УДК 581.19 : 631.52 : 633.522

ДИНАМІКА ЗМІНИ ВМІСТУ КАНАБІНОЇДІВ У ВЕГЕТАТИВНИХ І ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНАХ КОНОПЕЛЬ

Мигаль М.Д., *доктор біологічних наук, професор*
Шульга І.Л., *аспірант*

ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ЛУБ'ЯНИХ КУЛЬТУР ІСГПС НААН

Досліджено динаміку накопичення канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах конопель – в проростку, листках, оцвітині та маточці жіночих квіток, в листочках оцвітини, пиляках та пилку чоловічих квіток, а також в насінні. Установлені закономірності зміни вмісту канабіноїдів у різних органах рослини, що доцільно враховувати в селекції ненаркотичних сортів конопель.

Розвиток рослин в онтогенезі супроводжується значними змінами морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак, направлених на формування й функціонування вегетативних та генеративних органів задля утворення в кінцевому результаті насіння нового покоління. У цьому контексті цікаво знати, які онтогенетичні зміни відбуваються в накопиченні наркотичних речовин у різних органах рослин – від корінця паростка до зрілого насіння. Результати досліджень даного питання, крім теоретичного, мають перш за все методичне значення, оскільки вони показують, у якому органі і в якій кількості накопичуються канабіноїди.

До вивчення нами залучено два сорти конопель (Єрмаківські місцеві та ЮСО-1), спеціально підібраних з природно високим вмістом канабіноїдів, щоб більш об'єктивно простежити за характером зміни досліджуваної ознаки, виключивши вплив селекційних методів, направлених на зниження концентрації наркотичних речовин. У фазі трьох пар справжніх листків рослини помічали номерними етикетками. З цих рослин добирали зразки відповідних органів у фазі їх зрілості для аналізу на канабіноїди. На технічній довжині стебла вміст канабіноїдів визначали в листках усіх стеблових вузлів з наступним усередненням одержаних показників листків нижньої, середньої і верхньої частини технічної довжини стебла. Дослідження проводили у розрізі статевих типів – матірки, плосконі та однодомних рослин. Зразки аналізували у сухому вигляді як це прийнято при доборі елітних рослин на безнаркотичність. Дані за вмістом канабіноїдів різних органів на стадії зрілості їх дають найбільш об'єктивну оцінку рослин, що важливо для селекції. Вибірка – по 15 рослин для кожного з трьох варіантів досліду. Спосіб посіву конопель – 60 х 10 см. Вміст канабіноїдів визначали методом тонкошарової хроматографії [1].

Динаміку особливостей зміни вмісту канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах вивчала також Л.М. Горшкова [2], однак порівняно з нашими експериментами є суттєві відмінності: концентрація речовин

визначалась за фазами розвитку рослин. Показники вмісту канабіноїдів «слабкі сліди» та «сліди» не переведено в цифрові значення. Відсутній сумарний рівень канабіноїдів КБД, ТГК і КБН. Нами проведено дослідження на великій кількості сучасних сортів, у яких суттєво змінилося співвідношення компонентів канабіноїдів, особливо в напряму зниження вмісту ТГК.

За нашими даними, аналіз різних органів матірки, плосконі й однодомних рослин конопель показує, що у корінцях проростка, гіпокотилі, сім'ядолях, маточках жіночих квіток та насінні канабіноїдів не виявлено (табл. 1).

У матірки дводомних конопель сорту Єрмаківські місцеві параметри вмісту канабіноїдних сполук підвищується в напрямку від листків нижньої частини технічної довжини стебла до оцвітини жіночих квіток, у яких вони досягають максимуму. Зокрема концентрація КБД підвищується з 0,39 до 9,03, ТГК – з 0,48 до 18,02 і КБН з 4,78 до 18,31 бала.

