

НАКОПИЧЕННЯ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК У ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНАХ КОНОПЕЛЬ

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

*ГЛУХІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. Олександра Довженка*

Результати аналізу генеративних органів дводомних та однодомних форм конопель свідчать, що в оцвітині відбувалося найбільш інтенсивне накопичення канабіноїдних сполук, порівняно з усіма іншими вегетативними та генеративними органами. Квітки жіночих рослин містили велику кількість канабідіолової кислоти (КБДК) і канабідіолу (КБД), ніж чоловічі квітки і пилки.

Об'єкт вивчення та методи дослідження.

Об'єктом дослідження слугували сорти конопель дводомних та однодомних форм: ЮС-9, ЮС-12, Краснодарські-35, ЮСО-14, ЮСО-19, ЮСО-29, Глухівські-10, Жовтостетельні, ЮСО-1.

Мікроскопічний опис морфології залозистих волосків проводили за допомогою стереоскопічного мікроскопу МБС-10.

Напівкількісний метод визначення канабіноїдних сполук проводився методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на готових пластинах типу Silufol® UV254 з реактивом міцним синім Б [1,2].

Кількісне визначення канабіноїдних речовин проводилось за допомогою газорідного хроматографу марки Hewlett Packard 5830 A, обладнаного водневим пламенево-іонізуючим детектором. В якості газуносія використовувався азот. Швидкість потоку азоту та водню – 30 мл/хв., повітря – 300 мл/хв. Температура впускного отвору та детектору була, відповідно, 240 та 300⁰С. Скляні колонки були заповнені 5% OV – 101 на Chromosorb WAN – DMCS (80-100 меш). Вміст канабіноїдів у кожному зразку визначався за допомогою інтегратора марки Hewlett Packard 3380 A. Внутрішнім стандартом був метиловий ефір стеаринової кислоти – C₁₉H₃₈O₂. Повторюваність аналізів – п'ятикратна.

Результати досліджень.

Проведені нами дослідження показали, що генеративні органи конопель різних сортів відрізнялись складом пігментів, нуклеїнових кислот (ДНК і РНК), а також рівнем окисно-відновлювальних процесів [3].

Роль жовтих пігментів, каротиноїдів, у процесі проростання пилкових трубок значна. Жовті пігменти пилкових зерен, які проникли у тканини маточки, сприяли розвитку тканин стовпчика і більш

інтенсивному розвитку пилкових трубок. Вміст значної кількості каротиноїдів у тканинах і клітинах квітколожа і безпосередній зв'язок їх з тканинами андроцею свідчили про те, що вегетативні тканини і статеві клітини, що формуються у пилку, перебувають у тісному фізіологічному і біохімічному зв'язку – обміні речовин один з одним.

Чоловічі клітини дводомних конопель містили більшу кількість каротиноїдів, порівняно з чоловічими квітками однодомних конопель – фемінізованої й однодомно-фемінізованої плосконі [4,5]. Велика концентрація каротиноїдів у пилку сприяла кращому його проростанню та збільшенню довжини пилкових трубок [6]. Звідси випливає, що більш висока концентрація каротиноїдів у пилку дводомних конопель є однією з причин переzapилення однодомних сортів дводомними і, в кінцевому результаті, поступовому перетворенню однодомних рослин на дводомні.

Вивчаючи канабіноїдні сполуки в генеративних органах конопель ми вважали, що зможемо встановити закономірності, пов'язані з процесом запліднення, і використати їх у селекційній роботі. Методами тонкошарової і газорідинної хроматографії визначали вміст канабіноїдних речовин у квітах, пилку, пелюстках чоловічих рослин, приймочках і оцвітках жіночих. Нами з'ясовано, що, як у вегетативних органах (листочках), так і в генеративних, відбувалося накопичення кислот, зокрема канабідіолової (КБДК) і тетрагідроканабіолової (ТГКК) кислот. Ці органи містили канабіноїдні речовини. Їх концентрація була найбільш високою в оцвітках і квітках. P. Latta and B. Iton (1975) встановили, що найбільша концентрація даних речовин спостерігається у квітках із поступовим її зменшенням у листочках, черешках, стеблах, насінні та коренях. P.S. Fetterman та ін. (1971) вважали, що частини рослин за вмістом Δ^9 -транс-тетрагідроканабінолу розташовувалися наступним чином: оцвітка, квітки, листки, маленькі стебла, великі стебла, корені та насіння. Наші дослідження проводилися приблизно одночасно зі згаданими через недоступність інформації, ми не мали змоги ознайомитися з цими працями. Проведені в 1978-1979 рр. дослідження вегетативних і генеративних органів на багатьох сортах дали змогу зробити певні висновки (табл.1).

