003)	0.019 (0.001)	0.020 (0.004)	0.019 (0.002)	0.021 (0.004)	0.024 (0.004)	0.022 (0.004)	0.021 (0.001)	0.021 (0.003)	0.021 (0.003)
Ipsdienol	0.010 (0.001)	0.009 (0.001)	0.007 (0.002)	0.010 (0.001)	0.010 (0.001)	0.010 (0.001)	0.008 (0.001)	0.009 (0.001)	0.011 (0.002)	0.009 (0.002)
Juniper camphor	0.206 (0.02)	0.184 (0.012)	0.162 (0.008)	0.212 (0.013)	0.192 (0.009)	0.205 (0.007)	0.202 (0.008)	0.221 (0.017)	0.230 (0.018)	0.200 (0.003)
Limonene	0.450 (0.032)	0.533 (0.071)	0.407 (0.06)	0.473 (0.056)	0.486 (0.071)	0.462 (0.065)	0.469 (0.122)	0.472 (0.096)	0.496 (0.122)	0.450 (0.088)
Linalool	0.006 (0.001)	0.005 (0)	0.008 (0.002)	0.004 (0.001)	0.005 (0.001)	0.006 (0)	0.005 (0)	0.006 (0.001)	0.007 (0.001)	0.005 (0.001)
meta-Camphorene	0.008 (0)	0.005 (0.001)	0.004 (0.002)	0.007 (0.001)	0.005 (0.001)	0.007 (0.002)	0.002 (0.001)	0.009 (0.001)	0.009 (0.002)	0.004 (0.002)

A2. 7 (Continued) Average and standard deviation of the terpene flower content for *C. sativa* under different concentrations of P and K in a deep-water system.

P K	25		50		100		150		200	
	175	250	175	250	175	250	175	250	175	250
	(mg g ⁻¹ MS)									
Myrcene	1.118 (0.038)	1.365 (0.263)	1.043 (0.251)	1.133 (0.144)	1.241 (0.206)	1.210 (0.261)	1.074 (0.276)	1.134 (0.255)	1.305 (0.397)	1.166 (0.319)
Phytol	0.253 (0.032)	0.188 (0.048)	0.151 (0.04)	0.233 (0.03)	0.239 (0.076)	0.196 (0.029)	0.205 (0.034)	0.255 (0.058)	0.239 (0.051)	0.184 (0.027)
Sabinene	0.008 (0)	0.008 (0)	0.008 (0)	0.008 (0)	0.008 (0)	0.008 (0.001)	0.007 (0)	0.007 (0)	0.009 (0)	0.008 (0)
Selin-6-en-4 α -ol	0.127 (0.014)	0.114 (0.013)	0.097 (0.003)	0.134 (0.004)	0.123 (0.005)	0.128 (0.006)	0.126 (0.009)	0.145 (0.005)	0.126 (0.005)	0.109 (0.005)
Selin-6-en-4 α -ol isomer	0.112 (0.009)	0.103 (0.005)	0.093 (0.002)	0.116 (0.005)	0.111 (0.003)	0.113 (0.001)	0.116 (0.001)	0.123 (0.005)	0.122 (0.01)	0.112 (0.004)
Selina-3,7(11)-diene	1.685 (0.198)	1.701 (0.106)	1.434 (0.105)	1.809 (0.158)	1.653 (0.136)	1.720 (0.019)	1.714 (0.039)	1.782 (0.226)	1.946 (0.256)	1.726 (0.085)
Selina-4(15),7(11)-diene	1.269 (0.127)	1.219 (0.074)	1.030 (0.066)	1.329 (0.123)	1.204 (0.1)	1.265 (0.013)	1.239 (0.054)	1.369 (0.148)	1.470 (0.191)	1.275 (0.083)
Spirovetiva-1(10),7(11)-diene	0.176 (0.02)	0.171 (0.017)	0.155 (0.012)	0.187 (0.021)	0.177 (0.011)	0.184 (0.001)	0.178 (0.012)	0.196 (0.019)	0.195 (0.014)	0.176 (0.016)
