

大麻种质资源中大麻素化学型及基因型鉴定与评价

陈璇, 许艳萍, 张庆滢, 郭孟璧, 郭蓉, 杨明, 郭鸿彦

(云南省农业科学院经济作物研究所, 昆明 650205)

摘要:大麻素(cannabinoids)是大麻植物中特有的次生代谢产物,主要成分为四氢大麻酚(THC, tetrahydrocannabinol)和大麻二酚(CBD, cannabidiol)。本研究通过对我国不同来源地的23份大麻种质资源共69个单株材料中THC和CBD含量特征及其合成关键酶基因多态性进行分析,鉴定了我国大麻种质资源的大麻素化学型及基因型。结果显示,69个单株中大麻素含量差异显著,THC含量均值为0.56%,范围为0.01%~2.45%;CBD含量均值为0.53%,范围为0~2.24%;根据CBD/THC含量比值,大麻资源可划分为毒品型(占44.93%)、中间型(占20.29%)和纤维型(占34.78%)3种大麻素化学型,毒品型、中间型中分别有93.5%和71.4%的植株中THC含量>0.3%,纤维型植株中THC含量≤0.08%。3种化学型遗传位点(共显性位点B)的基因型分别为 B_T/B_T 、 B_T/B_D 和 B_D/B_D ; B_T 等位基因(*THCAS*)存在10个变异位点,氨基酸序列有4处变异, B_D 等位基因(*CBDAS*)存在4个变异位点,均为同义突变。根据*THCAS*和*CBDAS*基因多态性,设计了一个共显性复合PCR分子标记,可准确鉴定出大麻3种化学型。研究结果揭示了我国大麻种质资源中大麻素含量、化学型和基因型三者之间的关系,可为大麻素遗传研究与利用提供理论依据。

关键词:大麻素;四氢大麻酚;大麻二酚;化学型;基因型

Identification and Assessment of Chemotype and Genotype of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L.

CHEN Xuan, XU Yan-ping, ZHANG Qing-ying, GUO Meng-bi, GUO Rong, YANG Ming, GUO Hong-yan

(Industrial Crop Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205)

Abstract: Cannabinoids are specific secondary metabolites in the plant of *Cannabis sativa* L. Tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) are the main constituents of cannabinoids. To distinguish the chemotype and genotype of cannabinoids of *Cannabis* germplasm, 23 *Cannabis* germplasm resources (including 69 single plants) from different areas of China were selected to analyze content characteristics of THC and CBD, and also gene polymorphism of key enzymes in the pathway of cannabinoid biosynthesis. The results showed that the cannabinoid contents of 69 single plants were significantly different. The average content of THC was 0.56% ranging from 0.01% to 2.45%. The average content of CBD was 0.53% ranging from 0 to 2.24%. According to CBD/THC ratio, all *Cannabis* plants can be divided into 3 chemotypes: drug-type (accounting for 44.93%), intermediate-type (accounting for 20.29%) and fiber-type (accounting for 34.78%). The THC content of these plants, including 93.5% plants among drug-type and 71.4% plants among intermediate-type, were more than 0.3%. The THC content of plants in fiber-type were less than 0.08%. Genotypes in drug-type, intermediate-type and fiber-type were B_T/B_T , B_T/B_D and B_D/B_D , respectively. The sequences alignment showed that B_T allele (*THCAS*) had 10 mutation sites in nucleotide sequences, and 4 mutation sites in the deduced amino acids. The B_D allele (*CBDAS*) had 4 mutation sites in nucleotide sequences, but no mutation in the deduced amino acids. According to the polymorphism of *THCAS* and *CBDAS*, a codominant multiplex PCR

收稿日期:2015-12-07 修回日期:2016-01-25 网络出版日期:2016-08-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160812.1316.036.html>

基金项目:国家自然科学基金项目(31660407、31160296);国家麻类产业技术体系项目(CARS-19-E05);云南省科技计划面上项目(2012FB190)

第一作者主要从事麻类作物分子育种研究。E-mail: chenxuan9239@163.com

通信作者:郭鸿彦,主要从事麻类作物育种研究。E-mail: yanhong38@hotmail.com

molecular marker was designed to identify three chemotypes of cannabinoids. This study revealed that the relationship among cannabinoid contents, chemotypes and genotypes can provide a theoretical foundation for genetic research and utilization of cannabinoids.