У плосконі в цілому простежується аналогічний напрям зміни ознаки в онтогенезі, однак є й відмінності. У плосконі рівень концентрації канабіноїдних речовин помітно нижчий, ніж у матірки. Якщо в дрібних листочках суцвіття матірки вміст КБД досягає 5,13 бала, то у плосконі – 3,38 бала. По ТГК відповідно 7,92 і 3,50, по КБН – 6,76 і 4,50 бала. У чоловічих рослин дводомних конопель найвища концентрація наркотичних сполук спостерігається в пиляках. Як у матірки так і плосконі максимальна кількість канабіноїдів концентрується безпосередньо в тих органах, які контактують з маточкою та пиляком, тобто тих основних генеративних органів, що забезпечують процес запліднення і розвиток насіння. Це свідчить про важливу захисну роль залозистих волосків, пов'язану з розмноженням рослин конопель, з відтворення поколінь.

Особливості накопичення канабіноїдів у однодомних рослин наступні. За вегетативними органами й жіночими квітками зміни цих речовин проходять як у матірки, а за чоловічими квітками – як у плосконі. Разом з тим слід вказати й на таку різницю. Якщо у листочків оцвітини чоловічих квіток плосконі вміст КБД, ТГК і КБН складає 4,98; 4,82 і 10,03 бала, то в тому ж органі показники однодомних рослин значно нижчі – 2,18;1,21 і 5,34 бала.

Таблиця 1 – *Динаміка зміни вмісту канабіноїдів в онтогенезі рослин конопель (середнє за 2009–2010 рр.)*

Орган рослини	Сорт Єрмаківські місцеві								Сорт ЮСО-1			
	Матірка				Плоскінь				Однодомні рослини			
	КБД	ТГК	КБН	Сума	КБД	ТГК	КБН	Сума	КБД	ТГК	КБН	Сума
Листки нижньої частини ТДС	0,39	0,48	4,73	5,60	0,28	0,10	2,37	2,75	0,65	0,11	5,73	6,49
Листки середньої частини ТДС	1,32	1,38	1,21	3,91	0,66	0,20	0,52	1,38	1,19	0,84	2,80	4,83
Листки верхньої частини ТДС	1,70	1,55	1,48	4,73	1,38	0,65	0,74	2,77	1,80	1,02	3,08	5,90
Крупні листки суцвіття	3,31	3,33	2,38	9,02	2,03	2,29	1,87	6,19	3,00	2,40	3,80	9,20
Середні листки суцвіття	3,88	3,79	3,48	11,15	2,63	2,82	2,44	3,30	3,30	4,50	4,95	12,75
Дрібні листочки суцвіття	5,13	7,92	6,76	19,81	3,38	3,50	4,50	11,38	6,30	10,10	9,30	25,70
Оцвітина жіночих квіток	9,03	18,02	18,31	45,36	-	-	-	-	7,70	13,25	15,61	36,56
Маточка	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
Оболонка насіння	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
Зародок	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0
Листочки оцвітини чоловічих квіток	-	-	-	-	4,98	4,82	10,03	19,83	2,18	1,21	5,34	8,73
Пиляк	-	-	-	-	5,50	6,51	20,30	32,31	4,56	5,65	19,95	30,16
Пилок	-	-	-	-	0,25	0	1,75	2,00	0,38	0	3,06	3,44

Примітка. *ТДС – технічна довжина стебла (довжина від кореневої шийки стебла до суцвіття).*

Особливо варто виділити наступну загальну закономірність для матірки, плосконі та однодомних рослин. Це стосується листків нижньої частини технічної довжини стебла, у яких КБН накопичується в багато разів більше, ніж двох інших компонентів канабіноїдів. У матірки в згаданій зоні стебла концентрація КБД і ТГК відповідно становить 0,39 і 0,48 бала, а КБН – 4,73 бала. У плосконі – 0,28 і 0,10 проти 2,37 бала, у однодомних рослин – 0,65 і 0,11 проти 5,73 бала. Дане явище відмічено як у сприятливому (2009), так і несприятливому (2010) році для росту і розвитку рослин конопель. У листків середньої частини стебла вміст КБН різко знижується і далі у вертикальному напрямку рослини виходять приблизно на однаковий рівень концентрації порівняно зі зміною вмісту КБД і ТГК.

