

УДК 635.522 : 631.52+577.17

© 2010

Мищенко С.В., Лайко І.М., кандидати сільськогосподарських наук
 Інститут луб'яних культур НААН України

ОСОБЛИВОСТІ НАКОПИЧЕННЯ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК РОСЛИНАМИ КОНОПЕЛЬ ЗА РІЗНИХ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ НА ПРИКЛАДІ СУЧАСНОГО БЕЗНАРКОТИЧНОГО СОРТУ

Рецензент – доктор сільськогосподарських наук, професор Л.М. Горшкова

Встановлено рівень накопичення основних канабіноїдних сполук рослинами конопель сучасного безнаркотичного сорту Глухівські 58 від фази бутонізації до біологічної стиглості, вирощеними у природних умовах (на ізольованому розсаднику) і вегетаційному будинку, та кореляційні зв'язки між ними. Зроблено висновок, що гібридизація рослин конопель із показниками 0 балів усіх трьох компонентів канабіноїдів у вегетаційному будинку є гарантом повної відсутності цих речовин у більшості особин потомства, оскільки в природних умовах канабіноїди накопичуються менш інтенсивно, ніж у штучно створених.

Ключові слова: коноплі, канабідіол, тетрагідроканабінол, канабінол, бутонізація, біологічна стиглість.

Постановка проблеми. Коноплі посівні (*Cannabis sativa L.*) мають велике народногосподарське значення. Зокрема, їх вирощують для одержання волокна і насіння, з яких виготовляють широкий асортимент продукції. Однак масове вирощування даної культури сільськогосподарськими підприємствами дещо обмежено через наявність у конопель специфічних речовин – канабіноїдів.

У 30-ті роки минулого століття були описані способи виділення трьох індивідуальних сполук: канабінолу (КБН), канабідіолу (КБД) і тетрагідроканабінолу (ТГК), а також вперше наведені їх правильні сумарні формули. Природа цих речовин була встановлена у великій серії робіт таких відомих хіміків, як Адамс (США) і Тодд (Англія). Вони ж здійснили й перші синтези канабіноїдів [8].

Згодом у екстрактах конопель виявили ще декілька індивідуальних сполук. Усі вони виявилися похідними дифенілу, що містили в одному з циклів два фенольних гідроксили і радикал C_5H_{11} (амілрезорцин) [8].

Так, В.Г. Лазурьевский, Л.А. Николаева наводять формули дев'яти фенольних сполук, виділених із конопель, будова яких доведена з повною достовірністю, а саме: з радикалом $R=H$ –

канабінол ($C_{21}H_{26}O_2$; $T_{пл.} = 75-76$ °С), канабідіол ($C_{21}H_{30}O_2$; $T_{пл.} = 66-67$ °С; $[\alpha]_D -123^\circ, -174^\circ$), тетрагідроканабінол ($C_{21}H_{30}O_2$; масло $[\alpha]_D -120^\circ, -263^\circ$), канабігерол ($C_{21}H_{32}O_2$; $T_{пл.} = 51-53$ °С); із радикалом $R=COOH$ – канабінолова кислота ($C_{22}H_{26}O_4$), канабідіолова кислота ($C_{22}H_{30}O_4$), тетрагідроканабінолова кислота ($C_{22}H_{30}O_4$; $[\alpha]_D -206,8^\circ$), канабігеролова кислота ($C_{22}H_{32}O_4$), канабіхромен ($C_{21}H_{30}O_2$; $T_{пл.} = 144-146$ °С) [8]. Серед сполук конопель також описані канабіциклон і тетрагідроканабідіварол [8].

Усі канабіноїди з хімічної точки зору мають споріднену будову й належать до однієї групи природних фенолів. У рослинному матеріалі конопель, зазвичай, переважають три речовини – КБД, ТГК, КБН та деякі їх кислотні похідні. Решта канабіноїдів міститься в мінорних і слідових кількостях [8].