Terpinolene	0.012 (0.001)	0.015 (0.001)	0.013 (0)	0.013 (0.001)	0.013 (0.001)	0.014 (0.001)	0.011 (0)	0.012 (0.001)	0.014 (0.001)	0.011 (0.001)
trans-Pinene hydrate	0.146 (0.005)	0.138 (0.02)	0.107 (0.013)	0.148 (0.015)	0.133 (0.014)	0.143 (0.002)	0.141 (0.019)	0.148 (0.012)	0.156 (0.018)	0.134 (0.014)
trans-Sabinene hydrate	0.007 (0)	0.006 (0)	0.006 (0)	0.006 (0)	0.006 (0)	0.007 (0)	0.006 (0)	0.008 (0)	0.007 (0)	0.006 (0.001)
trans- α -Bergamotene	0.070 (0.002)	0.075 (0.002)	0.070 (0.008)	0.078 (0.005)	0.076 (0.007)	0.075 (0.004)	0.071 (0.005)	0.079 (0.007)	0.076 (0.011)	0.067 (0.001)
Inconnu 1	0.098 (0.008)	0.095 (0.003)	0.083 (0.004)	0.102 (0.007)	0.092 (0.007)	0.097 (0.002)	0.097 (0.004)	0.105 (0.01)	0.110 (0.011)	0.099 (0.003)
Inconnu 2	0.274 (0.016)	0.292 (0.004)	0.239 (0.005)	0.280 (0.016)	0.304 (0.03)	0.296 (0.022)	0.274 (0.009)	0.333 (0.033)	0.315 (0.058)	0.270 (0.015)
Inconnu 3	0.667 (0.045)	0.625 (0.092)	0.534 (0.071)	0.727 (0.081)	0.620 (0.042)	0.713 (0.065)	0.706 (0.053)	0.902 (0.102)	0.876 (0.155)	0.664 (0.063)
Valencene	0.028 (0.014)	0.120 (0.034)	0.114 (0.005)	0.021 (0.016)	0.128 (0.04)	0.109 (0.026)	0.092 (0.042)	0.038 (0.019)	0.074 (0.03)	0.086 (0.039)
α -Bisabolol	0.349 (0.012)	0.312 (0.02)	0.280 (0.026)	0.340 (0.012)	0.344 (0.018)	0.349 (0.009)	0.348 (0.026)	0.376 (0.013)	0.353 (0.03)	0.341 (0.032)
α -Cubebene	0.012 (0)	0.012 (0.001)	0.010 (0.001)	0.012 (0.001)	0.012 (0.001)	0.013 (0)	0.012 (0.001)	0.013 (0.001)	0.013 (0.001)	0.012 (0)
α -Eudesmol	0.104 (0.005)	0.065 (0.02)	0.073 (0.004)	0.098 (0.009)	0.085 (0.006)	0.095 (0.011)	0.093 (0.009)	0.097 (0.006)	0.105 (0.019)	0.095 (0.003)
α -Guaiene	0.070 (0.002)	0.075 (0.002)	0.070 (0.008)	0.078 (0.005)	0.076 (0.007)	0.075 (0.004)	0.071 (0.005)	0.079 (0.007)	0.076 (0.011)	0.067 (0.001)
α -Humulene	0.715 (0.049)	0.651 (0.058)	0.570 (0.055)	0.734 (0.055)	0.659 (0.018)	0.710 (0.026)	0.685 (0.049)	0.789 (0.069)	0.760 (0.093)	0.669 (0.058)
α -Pinene	1.535 (0.204)	1.555 (0.136)	1.372 (0.052)	1.540 (0.169)	1.454 (0.123)	1.453 (0.083)	1.651 (0.315)	1.736 (0.248)	1.375 (0.125)	1.352 (0.139)
α -Santalene	0.010 (0)	0.015 (0.004)	0.015 (0.004)	0.015 (0.003)	0.013 (0.004)	0.011 (0)	0.011 (0.001)	0.011 (0.001)	0.011 (0.002)	0.011 (0.001)