Kew words: cannabinoids; tetrahydrocannabinol; cannabidiol; chemotype; genotype

大麻 (*Cannabis sativa* L.) 为大麻科 (Cannabaceae) 大麻属 (*Cannabis* L.) 一年生草本植物, 多为雌雄异株, 是我国传统经济作物, 其利用涉及纺织、造纸、建材、食品及制药等多个方面^[1]。大麻素 (cannabinoids) 是大麻植物中特有的次生代谢产物, 主要成分为四氢大麻酚 (THC, tetrahydrocannabinol; 致幻成瘾成分)、大麻二酚 (CBD, cannabidiol; 非致幻成瘾的药用成分)、大麻环萜酚 (CBC, cannabichromene) 和大麻萜酚 (CBG, cannabigerol) 等, 其中又以雌株花叶中 THC 和 CBD 的含量最高^[2-3]。近年来, 随着世界各地对大麻经济价值的发掘和利用力度加大, 欧盟、加拿大及我国云南省等地均以法律形式规定植株中 THC 含量 $< 0.3\%$ 的大麻品种为工业大麻, 工业大麻无毒品利用价值, 获得种植许可后可以规模化种植^[4]。

大麻素主要存在于大麻雌株中, 以雌株始果期顶部花叶中含量最高, 通常用雌株花叶来分析大麻素含量和大麻素化学型^[5]。E. Small 等^[6]基于 THC 与 CBD 的绝对含量将大麻分为毒品型大麻 (I 型: THC $> 0.3\%$, CBD $< 0.5\%$)、中间型大麻 (II 型: THC $> 0.3\%$, CBD $> 0.5\%$) 和纤维型大麻 (III 型: THC $< 0.3\%$, CBD $> 0.5\%$) 3 种化学型, 并认为 THC $< 0.3\%$ 的大麻植株不具备成瘾性。D. Pacifico 等^[7]则根据大麻素的相对含量 (即 CBD/THC 含量比值) 作为划分大麻素化学型的标准, 将大麻植株分为毒品型大麻 (I 型: 以 THC 为主要成分, 含微量 CBD, CBD/THC 比值接近零)、中间型大麻 (II 型: THC 和 CBD 均为主要成分, CBD/THC 比值接近 1, 通常为 0.5 ~ 3.0)、纤维型大麻 (III 型: 以 CBD 为主要成分, 含微量 THC, CBD/THC 比值远大于 1)。除了上述 3 种化学型外, 还存在主要成分为 CBG 的 IV 型和不含大麻素的 V 型, 但是这两类化学型较少见^[8-10]。大麻素绝对含量受雌雄性别、发育阶段、存在部位等生物因子影响, 同时受到环境温度、光照强度、紫外线强度、营养供给和干旱等非生物环境因子的影响^[11-13], 而大麻素相对含量在植株整个生育期较稳定, 不易受外界因子影响^[3, 14]。

大麻素是经过一系列生化反应合成而来, 合

成途径中第一个大麻素成分为大麻萜酚酸 (CBGA), CBGA 作为共同底物在 3 个不同合成酶的作用下分别合成四氢大麻酚酸 (THCA)、大麻二酚酸 (CBDA) 及大麻环萜酚酸 (CBCA), 三者脱羧即形成 THC、CBD 和 CBC^[15]。CBC 主要存在于大麻幼苗中, CBG 和 CBC 在大麻营养生长期、花期、果期等发育阶段含量极低^[11, 16]。THC 和 CBD 为成熟大麻植株中大麻素主要成分, 二者互为同分异构体, 其含量约占大麻素总含量的 77% ~ 100%^[17]。E. P. M. de Meijer 等^[17]通过自交培育了 THC 纯系和 CBD 纯系, 并对这两个纯系的杂交 F_1 及 F_2 个体中大麻素含量进行了分析, 提出 THC 和 CBD 性状可能由同一位点 (B) 上的两个共显性等位基因 (B_T 和 B_D) 控制, 由此推断 B 位点为 B_T/B_T 时表现为毒品型 (I 型); B 位点为 B_D/B_D 时表现为纤维型 (III 型); B 位点为 B_T/B_D 时表现为中间型 (II 型); E. P. M. de Meijer 等^[10]还提出, B 位点可能存在于一个变异位点 B_0 , 当处于 B_0/B_0 时表现为 IV 型, IV 型植株中以 CBG 为主, 含少量 CBD。

我国是大麻起源地之一, 种质资源非常丰富, 我国资源中大麻素含量情况还鲜见报道, 大麻素化学型和基因型更是无从得知。本研究选取全国代表性大麻主产区的资源, 涵盖野生资源、地方品种及选育品种在内的 23 份大麻种质资源, 分析了各群体内单株中大麻素含量特征和化学型特征, 并针对大麻素合成关键酶基因位点 (B) 开展了等位基因多态性研究, 旨在揭示我国大麻种质资源中大麻素含量、化学型和基因型三者之间的关系, 并尝试开发出化学型特异分子标记, 为大麻素遗传研究与利用、工业大麻新品种选育等提供理论依据和技术手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来源于云南省农业科学院经济作物研究所大麻种质资源库 (表 1)。云南省作为我国大麻的主产区之一, 也是我国现阶段工业大麻新品种选育原始材料的主要来源地, 生态环境多样, 大麻资源非常丰富, 因此选取了云南多份大麻资源作为研究对象。

表 1 供试大麻种质资源

Table 1 The tested resources of *Cannabis sativa* L.

