

Скринінг колекційних зразків *Cannabis sativa* L. за особливостями прояву мінорних канабіноїдів

С. В. Міщенко*, Г. І. Кириченко, 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. Аналіз колекційних зразків конопель за вмістом мінорних (малопоширених) непсихотропних канабіноїдів – канабіхромену (КБХ), канабідиварину (КБДВ) та канабінолу (КБН), установлення кореляційних зв'язків між ними та поширеними сполуками, виділення на цій основі цінного селекційного матеріалу. **Методи.** Польові, біохімічні (газова хроматографія канабіноїдних сполук), статистичні (парна, часткова, множинна лінійна кореляція та детермінація). **Результати.** У результаті кількісного аналізу 210 колекційних зразків різного еколого-географічного та генетичного походження (місцеві та дикі форми, самозапилені лінії, гібриди, сорти, синтетичні популяції, поліплоїди) з вмістом тетрагідроканабінолу (ТГК) менше ніж 0,08% у висушених рослинах виявлено КБХ, КБДВ і КБН від відсутності в межах чутливості газового хроматографа до 0,6838; 0,1719 і 0,3274% відповідно. Між ознаками вмісту КБХ і канабідіолу (КБД) є середній негативний взаємозв'язок ($r = -0,53$), КБХ і КБДВ – слабкий негативний взаємозв'язок ($r = -0,35$), а між ознаками вмісту КБХ і ТГК, КБХ і КБН – середній позитивний взаємозв'язок (r становить 0,57 і 0,59 відповідно). Між ознаками вмісту КБДВ і КБД виявлено середній позитивний кореляційний зв'язок ($r = 0,57$), а КБН має сильний позитивний взаємозв'язок з ТГК ($r = 0,82$). Ознака вмісту канабігеролу (КБГ) майже не корелює з досліджуваними мінорними канабіноїдами. Біосинтез мінорних канабіноїдних сполук досить складний, експресія ознак їхнього вмісту залежить від багатьох як генетичних, так і зовнішніх чинників, часткові (за елімінації впливу однієї з трьох ознак) та множинні коефіцієнти кореляції (за визначення зв'язку однієї ознаки й сукупністю двох інших) дають підстави стверджувати, що ген КБХК-синтази має вплив на утворення КБД і, особливо, ТГК. **Висновки.** Тіснота лінійного взаємозв'язку мінорних канабіноїдів між собою й поширеними компонентами дає змогу виділяти для селекції цінні зразки конопель із підвищеним вмістом як однієї, так і декількох сполук за одночасної відсутності чи низького вмісту психотропного ТГК.

Ключові слова: конопелі; генетичні ресурси; синтаза; біосинтез; канабіхромен; канабідиварин; канабінол; кореляція; ген.

Вступ

Специфічними речовинами конопель посівних (*Cannabis sativa* L.) є канабіноїди, які належать до хімічного класу ароматичних сполук і накопичуються переважно в залозистих ворсинках (трихомах) [1–3]. Найбільш поширеними й відомими є тетрагідроканабінолова (ТГКК), канабідіолова (КБДК) та канабігеролова (КБГК) кислоти. У рослинному організмі вони синтезуються в кислотній формі, біоактивні форми канабіноїдів – відповідно тетрагідроканабінол (ТГК), канабідіол (КБД) і канабігерол (КБГ) – утво-

рюються внаслідок реакції декарбоксілювання під впливом зовнішніх умов [4]. Окрім основних, у конопель міститься багато мінорних (малопоширених) канабіноїдів – сполук, уміст яких дуже низький і зазвичай не перевищує 0,5% сухої біомаси. Фармакологічні властивості мінорних канабіноїдів достовірно ще не були підтверджені у клінічних дослідженнях чи раціональних аналізах *in vitro* й *in vivo*. Через відсутність такої біологічної і фармакологічної інформації, мінорні канабіноїди мають певний потенціал як можливі кандидати в лікарські препарати [5]. Якщо зараз спостерігається значна зацікавленість із боку виробників і науковців до ТГК і КБД, то передбачувано в найближчому майбутньому вони зосередять свою увагу на досі ще непізаному різноманітті другорядних мінорних канабіноїдів. Водночас екстракція й очищення цих сполук із рослинних екстрак-

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

Hanna Kyrychenko
<https://orcid.org/0000-0003-3609-3141>

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

тів конопель є досить складним завданням через низький вихід ізолятів, і за умови наступного перероблення – через низьку стабільність речовин [6].

Фармакологічна активність мінорних канабіноїдів нині активно досліджується, зокрема вивчається їхній вплив на рецептори CB1R і CB2R [7], КБГ, канабіхромен (КБХ), канабінол (КБН) і тетрагідроканабіварин (ТГКВ), наприклад, демонструють протисудомні, протизапальні, антибактеріальні й антидепресивні властивості, полегшують біль і сприяють розслабленню м'язів, є ймовірність їх використання як протипухлинних агентів, але необхідне подальше проведення досліджень для підтвердження можливості їхнього застосування в медицині [8].

Біосинтез мінорних канабіноїдів у конопель остаточно не з'ясований, навряд чи вони синтезуються ферментативним шляхом, висунуте припущення, що хімічне перетворення в трихомах під впливом світла, температури й ультрафіолетового випромінювання є основним каталітичним режимом їх утворення, саме ці перетворення можуть пояснити значне хімічне різноманіття й низьку структурну стабільність цих сполук [5, 6].