Таблиця 1 – Порівняльний аналіз вмісту канабіноїдних речовин в окремих органах рослин дводомних й однодомних сортів конопель, біологічна стиглість насіння

Сорт	Канабіноїди	Органи, що аналізуються			
		крупні листки стебла	дрібні листки суцвіття	чоловічі квітки	оцвітка
ЮС-12 - жіночі рослини	КБД	0-сліди	1	-	4
	ТГК	0	1	-	8
	КБН	0-сліди	сліди	-	1
	КБДК	2	4	-	6
ЮСО-19 - однодомні рослини	КБД	0-сліди	сліди	1	4-5
	ТГК	0	1	3	9
	КБН	сліди-0	0-сліди	6	3
	КБДК	1	3	3	6

У період дозрівання насіння в сортів і гібридів конопель вегетативні органи (крупні листки, стебла) містили невелику кількість як кислот, так і їх похідних, що пов'язано зі зниженням основних фізіологічних і біохімічних процесів. У цей період можливий відтік речовин з листків до інших органів, у яких більш активно протікали процеси метаболізму.

Таблиця 2 – Порівняльний аналіз вмісту канабіноїдів у різних органах дводомних і однодомних сортів конопель, біологічна стиглість насіння, (бали)

Сорт	Канабіноїди	Органи рослини, що аналізуються			
		крупні листки стебла	дрібні листки суцвіття	чоловічі квітки	оцвітина
ЮС-9	КБД	сліди	сліди	-	3
	ТГК	сліди	сліди	-	15
	КБН	0	0	-	0
	ТГКК	0	0	-	3
	КБДК	3	3	-	8
ЮСО-16	КБД	1	2	3	3
	ТГК	2	15	8	20
	КБН	0	сліди	6	2
	КБДК	4	7	7	8
ЮСО-19	КБД	1	3	3	4
	ТГК	0	сліди	5	15
	КБН	сліди	сліди	10	3
	КБДК	3	4	5	8
(Глухівські 10 жовтостеблові х ЮСО-1)	КБД	сліди	1	-	3
	ТГК	сліди	сліди	-	6
	КБН	0	0	-	2
	КБДК	3	4	-	7

Дрібні листки суцвіття, у зв'язку з більш активною функцією, пов'язаною з дозріванням насіння, містили більшу кількість канабіноїдів. Оцвітина жіночих однодомних рослин і чоловічі квітки містили найбільшу кількість як кислот, так і їх похідних канабіноїдів (канабідіол (КБД), тетрагідроканабінол (ТГК) і канабінол (КБН)).

Протягом наступних кількох років було вивчено вміст канабіноїдів у генеративних органах конопель – оцвітині та квітках (табл.3).

Порівняння дводомних й однодомних сортів конопель за вмістом канабіноїдів у чоловічих квітках і в оцвітині жіночих рослин показували, що у генеративних органах відбувалося більш інтенсивне накопичення канабідіолу (КБД), тетрагідроканабінолу (ТГК), ніж у вегетативних органах – листках (особливо у сортах Краснодарські-35, ЮС-9 і Дніпровські однодомні-6). Однодомні сорти конопель ЮСО-29, ЮСО-14 та ЮСО-16 накопичували кислоти та їх похідні у меншій кількості. Рівень накопичення канабіноїдів у різні роки не однаковий. Значну кількість цих речовин відмічено у 1984 році (порівняно з попередніми роками).

Вміст канабіноїдів у чоловічих квітках й оцвітині жіночих рослин також залежав від року вирощування, але кожний сорт зберігав відповідний рівень канабіноїдних речовин, по відношенню до інших

сортів, протягом років дослідження. У сортах Краснодарські-35, Дніпровські одностомні-6 та ЮС-9 вміст ТГК, КБД значно вищий за всі роки вирощування (у порівнянні з сортами ЮСО-29, ЮСО-14 та ЮСО-16). Порівняльний аналіз вмісту цих сполук за роками та сортами вказує на те, що рівень накопичення канабіноїдів залежав від умов навколишнього середовища в рік вирощування, але генетичний фактор був визначальним і кожний сорт, у всі роки вирощування, посідав певне місце незалежно від вмісту в ньому канабіноїдів (табл.3,4). За співвідношенням кількості ТГК і КБН до КБД у відсотках можна було встановити належність сорту до певного хімічного фенотипу. Отримані результати співвідношень за генеративними органами і віднесення сорту до «наркотичного» або «волокнистого» співпадали з даними таблиці.