序号 No	资源名称 Resource name	来源地 Source	海拔(m) Altitude	纬度(°N) Latitude	材料类型 Resource type
1	云麻 1 号	云南昆明	2000	25.6	工业大麻选育品种
2	ZY3	云南昆明	1920	25.8	地方品种
3	ZY16	西藏林芝	3000	29.6	野生资源
4	ZY23	云南昆明	2200	25.3	地方品种
5	ZY35	云南昆明	1906	24.5	地方品种
6	ZY52	云南昭通	2520	27.7	地方品种
7	ZY77	云南曲靖	1892	25.7	地方品种
8	ZY102	贵州六盘水	2200	26.9	地方品种
9	ZY122	云南大理	1900	25.3	地方品种
10	ZY151	安徽六安	47	31.5	地方品种
11	ZY162	甘肃酒泉	1453	39.5	地方品种
12	ZY188	云南昭通	2310	27.1	地方品种
13	ZY221	陕西延安	1047	36.1	地方品种
14	ZY225	陕西榆林	1430	37.5	地方品种
15	ZY235	陕西延安	1139	36.4	地方品种
16	ZY265	贵州毕节	2200	26.2	地方品种
17	ZY270	云南大理	2938	26.3	地方品种
18	ZY280	安徽淮北	50	33.9	地方品种
19	ZY328	广西河池	712	24.3	地方品种
20	ZY369	云南文山	1540	23.4	地方品种
21	ZY382	云南玉溪	718	23.6	地方品种
22	ZY400	云南红河	1600	24.6	地方品种
23	ZY455	云南文山	1400	22.7	地方品种

1.2 材料种植和采样

所有试验材料均采用种子种植,2014 年 5 月种植在云南省昆明市官渡区小哨大麻试验基地,按照株行距 0.8 m × 1.5 m 的籽用型种植模式,采用大田生产常规管理。取样过程中,根据不同品种资源的生育期分批选择取样时间,同一份品种资源同一天取样,每份资源选择处于始果期的 3 株雌性植株取样,取雌株主茎顶部约 15 cm 花穗(含叶片)用于大麻素含量测定,共 69 份样品,编号 S₁ ~ S₆₉。取样的同时取同株嫩叶提取基因组总 DNA。

1.3 大麻素含量检测及化学型鉴定

THC 等大麻素含量检测参照云南省地方标准《工业大麻 品种类型》(DB53/295.1-2009)中推荐的检测方法。液相色谱检测条件:色谱柱:Zorbax SB-C18(4.6 mm × 150 mm,5 μm);流动相:乙腈:磷酸盐缓冲液(pH4.0)(85:15);流速:1.0 mL/min;

检测波长:220 nm;柱温:30 ℃。进样量为 10 μL,按外标法以峰面积定量,同时计算样品中 THC 和 CBD 占花叶干重的百分比含量。每份样品进样 3 次,取含量平均值。计算大麻素相对含量(CBD/THC 比值)来判定大麻素化学型。

1.4 大麻素合成关键酶基因多态性比对

参照陈璇等^[18]方法提取大麻基因组 DNA 作 PCR 扩增的模板。采用先前用于克隆墨西哥大麻 *THCA* 合成酶基因(*THCAS*, GenBank 序列号 AB057805)的特异性引物(F: 5'-TGAAGAAAAAATGAATTGCTCAGCAATT TTCC -3'和 R: 5'-TCTATTTAAAGATAATTAATGATGATCGGTGG -3')、*CBDAS* 合成酶基因(*CB-DAS*, GenBank 序列号 AB292682)的特异性引物(F: 5'-GGGGATCCATGAAGTGCTCAACATTCTC -3'和 R: 5'-CTAGCTGAGCTCTTAATGACGATGCCGTGG -3')^[19-20],改进扩增条件后对 23 个试验材料进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:总体积 50 μL,正反引物各 2 μL(引物母液为 10 μmol/L),dNTP 为 2 μL(母液为 10 mmol/L),模板 DNA 为 2 μL(100 ng),高保真 DNA 聚合酶为 1 U,10 × Buffer 为 5 μL,其余用水补齐。扩增条件:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,59.5 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环;72 ℃延伸 7 min。PCR 扩增产物进行双向测序,使用 DNASTar 软件中 SeqMan 程序进行拼接及人工校对。每个样品重复扩增 3 次,测序 3 次。

使用 DNASTar 软件中 MegAlign 程序将测得的多态性序列进行比对,并设计 3 条特异性引物,A 引物(5'-AGTTGGCTTGCAGATTGCAACTCG-3',为 *THCAS* 和 *CBDAS* 序列上共有序列),B 引物(5'-GGAAAAATT GAAGAGAAGTAACCA-3',用于特异结合 *THCAS*),C 引物(5'-GCCTTGCTTCTCCCAACTA-CATA-3',用于特异结合 *CBDAS*)。PCR 反应体系:总体积 25 μL,引物 A 为 0.5 μL、B 为 1 μL、C 为 1 μL(母液均为 10 μmol/L),dNTP 为 2 μL(母液为 10 mmol/L),模板 DNA 为 2 μL(100 ng),Taq DNA 聚合酶为 1 U,10 × Buffer 为 2.5 μL,其余用水补齐。扩增条件:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 90 s,35 个循环;72 ℃延伸 7 min。