Попередники біосинтезу канабіноїдів утворюються у двох різних біосинтетичних шляхах: полікетидному, унаслідок чого продукується оліветолова кислота, і пластидному, унаслідок чого продукується геранілдіфосфат, з яких за участю пренілтрансферази синтезується КБГК, що є основним попередником декількох різних канабіноїдів [9]. При цьому специфічні синтази ферментують певну канабіноїдну сполуку: ТГКК-синтаза перетворює КБГК в ТГКК, КБДК-синтаза – у КБДК і КБХК-синтаза – у КБХК [10]. Також виявлено нефункціональний алельний варіант гена ТГКК-синтази: так звана «нульова» ТГКК-синтаза з однонуклеотидним поліморфізмом (SNP), що робить синтазу нездатною перетворювати КБГК в ТГКК, що й призводить до значного накопичення першої сполуки [11]. Крім вищезгаданих ферментів (ТГКК-, КБДК- і КБХК-синтаз) ще не виявлено жодних інших генів чи ферментів, що контролюють біосинтез канабіноїдів від КБГК [5].

Більшість авторів передбачають мембранну локалізацію ферменту КБГК-синтаза і цитозольну локалізацію ТГКК-синтаза, однак нещодавно ТГКК-синтазу виявлено і за межами плазматичної мембрани залозистої клітини та каталіз у неводних умовах [2]. Відтак трихома може відігравати значну роль в утворенні вторинних метаболітів,

вона є біосинтезувальним органом, у якому проходять фотосинтетичні реакції. На користь цього твердження наводяться такі аргументи: 1) майже ідеальна сферична форма в нижньому мікрометричному діапазоні, що сильно сприяє заломленню й фокусуванню світлових променів як у лінзі, заповненій рідиною; 2) підвищення температури до 50 °С під прямими сонячними променями ймовірно прискорює процес утворення зв'язків між атомами карбону та інші хімічні реакції [6]. Загалом, кількість мінорних канабіноїдів сягає мінімум 150 [12], біологічна роль і фізіологічні функції їх у рослинному організмі не відомі, багато з них є артефактами процесів, що йдуть за синтезом основних канабіноїдів, а деякі набувають стабільності після реакцій ацетилювання, метилювання або димеризації. Хімічне різноманіття канабіноїдів досі остаточно не досліджено, а біосинтетичний вплив ферментативного каталізу було переоцінено, тому фотохімічні перетворення у неводному «трихомному біореакторі» стає прийнятною гіпотезою для пояснення закономірностей їхнього виникнення [5]. Отже, у підсумку можна стверджувати про два типи утворення канабіноїдних сполук – ферментативний та неферментативний (фотохімічний).

Слід зазначити, що колекційним зразкам конопель неспорідненого походження властива мінливість ознак основних (поширених) канабіноїдних сполук – КБД, ТГК і КБГ. За результатами проведених досліджень із національною колекцією конопель, уміст КБД у висушених суцвіттях був у межах від 0,0052 до 1,7251%, ТГК – від 0,0000 (відсутності) до 0,0775% (що не перевищує дозволеної законодавством норми), КБГ – від 0,0000 (відсутності) до 0,8892%. Установлений розмах варіації дає змогу виділяти зразки з підвищеним умістом КБД і/або КБГ за відсутності ТГК. Проаналізований матеріал віднесено до трьох хемотипів конопель: III (65,5% від загальної кількості) – це волокнисті коноплі з переважанням КБД і високим співвідношенням КБД : ТГК, у яких уміст ТГК становить від невеликого відсотка до повної відсутності; IV (1,8%) – коноплі з переважанням КБГ, який є основною сполукою, і низьким умістом чи відсутністю ТГК; V (32,7%) – коноплі з повною відсутністю канабіноїдних сполук, які практично не можна виділити в межах чутливості хроматографа. При цьому встановлено сильні кореляційні зв'язки між КБД і ТГК та фактично відсутність взаємозв'язку КБГ з іншими канабіноїдними сполуками, до того ж у зразків

хемотипу III зв'язки слабкіші, порівняно з хемотипом V [13]. Не з'ясованим залишається питання характеризування генетичних ресурсів конопель за вмістом міnorних (малопоширених) непсихотропних канабіноїдів – КБХ, канабидиварину (КБДВ) і КБН, установлення кореляційних зв'язків між ними й поширеними сполуками, виділення джерел та донорів цінних ознак і добір на цій основі вихідного селекційного матеріалу.

Матеріали та методика досліджень

Матеріалом для досліджень слугували 210 зразків з Національної колекції конопель Інституту луб'яних культур НААН України, які належать до різних еколого-географічних типів (північного, середньоевропейського і південного), генетичного походження (місцеві та дикі форми, самозапилені лінії, гібриди, сорти, синтетичні популяції, поліплоїди), були отримані з 10 країн (переважно з України, Росії, Франції, Німеччини та Китаю) і для яких уміст ТГК є в межах дозволеного чинним законодавством показника, що не перевищує 0,08%.

