

Накопичення канабідіолу в онтогенезі рослин технічних (промислових) конопель

С. В. Міщенко*, І. М. Лайко

Інститут луб'яних культур НААН України, вул. Терещенків, 45, м. Глухів, Сумська обл., 41400, Україна,
*e-mail: serhii-mishchenko@ukr.net

Мета. Встановити особливості накопичення канабідіолу та інших канабіноїдних сполук під час онтогенезу технічних (промислових) однодомних конопель, визначити оптимальну фенологічну фазу конопель, у яку доцільно проводити збирання рослин з метою отримання канабідіолу для потреб фармацевтичної галузі. **Методи.** Польові, лабораторні (тонкошарова хроматографія), математичної статистики (кореляційно-регресійний аналіз). **Результати.** Наведено результати трирічних досліджень із вивчення накопичення біомаси в онтогенезі рослин конопель сортів 'Гляна', 'ЮСО 31' і 'Золотоніські 15', вмісту канабідіолу, тетрагідроканабінолу і канабінолу в середньозваженому зразку вегетативної маси усіх живих листків і суцвіття. **Висновки.** Наявність та інтенсивність накопичення певної канабіноїдної сполуки є спадково обумовленими ознаками. Невелику кількість канабіноїдів у конопель можна ідентифікувати вже на ранніх стадіях розвитку, зокрема у фазі 1–3 пар справжніх листків. На основі теоретичних розрахунків і згідно проведених досліджень встановлено, що оптимальним періодом для збирання біомаси конопель медичного напрямку використання та подальшого виділення канабідіолу є період від повного цвітіння до фази біологічної стиглості. У окремих сімей сорту 'Гляна', з якими проводилась селекційна робота у напрямі підвищення вмісту канабідіолу, можна отримати близько 5,808 г/м², сорту 'ЮСО 31' – 1,528 г/м², сорту 'Золотоніські 15' – 1,563 г/м² даної речовини. Суцвіття конопель містять набагато більше канабіноїдних сполук, порівняно з листками, але зважаючи на їх частку в загальній біомасі рослин, можна стверджувати, що і суцвіття, і листки однаковою мірою придатні для використання як джерела канабідіолу. Використання технічних (промислових) конопель у медичній (фармацевтичній) галузях є перспективним, але за умови цілеспрямованої селекційної роботи.

Ключові слова: коноплі; канабідіол; тетрагідроканабінол; канабінол; біомаса; фенологічні фази.

Вступ

Канабіноїди є специфічними речовинами конопель (*Cannabis sativa* L.), що належать до класу ароматичних сполук і синтезуються та накопичуються переважно у залозистих трихомах.

Вважається, що біосинтез канабіноїдів відбувається на поверхні плазматичної мембрани, або в клітинній стінці на межі з секреторною порожниною. Канабіноїди зустрічаються не лише в клітинах видільних тканин. Це свідчить про те, що гени синтезу цих сполук можуть експресуватися у всіх клітинах рослини. Однак, саме залозисті трихоми спеціалізовані на синтезі високих рівнів канабіноїдів, в інших тканинах вміст цих речовин набагато менший. Напевно, канабіноїди виконують захисну роль у рослині, при цьому зниження вмісту канабіноїдів і кількості залоз у технічних (промислових) конопель не змінюють ці фізіологічні функції, достатнім є синтез даних речовин у невеликих кількостях іншими клітинами рослинного організму [1].

Найбільш поширеними канабіноїдами в залозистих трихомах конопель є тетрагідроканабінолова кислота (ТГКК), канабідіолова кислота (КБДК) і канабігеролова кислота (КБГК). Біоактивні форми канабіноїдів – тетрагідроканабінол (ТГК), канабідіол (КБД) і канабігерол (КБГ) – утворюються в результаті реакції декарбоксілювання під впливом зовнішніх умов. Декарбоксіловані похідні – канабіхромен (КБХ) і канабінол (КБН) виявлені у невеликих кількостях [2]. Шляхи біосинтезу канабіноїдних сполук конопель були встановлені порівняно недавно. КБГК є центральним попередником різних канабіноїдів. ТГКК-синтаза перетворює КБГК в ТГКК [3, 4], відповідно КБДК-синтаза – в КБДК [5] і КБХК-синтаза – в КБХК [6]. КБН є кінцевим продуктом синтезу ТГК (утворюється внаслідок окиснення).

Прийнято виділяти декілька хімічних фенотипів (хемотипів) конопель на основі співвідношення певних канабіноїдів. До хемотипу I відносять наркотичні коноплі з переважанням ТГК, тобто низьким співвідношенням КБД/ТГК; хемотип II є проміжним за вказаним співвідношенням; до хемотипу III відносять волокнисті коноплі з переважанням КБД, у яких вміст ТГК становить від невеликого відсотка до повної відсутності [7]. Пізніше були виділені ще два хемотипи. Хе-

Serhii Mishchenko

<https://orcid.org/0000-0002-1979-4002>

Iryna Laiko

<https://orcid.org/0000-0003-1514-574X>

мотип IV характеризується переважанням КБГ, який є основною сполукою, і низьким вмістом ТГК [8]; хемотип V має повну відсутність даних сполук і їх практично не можна виділити в межах чутливості хроматографа [9]. Виходячи з особливостей успадкування хімічних фенотипів, гени для ТГКК-синтази і КБДК-синтази вважають кодомінантними алелями в одному локусі. Вважається, що така кодомінантність обумовлена двома алелями для різних ізоформ однієї і тієї ж синтази, що має різну специфічність для перетворення КБГК-попередника в КБДК чи ТГКК відповідно [10], у той же час ген для КБХК-синтази знаходиться в незалежному локусі. В інших дослідженнях спостерігали різноманітність послідовностей для ТГКК- і КБДК-синтази, що може бути обумовлено наявністю декількох зчеплених локусів для цих генів [11]. RAPD-аналіз показав, що здатність накопичувати ТГК не є доміантною ознакою, а первинний синтез ненаркотичного канабідіолу пов'язаний з високою активністю КБДК-синтази [12].

Особливості накопичення канабіноїдних сполук у конопель добре вивчені. Відмічено, що вміст канабіноїдів збільшується на генеративній стадії розвитку [13, 14], кількість даних речовин зменшується від верхівки до нижньої частини рослини [15, 16]. Хемотипи різних зразків, зокрема відношення КБД/ТГК і КБГ/КБД не змінюється протягом онтогенезу, вони є порівняно сталими, тому визначити хемотип можна вже на ранніх стадіях розвитку (через 28–40 діб після посіву), а калусні тканини взагалі не здатні утворювати канабіноїдні сполуки [17]. Існує позитивна кореляція між вмістом КБД у листках і суцвітті, тобто, якщо у вегетативних органах високий вміст ТГК, то і у генеративних органах він також буде високим, і навпаки. Це означає, що вже на ранніх етапах розвитку до цвітіння можна передбачити хемотип рослини [18].