2 结果与分析

2.1 大麻种质资源中大麻素含量及化学型鉴定

对我国不同地理来源地的 23 份大麻资源共 69 个雌性植株中大麻素含量进行了检测。结果显示(表 2),69 个单株资源中均含有 THC,平均值为

0.56%,标准差为 0.57%,其中有 39 个单株(占 56.52%)中 THC > 0.3%,云南玉溪的 ZY382(S₆₃) THC 含量最高(2.45%),安徽淮北的 ZY280(S₅₃和 S₅₄)含量最低,为 0.01%。CBD 含量平均值为 0.53%,标准差为 0.63%,其中云南昆明的 ZY3(S₆)中 CBD 含量最高(2.24%),ZY16(S₇)等 18 份单株资源未检出 CBD。THC 和 CBD 含量之和介于 0.21%(S₅₇)~2.93%(S₄₇)。结果说明,我国大麻种质资源中大麻素含量差异显著,没有发现不含大麻素的植株,THC 和 CBD 含量最高的资源均来自云南地区。

根据大麻素的相对含量(CBD/THC 比值)对 69 个单株资源进行化学型分类,结果显示(表 2):毒品型(I 型)为 31 个,占 44.93%,中间型(II 型)为 14 个,占 20.29%,纤维型(III 型)为 24 个,占 34.78%。I 型:II 型:III 型数量比值约为 2.2:1:1.7,说明自然

界中大麻植物以毒品型和纤维型为主,推测中间型是毒品型和纤维型杂交的结果。从资源来源地来看,有 7 份资源的 3 个单株均为 I 型,有 5 份资源的 3 个单株均为 III 型,只有 1 份资源的 3 个单株均为 II 型。另外 10 份资源为混合化学型,其中 5 份资源为 I 型/II 型,1 份资源为 I 型/III 型,3 份资源为 II 型/III 型,1 份资源为 I 型/II 型/III 型。结果说明,大麻资源群体以同质化学型为主,但混合化学型也较普遍。14 个中间型(II 型)材料来自 10 个不同地方,使用 SPSS 软件分析 THC 和 CBD 含量之间的相关性。结果显示,THC 含量和 CBD 含量的相关系数为 0.882,且两者之间存在极显著的正相关($P=0.000<0.01$),可建立 THC 和 CBD 之间的回归方程为 $Y=0.502x+0.087$ 。结果说明,尽管中间型(II 型)材料来源不同,但是 THC 和 CBD 含量关系密切,呈现出 CBD 含量 > THC 含量的现象。

表 2 我国 23 份大麻资源 69 个单株材料中大麻素含量情况

Table 2 Cannabinoid contents of 69 single plants from 23 different *Cannabis* L. resources

编号 No.	材料 Sample	CBD 含量(%) CBD content	THC 含量(%) THC content	CBD/THC CBD/THC ratio	化学型 Chemotype	复合 PCR 结果 Multiplex PCR
S ₁	云麻 1 号	0.84	0.03	28.00	III	Y
S ₂	云麻 1 号	1.74	0.06	29.00	III	Y
S ₃	云麻 1 号	1.06	0.04	26.50	III	Y
S ₄	ZY3	0.98	0.03	32.67	III	Y
S ₅	ZY3	1.69	0.06	28.17	III	Y
S ₆	ZY3	2.24	0.08	28.00	III	Y
S ₇	ZY16	0.00	1.35	0.00	I	Y
S ₈	ZY16	0.00	1.00	0.00	I	Y
S ₉	ZY16	0.76	0.47	1.62	II	N
S ₁₀	ZY23	0.03	0.99	0.03	I	Y
S ₁₁	ZY23	1.26	0.05	25.20	III	Y
S ₁₂	ZY23	1.42	0.04	35.50	III	Y
S ₁₃	ZY35	0.63	0.03	21.00	III	Y
S ₁₄	ZY35	0.73	0.04	18.25	III	Y
S ₁₅	ZY35	0.86	0.48	1.79	II	Y
S ₁₆	ZY52	0.01	1.56	0.01	I	Y
S ₁₇	ZY52	0.03	1.35	0.02	I	Y
S ₁₈	ZY52	0.00	1.48	0.00	I	Y
S ₁₉	ZY77	0.62	0.60	1.03	II	Y
S ₂₀	ZY77	0.02	1.51	0.01	I	Y
S ₂₁	ZY77	0.00	1.38	0.00	I	Y
S ₂₂	ZY102	0.74	0.03	24.67	III	Y
S ₂₃	ZY102	0.38	0.31	1.23	II	Y
S ₂₄	ZY102	0.66	0.03	22.00	III	Y
S ₂₅	ZY122	1.68	0.05	33.60	III	Y

表 2(续)