Трирічні польові дослідження (вирощування) проводили у північно-східній частині України на південній межі зони мішаних лісів найбільш низинної ділянки Українського Полісся. Висота над рівнем моря – 166 м, географічні координати місцевості: 51°39' північної широти і 33°59' східної довготи. Грунти в селекційній сівозміні – темно- й світло-сірі лісові, слабкоопідзолені суглинки, утворені на моренній глині. Норма внесення добрив – $N_{120}P_{90}K_{90}$. Погодні умови впродовж років досліджень (2018–2020) були різноманітними й характеризувалися відхиленнями від середньобогаторічних показників температури повітря, кількості опадів і відносної вологості повітря: 2018 і 2020 рр. були спекотними (у вересні до 3,9 °C вище норми) та посушливими протягом вегетації конопель, а 2019 р. характеризувався надмірними опадами з травня до липня і майже їх відсутністю в серпні (9,9 мм). Це дало змогу всебічно оцінити показники колекційних зразків за різних погодних умов.

Для ідентифікації канабіноїдних сполук під час обмолоту рослин конопель, вирощених у розсаднику оцінки за площі живлення 30 × 5 см (фаза ВВСН 89) [14], з кожної ділянки площею 1 м² із суцвіть відбирали об'єднаний зразок рослинного матеріалу, який висушували та зберігали за температури лабораторії. Перед проведенням аналізу зразки висушували до постійної маси за

температури 105 °C у сушильній шафі, подрібнювали до порошкоподібного стану та ретельно перемішували, відбирали проби у двох повтореннях масою 0,5 г та додавали 5 мл метанолу (співвідношення «рослинний зразок : екстрагент» – 1 : 10). Тривалість екстракції становила 24 год, після чого екстракт фільтрували з використанням паперового фільтра. В отриманих метанольних екстрактах рослинних зразків конопель визначали кількісний уміст канабіноїдних сполук методом газової хроматографії на хроматографі HP 6890 Series GC System з детектуванням. Умови хроматографування:

- капілярна колонка – Agilent Technologies 19091J-413 (HP-5), довжина – 30 м, діаметр – 0,320 мм, фаза – 0,25 мкм, SN: USN493366H, постійний потік – 1,5 мл/хв, газ-носії – гелій;
- інжектор – автоінжектор 7683, Split 20 : 1, температура випарника – T = 250 °C; піч – T_{поч} = 100 °C, тримати 2 хв, нагрівання – 15 °C/хв, T_{кін} = 280 °C, тримати 11 хв;
- детектор – полум'яно-іонізаційний;
- проба – 1,0 мкл.

Сполуки ідентифікували за часом утримання. Концентрацію канабіноїдів визначали з використанням внутрішнього стандарту (метиловий ефір стеаринової кислоти у концентрації 0,392% від проби), для чого завдяки використанню програми Chemstation порівнювали площу хроматографічних піків внутрішнього стандарту та площі хроматографічних піків для сполук, які досліджували.

Статистично експериментальні дані обробляли згідно з методикою польового дослідження [15]. Зразком з високим умістом певного канабіноїда вважали матеріал, у якого цей показник був вищим від значення медіани (Me).

Результати досліджень

У результаті кількісного аналізу канабіноїдних сполук виявлено, що КБХ в суцвіттах колекційних зразків конопель містився у невеликій кількості, а саме – від повної відсутності до 0,6836%. Кумулятивний графік розподілу частот значень ознаки вмісту цієї сполуки в усіх досліджених зразках показує, що їх лєвова частка (88,1% від загальної кількості) знаходиться в межах класу 0,0000–0,0683%, значно менша кількість зразків (5,2%) припадає на клас 0,0684–0,1367%, решта (від 0 до 4 зразків, або до 1,9%) належить до інших класів (рис. 1).

КБХ був виділений на самому початку сучасних біохімічних досліджень конопель,

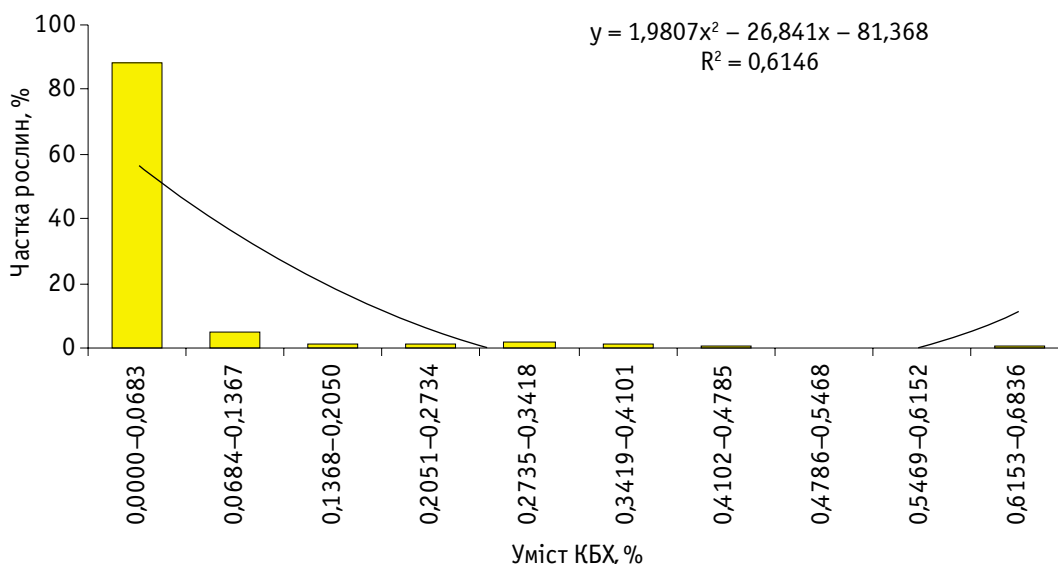


Рис. 1. Кумулятивний графік розподілу частот значень ознаки вмісту КБХ в колекційних зразках конопель (середнє за 2018–2020 рр.)