α -Selinene	0.351 (0.039)	0.306 (0.022)	0.291 (0.014)	0.421 (0.03)	0.316 (0.016)	0.329 (0.01)	0.377 (0.045)	0.389 (0.064)	0.355 (0.049)	0.369 (0.056)
α -Terpinene	0.005 (0)	0.007 (0.001)	0.005 (0.002)	0.005 (0.001)	0.006 (0.001)	0.006 (0.001)	0.005 (0)	0.005 (0.001)	0.006 (0)	0.005 (0.001)
α -Terpineol	0.154 (0.006)	0.143 (0.023)	0.112 (0.015)	0.160 (0.015)	0.145 (0.015)	0.154 (0.001)	0.150 (0.018)	0.159 (0.013)	0.169 (0.021)	0.142 (0.015)
α -Ylangene	0.025 (0.002)	0.023 (0.001)	0.022 (0.001)	0.025 (0.002)	0.025 (0.001)	0.025 (0)	0.025 (0)	0.027 (0.002)	0.028 (0.003)	0.024 (0.001)
β -Bisabolene	0.089 (0.005)	0.087 (0.005)	0.078 (0.007)	0.089 (0.009)	0.097 (0.005)	0.094 (0.003)	0.093 (0.01)	0.099 (0.009)	0.096 (0.015)	0.086 (0.003)
β -Caryophyllene	2.714 (0.175)	2.494 (0.207)	2.172 (0.219)	2.799 (0.208)	2.492 (0.068)	2.696 (0.105)	2.597 (0.207)	3.002 (0.267)	2.857 (0.347)	2.547 (0.233)
β -Eudesmol	0.047 (0.004)	0.057 (0.013)	0.034 (0.002)	0.045 (0.004)	0.039 (0.004)	0.046 (0.003)	0.043 (0.004)	0.047 (0.004)	0.050 (0.006)	0.043 (0.002)
β -Phellandrene	0.025 (0.001)	0.028 (0.004)	0.021 (0.005)	0.027 (0.003)	0.026 (0.003)	0.025 (0.004)	0.022 (0.003)	0.024 (0.005)	0.026 (0.008)	0.024 (0.006)
β -Pinene	0.626 (0.047)	0.642 (0.066)	0.534 (0.021)	0.625 (0.054)	0.586 (0.055)	0.597 (0.037)	0.626 (0.107)	0.669 (0.096)	0.585 (0.06)	0.561 (0.024)
β -Selinene	0.367 (0.038)	0.357 (0.016)	0.309 (0.007)	0.387 (0.029)	0.377 (0.011)	0.379 (0.02)	0.357 (0.018)	0.422 (0.028)	0.407 (0.064)	0.350 (0.021)
γ -Elemene	1.073 (0.117)	1.000 (0.123)	0.814 (0.087)	1.108 (0.094)	1.082 (0.063)	1.097 (0.052)	1.089 (0.122)	1.230 (0.086)	1.166 (0.104)	0.978 (0.098)
γ -Eudesmol	0.027 (0.003)	0.022 (0.001)	0.020 (0.003)	0.024 (0.002)	0.022 (0.003)	0.022 (0.002)	0.023 (0.004)	0.025 (0.002)	0.028 (0.006)	0.023 (0.001)
γ -Terpinene	0.007 (0)	0.007 (0)	0.007 (0)	0.007 (0)	0.007 (0.001)	0.007 (0)	0.006 (0)	0.006 (0)	0.007 (0)	0.006 (0)
δ -Guaiene	0.081 (0.006)	0.056 (0.015)	0.051 (0.013)	0.081 (0.003)	0.078 (0.003)	0.062 (0.017)	0.078 (0.001)	0.079 (0.006)	0.072 (0.025)	0.078 (0.004)



A2. 8 Principal component analysis on the correlation between the terpenes with a concentration over 0.50 mg/g identified in the flowers of *C. sativa* with the treatments.