Біохімічні шляхи та особливості накопичення канабіноїдів вивчені здебільшого або у верхівках рослин конопель, де прояв ознаки максимальний, або для сортів з високим вмістом канабіноїдів. Останнім часом зростає інтерес до ненаркотичних сортів конопель (з відсутністю ТГК чи його дуже низьким вмістом), які містять КБД, що не є наркотичним чи психотропним засобом, для потреб фармацевтичної галузі [19, 20].

Ця сполука може використовуватися як анксиолітичний, антипсихотичний, знеболювальний, протизапальний та імуномодельючий засіб [21, 22]; КБД показав потенціал як

терапевтичний агент у доклінічних моделях захворювань центральної нервової системи, зокрема епілепсії, нейродегенеративних розладів, шизофренії, розсіяного склерозу [23], хвороби Паркінсона [24]; введення певної дози КБД пригнічує специфічний імунітет, але може підвищити неспецифічну протипухлинну та протипухлинну імунну реакцію, при цьому важливо визначити необхідну дозу, оскільки терапевтичні ефекти від застосування КБД дуже від неї чутливі [25]. Останнім часом канабіноїди успішно використовують і при лікуванні нудоти і блювоти – побічних ефектів, що супроводжують процес хіміотерапії у хворих на рак, та вивчається протипухлинний ефект КБД, є відомості, що КБД – потужний інгібітор росту ракових клітин *in vitro*, який одночасно характеризується значно нижчою активністю пригнічення росту неракових клітин [26]. Сполука має протигрибкові і антибактеріальні властивості, характеризується активністю проти *Staphylococcus aureus* [27]; КБД потенційно може бути використаний для лікування героїнової залежності та рецидивів цього захворювання [28] тощо.

Мета досліджень – вивчити особливості накопичення канабідіолу та інших канабіноїдних сполук в онтогенезі технічних (промислових) однодомних конопель, визначити оптимальну фенологічну фазу конопель, у яку доцільно проводити збирання з метою отримання КБД для медичних (фармацевтичних) цілей.

Матеріали та методика досліджень

Об'єкт досліджень: 1) окремі сім'ї сорту 'Гляна' середньоросійського еколого-географічного типу, з якими проводився добір на збільшення вмісту КБД, з показниками КБД – 3 бали, ТГК – 1 бал, КБН – 3–10 балів; 2) сорт 'ЮСО 31' середньоросійського еколого-географічного типу, який характеризується нижчим рівнем стабільності ознаки відсутності канабіноїдних сполук, порівняно з сучасними сортами; 3) сорт 'Золотоніські 15' південного еколого-географічного типу. Таким чином, був залучений матеріал різного генетичного походження. У всіх досліджуваних сортів вміст ТГК був значно нижче дозвolenої законодавством норми (яка згідно з «Переліком наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів», затвердженим постановою Кабінету Міністрів України від 06.05.2000 р. № 770 з наступними змінами, становить 0,08%).

Аналіз накопичення КБД у процесі онтогенезу рослин конопель здійснювали для середньозваженого зразка вегетативної маси

усіх живих листків і суцвіття (без стебла). Урожай біомаси та вміст КБД аналізували у різні фенологічні фази (кожні 2 тижні). Облікова площа для різних фаз росту і розвитку конопель становила 1 м² у 2-х повтореннях, аналіз рослинних зразків проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) також у 2-х повтореннях за методикою [29].

Визначали масу висушених зразків рослин конопель, подрібнювали їх до порошкоподібного стану і просіювали, використовуючи лабораторні калібровані сита. Наважку зразка прогрівали 30 хв при температурі 120 °С. Співвідношення «сухий подрібнений рослинний зразок : екстрагент» – 1 : 10 (або 0,1 г : 1 мл), екстрагент – етанол (96%), тривалість екстракції – 1 доба за температурних умов лабораторії. Використовували пластини для ТШХ розміром 100 × 150 мм марки ПТСХ-П-В [сорбент – силікагель СТХ-1ВЕ товщиною 80–100 мкм і зернистістю 8–12 мкм на основі з поліетилентерефталату (ПЕТФ)]. На пластинку наносили пробу об'ємом 5 мкл, хроматографування проводили в насиченій

камері з системою розчинників «петролійний ефір – диетиловий ефір» (40 : 10). Після піднімання фронту розчинників від лінії старту до лінії фінішу, пластину виймали з камери і сушили в потоці повітря до повного зникнення характерного запаху розчинників. Після цього пластинки обробляли барвником, барвник – тривкий синій Б (лужний розчин). Забарвлені зони (плями) візуально оцінювали за 10-ти бальною шкалою у порівнянні з еталон-свідком, для якого встановлено вміст канабіноїдних сполук (1 бал КБД = 0,375%, 1 бал ТГК = 0,008%).

Результати досліджень

У фазу розвитку 1–3 і 5 справжніх листків (кінець травня і середина червня) біомаса рослин, придатна для використання як джерело КБД, була незначною та відповідно становила 3,5 і 37,3 г/м² для сорту 'Гляна', 3,0 і 64,3 г/м² для сорту 'ЮСО 31', 2,3 і 56,2 г/м² абсолютно сухої речовини для сорту 'Золотоніські 15'. Найбільш інтенсивний приріст біомаси спостерігали від фази масової бут-

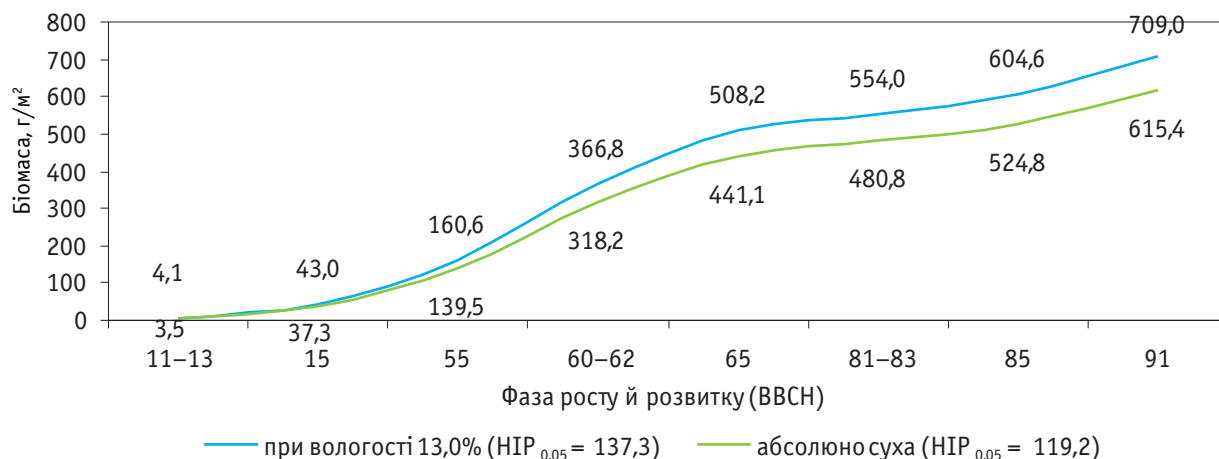


Рис. 1. Динаміка накопичення рослинами конопель сорту 'Гляна' біомаси, придатної для використання як джерела КБД (середнє значення за 2016–2018 рр.)