Із усіх фенольних компонентів конопель лише КБН відрізняється хімічною стійкістю і порівняно легко виділяється у кристалічному стані, що пояснюється його повною ароматичністю і відсутністю ізомерів. Доведено, що за певних фізико-хімічних умов відбувається перехід КБД у ТГК і навпаки [8]. Для ТГК описані також багатоваріантні синтези структурних, геометричних і просторових ізомерів. Із усіх відомих канабіноїдів лише ізомери ТГК відрізняються високою психотоміметичною активністю. Решта компонентів фактично не є наркотиками, хоча розглядаються як біогенні попередники або як потенційні їх джерела [8]. На відміну ТГК, КБД властиві виражені седативні та психолітичні властивості. Таким чином, КБД є антагоністом психотропності ТГК. Психотипи або хемотипи конопель можна поділяти за домінуючим вмістом у рослині одного з канабіноїдів чи їх співвідношенням – КБД/ТГК. Сорти промислових конопель мають вказане співвідношення від 2 до 17 [2]. Побутує думка, що селекція на підвищення числових показників відношення КБД/ТГК ефективна у зниженні психотропності конопель [2, 12].

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. Із 70-х років ХХ століття селекційно-генетична робота поступово була переорієнтована на створення однодомних високопродуктивних сортів і гібридів із пониженим вмістом канабіноїдів. Приступаючи до такої селекційної роботи, майже не були виявлені сорти і зразки зі світової колекції конопель із повною відсутністю канабіноїдів [1, 3, 6]. Водночас багатьма дослідниками було встановлено, що у рослинах конопель, співвідношенні їх окремих компонентів немає постійності: ці величини залежать від генотипу рослин (сортів) та еколого-кліматичних умов зростання, а також строків, способів збору зразків і умов їх зберігання [4, 6-8]. Зокрема, Н.С. Захарова встановила, що вміст ТГК у рослинах конопель залежить від місця зростання, а саме: збільшується у напрямі з північного заходу на південний схід; відносно високі температури повітря і недостатнє зволоження ґрунту у період вегетації рослин сприяють вищому накопиченню ТГК [6].

Завдяки використанню класичних методів селекції (гібридизації і добору), оригінальних прийомів і методик визначення вмісту канабіноїдних сполук у рослинному матеріалі, пошуковим генетичним дослідженням (щодо успадкування вмісту канабіноїдів) науковцями Інституту луб'яних культур УААН були створені високопродуктивні сорти однодомних конопель без наркотичних властивостей [10]. Даній проблематиці присвятили окремі дисертації і монографії такі вчені, як В.Г. Вировець [1], Л.М. Горшкова [4], Т.И. Сухорада [11]. На сьогодні всі сорти, які вирощуються в Інституті луб'яних культур НААН України, є безнаркотичними або з повною відсутністю тетрагідроканабінолу. При цьому селекційна робота щодо відсутності канабіноїдів не послаблюється.

Мета і завдання досліджень – встановити рівень накопичення основних канабіноїдних сполук рослинами конопель сучасного безнаркотичного сорту від фази бутонізації до біологічної стиглості, вирощених у природних умовах (на ізолюваному розсаднику) і вегетаційному будинку, а також взаємозв'язки між ними. Актуальність дослідження викликана необхідністю розробки критеріїв підбору батьківських форм для гібридизації у напрямі зменшення канабіноїдних сполук саме в умовах вегетаційного будинку, де протягом останніх п'яти років здійснюється вся робота зі створення вихідного матеріалу. Останнє обумовлене тим, що гібридизація на рівні окремих елітних рослин однодомної фемінізова-

ної матірки з використанням комбінованих (тканинно-плівкових) ізоляторів в умовах вегетаційного будинку є ефективним методом при створенні сортів, стабільних за ознакою однодомності і з високими показниками продуктивності. Крім того, залишається недослідженою динаміка накопичення специфічних речовин конопель рослинами сучасних безнаркотичних сортів.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводилися на базі Інституту луб'яних культур НААН України (м. Глухів Сумської обл., географічні координати місцевості – 51°39' північної широти і 33°59' східної довготи) у 2008-2010 роках. Об'єктом досліджень слугував сучасний безнаркотичний сорт однодомних конопель Глухівські 58 (автори – В.Г. Вировець, І.М. Лайко, Г.І. Кириченко, І.І. Щербань), створений у результаті добору рослин із сорту ЮСО-31 зі зближеними строками зацвітання чоловічих та жіночих квіток у суцвітті для стабілізації ознаки однодомності в потомстві та відсутністю канабіноїдних сполук. Зразки для аналізу відбирали у дві фенологічні фази – бутонізацію (до цвітіння) та біологічну стиглість – з ізолюваного розсадника досліджуваного сорту та вегетаційного будинку. Визначення вмісту канабіноїдних речовин проводили загальноприйнятим методом тонкошарової хроматографії [9], статистичну обробку даних – за методикою польового дослідження [5]. Вміст КБД, ТГК, КБН визначали у балах: від 0 до 10, порівнюючи з еталоном-свідком зі встановленим вмістом канабіноїдних сполук на рівні 3 балів. Це є напівкількісним способом визначення канабіноїдів, і, навіть, 10 балів – це вміст канабіноїдів, який перебуває у межах дозволеної законодавством норми 0,15% ТГК. Погодні умови 2008 і 2009 років під час вегетації конопель були різними, що дозволило об'єктивно оцінити матеріал.