编号 No.	材料 Sample	CBD 含量(%) CBD content	THC 含量(%) THC content	CBD/THC CBD/THC ratio	化学型 Chemotype	复合 PCR 结果 Multiplex PCR
S ₂₆	ZY122	1.89	0.06	31.50	Ⅲ	Y
S ₂₇	ZY122	1.29	0.04	32.25	Ⅲ	Y
S ₂₈	ZY151	0.00	0.65	0.00	I	Y
S ₂₉	ZY151	0.00	0.89	0.00	I	Y
S ₃₀	ZY151	0.00	0.96	0.00	I	Y
S ₃₁	ZY162	0.28	0.23	1.22	Ⅱ	Y
S ₃₂	ZY162	0.66	0.02	33.00	Ⅲ	Y
S ₃₃	ZY162	0.81	0.03	27.00	Ⅲ	Y
S ₃₄	ZY188	0.01	1.24	0.01	I	Y
S ₃₅	ZY188	0.65	0.67	0.97	Ⅱ	N
S ₃₆	ZY188	0.62	0.45	1.38	Ⅱ	Y
S ₃₇	ZY221	0.40	0.12	3.33	Ⅱ	Y
S ₃₈	ZY221	0.01	0.35	0.03	I	Y
S ₃₉	ZY221	0.37	0.12	3.08	Ⅱ	Y
S ₄₀	ZY225	0.02	0.69	0.03	I	Y
S ₄₁	ZY225	0.01	0.46	0.02	I	Y
S ₄₂	ZY225	0.00	0.60	0.00	I	Y
S ₄₃	ZY235	0.45	0.03	15.00	Ⅲ	Y
S ₄₄	ZY235	0.01	0.40	0.03	I	Y
S ₄₅	ZY235	0.21	0.07	3.00	Ⅱ	Y
S ₄₆	ZY265	1.00	0.60	1.67	Ⅱ	Y
S ₄₇	ZY265	1.90	1.03	1.84	Ⅱ	Y
S ₄₈	ZY265	1.38	0.65	2.12	Ⅱ	N
S ₄₉	ZY270	0.00	0.48	0.00	I	Y
S ₅₀	ZY270	0.54	0.43	1.26	Ⅱ	Y
S ₅₁	ZY270	0.00	0.62	0.00	I	Y
S ₅₂	ZY280	0.36	0.02	18.00	Ⅲ	Y
S ₅₃	ZY280	0.42	0.01	42.00	Ⅲ	Y
S ₅₄	ZY280	0.70	0.01	70.00	Ⅲ	Y
S ₅₅	ZY328	0.00	0.29	0.00	I	Y
S ₅₆	ZY328	0.00	0.43	0.00	I	Y
S ₅₇	ZY328	0.00	0.21	0.00	I	Y
S ₅₈	ZY369	1.10	0.03	36.67	Ⅲ	Y
S ₅₉	ZY369	0.72	0.02	36.00	Ⅲ	Y
S ₆₀	ZY369	2.21	0.06	36.83	Ⅲ	Y
S ₆₁	ZY382	0.00	0.81	0.00	I	Y
S ₆₂	ZY382	0.00	1.57	0.00	I	Y
S ₆₃	ZY382	0.00	2.45	0.00	I	Y
S ₆₄	ZY400	0.02	1.48	0.01	I	Y
S ₆₅	ZY400	0.01	1.60	0.01	I	Y
S ₆₆	ZY400	0.00	1.42	0.00	I	Y
S ₆₇	ZY455	0.00	1.18	0.00	I	Y
S ₆₈	ZY455	0.01	1.11	0.01	I	Y
S ₆₉	ZY455	0.01	1.24	0.01	I	Y

Y 表示基因型与化学型相符合, N 表示基因型与化学型不相符合或者基因型不清晰

Y means that the genotype is according with chemotype, N means the genotype is not according with chemotype or can not be recognized

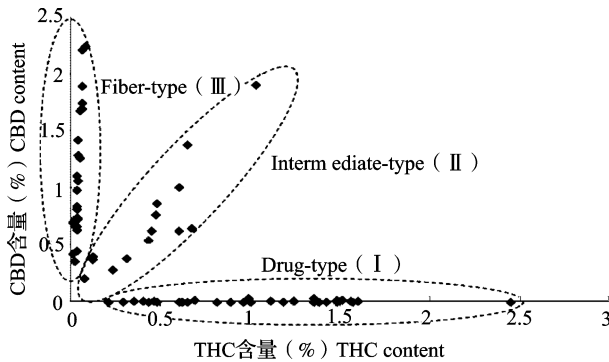


图1 我国23份大麻资源69个单株材料的化学型分布

Fig.1 Chemotype distributions of 69 single plants from 23 different *Cannabis L.* resources