Таблиця 3 – Вміст канабіноїдних речовин у чоловічих квітках різних сортів конопель (%)

Канабіноїди	Сорти									
	ЮСО-14	ЮСО-16	ЮСО-29	Дніпро- вські одно- домні 6	ЮС-9	Красно- дарські 35	ЮС-9	Красно- дарські 35	ЮСО-14	ЮСО-29
КБД	0,340	0,500	0,166	0,850	0,340	0,500	0,500	0,850	1,328	0,166
ТГК	0,075	0,100	0,050	0,225	0,200	0,500 ^x	0,225 ^x	0,450 ^x	0,425	0,050
КБН	0,226	0,126	0,063	0,147	0,084	0,042	0,147	0,021	0	0
$\frac{\%ТГК + \%КБН}{\%КБД}$	0,59	0,45	0,69	0,43	0,84	1,1	0,74	- ^x	0,32	0,30

^{x/} В цих сортах, окрім ТГК містилася приблизно однакова кількість ТГКК

Таблиця 4 – Вміст канабіноїдних речовин в оцвітині жіночих рослин конопель різних сортів, (%)

Канабіноїди	Сорти											
	ЮСО-14	ЮСО-16	ЮСО-29	Дніпро- вські одностомні 6	ЮС-9	ЮС-9	ЮСО-29	ЮСО-14	ЮСО-29	ЮС-9	Красно- дарські 35 ^x	
КБД	0,498	0,830	0,332	1,162	0,664	0,664	0,166	1,494	0,498	1,494	0,996	
ТГК	0,100	0,150	0,075	0,375	0,375	0,375	0,075	0,400	0,150	0,625	0,425	
КБН	0,021	0,042	0,021	0,084	0,042	0,021	0,021	0,021	0	0,399	0,042	
$\frac{\%ТГК + \%КБН}{\%КБД}$	0,24	0,23	0,29	0,40	0,62	0,62	0,58	0,28	0,30	0,68	-	

^x – Сорт Краснодарські 35 мав невелику кількість оцвітини в умовах м. Глухова, Україна. Сорт не визрівав.

Пилкові зерна чоловічих квіток і листочки містили меншу кількість канабіноїдів, ніж квітки - пелюстки (табл. 5).

Таблиця 5 – Вміст канабіноїдних речовин у генеративних органах чоловічих рослин конопель, (%)

Сорт, рослина	Пилкок			Квітки - пелюстки (без пилку)		
	КБД	ТГК	КБН	КБД	ТГК	КБН
Краснодарські 35						
Рослина 1	0,003	0,005	слабі сліди	слабі сліди	0,001	слабі сліди
2	0,027	0,018	слабі	0,041	0,036	0
3	-	-	-	0,005	0,0	0
4	-	-	-	слабі сліди	0,006	слабі сліди
5	0,049	0,040	слабі сліди	0,013	слабі сліди	слабі сліди
6	-	-	-	0,044	0,017	слабі сліди
Суміш пилку і квіток	слабі сліди	0,013	слабі сліди	слабі сліди	0,001	0,001
Краснодарські 56						
вдосконалені Рослина 1	0,010	0,019	слабі сліди	0,051	0,002	слабі сліди
2	0,017	0,018	слабі сліди	0,013	0,007	слабі сліди
3	0,006	0,013	слабі сліди	0,016	0,002	слабі сліди
4	слабі сліди	0,002	слабі сліди	0,032	0,003	слабі сліди
Суміш пилку і квіток	0,014	0,013	слабі сліди	0,042	0,0	слабі сліди

За допомогою спектроскопічного мікроскопу було встановлено, що пилкові зерна не мали залозистих волосків аналогічних до волосків на оцвітині жіночих рослин. Незважаючи на відсутність залоз результати проведеного методом газорідинної хроматографії дослідження вказали на невелику кількість канабіноїдів. D.k. Hemphill, g.c. Turner, P. Mahlberg (1980) на скануючому електронному мікроскопі встановили, що зразки пилкових зерен містили епідермальні залозисті трихоми (голівки), перемішані з пилковими зернами.

D.c. Turner, g.k. Hemphill, P.I. Mahlberg (1977) вважають, що низький рівень канабіноїдів – це засмічуючі домішки, які, скоріше за все, виділялися з залоз, а не з пилкових зерен.

За допомогою скануючого мікроскопа дослідникам, не вдалося знайти залозисті трихоми. Наші дослідження показали, що на пилкових зернах, пелюстках чоловічих квіток і жіночих маточках не виявлені залози подібні до тих, які ми знаходимо на оцвітині жіночих рослин. На нашу думку, застосовуючи інші методи роботи і особливу підготовку матеріалу до експерименту, вдалося б встановити наявність залозистих волосків або інші місця їх локалізації, але за величиною, формою і кольором вони, можливо, будуть відрізнятися від тих, які ми знайшли на оцвітині. Отримані результати дали змогу зробити висновки, що канабіноїдні сполуки можуть синтезуватися не лише в залозах, але і в інших органах клітини.