Результати досліджень. У результаті проведених досліджень вдалося прослідкувати рівень накопичення основних канабіноїдних сполук рослинами від фази бутонізації до біологічної стиглості у природних умовах і вегетаційному будинку та взаємозв'язок між ними. На прикладі сучасного сорту конопель встановлено, зокрема, що у рослин, вирощених у природних умовах, вміст КБД зростає з фази бутонізації до біологічної стиглості у 1,2 разу (з 0,62 бала до 0,74 бала), вміст ТГК – у 1,5 разу (з 0,35 бала до 0,54 бала), вміст КБН – у 1,3 разу (з 0,72 бала до 0,96 бала), проте не на достовірному рівні. Для рослин, вирощених у вегетаційному будинку, характерна протилежна особливість. Так, вміст КБД збільшується з фази бутонізації до біологічної

стигlostі у 1,8 разу (з 0,64 бала до 1,14 бала), ТГК – у 4,9 разу (з 0,27 бала до 1,32 бала), КБН – у 2,8 разу (з 0,54 бала до 1,50 бала). У останніх двох сполук різниця між вказаними показниками є достовірною (табл. 1).

Наведені результати свідчать, що накопичення канабіноїдів протягом вегетаційного періоду відбувається інтенсивніше у штучно створених умовах для вирощування культури – вегетаційному будинку. У природних умовах вміст канабіноїдів у рослин конопель з фази бутонізації до біологічної стигlostі фактично не змінюється.

Розподіл рослин досліджуваного сорту конопель за такими 4 умовними класами канабіноїдних сполук, як “0 балів”, “слабкі сліди та сліди”, “1-5 балів”, “6-10 балів”, показав наступне (табл. 2).

Як і в природних умовах, так і у вегетаційному будинку, спостерігається поступове накопичення канабіноїдів і збільшення кількості рослин із вмістом КБД, ТГК, КБН 6-10 балів, тобто, якщо у фазу бутонізації у рослинному організмі була певна кількість канабіноїдних сполук, то вони продовжують накопичуватись у процесі онтогенезу. При цьому кількість рослин із повною відсутністю ТГК і КБН залишається на високому

рівні. Останнє твердження характерне, зокрема, для ТГК. Так, серед рослин, вирощених у природних умовах, було 75,5% особин із відсутністю ТГК у фазі бутонізації і 75,8% (на 0,3%, навіть, більше) із даним проявом ознаки у фазі біологічної стигlostі. Серед рослин, вирощених у вегетаційному будинку, виявлено 71,9% особин із відсутністю ТГК у фазі бутонізації і 58,6% – у фазі біологічної стигlostі. Кількість рослин з відсутністю КБД у процесі їх розвитку зменшується істотно у штучних умовах (з 44,6% до 22,8%), а рослин із відсутністю КБН збільшується незалежно від місця зростання, що є наслідком перетворення одних канабіноїдних речовин в інші.

Таким чином, рання діагностика рослин (до цвітіння) методом тонкошарової хроматографії й, відповідно, вибравка небажаних особин як на селекційних розсадниках, так і у вегетаційному будинку, є ефективною, оскільки існує значна ймовірність, що рослини з відсутністю канабіноїдів збережуть таку властивість до фази біологічної стигlostі й кінця вегетації; у незначного ж відсотка рослин із нульовими показниками будуть виявлені лише слабкі сліди та сліди даних сполук.

1. Рівень накопичення канабіноїдних сполук рослинами сорту конопель Глухівські 58 із фази бутонізації до біологічної стигlostі за різних умов вирощування (середнє за 2008-2009 рр.)