Окремо слід виділити розгляд динаміки зміни ознаки сумарного вмісту трьох компонентів канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах рослин конопель. З цією метою наводимо більш наочні експериментальні дані у графічній формі (рис. 1 і 2). Установлено, що показники загальної кількості КБД, ТГК і КБН дуже високі. У матірки, плосконі та однодомних рослинах у листків нижньої частини технічної довжини стебла концентрація канабіноїдів вища, ніж у двох наступних його частинах. Це досягається, як було вже відмічено в попередній таблиці, завдяки істотно більшому накопиченню КБН порівняно з двома іншими компонентами канабіноїдних сполук. У матірки та однодомних рослин максимальний показник загального вмісту досліджуваних речовин проявляється в оцвітині жіночих квіток (45,36 і 36,56 бала), а в плосконі – в пиляках чоловічих квіток (32,31 бала). За цим параметром найбільше канабіноїдів містить матірка, менше – плоскінь, а однодомні рослин відрізняються проміжною кількістю. Цікаво, що максимальну концентрацію хімічних речовин у статевих типів конопель забезпечують різні типи залозистих волосків: в оцвітині – в основному головчато-стебельцеві залози, в пиляках – головчато-прикріплені залози.

Дослідження листків, сформованих на технічній довжині стебла, показують сталу закономірність зміни вмісту канабіноїдів в онтогенезі, описану вище. Однак у інших вегетативних і генеративних органах дана ознака змінюється складніше. Виходячи з цього, з метою більш детального вивчення насіння, проростка, жіночих і чоловічих квіток нами додатково проведено експерименти із залученням 5 сортів з різко відмінною концентрацією канабіноїдних речовин: з високим (Глухівські 10 і ЮС-9) та низьким вмістом (Гляна, Глухівські 18 і Глухівські 58).

Рис. 1 *– Онтогенетична зміна загального вмісту канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах матірки і плосконі дводомних конопель сорту Єрмаківські місцеві (середнє за 2009–2010 рр.)*