але є менш вивченим, порівняно з іншими фітоканабіноїдами з позицій біологічного профілю та хімічної активності [16]. Традиційно, разом з КБД, ТГК і КБГ, він вважається основним фітоканабіноїдом і складником так званої «великої четвірки» компонентів канабіноїдних сполук, навіть другим за поширенням, але його концентрація була суттєво завищена через складність поділу КБХ і КБД за умови газової хроматографії з наступним віднесенням площі піка виключно до КБХ. Насправді, концентрація КБХ набагато нижча, вона рідко перевищує 0,2–0,3% сухої біомаси, ніколи не

було виявлено, що КБХ накопичується в одно- чи двоцифрових концентраціях [12]. У наших дослідженнях підтверджено цю особливість.

КБДВ ідентифікований ще в меншій кількості, порівняно з КБХ, – від повної відсутності до 0,1719% сухої біомаси. До класу з умістом 0,0000–0,0171% належить 62,4% від усіх досліджених зразків, з умістом 0,0172–0,0343% – 18,1%, а наступних двох – 11,4 і 4,3% проаналізованих зразків відповідно. Решта класів містить лише від одного до трьох зразків, або від 0,5 до 1,4% від загальної кількості (рис. 2).

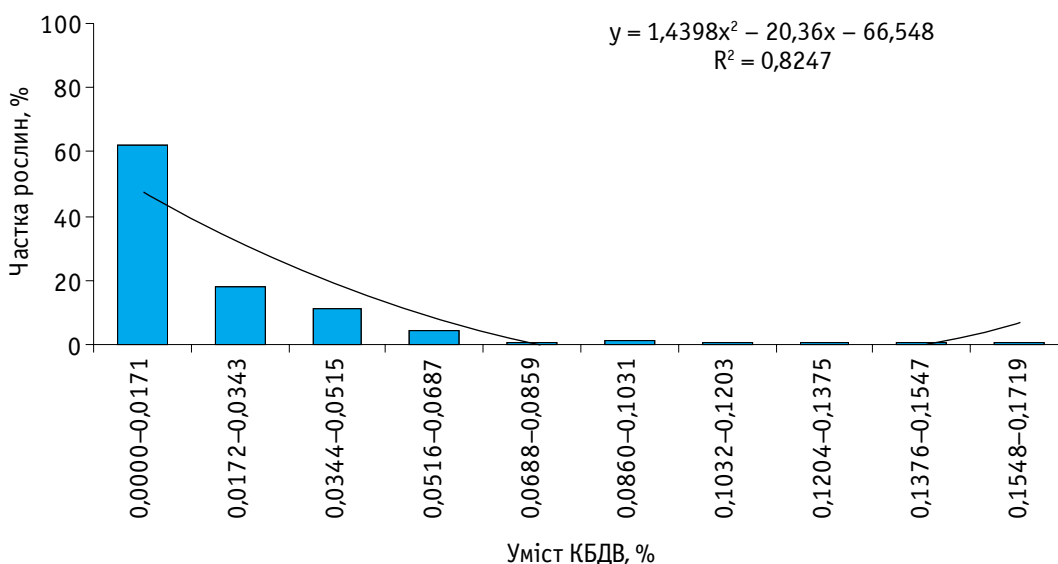


Рис. 2. Кумулятивний графік розподілу частот значень ознаки вмісту КБДВ в колекційних зразках конопель (середнє за 2018–2020 рр.)

Із досліджуваних мінорних канабіноїдів КБН ідентифіковано в найменшій кількості зразків, максимальний уміст його стано-

вив 0,3274%. Кумулятивний графік розподілу частот значень за цією ознакою чітко показує, що у переважній більшості рос-

лин ця сполука відсутня або знаходиться в незначних кількостях, зокрема 192 колекційних зразки з 210 проаналізованих, або 91,4%, містять 0,0000–0,0327% цієї сполуки. При цьому встановлено негативний коефіцієнт ексцесу досліджуваної ознаки,

оскільки 7,6% генотипів містили від 0,0328 до 0,0654% КБН, по 0,5% генотипів – від 0,2620 до 0,2947% і від 0,2948 до 0,3274% відповідно. Рослин з умістом КБН від 0,0655 до 0,2619% не виявлено зовсім (рис. 3).