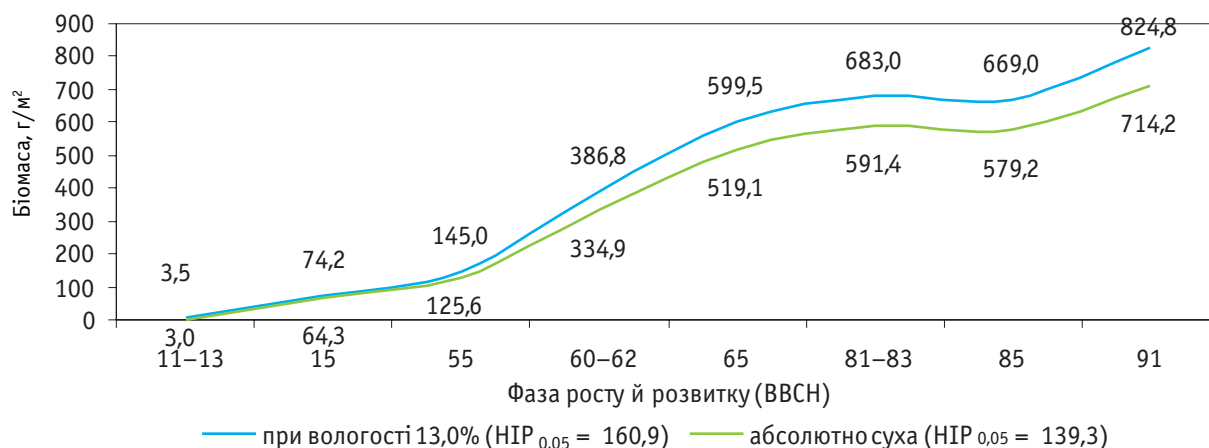


Рис. 2. Динаміка накопичення рослинами конопель сорту 'ЮСО 31' біомаси, придатної для використання як джерела КБД (середнє значення за 2016–2018 рр.)

нізації (кінець червня) до повного цвітіння (кінець липня – початок серпня). З фази початку дозрівання насіння (середина серпня) біомаса рослин збільшувалась слабо, майже залишаючись на одному рівні, що було викликано урівноваженням маси вегетативних і генеративних органів: листки поступово відмирили та опадали, а суцвіття збіль-

шувалось. Вона досягла свого максимуму на фазі біологічної стиглості, незважаючи на масове опадання листків майже до зони суцвіття. У середині вересня (фаза біологічної стиглості) біомаса складала 615,4, 714,2 і 666,2 г/м² сухої речовини відповідно у сортів 'Гляна', 'ЮСО 31' і 'Золотоніські 15' (рис. 1–3).

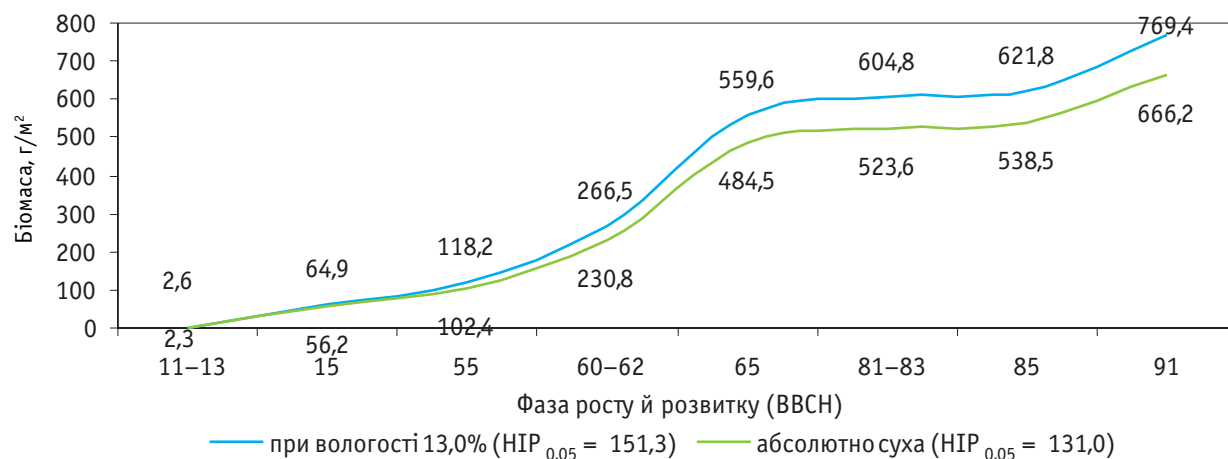


Рис. 3. Динаміка накопичення рослинами конопель сорту 'Золотоніські 15' біомаси, придатної для використання як джерела КБД (середнє значення за 2016–2018 рр.)

Динаміка накопичення різних канабіноїдних сполук має свої особливості. У окремих сім'ях сорту 'Гляна', що містили певну кількість канабіноїдів, їх можна ідентифікувати вже у фазі 1–3 пар справжніх листків (табл. 1). Вміст КБД і ТГК за даними напівкількісної оцінки методом ТШХ знизився у фазу 5 пар справжніх листків, потім підвищився і майже не змінювався до фази біологічної стиглості, досягнувши 2,50 і 2,38 бала відповідно для зазначених сполук. Несподіваним виявився високий вміст КБН, особливо на ранніх стадіях розвитку, який потім під час етапів інтенсивного росту і розвитку (накопичення біомаси) зменшується і знову зростає у фазу масового дозрівання насіння – біологічної стиглості (у середньому до 5,00–7,25 бала). Спостерігається тенденція до більш інтенсивного накопичення

зазначеної сполуки у сім'ї (потомстві рослини) з фенотипом КБД 3 бали, ТГК 1 бал, КБН 10 балів, у порівнянні з потомством рослини з фенотипом КБД 3 бали, ТГК 1 бал, КБН 3 бали. Отже, інтенсивність накопичення певної канабіноїдної сполуки, у порівнянні з іншими, спадково обумовлена.

Рослини сорту 'ЮСО 31' протягом онтогенезу до масового дозрівання насіння не накопичували ТГК, а лише містили КБД, хоча й у меншій, як порівняти з сортом 'Гляна', кількості (до 0,66 бала). За величиною вмісту КБД сорт Золотоніські 15 був подібним до сорту 'ЮСО 31', однак найбільша кількість даної сполуки виявлена у фазі біологічної стиглості (0,63 бала). ТГК ідентифіковано, починаючи з фази повного цвітіння, у незначній кількості. Подібно до сорту 'Гляна', у

Таблиця 1

Динаміка накопичення канабіноїдних сполук рослинами конопель (середнє значення за 2016–2018 рр.)