Фаза розвитку рослин	К-сть рослин, шт.	Вміст канабіноїдів, балів		
		КБД	ТГК	КБН
		$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$
У природних умовах (ізолюваний розсадник)				
Бутонізація	179	0,62 ± 0,13	0,35 ± 0,11	0,72 ± 0,20
Біол. стигlostь	166	0,74 ± 0,16	0,54 ± 0,16	0,96 ± 0,26
В умовах вегетаційного будинку				
Бутонізація	319	0,64 ± 0,44	0,27 ± 0,06	0,54 ± 0,10
Біол. стигlostь	236	1,14 ± 0,16	1,32 ± 0,26***	1,50 ± 0,28**

Примітки:

- Тут і далі: бут. – бутонізація, біол. ст. – біологічна стигlostь.
- Ступінь достовірності різниці: **P < 0,01, ***P < 0,001; при визначенні ступеня достовірності різниці показники рослин у фазу бутонізації порівнювалися з показниками у фазу біологічної стигlostі.

2. Розподіл рослин сорту конопель Глухівські 58 за умовними класами канабіноїдних сполук у фазу бутонізації та біологічної стигlostі за різних умов вирощування (середнє за 2008-2009 рр.)

Фаза розвитку рослин	Сполука	Кількість рослин (%) із вмістом канабіноїдів			
		0 балів	слабкими слідами та слідами	1-5 балів	6-10 балів
Бутонізація	КБД	54,0 / 44,6	27,0 / 28,8	16,4 / 26,4	2,6 / 0,2
Біол. стигlostь		48,2 / 22,8	29,7 / 40,2	16,7 / 31,2	5,4 / 5,8
Бутонізація	ТГК	75,5 / 71,9	14,2 / 18,6	9,7 / 9,5	0,6 / 0
Біол. стигlostь		75,8 / 58,6	12,8 / 15,3	7,4 / 16,5	4,0 / 9,6
Бутонізація	КБН	64,0 / 58,4	18,6 / 24,6	14,3 / 15,6	3,1 / 1,4
Біол. стигlostь		72,1 / 64,8	9,6 / 7,6	10,9 / 16,2	7,4 / 11,4

Примітка: Чисельник – природні умови, знаменник – умови вегетаційного будинку.

3. Кореляційний зв'язок між вмістом основних канабіноїдних сполук у фазах бутонізації й біологічної стиглості рослин сорту конопель Глухівські 58 за різних умов вирощування (середнє за 2009-2010 рр.)

Сполука, фаза розвитку	КБД, біол. ст.	ТГК, бут.	ТГК, біол. ст.	КБН, бут.	КБН, біол. ст.
КБД, бутонізація	0,86*/ 0,84*	0,94*/ 0,88*	0,77*/ 0,60*	0,94*/ 0,87*	0,82*/ 0,78*
КБД, біол. стиглість		0,84*/ 0,76*	0,88*/ 0,78*	0,83*/ 0,77*	0,94*/ 0,92*
ТГК, бутонізація			0,78*/ 0,52*	0,94*/ 0,87*	0,82*/ 0,69*
ТГК, біол. стиглість				0,74*/ 0,56*	0,86*/ 0,81*
КБН, бутонізація					0,80*/ 0,73*

Примітки:

1. Чисельник – природні умови, знаменник – умови вегетаційного будинку.
2. * – значення достовірні на п'ятивідсотковому рівні.

Даний висновок підтверджує аналіз коефіцієнтів кореляції між вмістом основних канабіноїдних компонентів в обидва періоди розвитку (табл. 3).

Як видно з даних таблиці, вміст КБД, ТГК і КБН знаходиться у значному прямому взаємозв'язку між собою у зазначених фазах і умовах вирощування та між фазами бутонізації й біологічної стиглості.

Виняток у окремих випадках може становити вміст ТГК, оскільки між ТГК й іншими сполуками у рослин вегетаційного будинку він може бути середнім.

Суттєвий позитивний взаємозв'язок існує між вмістом КБД у рослинах у фазу бутонізації і вмістом цього ж компоненту канабіноїдів у рослинах у фазу біологічної стиглості ($r = 0,86$ для конопель, вирощених у природних умовах і $r = 0,84$ для конопель, вирощених у вегетаційному будинку).

Такий самий характер взаємозв'язку і для КБН ($r = 0,80$ і $r = 0,73$ відповідно). Між ознаками вмісту ТГК у рослин фази бутонізації та біологічної стиглості, вирощених у природних умовах, наявний сильний позитивний взаємозв'язок ($r = 0,78$), а у рослин, вирощених в умовах штучної ізоляції, – середній позитивний ($r = 0,52$). Ефективність вибраковки рослин до цвітіння хоча б з наявністю слідів канабіноїдів є ефективною в аспекті цілеспрямованого перезапилення рослин

із відсутністю всіх компонентів канабіноїдних сполук.