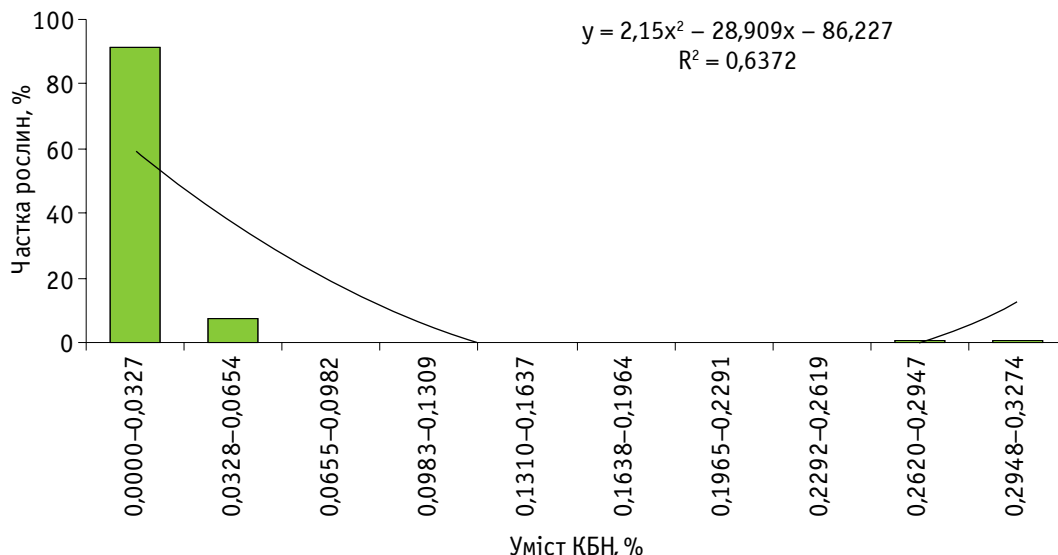


Рис. 3. Кумулятивний графік розподілу частот значень ознаки вмісту КБН у колекційних зразках конопель (середнє за 2018–2020 рр.)

Загалом, виявлені біохімічні особливості колекційних зразків конопель свідчать про складність їх використання в селекції як джерел і донорів ознаки високого вмісту мінорних канабіноїдів. До того ж актуальності набуває питання встановлення кореляцій між канабіноїдними сполуками, оскільки наявність сильних взаємозв'язків може спричинити труднощі у селекційній роботі, коли потрібно підвищити вміст якогось не психотропного компонента, а знизити вміст іншого, наприклад ТГК.

У межах досліджуваних зразків встановлено, що між ознаками вмісту КБХ і КБД є середній негативний взаємозв'язок ($r = -0,53$), КБХ і КБДВ – слабкий негативний ($-0,35$), а між ознаками вмісту КБХ і ТГК, КБХ і КБН – середній позитивний взаємозв'язок (0,57 і 0,59 відповідно). Між ознаками вмісту КБДВ і КБД виявлено середній позитивний кореляційний зв'язок (0,57), а КБН має сильний позитивний взаємозв'язок з ТГК (0,82). Слід зазначити, що КБГ майже не корелює з досліджуваними мінорними канабіноїдами (табл. 1).

Оскільки біосинтез різних канабіноїдних сполук досить складний, а експресія ознак їхнього вмісту залежить від багатьох як генетичних, так і зовнішніх чинників, має сенс встановлення часткової та множинної лінійної кореляції. Часткові коефіцієнти кореля-

Таблиця 1

Кореляційний зв'язок ознак вмісту мінорних канабіноїдів з поширеними сполуками

| Коефіцієнти парної кореляції (r) | КБХ | КБДВ | КБН |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|
| КБД | -0,53* | 0,57* | -0,10* |
| ТГК | 0,57* | -0,12* | 0,82* |
| КБГ | 0,07* | -0,01 | -0,06* |
| КБХ | - | -0,35* | 0,59* |
| КБДВ | - | - | -0,08* |

* істотно на рівні значущості 0,05.

ції свідчать про те, що КБД і ТГК за постійного значення, або виключення (елімінації) КБХ, пов'язані лише слабким позитивним кореляційним зв'язком ($r_{\text{КБД ТГК} \cdot \text{КБХ}} = 0,22$), коли зазвичай між КБД і ТГК є сильна кореляція, коефіцієнти якої можуть наближатися до одиниці. КБН і ТГК, за виключення впливу КБХ, пов'язані сильним взаємозв'язком ($r_{\text{КБН ТГК} \cdot \text{КБХ}} = 0,97$). Зважаючи на коефіцієнт детермінації, ця закономірність у 94% випадків виявляється саме під впливом досліджуваних чинників. На відміну від парної кореляції, взаємозв'язок КБХ і КБН за елімінації впливу ТГК і навпаки (взаємозв'язок КБХ і ТГК за елімінації впливу КБН) є слабким ($r_{\text{КБХ КБН} \cdot \text{ТГК}} = 0,26$ і $r_{\text{КБХ ТГК} \cdot \text{КБН}} = 0,19$) (табл. 2).

За множинної кореляції трьох змінних (показника тісноти лінійного зв'язку між од-

Таблиця 2

**Часткові й множинні коефіцієнти лінійної кореляції
та детермінації між ознаками вмісту мінорних і поширених
канабіноїдів**

| Часткова лінійна кореляція | | | Множинна лінійна кореляція | | |
|----------------------------|--------|------|----------------------------|-------|----------------|
| Ознаки | r | d | Ознаки | R | R ² |
| КБД ТГК • КБХ | 0,22* | 0,05 | КБХ • КБД ТГК | 0,58* | 0,34 |
| КБД КБДВ • КБХ | 0,50* | 0,25 | КБХ • КБД КБДВ | 0,59* | 0,35 |
| КБН ТГК • КБХ | 0,97* | 0,94 | КБХ • КБН ТГК | 0,99* | 0,98 |
| КБХ ТГК • КБД | 0,60* | 0,36 | КБД • ТГК КБХ | 0,57* | 0,33 |
| КБХ КБДВ • КБД | 0,07* | 0,01 | КБД • КБДВ КБХ | 0,67* | 0,45 |
| КБХ КБД • ТГК | -0,56* | 0,32 | ТГК • КБД КБХ | 0,68* | 0,46 |
| КБХ КБН • ТГК | 0,26* | 0,07 | ТГК • КБН КБХ | 0,83* | 0,68 |
| КБХ КБД • КБДВ | -0,43* | 0,18 | КБДВ • КБД КБХ | 0,57* | 0,33 |
| КБХ ТГК • КБН | 0,19* | 0,03 | КБН • ТГК КБХ | 0,83* | 0,68 |

* істотно на рівні значущості 0,05.