Дата відбору зразків	Код за шкалою ВВСН	Фаза розвитку рослин	Вміст канабіноїдних сполук у сортів за даними ТШХ, бал								
			'Гляна'			'ЮСО 31'			'Золотоніські 15'		
			КБД	ТГК	КБН	КБД	ТГК	КБН	КБД	ТГК	КБН
31.05	11–13	1–3 пари справжніх листків	3,75	1,50	10,00	0,44	0	0,25	0,34	0	3,28
14–16.06	15	5 пар справжніх листків	1,88	0,88	5,75	0,40	0	0,12	0,44	0	0,22
29–30.06	55	масова бутонізація	3,25	2,00	3,00	0,40	0	0,12	0,34	0	0,12
14.07	60–62	початок цвітіння	2,88	1,62	2,50	0,50	0	0,12	0,40	0	0,12
30.07–01.08	65	повне цвітіння	3,00	1,75	3,75	0,44	0	0,12	0,34	0,10	0,40
14–16.08	81–83	початок дозрівання насіння	2,45	1,74	3,30	0,46	0	0,12	0,46	0,08	0,84
30.08–01.09	85	масове дозрівання насіння	2,38	1,75	5,00	0,66	0,12	0,12	0,56	0,12	0,86
14–15.09	91	біологічна стиглість	2,50	2,38	5,25	0,56	0,25	0,16	0,63	0,25	1,00

рослин сортів 'ЮСО 31' і 'Золотоніські 15' найвищий вміст КБН спостерігали на ранніх етапах розвитку – у фазу 1–3 пар справжніх листків (0,25 і 3,28 бала відповідно).

Припускаємо, що порівняно високий вміст канабіноїдів у загальній біомасі рослин на ранніх етапах розвитку конопель разом з розвитком численних залозистих трихом – це еволюційно сформована адаптація молодих особин протидіяти впливу несприятливих абіотичних (погодні умови) і біотичних (шкідники, хвороби) факторів шляхом синтезу цих сполук (про їхню захисну функцію вказується у праці [30]) та непропорційна швидкість росту рослин і синтезу канабіноїдів. Вміст зазначених речовин може зменшуватися аж до нуля, оскільки рослини інтенсивно накопичують біомасу, а кількість канабіноїдних сполук залишається незмінною чи збільшується повільніше, що в загальній біомасі визначається доступними нам методами як відсутність чи слідові кількості, і поступово підвищується, коли сповільнюється ріст у генеративній фазі, а синтез канабіноїдів продовжується.

Хоча вміст КБД фактично не змінюється протягом вегетаційного періоду, дану сполуку більше містять суцвіття, а не листки конопель, однак зважаючи на кількість біомаси, яку можна використати для виділення КБД, у ту чи іншу фенологічну фазу чи з різних органів рослин можна отримати і різну кількість даної речовини. Провівши розрахунок відповідності бальної оцінки вмісту канабіноїдних сполук їх кількісному вмісту можна проілюструвати особливості динаміки їх накопичення на певній одиниці площі, зокрема теоретично з 1 м² окремих сімей сорту 'Гляна' у фазі 1–3 пари справжніх листків можна отримати 0,050, 5 пар справжніх листків – 0,266, масової бутонізації – 1,650, початку цвітіння – 3,433, повного цвітіння – 4,857, початку дозрівання насіння – 4,415, масового дозрівання насіння – 4,632, біологічної стиглості – 5,808 г КБД; з 1 м² сорту 'ЮСО 31' – 0,004, 0,116, 0,208, 0,632, 0,804, 1,049, 1,475 і 0,130 г відповідно; з 1 м² сорту 'Золотоніські 15' – 0,003, 0,093, 0,133, 0,346, 0,624, 0,928, 1,200 і 1,563 г відповідно (рис. 4–6).

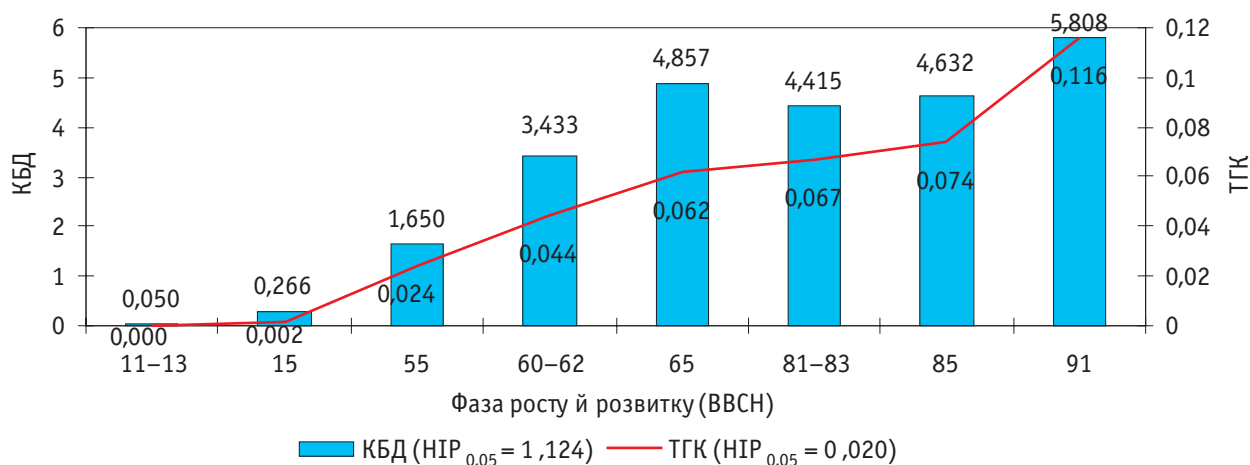


Рис. 4. Динаміка накопичення КБД і ТГК рослинами конопель сорту 'Гляна', г/м² (середнє значення за 2016–2018 рр.)

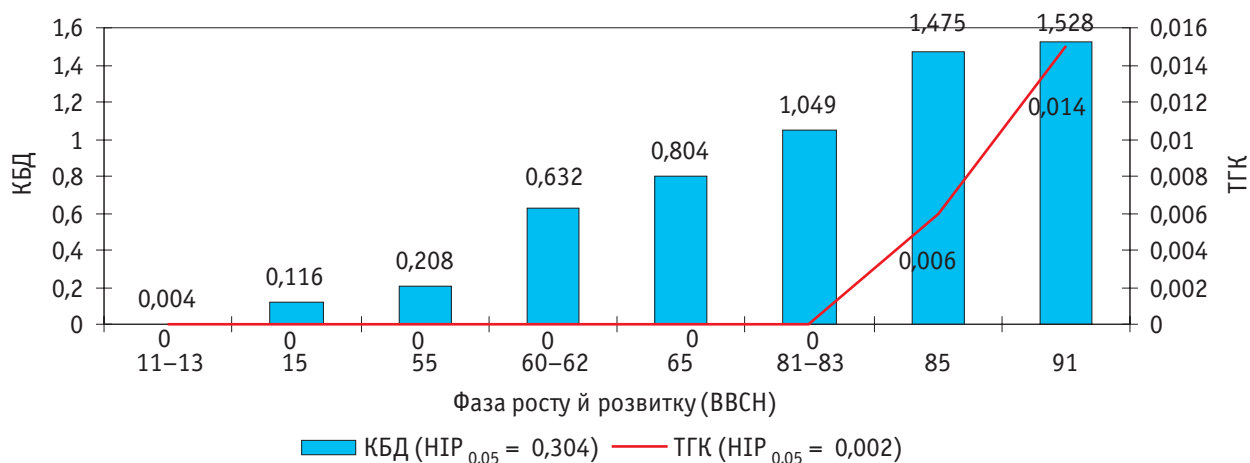


Рис. 5. Динаміка накопичення КБД і ТГК рослинами конопель сорту 'ЮСО 31', г/м² (середнє значення за 2016–2018 рр.)