2.2 大麻种质资源中大麻素基因型鉴定

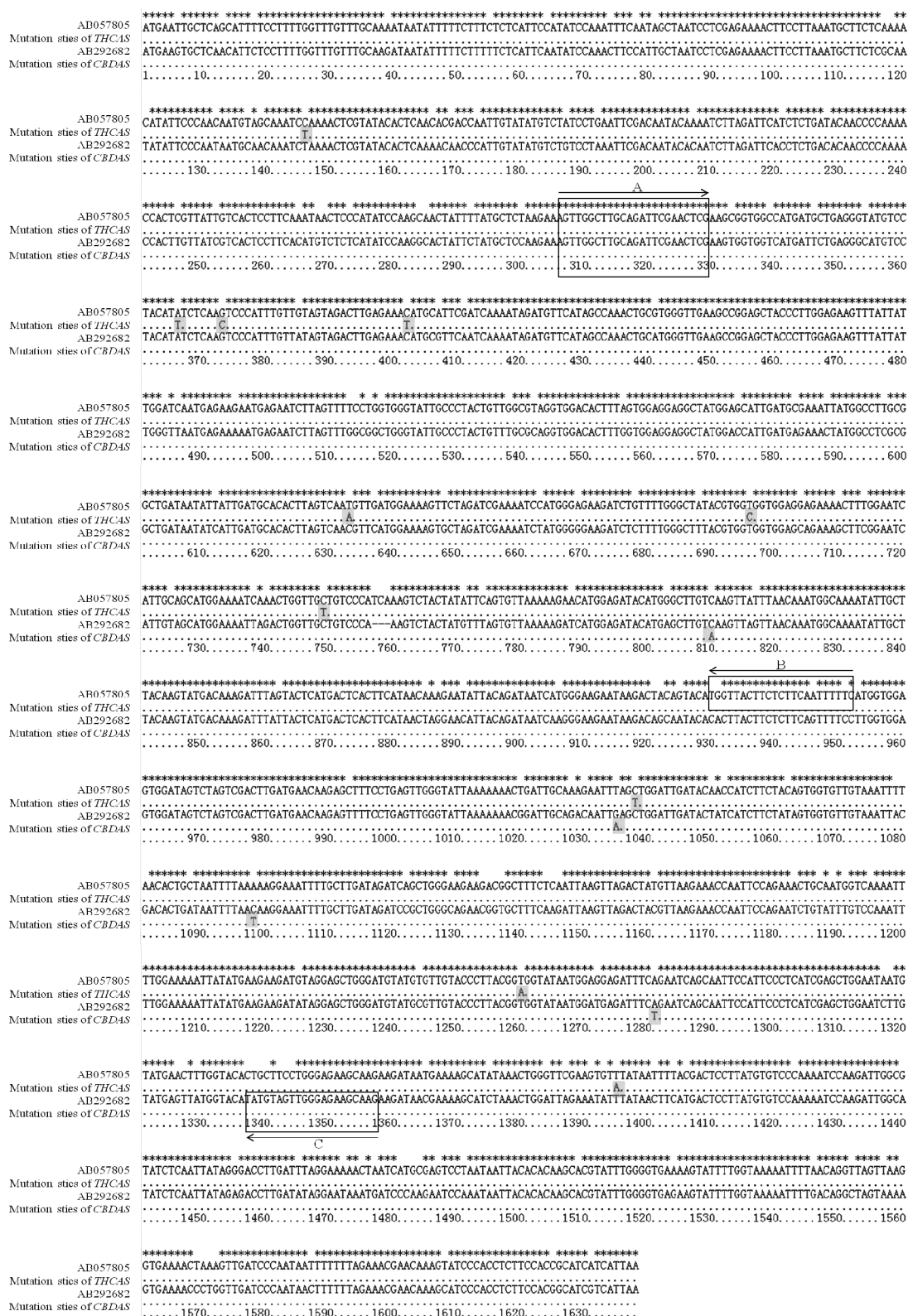
在大麻素化学型鉴定结果的基础上研究大麻素基因型(B 位点)的遗传组成,有助于明确大麻素基因型同大麻素含量、大麻素化学型之间的关系。利用墨西哥大麻中 *THCAS* 基因和 *CBDAS* 基因的克隆引物进行PCR扩增和测序,结果显示:*THCAS* 引物在69个单株材料中有44个样品扩增出了1600 bp左右的特异性条带,31个毒品型(I型)和13个中间型(II型)单株中均扩增出了条带,但是S31(中间型)未能如期扩增出条带;*CBDAS* 引物在69个单株材料中有40个样品扩增出了1600 bp左右的特异性条带,24个纤维型(III型)、14个中间型(II型)和2个毒品型(I型)单株中扩增出了条带。结果表明,大麻种质资源中 *THCAS* 基因、*CBDAS* 基因即为 B_T 和 B_D 等位基因,毒品型、中间型和纤维型3种化学型的基因型分别为 B_T/B_T 、 B_T/B_D 和 B_D/B_D ,但这两对特异性引物扩增标记不能一次性区分3种化学型,扩增片段大小非常接近且容易出现假阳性的现象,需要将扩增的序列进行测序后,通过序列比对才能鉴定。