нією з ознак і сукупністю двох інших ознак) усі досліджувані мінорні канабіноїди на середньому чи сильному рівні залежать від сукупного впливу різних сполук. Найсильніше залежить уміст КБХ від взаємодії КБН і ТГК ($R_{\text{КБХ} \cdot \text{КБН ТГК}} = 0,99$, $R^2 = 0,98$), у свою чергу вміст ТГК і КБН сильно залежить від взаємодії КБХ з певною канабіноїдною сполукою ($R_{\text{ТГК} \cdot \text{КБН КБХ}}$ і $R_{\text{КБН} \cdot \text{ТГК КБХ}}$ становлять $0,83$, $R^2 = 0,68$). Звідси випливає закономірність, що КБХ має істотний вплив на рівень накопичення основних канабіноїдів, хоча за поширеними теоріями генетичної детермінації вмісту канабіноїдів успадковується незалежно.

Останні дослідження [17] свідчать, що тоді як високий рівень транскрипції ТГКК-та КБДК-синтази чітко відображає хімічний фенотип конопель, низький, але стабільний рівень транскрипції КБХК-синтази в усіх генотипах передбачає, що ці гени можуть робити внесок в остаточну кількість канабіноїдів. Було висунуто гіпотезу, що КБХК-синтази не лише є ферментами для перетворення КБГК в КБХК, а й можуть брати участь в утворенні ТГКК у матеріалі з переважанням КБД, відтак реципрокний (взаємний) вплив груп генів має місце в кількісному вираженні хемотипу [17].

Проведений скринінг великої кількості колекційних зразків за ознаками вмісту канабіноїдів та встановлення взаємозв'язків між ними дає підстави стверджувати, що наявність високого вмісту КБХ у зразків,

які переважно належать до хемотипу III (з високим співвідношенням КБД : ТГК), взаємопов'язана з високим умістом ТГК. Можна припустити, що ген КБХК-синтази не знаходиться в незалежному локусі, у цьому разі діє складніший генетичний механізм детермінації синтезу канабіноїдів і ген КБХК-синтази, наприклад, має декілька зчеплених локусів, зокрема з генами КБДК-синтази й, особливо, ТГКК-синтази.

КБН – кінцевий продукт біосинтезу ТГК – ароматизований ТГК, продукт окиснення, який зазвичай ідентифікується, якщо рослинний матеріал конопель або ізолюваний ТГК тривалий час зазнає впливу ультрафіолетового випромінювання чи сонячного світла [5, 18], тому логічними є встановлені нами особливості кореляції КБН з ТГК і КБХ: чим більше синтезувалося ТГК, тим більша його частина могла перетворитися в КБН, чим активніше діяла КБХК-синтаза, тим більше накопичилося ТГК. Оскільки КБДВ – n-пропіловий аналог КБД [18], то середній кореляційний зв'язок між зазначеними сполуками є очевидним.

У результаті дослідження колекції генетичних ресурсів цієї культури вдалося виділити цінні колекційні зразки (джерела й донори ознак) для практичної селекції сортів промислових конопель медичного напрямку використання, а саме – з високим умістом мінорних канабіноїдів і вмістом психотропного ТГК в межах дозволеної чинним законодавством норми. Тіснота лінійного взаємозв'язку мі-

Таблиця 3

Джерела й донори ознак високого вмісту мінорних канабіноїдів за вмісту ТГК < 0,08%

| Ознака | Номер колекційного зразка конопель у національному каталозі |
|--------------------------|---|
| Високий уміст КБХ | UF0600506, UF0600721, UF0600723, UF0600724, UF0600727 |
| Високий уміст КБДВ | UF0600040, UF0600045, UF0600116, UF0600409, UF0600442, UF0600565, UF0600690 |
| Високий уміст КБН | UF0600253, UF0600254 |
| Високий уміст КБДВ і КБД | UF0600116, UF0600409, UF0600442, UF0600565, UF0600690 |

норних канабіноїдів між собою та поширеними компонентами дає змогу знаходити вихідний матеріал із зазначеними вище особливостями, тобто рослини-контркорелянти, зокрема з високим вмістом КБХ виділено п'ять зразків (2,4% від загальної кількості проаналізованих), КБДВ – сім зразків (3,3%), КБН – два зразки (1,0%), нарешті з поєднанням високого вмісту КБДВ і поширеної сполуки КБД – п'ять зразків (2,4%) (табл. 3).

Висновки

У проаналізованих колекційних зразках конопель вміст КБХ не перевищував 0,6836%, КБДВ – 0,1719% і КБН – 0,3270%, у переважній більшості з них мінорні канабіноїди взагалі не ідентифіковано. Рівень накопичення деяких мінорних канабіноїдів залежить від впливу багатьох як генетичних, так і зовнішніх чинників, встановлено різний характер кореляційних зв'язків між ними: КБДВ найбільш пов'язаний з КБД, КБН – з ТГК, ознака вмісту КБХ має вплив на формування КБД і, особливо, ТГК. Тісно-лінійного взаємозв'язку мінорних канабіноїдів між собою й поширеними компонентами дає змогу виділяти для селекції цінні зразки з підвищеним вмістом як однієї, так і декількох сполук, за одночасної відсутності чи низького вмісту психотропного ТГК.