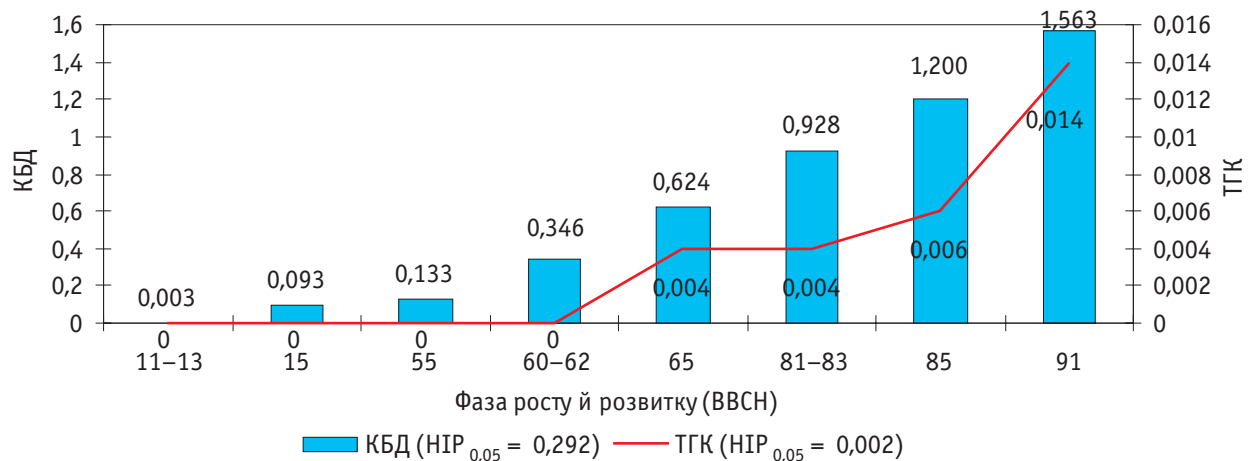


Рис. 6. Динаміка накопичення КБД і ТГК рослинами конопель сорту 'Золотоніські 15', г/м² (середнє значення за 2016–2018 рр.)

При цьому слід мати на увазі, що поступово зростає і кількість ТГК, особливо з фази повного цвітіння – початку дозрівання насіння. Так, у середині вересня його кількість становила від 0,014 ('ЮСО 31' і 'Золотоніські 15') до 0,116 г/м² ('Гляна'). Фактично у період з повного цвітіння до біологічної стиглості у сорту Гляна накопичення КБД і ТГК на одиниці площі було несуттєвим. Важливо вибрати етап онтогенезу конопель, а також частину рослини (суцвіття чи листки), у яких би була накопичена бажана для виробництва кількість КБД при найменшому значенні ТГК.

Оскільки регресійна залежність є лінійною, розподіл значень апріорі можна вважа-

ти нормальним, а коефіцієнти a і b за результатами обробки даних статистичною програмою є значимими, побудуємо рівняння лінійної регресії, зокрема залежності накопичення рослинами конопель біомаси і КБД від тривалості розвитку (табл. 2). Дана модель дає можливість прогнозувати врожай біомаси та кількість накопиченого КБД на певну добу росту й розвитку конопель, при зменшенні чи збільшенні одиниці незалежної змінної. Вибіркові рівняння лінійної регресії можуть бути використані в сільськогосподарській практиці при вирощуванні конопель як сировини для фармацевтичної галузі.

Таблиця 2
Кореляційно-регресійна залежність накопичення рослинами конопель різних сортів біомаси і КБД від тривалості розвитку

Коефіцієнти детермінації, рівняння лінійної регресії		
'Гляна'	'ЮСО 31'	'Золотоніські 15'
Біомаса і тривалість розвитку		
$r^2 = 0,960$	$r^2 = 0,941$	$r^2 = 0,941$
$Y = -70,183 + 6,244X^*$	$Y = -86,638 + 7,250X^*$	$Y = -99,839 + 6,806X^*$
КБД і тривалість розвитку		
$r^2 = 0,902$	$r^2 = 0,980$	$r^2 = 0,941$
$Y = -0,425 + 0,057X^*$	$Y = -0,273 + 0,016X^*$	$Y = -0,337 + 0,015X^*$

* Y – маса, г/м²; X – тривалість розвитку, діб (достовірно на рівні значущості 0,05)

Установлено, що біомаса листків рослин конопель завжди більша від біомаси суцвіття. У фазу початку дозрівання насіння це співвідношення складає 357,2 і 123,0 г/м² у сорту 'Гляна', 317,8 і 273,6 г/м² у сорту 'ЮСО 31', 429,6 і 94,0 г/м² у сорту 'Золотоніські 15' (рис. 7).

Суцвіття конопель містять набагато більше канабіноїдних сполук, порівняно з листками, що пов'язано з розвитком численних залозистих волосків на оцвіттинах жіночих квіток,

які є основними вмістилицями канабіноїдів. Так, у сорту 'Гляна' у перших виявлено 4,25 КБД, 3,38 ТГК і 8,62 бала КБН, а у других – 2,00, 1,34 і 1,28 бала відповідно. Суцвіття сорту 'ЮСО 31' також містили більше КБД, порівняно з листками (0,72 і 0,25 бала). У сорту 'Золотоніські 15' суцвіття характеризувались наявністю 1,44 КБД, 0,44 ТГК і 4,50 бала КБН, а листки даних сполук у фазі початку дозрівання насіння містили лише 0,25 КБД і 0,03 бала КБН (табл. 3).

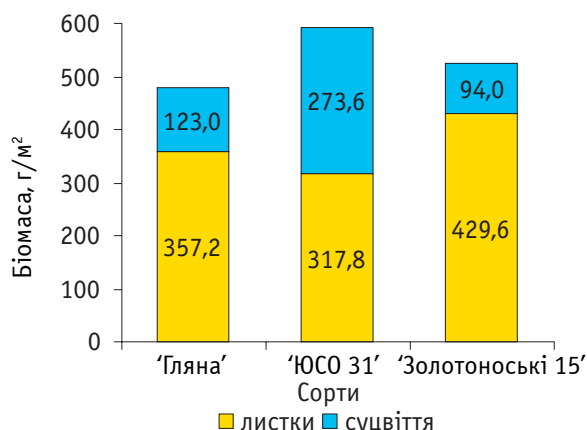


Рис. 7. Співвідношення біомаси суцвіття і листків рослин конопель у фазі початку дозрівання насіння (середнє значення за 2016–2018 рр.)