为进一步明确关键酶基因序列的多态性,分别开展大麻资源中 *THCAS* 基因和 *CBDAS* 基因序列多态性分析。根据表2中化学型鉴定结果,随机选取4个中间型(II型)材料(S_{15} 、 S_{19} 、 S_{23} 和 S_{37})和12个毒品型(I型)材料(S_7 、 S_{10} 、 S_{16} 、 S_{30} 、 S_{34} 、 S_{40} 、 S_{44} 、 S_{49} 、 S_{55} 、 S_{61} 、 S_{64} 和 S_{69})来开展 *THCAS* 测序和多态性比对。结果显示(图2),16个 *THCAS* 基因均含有1635个碱基的开放阅读框,与墨西哥大麻 *THCAS* 序列(AB057805)相比存在10个单核苷酸变异位点。变异位点分别为(1)第146位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{30} (C/T杂合), S_{34} 和 S_{40} (C/T杂合), S_{55} (C/T杂合)存在C→T突变;(2)第366位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{23} 、 S_{30} 、 S_{34} 、 S_{40} 、 S_{55} 存在A→T突变;

(3)第373位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{23} 、 S_{30} 、 S_{34} 、 S_{40} 、 S_{55} 存在G→C突变;(4)第402位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{30} (C/T杂合), S_{34} 、 S_{40} 、 S_{55} (C/T杂合)存在C→T突变;(5)第633位点, S_{15} 存在T→A突变;(6)第696位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{30} (T/C杂合), S_{34} 、 S_{40} 、 S_{55} (T/C杂合)存在T→C突变;(7)第749位点, S_{19} 、 S_{34} 存在C→T突变;(8)第1038位点, S_{55} (C/T杂合)存在C→T突变;(9)第1260位点, S_{55} (T/A杂合)存在T→A突变;(10)第1395位点, S_{15} 、 S_{19} 、 S_{23} 、 S_{30} 、 S_{34} 、 S_{40} 、 S_{55} 存在T→A突变。上述10个变异位点集中发生在 S_{15} 、 S_{19} 、 S_{23} 、 S_{30} 、 S_{34} 、 S_{40} 和 S_{55} 等7个材料中。同对照相比,推导氨基酸序列仅存在4个变异位点,分别为第49位点P→L变异,第125位点V→L变异,第211位点N→K变异,第250位点A→V变异。同样,随机选取6个中间型(II型)材料(S_9 、 S_{19} 、 S_{31} 、 S_{35} 、 S_{37} 和 S_{50})和10个纤维型(III型)材料(S_1 、 S_4 、 S_{11} 、 S_{13} 、 S_{22} 、 S_{25} 、 S_{33} 、 S_{43} 、 S_{52} 和 S_{58})来开展 *CBDAS* 测序和多态性比对。结果显示(图2),16个 *CBDAS* 基因均含有1632个碱基的开放阅读框,与墨西哥大麻 *CBDAS* 序列(AB292682)相比存在4个单核苷酸变异位点。变异位点分别为(1)第807位点, S_9 中存在C→A突变;(2)第1032位点, S_{11} 中存在G→A突变;(3)第1095位点, S_{11} 中存在C→T突变;(4)第1278位点, S_9 和 S_{11} 中存在A→T突变。4个变异位点均发生在西藏林芝(S_9)及云南昆明(S_{11})中,且均为同义突变。

2.3 大麻种质资源中大麻素化学型特异分子标记设计及验证

为了简单、准确鉴别我国大麻资源中3种化学型,将 *THCAS* 基因和 *CBDAS* 基因序列使用 MegAlign 程序进行比对,在考虑两个基因之间的差异序列的同时,又考虑到单个基因在不同资源中的多态性,从特异性和条带大小差异直观性两方面设计了一个共显性PCR标记(图2),通过优化复合PCR体系和条件,可在一次PCR实验中成功鉴定大麻3种化学型。将含ABC引物的复合PCR体系在69个应试材料中进行验证,结果显示(图3),当材料为毒品型(I型)时,AB引物可特异结合到 *THCAS* 基因序列上,扩增出大小约640 bp标记条带;当材料为纤维型(III型)时,AC引物特异结合到 *CBDAS* 基因序列上,并扩增出大小约1060 bp标记条带;当材料为中间型(II型)时,可同时扩增出640 bp和1060 bp的两个标记。PCR标记同化学型鉴定比对结果显示(表2),除了少数II型单株(S_9 、 S_{35} 和 S_{48})条带清晰度不够外,PCR标记均与化学型鉴定结果一致,说明PCR特异标记具有共显性,能够一次性鉴定出我国3种大麻化学型。