Використана література

1. Мигаль М. Д., Кмець І. Л., Лайко І. М. Трихоми і канабіноїди конопель. До теорії селекції ненаркотичних сортів. Суми : ФОП Щербина І. В., 2017. 228 с.
2. Rodziewicz P., Lorocho S., Marczak Ł. et al. Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of *Cannabis sativa* L. glandular trichomes. *Plant Sci.* 2019. Vol. 284. P. 108–116. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.04.008
3. Livingston S. J., Quilichini T. D., Booth J. H. et al. Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *Plant J.* 2020. Vol. 101, Iss. 1. P. 37–56. doi: 10.1111/tj.14516
4. 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
5. Nguyen G.-N., Kayser O. Biosynthesis and chemical modifications of minor cannabinoids. *eLS*. Chichester : John Wiley & Sons, 2020. P. 1–9. doi: 10.1002/9780470015902.a0028875
6. Thomas F. J., Kayser O. Minor cannabinoids of *Cannabis sativa* L. *JMS*. 2019. Vol. 88, Iss. 3. P. 141–149. doi: 10.20883/jms.367
7. Zagzoog A., Mohamed K. A., Kim H. J. J. et al. *In vitro* and *in vivo* pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. 20405. doi: 10.1038/s41598-020-77175-y
8. Clarke H., Roychoudhury P., Narouze S. N. Other phytocannabinoids. *Cannabinoids and Pain* / S. N. Narouze (Ed.) Cham : Springer, 2020. P. 87–92. doi: 10.1007/978-3-030-69186-8_12
9. Zirpel B., Kayser O., Stehle F. Elucidation of structure-function relationship of THCA and CBDA synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biotechnol.* 2018. Vol. 284. P. 17–26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.031

10. Taura F., Tanaya R., Sirikantaramas S. Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology. *ScienceAsia*. 2019. Vol. 45, Iss. 5. P. 399–407. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2019.45.399
11. Garfinkel A. R., Otten M., Crawford S. SNP in potentially defunct tetrahydrocannabinolic acid synthase is a marker for cannabigerolic acid dominance in *Cannabis sativa* L. *Genes*. 2021. Vol. 12, Iss. 2. 228. doi: 10.3390/genes12020228
12. Hanuš L. O., Meyer S. M., Muñoz E. et al. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.* 2016. Vol. 33, Iss. 12. P. 1357–1392. doi: 10.1039/C6NP00074F
13. Кириченко Г. І., Лайко І. М., Міщенко С. В. Аналіз колекційних зразків *Cannabis sativa* L. за вмістом канабіноїдних сполук і хемотипом. *Генетичні ресурси рослин*. 2019. № 25. С. 115–128. doi: 10.36814/pgr.2019.25.09
14. Mishchenko S., Mokher J., Laiko I. et al. Phenological growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.): codification and description according to the BBCH scale. *Žemės ūkio mokslai*. 2017. Vol. 24, Iss. 2. P. 31–36. doi: 10.6001/zemesukiomokslai.v24i2.3496
15. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. Москва : Агропромиздат, 1985. 351 с.
16. Pollastro F., Caprioglio D., Pretea D. D. et al. Cannabichromene. *Nat. Prod. Commun.* 2018. Vol. 13, Iss. 9. P. 1189–1194. doi: 10.1177/1934578X1801300922
17. Fulvio F., Paris R., Montanari M. et al. Analysis of sequence variability and transcriptional profile of cannabinoid synthase genes in *Cannabis sativa* L. chemotypes with a focus on cannabichromenic acid synthase. *Plants*. 2021. Vol. 10, Iss. 9. 1857. doi: 10.3390/plants10091857
18. Tuner S. E., Williams C. M., Iversen L., Whalley B. J. Molecular pharmacology of phytocannabinoids. *Phytocannabinoids. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* / A. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi (Eds.). Cham : Springer, 2017. Vol. 103. P. 62–101. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_3

References

1. Myhal, M. D., Kmets, I. L., & Laiko, I. M. (2017). *Trykhomy i kanabinoidy konopel. Do teorii seleksii nenarkotychnykh sortiv* [Hemp trichomes and cannabinoids. To the theory of breeding of non-narcotic varieties]. Sumy: FOP Shcherbina I. V. [in Ukrainian]
2. Rodziewicz, P., Lorocho, S., Marczak, Ł., Kayser, O., & Sickmann, A. (2019). Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of *Cannabis sativa* L. glandular trichomes. *Plant Sci.*, 284, 108–116. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.04.008
3. Livingston, S. J., Quilichini, T. D., Booth, J. H., Wong, D. C. J., Rensing, K. H., Laflamme-Yonkman, J., ... Samuels, A. L. (2020). Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *Plant J.*, 101(1), 37–56. doi: 10.1111/tj.14516
4. 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
5. Nguyen, G.-N., & Kayser, O. (2020). Biosynthesis and chemical modifications of minor cannabinoids. In *eLS* (pp. 1–9). Chichester: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9780470015902.a0028875
6. Thomas, F. J., & Kayser, O. (2019). Minor cannabinoids of *Cannabis sativa* L. *JMS*, 88(3), 141–149. doi: 10.20883/jms.367
7. Zagzoog, A., Mohamed, K. A., Kim, H. J., Kim, E. D., Frank, T. B., Jadhav, P. D., Holbrook, L. A., & Laprairie, R. B. (2020). *In vitro* and *in vivo* pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*. *Sci. Rep.*, 10, 20405. doi: 10.1038/s41598-020-77175-y
8. Clarke, H., Roychoudhury, P., & Narouze, S. N. (2020). Other phytocannabinoids. In S. N. Narouze (Ed.), *Cannabinoids and Pain*