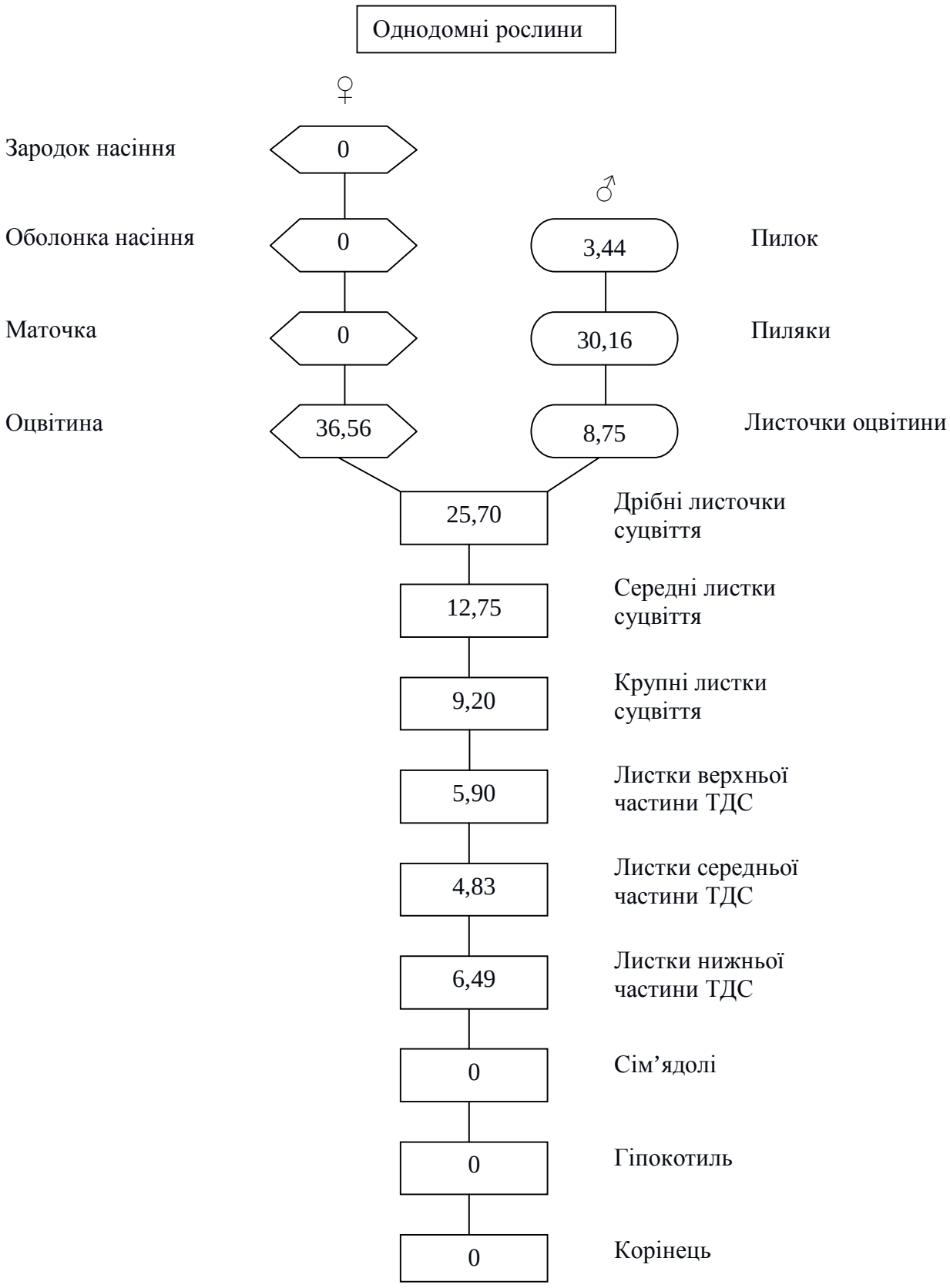

Рис. 2 *– Онтогенетична зміна загального вмісту канабіноїдів у вегетативних і генеративних органах однодомних рослин конопель сорту ЮСО-1 (середнє за 2009–2010 рр.)*

Аналізуючи нижченаведену таблицю 2, можна констатувати: дворічні дані п’яти сортів конопель показують, що в проростку, маточках жіночих квіток та в насінні канабіноїдів не виявлено.

Високим вмістом накопичення всіх трьох компонентів канабіноїдів виділяється оцвітина жіночих квіток. У сортів з високим вмістом канабіноїдних сполук КБД складає 7,05–7,70, ТГК – 12,93–14,49, КБН – 15,47–15,50 бала, тоді як у сучасних сортів з низьким вмістом канабіноїдів показники КБД коливаються від 0,07 до 0,40, ТГК – від 0,02 до 0,14 і КБН – від 0,02 до 1,18 бала.

У листочків оцвітини чоловічих квіток вміст канабіноїдів помітно нижчий. У сортів Глухівські 10 і ЮС-9 концентрація їх знаходиться в межах 1,78–9,62, а в сортів Гляна, Глухівські 18 та Глухівські 58 – в межах 0–0,50 бала. У останнього згадані речовини взагалі відсутні.

Неочікувані для нас дані отримано в результаті аналізу пиляків (без пилку). У середньому всіх сортів співвідношення КБД, ТГК і КБН становить 2,01 : 1,96 : 11,50 бала. Звертає на себе увагу високий показник вмісту КБН, що особливо яскраво видно на рисунку 3. Параметр цієї речовини вищий, ніж в оцвітині жіночих квіток. Причому КБН багато міститься не тільки у сортів з високим, але й низьким вмістом канабіноїдів: Глухівські 10 – 17,58, ЮС-9 – 17,49, Гляна – 6,35, Глухівські 18 – 9,21 і Глухівські 58 – 6,88 бала. Однак слід відмітити, що власне КБН не є безпосередньо наркотичною речовиною, він являє собою продукт розпаду ТГК.

На пиляках локалізуються лише головчато-прикріплені трихоми, які, отже, і є носіями КБН. Виникає запитання: чим же пояснити високий вміст КБН у пиляках рослин селекційних сортів. Здогадно, це пов’язано із застосуванням існуючого методу добору рослин на зниження канабіноїдів. Добір елітних рослин проводиться за результатом аналізу зразків, що складаються з дрібних листочків суцвіття та оцвітини жіночих квіток. Чоловічі квітки, у яких пиляки багато містять КБН, у зразки не включаються.