У той же час як із суцвітть, так і листків сорту 'Гляна', можна отримати майже однакову кількість КБД – 2,351 і 2,063 г/м², при показниках ТГК – 0,042 і 0,026 г/м² відповідно; з суцвітть сорту 'ЮСО 31' – 0,744, а з листків – 0,304 г/м² КБД, тобто більш ніж удвічі менше, при відсутності ТГК в обох випадках; на 1 м² сорту 'Золотоніські 15' накопичувалось 0,536 у суцвітті і 0,932 г КБД у листках (табл. 4). Отже, доцільно збирати і суцвіття, і листки з метою отримання КБД.

Отже, динаміку накопичення біомаси в онтогенезі рослин конопель, придатної для використання як фармацевтичної сировини, а також динаміку прояву КБД, ТГК і КБН

Таблиця 3

Вміст канабіноїдних сполук у суцвітті та листках рослин конопель у фазі початку дозрівання насіння (середнє значення за 2016–2018 рр.)

Орган рослин	Вміст канабіноїдних сполук у сортів за даними ТШХ, бал								
	'Гляна'			'ЮСО 31'			'Золотоніські 15'		
	КБД	ТГК	КБН	КБД	ТГК	КБН	КБД	ТГК	КБН
Суцвіття	4,25	3,38	8,62	0,72	0	0,12	1,44	0,44	4,50
Листки	2,00	1,34	1,28	0,25	0	0,12	0,25	0	0,03

Таблиця 4

Накопичення КБД і ТГК у суцвітті й листках рослин конопель у фазі початку дозрівання насіння (середнє значення за 2016–2018 рр.)

Орган рослин	Накопичення канабіноїдних сполук у сортів, г/м ²					
	'Гляна'		'ЮСО 31'		'Золотоніські 15'	
	КБД	ТГК	КБД	ТГК	КБД	ТГК
Суцвіття	2,351	0,042	0,744	0	0,536	0,004
Листки	2,063	0,026	0,304	0	0,392	0

нами було встановлено не за максимальним виразом вмісту (шляхом використання для аналізу верхівкових частин рослин, оцвітні жіночих квіток), а в середньозваженому зразку маси усіх живих листків і суцвіття (без стебла) певного етапу розвитку. Це потрібно для визначення оптимальної фенологічної фази конопель, у яку доцільно проводити збирання з метою отримання КБД для медичних цілей (у виробничих масштабах).

Лікарські препарати на основі конопель, що використовуються в медичних цілях, у деяких країнах виготовляються з рослин із високим вмістом КБД, але і наявністю ТГК. Такі препарати мають подвійну дію: седативну та психотропну. Наявність в рослинах високого вмісту КБД і відсутність або незначна кількість ТГК (не більше 0,08%) гіпотетично збільшує лікувальний ефект в кілька разів і дозволяє використовувати коноплі в медичній практиці без загрози психотропного ефекту і звикання. Сорти технічних (промислових) конопель україн-

ської селекції майже з повною відсутністю ТГК мають виключне значення для започаткування нового напрямку селекції і перспективи для використання у фармацевтичній галузі.

Висновки

На основі теоретичних розрахунків і згідно описаної методики проведення досліджень оптимальним періодом для збирання біомаси конопель медичного напрямку використання з подальшим виділенням з неї КБД є період від повного цвітіння до фази біологічної стиглості. У окремих сімей сорту 'Гляна', з якими проводилась селекційна робота у напрямі підвищення КБД, можна отримати близько 5,808 г/м² даної речовини. Суцвіття конопель містять набагато більше канабіноїдних сполук, порівняно з листками, але зважаючи на його частку в загальній біомасі рослин, і суцвіття, і листки однаково придатні для використання їх як сировини КБД.

Використання технічних (промислових) конопель у медичній (фармацевтичній) галузях є перспективним, але за умови цілеспрямованої селекційної роботи.

Використана література

- Mahlberg P. G., Kim E. S. Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Journal of Industrial Hemp*. 2004. Vol. 9, Iss. 1. P. 15–36. doi: 10.1300/J237v09n01_04
- Happyana N., Agnolet S., Muntendam R. et al. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*. 2013. Vol. 87. P. 51–59. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.11.001
- Sirikantaramas S., Morimoto S., Shoyama Y. et al. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, Iss. 38. P. 39767–39774. doi: 10.1074/jbc.M403693200
- Sirikantaramas S., Taura F., Tanaka Y. et al. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* 2005. Vol. 46, Iss. 9. P. 1578–1582. doi: 10.1093/pcp/pci166
- Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y. et al. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*. 2007. Vol. 581, Iss. 16. P. 2929–2934. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.043
- Morimoto S., Komatsu K., Taura F., Shoyama Y. Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*. 1998. Vol. 49, Iss. 6. P. 1525–1529. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00278-7
- Small E., Beckstead H. D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*. *Lloydia*. 1973. Vol. 6, Iss. 2. P. 144–165.
- Fournier G., Richez-Dumanois C., Duvezin J. et al. Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica*. 1987. Vol. 53, Iss. 3. P. 277–280. doi: 10.1055/s-2006-962705
- Mandolino G., Carboni A. Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*. 2004. Vol. 140, Iss. 1. P. 107–120. doi: 10.1007/s10681-004-4759-6
- de Meijer E. P., Bagatta M., Carboni A. et al. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 2003. Vol. 163, Iss. 1. P. 335–346.
- Weiblen G. D., Wenger J. P., Craft K. J. et al. Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytol.* 2015. Vol. 208, Iss. 4. P. 1241–1250. doi: 10.1111/nph.13562
- Sarsenbaev K. N., Kozhamzharova L. S., Yessimsitova Z., Seitbayev K. Z. H. Polymorphism of DNA and accumulation of cannabinoids by the cultivated and wild hemp in Chu Valley. *World Appl. Sci. J.* 2013. Vol. 26, Iss. 6. P. 744–749. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.26.06.13381
- Chandra S., Lata H., Mehmedic Z. et al. 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. *Planta Medica*. 2010. Vol. 76, Iss. 7. P. 743–750. doi: 10.1055/s-0029-1240628
- Aizpuru-Olaizola O., Soydaner U., Öztürk E. et al. Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *J. Nat. Prod.* 2016. Vol. 79, Iss. 2. P. 324–331. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00949
- Namdar D., Mazur M., Ion A., Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Ind. Crops Prod.* 2018. Vol. 113. P. 376–382. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.060
- Зеленина О. Н., Смирнов А. А. Динамика содержания каннабиоидов в растениях конопли. *Нива Поволжья*. 2010. № 4. С. 16–20.
- Pacifico D., Miselli F., Carboni A. et al. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*. 2007. Vol. 160, Iss. 2. P. 231–240. doi: 10.1007/s10681-007-9543-y
- Richins R. D., Rodriguez-Urbe L., Lowe K. et al. Accumulation of bioactive metabolites in cultivated medical Cannabis. *PLoS ONE*. 2018. Vol. 13, Iss. 7. e0201119. doi: 10.1371/journal.pone.0201119
- Лайко І. М., Міщенко С. В., Орлов М. М. та ін. Перспективи переорієнтації селекції конопель для створення сортів медичного напрямку використання. *Наукові праці Ін-ту біоенергетичних культур і цукрових буряків*. 2015. Вип. 23. С. 107–111.
- Зеленина О. Н., Галихметова И. А., Серков В. А. Перспективы использования технической конопли в фармакологических целях. *Инновационная техника и технология*. 2016. № 4. С. 11–13.
- Rong C., Lee Y., Carmona N. E. et al. Cannabidiol in medicinal marijuana: Research vistas and potential opportunities. *Pharmacol. Res.* 2017. Vol. 121. P. 213–218. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.005
- Zuardi A. W., Crippa J. A. S., Hallak J. E. C. et al. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006. Vol. 39, Iss. 4. P. 421–429. doi: 10.1590/S0100-879X2006000400001
- Hill A. J., Williams C. M., Whalley B. J., Stephens G. J. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Ther.* 2012. Vol. 133, Iss. 1. P. 79–97. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.09.002
- Crippa J. A. S., Zuardi A. W., Hallak J. E. C. et al. Cannabidiol for the psychosis in Parkinson's disease. *J. Psychopharmacol.* 2009. Vol. 23, Iss. 8. P. 979–983. doi: 10.1177/0269881108096519
- Ignatowska-Jankowska B., Jankowski M., Glac W., Swiergiel A. H. Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells. *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. Vol. 60, Suppl. 3. P. 99–103.
- Sharma M., Hudson J. B., Adomat H. et al. *In vitro* anticancer activity of plant-derived cannabidiol on prostate cancer cell lines. *Pharmacol. Pharm.* 2014. Vol. 5, Iss. 8. P. 806–820. doi: 10.4236/pp.2014.58091
- Appendino G., Gibbons S., Giana A. et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J. Nat. Prod.* 2008. Vol. 71, Iss. 8. P. 1427–1430. doi: 10.1021/np8002673
- Ren Y., Whittard J., Higuera-Matas A. et al. Cannabidiol, a non-psychoactive component of *Cannabis*, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, Iss. 47. P. 14764–14769. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4291-09.2009
- Вировець В. Г., Горшкова Л. М., Сенченко Г. И., Сажко М. М. Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов. Москва, 1985. 14 с.
- Мигаль М. Д., Кмець І. Л., Лайко І. М. Трихоми і канабіноїди конопель. До теорії селекції ненаркотичних сортів. Суми : ФОРЩербина І. В., 2017. 228 с.