- (pp. 87–92). Cham: Springer. doi: 10.1007/978-3-030-69186-8_12
9. Zirpel, B., Kayser, O., & Stehle, F. (2018). Elucidation of structure-function relationship of THCA and CBDA synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biotechnol.*, 284, 17–26. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.031
 10. Taura, F., Tanaya, R., & Sirikantaramas, S. (2019). Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology. *ScienceAsia*, 45(5), 399–407. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2019.45.399
 11. Garfinkel, A. R., Otten, M., & Crawford, S. (2021). SNP in potentially defunct tetrahydrocannabinolic acid synthase is a marker for cannabigerolic acid dominance in *Cannabis sativa* L. *Genes*, 12(2), 228. doi: 10.3390/genes12020228
 12. Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatalata-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Nat. Prod. Rep.*, 33(12), 1357–1392. doi: 10.1039/C6NP00074F
 13. Kyrychenko, H. I., Laiko, I. M., & Mishchenko, S. V. (2019). Analysis of *Cannabis sativa* L. collection accessions for cannabinoid contents and chemotype. *Genetični resursi roslin* [Plant Genetic Resources], 25, 115–128. doi: 10.36814/pgr.2019.25.09 [in Ukrainian]
 14. Mishchenko, S., Mokher, J., Laiko, I., Burbulis, N., Kyrychenko, H., & Dudukova, S. (2017). Phenological growth stages of hemp (*Cannabis sativa* L.): codification and description according to the BBCH scale. *Žemės ūkio mokslai*, 24(2), 31–36. doi: 10.6001/zemesukiomokslai.v24i2.3496
 15. Dospikhov, B. A. (1985). *Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy)* [Methods of field experiment (with the basics of statistical processing of research results)] (5th ed., rev. and enl.). Moscow: Agropromizdat. [in Russian]
 16. Pollastro, F., Caprioglio, D., Pretea, D. D., Rogatia, F., Minasia, A., Tagliatalata-Scafati, O., Munoz, E., & Appendino, G. (2018). Cannabichromene. *Nat. Prod. Commun.*, 13(9), 1189–1194. doi: 10.1177/1934578X1801300922
 17. Fulvio, F., Paris, R., Montanari, M., Citti, C., Cilento, V., Bassolino, L., ... Mandolino, G. (2021). Analysis of sequence variability and transcriptional profile of cannabinoid synthase genes in *Cannabis sativa* L. chemotypes with a focus on cannabichromenic acid synthase. *Plants*, 10(9), 1857. doi: 10.3390/plants10091857
 18. Tüner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., & Whalley, B. J. (2017). Molecular pharmacology of phytocannabinoids. In A. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi (Eds.), *Phytocannabinoids. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 103, pp. 62–101). Cham: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_3

UDC 633.522:631.52:577

Mishchenko, S. V.*, **Kyrychenko, H. I.**, & **Laiko, I. M.** (2021). Genotype screening of *Cannabis sativa* L. based on the specifics of minor cannabinoids manifestation. *Plant Varieties Studying and Protection*, 17(3), 218–225. <https://doi.org/10.21498/2518-1017.17.3.2021.242949>

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

Purpose. Analysis of hemp collection samples based on the content of minor (rare) non-psychoactive cannabinoids, such as cannabichromene (CBC), cannabidivarin (CBDV), and cannabiol (CBN); determination of correlation relationships between them and common compounds; selection of valuable breeding genotypes. **Methods.** Field, biochemical (gas chromatography of cannabinoid compounds), and statistical (pair, partial, and multiple linear correlations). **Results.** Quantitative analysis of 210 samples of various ecological-geographical and genetic origin (local and wild forms, self-filing lines, hybrids, varieties, synthetic populations, polyploids) with a tetrahydrocannabinol (THC) content of less than 0.08% in dried plants showed the level of manifestation of the trait from its absence within the sensitivity of the gas chromatograph up to 0.6838% CBC, 0.1719% CBDV and 0.3274% CBN. In the studied hemp samples, a medium negative relationship was found between the signs of the CBC and cannabidiol (CBD) contents ($r = -0.53$), a weak negative relationship between CBC and CBDV contents ($r = -0.35$), medium positive relationships between the signs of CBC and THC con-

tents ($r = 0.57$) and CBC and CBN contents ($r = 0.59$). A medium positive correlation ($r = 0.57$) was found between the signs of CBDV and CBD contents, while CBN had a strong positive relationship with THC ($r = 0.82$). There is almost no correlation between cannabigerol (CBG) and the minor cannabinoids under study. The biosynthesis of minor cannabinoid compounds is quite complex. Signs manifestation is affected by many genetic and external factors. Partial correlation coefficients (given that one of the three signs is eliminated) and multiple correlation coefficients (given that the relationship of one sign is determined and two other signs are combined) give grounds to state that the gene for CBCA-synthase affects the production of CBD and, in particular THC. **Conclusions.** The closeness of the linear relationships between minor cannabinoids and common components allows selecting valuable hemp samples with a high content of one or several compounds under the absence or low content of psychoactive THC.

Keywords: hemp; genetic resources; sample; biosynthesis; cannabichromene; cannabidivarin; cannabiol; correlation; gene.

Надійшла / Received 02.09.2021
Погоджено до друку / Accepted 22.09.2021