У пилку конопель також виявлено канабіноїди, але в незначній кількості: у середньому п’яти сортів КБД – 0,13 і КБН – 0,44 бала, а ТГК взагалі відсутній. До того ж факт наявності канабіноїдів можна вважати суперечливим. Велика вірогідність того, що вміст КБД і КБН – це механічна домішка. У даному випадку показовим є порівняння маточок жіночих квіток і пилку. Добір маточок для аналізу проводиться на ранній стадії розвитку квітки, коли ще зовсім на молодих оцвітинах відсутні залозисті волоски. Тому маточки не контактують з іншими органами, які виділяють канабіноїди назовні. Що стосується пилку, то ми спостерігали в ньому зрілі головки головчато-прикріплених залоз, що формуються на поверхні пиляків. Вони порівняно легко відокремлюються від пиляків і потрапляють у пилок в процесі виділення його для експерименту.

Таблиця 2 *– Відмінності проростка, жіночих і чоловічих квіток та насіння сортів конопель за вмістом канабіноїдів (середнє за 2009–2010 рр.)*

Сорт	Кана-біноїди	Проросток			Жіноча квітка		Чоловіча квітка			Насіння	
		Корінець	Гіпокотиль	Сім'ядолі	Оцвітина	Маточка	Листочки оцвітини	Пиляк	Пилок	Оболонка	Зародок
Глухівські 10	КБД	0	0	0	7,05	0	3,75	4,13	0,38	0	0
	ТГК	0	0	0	12,93	0	1,78	4,56	0	0	0
	КБН	0	0	0	15,47	0	7,74	17,58	1,93	0	0
ЮС-9	КБД	0	0	0	7,70	0	3,06	4,52	0,25	0	0
	ТГК	0	0	0	14,94	0	2,84	5,09	0	0	0
	КБН	0	0	0	15,50	0	9,62	17,49	0,25	0	0
Гляна	КБД	0	0	0	0,40	0	0,25	0,50	0	0	0
	ТГК	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0	0
	КБН	0	0	0	0,09	0	0,25	6,35	0	0	0
Глухівські 18	КБД	0	0	0	0,13	0	0,25	0,38	0	0	0
	ТГК	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0
	КБН	0	0	0	1,18	0	0,50	9,21	0	0	0
Глухівські 58	КБД	0	0	0	0,07	0	0	0,50	0	0	0
	ТГК	0	0	0	0,03	0	0	0,13	0	0	0
	КБН	0	0	0	0,02	0	0	6,88	0	0	0
Середнє	КБД	0	0	0	3,07	0	1,46	2,01	0,13	0	0
	ТГК	0	0	0	5,62	0	0,92	1,96	0	0	0
	КБН	0	0	0	6,65	0	3,62	11,50	0,44	0	0