References

- Mahlberg, P. G., & Kim, E. S. (2004). Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Journal of Industrial Hemp*, 9(1), 15–36. doi:10.1300/J237v09n01_04
- Happyana, N., Agnolet, S., Muntendam, R., Van Dam, A., Schneider, B., & Kayser, O. (2013). Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87, 51–59. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.11.001
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., & Shoyama, Y. (2004). The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biol. Chem.*, 279(38), 39767–39774. doi: 10.1074/jbc.M403693200

4. Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S., & Shoyama, Y. (2005). Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.*, 46(9), 1578–1582. doi: 10.1093/pcp/pci166
5. Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., & Morimoto, S. (2007). Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Letters*, 581(16), 2929–2934. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.043
6. Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., & Shoyama, Y. (1998). Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 49(6), 1525–1529. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00278-7
7. Small, E., & Beckstead, H. D. (1973). Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. *Lloydia*, 6(2), 144–165.
8. Fournier, G., Richez-Dumanois, C., Duvezin, J., Mathieu, J.-P., & Paris, M. (1987). Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects. *Planta Medica*, 53(3), 277–280. doi: 10.1055/s-2006-962705
9. Mandolino, G., & Carboni, A. (2004). Potential of marker-assisted selection in hemp genetic improvement. *Euphytica*, 140(1), 107–120. doi: 10.1007/s10681-004-4759-6
10. de Meijer, E. P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V. M., Ranalli, P., & Mandolino, G. (2003). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*, 163(1), 335–346.
11. Weiblen, G. D., Wenger, J. P., Craft, K. J., ElSohly, M. A., Mehmedic, Z., Treiber, E. L., & Marks, M. D. (2015). Gene duplication and divergence affecting drug content in *Cannabis sativa*. *New Phytol.*, 208(4), 1241–1250. doi: 10.1111/nph.13562
12. Sarsenbaev, K. N., Kozhamzharova, L. S., Yessimsitova, Z., & Seitbayev, K. Z. H. (2013). Polymorphism of DNA and accumulation of cannabinoids by the cultivated and wild hemp in Chu Valley. *World Appl. Sci. J.*, 26(6), 744–749. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.26.06.13381
13. Chandra, S., Lata, H., Mehmedic, Z., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2010). 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. *Planta Medica*, 76(7), 743–750. doi: 10.1055/s-0029-1240628
14. Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., ... Usobiaga, A. (2016). Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *J. Nat. Prod.*, 79(2), 324–331. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00949
15. Namdar, D., Mazuz, M., Ion, A., & Koltai, H. (2018). Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Ind. Crops Prod.*, 113, 376–382. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.01.060
16. Zelenina, O. N., & Smirnov, A. A. (2010). Dynamics of contents cannabinoids in plants of the zoned non psychoactive hemp varieties. *Niva Povoizh'ya* [Niva Povoizhya], 4, 16–20. [in Russian]
17. Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., & Mandolino, G. (2007). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*, 160(2), 231–240. doi: 10.1007/s10681-007-9543-y
18. Richins, R. D., Rodriguez-Urbe, L., Lowe, K., Ferral, R., & O'Connell, M. A. (2018). Accumulation of bioactive metabolites in cultivated medical Cannabis. *PLoS ONE*, 13(7), e0201119. doi: 10.1371/journal.pone.0201119
19. Laiko, I. M., Mishchenko, S. V., Orlov, M. M., Marynchenko, I. O., Shkurdoda, S. V., & Pasichnyk, V. V. (2015). Prospects of re-orientation of hemp breeding for creation of pharmaceutical varieties. *Naukovi praci Institutu bioenergetichnih kul'tur i cukrovih burakiv* [Scientific Papers of the Institute of Bioenergy Crops and Sugar Beet], 23, 107–111. [in Ukrainian]
20. Zelenina, O. N., Gali Ahmetova, I. A., & Serkov, V. A. (2016). The possibility of using the industrial (technical) cannabis for pharmacological purposes. *Innovatsionnaya tekhnika i tekhnologiya* [Innovative Machinery and Technology], 4, 11–13. [in Russian]
21. Rong, C., Lee, Y., Carmona, N. E., Cha, D. S., Ragguett, R., Rosenblatt, J. D., ... McIntyre, R. S. (2017). Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. *Pharmacol. Res.*, 121, 213–218. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.005
22. Zuardi, A. W., Crippa, J. A. S., Hallak, J. E. C., Moreira, F. A., & Guimaraes, F. S. (2006). Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 39(4), 421–429. doi: 10.1590/S0100-879X2006000400001
23. Hill, A. J., Williams, C. M., Whalley, B. J., & Stephens, G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol. Ther.*, 133(1), 79–97. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.09.002
24. Crippa, J. A. S., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Pinto, J. P., Chagas, M. H., Rodrigues G. G., ... Tumas, V. (2009). Cannabidiol for the psychosis in Parkinson's disease. *J. Psychopharmacol.*, 23(8), 979–983. doi: 10.1177/0269881108096519
25. Ignatowska-Jankowska, B., Jankowski, M., Glac, W., & Swiergiel, A. H. (2009). Cannabidiol-induced lymphopenia does not involve NKT and NK cells. *J. Physiol. Pharmacol.*, 60(3), 99–103.
26. Sharma, M., Hudson, J. B., Adomat, H., Guns, E., & Cox, M. E. (2014). *In vitro* anticancer activity of plant-derived cannabidiol on prostate cancer cell lines. *Pharmacol. Pharm.*, 5(8), 806–820. doi: 10.4236/pp.2014.58091
27. Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., ... Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J. Nat. Prod.*, 71(8), 1427–1430. doi: 10.1021/np8002673
28. Ren, Y., Whittard, J., Higuera-Matas, A., Morris, C. V., & Hurd, Y. (2009). Cannabidiol, a nonpsychotropic component of *Cannabis*, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J. Neurosci.*, 29(47), 14764–14769. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4291-09.2009
29. Virovets, V. G., Gorshkova, L. M., Senchenko, G. I., & Sazhko, M. M. (1985). *Metodicheskie ukazaniya po selektsii konopli na snizhenie soderzhaniya kannabinoïdov* [Methodological guidelines for the selection of hemp on the reduction of cannabinoids]. Moscow: N.p. [in Russian]
30. Myhal, M. D., Kmets, I. L., & Laiko, I. M. (2017). *Trykhomy i kanabinoïdy konopel. Do teorii selektsii nenarkotychnykh sortiv* [Hemp trichomes and cannabinoids. To the theory of breeding of non-narcotic varieties]. Sumy: FOP Shcherbyna I. V. [in Ukrainian]