Порівняно з чоловічими квітками, жіночі дрібніші, безбарвні, слабо зафарбовані в жовтий колір, тому їх важко побачити неозброєним оком. Результати аналізу методом газо-рідинної хроматографії (ГРХ) показали, що жіночі квітки містили велику кількість КБД (порівняно з вмістом пилку і

квіток чоловічих рослин). Вміст ТГК, навпаки, був незначним, КБН – відсутній (табл.6).

Таблиця 6 – Вміст канабіноїдних речовин у генеративних органах конопель.

Органи рослин, що аналізуються	Вміст канабіноїдів, (%)		
	КБД	ТГК	КБН
Квітки чоловічих рослин	слабі сліди	0,019	слабі сліди
Пилок	0,028	0,015	слабі сліди
Квітки жіночих рослин	1,088	0,007	0

Результати аналізу екстрактів з генеративних органів конопель, проведений методом ТШХ, свідчили, що жіночі квітки також містили велику кількість КБДК і КБД. Вміст ТГК був однаковим (табл. 7).

Таблиця 7 – Вміст канабіноїдних сполук у генеративних органах конопель

Органи рослин, що аналізуються	Вміст канабіноїдів (бали)			
	КБД	ТГК	ТГКК	КБДК
Квітки чоловічих	слабі сліди	3	5	4
Пилок	сліди - 1	3	4	3
Квітки жіночих рослин	2	3	3	6

Результати аналізу генеративних органів конопель свідчать, що в оцвітінні відбувається найбільш інтенсивне накопичення канабіноїдів, порівняно з усіма іншими вегетативними і генеративними органами. Квітки жіночих рослин містять більшу кількість КБДК і КБД ніж чоловічі квітки і пилок.

1. *Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов* [Вировец В.Г., Горшкова Л.М., Сенченко Г.И., Сажко М.М.] – М., 1985. – 14с.

2. А. с. 138687 СССР. Способ оценки растений конопли по содержанию каннабиноидных соединений /Горшкова Л.М., Сенченко Г.И., Вировец В.Г. – заявл. 15.11.1987.

3. *Горшкова Л.М.* Конопля колхоза «Восход» /Горшкова Л.М //Лён и конопля. – 1970. – №6. – С.5–7.

4. *Горшкова Л.М.* Каратиноиды в пыльце конопли и процесс оплодотворения /Горшкова Л.М. // Лен и конопля. – 1971. – № 2. –24с.

5. *Горшкова Л.М.* Изменчивость физиолого-биохимических процессов у сексуальных особей двудомной и однодомной конопли / Горшкова Л.М. // Сб. трудов ВНИИЛК: Биология, возделывание и первичная обработка конопли и кенафа. – Глухов. – 1971. – Вып. 36.

6. *Лебедев С.И.* О содержании каротина в пыльце и влиянии его на рост пыльцевых трубок / Лебедев С.И. // ДАМ СССР. – 1948.– № 6. – С.24–26.

7. *Fetterman P.S.* Mississippi – Grown Cannabis sativa L. Preliminary Observation on chemical Definition of Phenotype and Variations in Tetrahydrocannabinol Content – Vernes. Age. Sex. and Plant Part / Fetterman P.S., Keith E.S., Waller G.W., Guerrero O., Doorenbos N.J., Quimby M. // J. Pharm. Sci. – 1971. – №60. – С.1276.

8. *Fetterman P.S.* A Simple Gas liquid Chromatography Procedure for Determination of Cannabinoidic Acids in Cannabis sativa L. / P.S.Fetterman, N.J.Doorenbos // *Experientia.* – 1971. – V.27, №8. – P.988–990.

9. *Latta R.P.* Seasonal fluctuations in cannabinoid content of Kansas Marihuana /R.P.Latta, B.J.Eaton // *Economic Botany.* – 1975. – №2. – P.153–163.

10. *Hemphill D.K.* Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of Cannabis sativa L. / D.K.Hemphill, D.C.Turner, P.G.Mahlberg // *Natur. Prod.* – 1980. – Vol.49, №1. – P.112–122.

11. *Turner G.C.* Gland distribution and cannabinoid content in clones of Cannabis sativa L. /G.C.Turner, Hemphill, P. Mahlberg // *Amer. J.Bot.*– 1977. – Vol.64. – C.687–693.