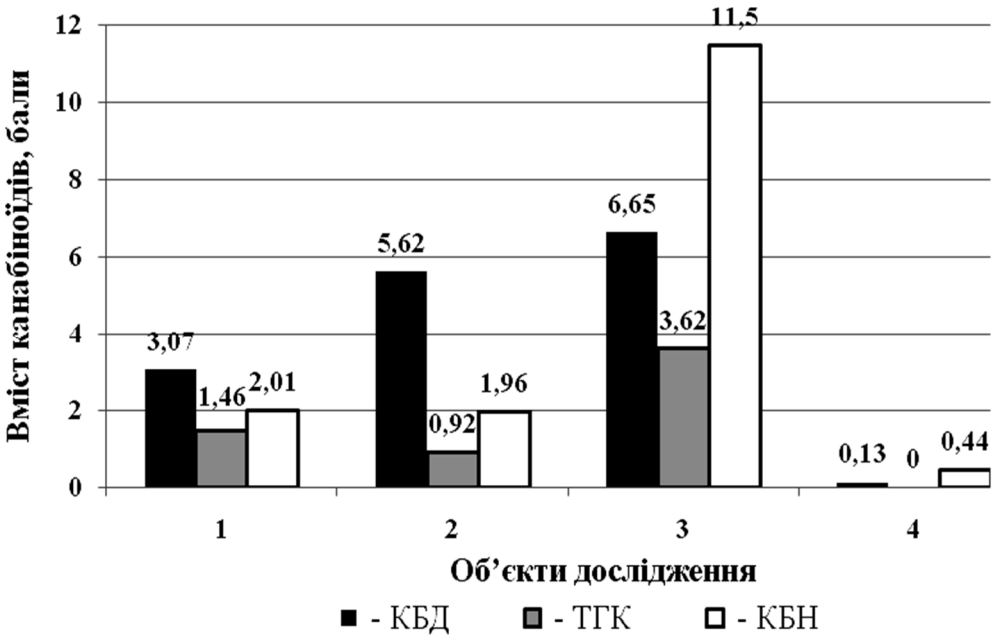

Рис. 3 *– Зміна вмісту канабіноїдів жіночих і чоловічих генеративних органів: 1 – оцвітина жіночих квіток; 2 – листочки оцвітини чоловічих квіток; 3 – пиляки; 4 – пилок*

Результати окремого дослідження маточок жіночих квіток на вміст канабіноїдів нам невідомі. Це очевидно пов'язано зі складним процесом добору маточок для аналізу, оскільки вони дуже дрібні й закриті оцвітиною. З цього приводу, слід вказати на спосіб добору маточок жіночих квіток для аналізу на вміст канабіноїдів, застосований нами. Для одержання крупних незапліднених маточок рослини конопель штучно або просторово ізолюють. У однодомних рослин при цьому каструють чоловічі квітки у фазі бутонів, у дводомних конопель бракують плоскінь до цвітіння, залишаючи матірку. В окремі несприятливі роки для росту і розвитку рослин (посуха в сполученні з високими температурними показниками як це спостерігалося в 2010 р.) можна було обійтись без ізоляції піддослідних конопель, оскільки пилок стає нежиттєздатним, а незапліднені маточки розвиваються, досягаючи значних розмірів. Утворення відносно крупних маточок спостерігається також в умовах затяжних прохолодних дощів, коли пиляки не розтріскуються і не звільнюються від пилку. В усіх випадках маточки збирають з допомогою пінцета. Для цього маточку беруть пінцетом за приймочку і висмикують (важливо!) її з оцвітини.

За даними М.Д. Мигаля [3] трихоми на пилку відсутні. Поверхня пилкових зерен конопель рівна, позбавлена будь-яких виростів або потовщень. На зовнішній оболонці (екзині) формується лише дрібнозерниста текстура у вигляді світлих острівців, оточених густо розташованими точками, що обумовлено своєрідною внутрішньою будовою оболонки пилкових зерен.

У своїх дослідженнях ми застосовували метод тонкошарової хроматографії визначення вмісту канабіноїдів. Крім нього, існує більш точніший, але дорожчий кількісний спосіб – метод газорідинної хроматографії. Цим способом Л.М. Горшкова [4] визначала вміст канабіноїдних речовин у проростку і насінні. Якщо, за нашими даними, у різних частинах проростка і насіння конопель відсутні канабіноїди, то за результатами досліджень Л.М. Горшкової у проростку в цілому кількість КБД, ТГК і КБН знаходиться на рівні від 0 до 0,004 %, в різних складових насінини – від 0 до 0,001 %, у цілому в насінні – від 0 до 0,039, у пилку – від <0,001 до 0,044 %. З цього можна зробити висновок, що в проростку та насінні міститься мізерна кількість канабіноїдів, яка може не виявитися методом тонкошарової хроматографії. Таким вмістом канабіноїдних речовин у насінні з якого виготовляють олію та інші вироби, з наркотичної точки зору можна абсолютно нехтувати.

Не виключена можливість того, що на вміст канабіноїдів у насінні впливає зовнішній фактор, обумовлений контактом насінини з оцвітиною. Це відбувається у фазі стиглості конопель, коли на оцвітині у залозистих волосках максимально накопичуються секрети, головки залоз лопаються, липка смолиста речовина виходить на поверхню і може попадати на насіння, оскільки оцвітина засихає і поступово відхиляється від насінини, більшою-меншою мірою оголюючи її.