УДК 633.522: [631.52 + 577.1]

Мищенко С. В.*, **Лайко И. М.** Накопление каннабидиола в онтогенезе растений технической (промышленной) конопли // *Plant Varieties Studying and Protection*. 2018. Т. 14, № 4. С. 390–399.

<https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151902>

*Институт лубяных культур НААН Украины, ул. Терещенков, 45, г. Глухов, Сумская обл., 41400, Украина, *e-mail: serhii-mishchenko@ukr.net*

Цель. Установить особенности накопления каннабидиола и других каннабиноидных соединений в онтогенезе технической (промышленной) однодомной конопли, определить оптимальную фенологическую фазу конопли, в которую целесообразно проводить уборку растений с целью получения каннабидиола для нужд фармацевтической отрасли. **Методы.** Полевые, лабораторные (тонкослойная хроматография), математической статистики (корреляционно-регрессионный анализ). **Результаты.** Приведены результаты трехлетних исследований накопления биомассы в онтогенезе растений конопли сортов 'Гляна', 'ЮСО 31' и 'Золотоніські 15', проявления содержания каннабидиола, тетрагидроканнабинола и каннабинола в средневзвешенном образце вегетативной массы всех живых листьев и соцветия. **Выводы.** Наличие и интенсивность накопления определенного каннабиноидного соединения являются наследственно обусловленными признаками. Небольшое количество каннабиноидов у конопли можно идентифицировать уже на ранних стадиях развития, в частности в фазе 1–3 пар настоящих листьев. На основе теоретических расчетов и согласно

проведенных исследований установлено, что оптимальным периодом для сбора биомассы конопли медицинского направления использования с последующим выделением из нее каннабидиола является период от полного цветения до фазы биологической спелости. В отдельных семей сорта 'Гляна', с которыми проводилась селекционная работа в направлении повышения содержания каннабидиола, можно получить около 5,808 г/м², сорта 'ЮСО 31' – 1,528 г/м², сорта 'Золотоніські 15' – 1,563 г/м² данного вещества. Соцветия конопли содержат гораздо больше каннабиноидных соединений по сравнению с листьями, но ввиду их доли в общей биомассе растений можно утверждать, что и соцветия, и листья в равной степени пригодны для использования в качестве источника каннабидиола. Использование технической (промышленной) конопли в медицинской (фармацевтической) отрасли является перспективным, но при условии целенаправленной селекционной работы.

Ключевые слова: конопля; каннабидиол; тетрагидроканнабинол; каннабинол; биомасса; фенологические фазы.

UDC 633.522: [631.52 + 577.1]

Mishchenko, S. V.*, & **Laiko, I. M.** (2018). Accumulation of cannabidiol during the ontogenesis of industrial hemp. *Plant Varieties Studying and Protection*, 14(4), 390–399.

<https://doi.org/10.21498/2518-1017.14.4.2018.151902>

*Institute of Bast Crops, NAAS of Ukraine, 45 Tereshchenkiv St., Hlukhiv, Sumy region, 41400, Ukraine, *e-mail: serhii-mishchenko@ukr.net*

Purpose. To find out the specifics of cannabidiol and other cannabinoid compounds accumulation during the ontogenesis of industrial monoecious hemp (i); to determine the optimal phenological stage of harvesting for the purpose of obtaining cannabidiol for pharmaceutical purposes (ii); to find out the prospects of using hemp for the needs of pharmaceutical industry (iii). **Methods.** Field, laboratory (thin-layer chromatography), statistics (correlation and regression analysis). **Results.** The results of three-year research on the dynamics of biomass accumulation in the ontogenesis of hemp plants of the 'Hliana', 'USO 31' and 'Zolotoniski 15' varieties are presented. The manifestation of the content of cannabidiol, tetrahydrocannabinol and cannabiol is given not in terms of their maximum content (using the analysis of apical parts of plants or female flowers) but using a weighted average sample of the vegetative mass from all live leaves and inflorescences. **Conclusions.** The presence and intensity of certain cannabinoid compound accumulation are the hereditary signs. A small number of cannabinoids in hemp can be identified already at

early stages of development, in particular at the 1–3 true leaf pairs stage. On the basis of theoretical calculations and in accordance with the described research methodology, it was found that the optimal period for harvesting biomass of pharmaceutical hemp with subsequent release of cannabidiol is the period from full flowering to the stage of biological maturity. Certain families of the 'Hliana' variety involved into selection for increasing cannabidiol content can produce about 5.808 g/m² of the active substance. The families of variety 'USO 31' can produce 1.528 g/m² and the 'Zolotoniski 15' 1.563 g/m² of the active substance. Inflorescences of hemp contain much more cannabinoid compounds compared to leaves; however, taken into account their shares in the total biomass of plants, it can be argued that inflorescences and leaves are equally suitable for use as a source of cannabidiol. The use of industrial hemp in the pharmaceutical industry is promising but on the assumption of the target breeding.

Keywords: hemp; cannabidiol; tetrahydrocannabinol; cannabiol; biomass; phenological phases.

*Надійшла / Received 31.10.2018
Погоджено до друку / Accepted 26.11.2018*