Висновки і перспективи подальших розвідок: 1. Вміст канабіноїдних сполук із фази бутонізації до біологічної стиглості у рослин сучасного безнаркотичного сорту конопель Глухівські 58, вирощених на ізолюваному розсаднику у природних умовах, змінюється не на достовірному рівні; у штучно створених умовах для вирощування культури – вегетаційному будинку – накопичення цих речовин відбувається інтенсивніше. При цьому, кількість рослин із повною відсутністю ТГК і КБН залишається високою.

2. Діагностика рослин конопель до цвітіння на наявність/відсутність канабіноїдів і відповідна їх вибраковка є ефективною, оскільки значна кількість рослин збереже відсутність наркотичних речовин до фази біологічної стиглості завдяки сильним позитивним кореляційним зв'язкам вмісту КБД, ТГК і КБН між собою та між різними фазами розвитку.

3. З метою прискорення селекційного процесу на зниження вмісту канабіноїдних сполук рекомендуємо проводити гібридизацію рослин конопель у вегетаційному будинку з показниками 0 балів усіх трьох компонентів канабіноїдів, що є гарантом повної відсутності цих речовин у більшості особин потомства, поскільки в природних умовах канабіноїди накопичуватимуться ще менш інтенсивно, ніж у штучно створених.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. *Вировець В.Г.* Создание высокопродуктивных сортов конопли, не обладающих наркотической активностью : автореф. дисс.... доктора с.-х. наук : спец. 06.01.05 "Селекция и семеноводство" / В.Г. Вировець. – К., 1992. – 42 с.
2. *Григорьев С.В.* Наследование признака наркотичности конопли / С.В. Григорьев, С.Л. Гордиенко // Селекция против наркотиков : материалы междунар. науч. конф., 9-11 авг., 2004 г. – Краснодар, 2004. – С. 29-35.
3. *Горшкова Л.М.* Характеристика сортов коллекционного питомника конопли по содержанию тетрагидроканнабинола / Л.М. Горшкова, Е.И. Бородин // Биология, возделывание и первичная обработка конопли и кенафа. – Глухов, 1978. – Вып. 41. – С. 35-40.
4. *Горшкова Л.М.* Біологічні основи формування каннабіноїдних сполук конопель та розробка методів визначення їх вмісту в селекційних цілях : автореф. дис. ... доктора с.-г. наук : спец. 06.01.05 "Селекція і насінництво" / Л.М. Горшкова. – К., 1994. – 49 с.
5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта : [учебн. для студ. агроном. спец. с.-х. вузов] / Б.А. Доспехов. – [3-е изд., перераб. и доп.]. – М.: Колос, 1973. – 336 с.
6. *Захарова Н.С.* Содержание каннабиноидов в коллекционных образцах конопли : автореф. дисс. ... канд. биол. наук : спец. 03.00.04 «Биохимия» / Н.С. Захарова. – Л., 1973. – 24 с.
7. *Кечатов Е.А.* Исследование смолистых выделений конопли посевной и сорной, произрастающих в европейской части СССР : автореф. дисс. ... канд. фармац. наук / Е.А. Кечатов. – Баку, 1962. – 23 с.
8. *Лазурьевский Г.В.* Каннабиноиды (наркотические вещества конопли) / Г.В. Лазурьевский, Л.А. Николаева. – Кишинев : Штиинца, 1972. – 68 с.
9. Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов / В.Г. Вировець, Л.М. Горшкова, Г.И. Сенченко [и др.] – М. : ВАСХНИЛ, 1985. – 14 с.
10. Про шляхи і результати селекційно-генетичних досліджень конопель // В.Г. Вировець, В.П. Ситник, М.Д. Мигаль [та ін.] // Селекція, технологія вирощування і збирання луб'яних культур : зб. наук. праць. – Глухів, 2001. – Вип. 2. – С. 51-60.
11. *Сухорада Т. И.* Селекция южной конопли / Т.И. Сухорада. – Краснодар : КНИИСХ, 2005. – 190 с.
12. *Grotenhermen F.* Industrial hemp is not marijuana: Comment on the drug potential of fiber Cannabis / F. Grotenhermen, M. Karus // Journal of the International hemp. – 1998. – Vol. 5, № 2. – P. 96-99.