З огляду на результати проведеного аналізу генеративних органів конопель вміст канабіноїдів у них відрізняється як кількісно, так і якісно. У оцвітині жіночих квіток сконцентрована максимальна сумарна кількість наркотичних речовин порівняно з іншими органами рослин. Співвідношення досліджуваних хімічних сполук в оцвітині характеризується тим, що в ній найменше міститься КБД. Рівень вмісту ТГК і КБН значно вищий. При цьому показники останніх близькі між собою. Домінантним типом на оцвітині є головчато-стебельцеві залозисті волоски. У чоловічих генеративних органах сумарний вміст канабіноїдів істотно нижчий, проте співвідношення окремих компонентів їх змінюється в напряму підвищення концентрації КБН порівняно з КБД і ТГК. Найбільший контраст у співвідношенні КБД, ТГК і КБН спостерігається в пиляках (без пилку), тобто в тому органі, на поверхні якого розвиваються крупні за розміром головчато-прикріплені залози і відсутні інші типи волосків. Вочевидь саме в головчато-прикріплених залозистих волосках найбільше накопичується КБН, однак, на відміну від ТГК, він не є безпосередньо психотропною речовиною.

Висновки

1. Сумарний вміст канабіноїдів КБД, ТГК і КБН поступово підвищується у вертикальному напрямку рослини конопель, досягаючи максимуму в оцвітині жіночих квіток і пиляках чоловічих квіток, за винятком листків нижньої частини технічної довжини стебла, де відмічається високий вміст канабіноїдів завдяки великій кількості КБН порівняно з ТГК і КБД.

2. Найбільше накопичується канабіноїдів у матірки, найменше – у плосконі, а однодомні рослини за даним показником займають проміжне положення.

3. Пиляки чоловічих квіток виділяються особливо високим вмістом КБН.

4. Методом застосування тонкошарової хроматографії канабіноїдів не виявлено в таких органах рослин конопель, як корінець, гіпокотиль, сім'ядолі маточка жіночих квіток та оболонка і зародок насінини.

5. У зв'язку з максимальним вмістом канабіноїдів в оцвітині жіночих квіток даний орган є найбільш прийнятним для об'єктивної оцінки елітних рослин при селекції на безнаркотичність конопель.

1. *Вировец В. Г.* Методические указания по селекции конопли на снижение содержания каннабиноидов / В. Г. Вировец, Л. М. Горшкова, М. М. Сажко [и др.]. — М. : ВАСХНИЛ, 1985. — 14 с.

2. *Горшкова Л. М.* Каннабіс. Част. І / Л. М. Горшкова. — Глухів : Глух. держ. пед. ун-т, 2007. — 137 с.

3. *Мигаль Н. Д.* О морфологи пыльцы конопли / Н. Д. Мигаль // Ботанический журнал. — 1969. — Т.54. — №2. — с. 374—376.

4. *Горшкова Л. М.* Вміст канабіноїдних сполук у насінні та проростках конопель / Л. М. Горшкова // Зб. наукових праць Ін-ту луб'яних культур УААН. — Суми, 2009. — Вип. 5. — С. 22—26.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАННАБИНОИДОВ В ВЕГЕТАТИВНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНАХ КОНОПЛИ

Мигаль Н.Д., Шульга И.Л.

Исследована динамика накопления каннабиноидов в вегетативных и генеративных органах конопли - в проростках, листьях, околоцветниках и пестиках женских цветков, в листочках околоцветников, пыльниках и пыльце мужских цветков, а также в семенах. Установлены закономерности изменения содержания каннабиноидов в различных органах растения, что целесообразно учитывать в селекции ненаркотических сортов конопли.

DYNAMICS OF CHANGE OF CANNABINOIDS CONTENT IN VEGETATIVE AND GENERATIVE HEMP ORGANS

Myhal M.D., Shulha I.L.

Dynamics of cannabinoids accumulation in vegetative and generative hemp organs – in hypocotyls, leaves, leaves of perianths, anthers and pollen of male flowers and seeds is investigated. Normalities of change of cannabinoids content in different plant's organs were established. They have to be taken into account at breeding of drug-free hemp varieties.