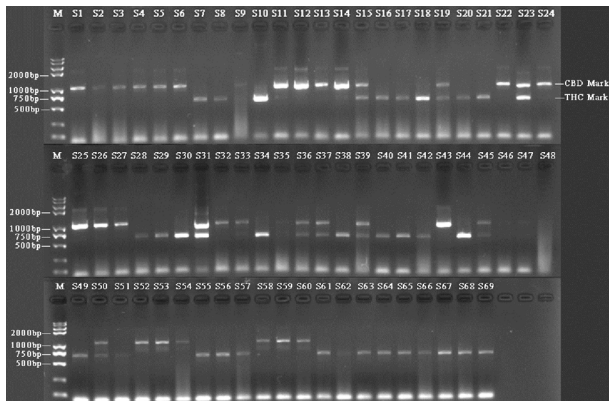
* 表示相同碱基, 变异位点用阴影字母表示, ABC 三条引物结合位点用箭头表示

Identical nucleotides are shown in *, Mutation sites of nucleotide are shown in gray,

Binding-sequences by primers (A, B and C) are indicated by arrows

图 2 *THCA5* 及 *CBDAS* 基因的多态性比对及特异性引物设计

Fig. 2 Alignment and primers designed of gene polymorphisms of *THCA5* and *CBDAS*



S1 ~ S69: 69 个单株样品编号; M: DNA 分子 Marker
(Trans 2K Plus II DNA Marker)

S1-S69: The number of single plant, M: DNA Marker
(Trans 2K Plus II DNA Marker)

图 3 69 个大麻单株资源复合 PCR 扩增

Fig. 3 Electrophoresis of multiplex PCR amplification from 69 single plants

3 讨论

3.1 我国不同地理来源地大麻资源中 THC 等大麻素含量差异显著

我国是大麻起源地之一,大麻种质资源非常丰富,不仅在西藏、新疆、内蒙古、云南等多地发现有野生类型的大麻,而且从南到北均有种植农家大麻品种^[21-22]。由于大麻分布广泛,形态多样,明确不同大麻资源中大麻素含量特征是业界普遍关心的问题。本试验研究了我国 23 份不同来源地大麻资源共 69 个雌性单株中大麻素含量特征,发现大麻资源中大麻素含量差异显著,THC 含量分布在 0.01% ~ 2.45% 之间,CBD 含量分布在 0 ~ 2.24% 之间,THC 和 CBD 含量之和介于 0.21% ~ 2.93% 之间,其中云南的大麻资源既有低大麻素含量的材料,又有高大麻素含量的材料(THC 和 CBD 最高含量均出自云南大麻资源)。胡尊红等^[23]对我国 13 个不同来源地的大麻群体进行遗传多样性研究发现,云南地区的大麻资源群体具有最高的遗传多样性水平,丰富的遗传多样性可能导致了大麻素含量多样性,云南大麻资源可为纤维用、药用(CBD 利用)和药纤兼用型大麻品种选育提供丰富的育种材料。尽管如此,从工业大麻定义(THC < 0.3%)的角度上来说,有 56.52% 的应试材料中 THC > 0.3%,在利用大麻资源时要引起充分重视。

3.2 大麻素化学型和大麻素含量关系密切

从本研究结果看,毒品型(I型)大麻中 THC 含量介于 0.21% ~ 2.45%,不含或含微量 CBD(最高

为 0.03%),其中 93.5% 的植株中 THC 含量 > 0.3%,超出了工业大麻 THC < 0.3% 的限量标准;纤维型(Ⅲ型)大麻中 CBD 含量介于 0.36% ~ 2.24%,CBD 含量平均值达 1.10%,且 THC 最大值为 0.08%,远低于工业大麻 0.3% 的限量标准;中间型(Ⅱ型)大麻中有 71.4% 的植株中 THC 含量 > 0.3%,CBD 含量平均值为 0.71%。由此可见,毒品型(I型)大麻和中间型(Ⅱ型)大麻毒品滥用风险较大,而纤维型(Ⅲ型)大麻无毒品利用价值,非常适合工业利用,尤其是高 CBD 含量的特性,为目前国际上热衷开发药用 CBD 成分奠定了资源基础。鉴于大麻素化学型在植株整个生育期较稳定,在大麻种质资源及其他育种材料的评价过程中,结合大麻素绝对含量和化学型来进行鉴定,可以避免大麻素绝对含量波动而带来的误判。然而,大麻资源群体的大麻素含量和大麻素化学型的关系要比单株复杂。本研究中有 10 份资源为混合化学型,即同一资源中存在多种化学型的现象,可能是大麻异花风媒传粉、不同资源之间串粉导致大麻素化学型遗传位点(B 位点)改变所致,因此在评价大麻资源群体的大麻素含量时,需选择一定数量的混合株样品为对象,而在评价大麻资源群体的化学型时,则需对多个单株化学型分别鉴定,如若化学型混杂,可通过剔杂来获得一致的化学型。

3.3 大麻素特异分子标记可应用于工业大麻选育过程

目前工业大麻品种选育过程中常采用化学检测法选择低 THC 含量(THC < 0.3%)、高 CBD 含量的资源作为选育的原始材料^[24-26],但鉴于大麻遗传上异质杂合及大麻素含量受发育和环境因子影响,化学含量绝对值常常难以在遗传上稳定表现。本研究证明了 *THCAS* 基因和 *CBDAS* 基因是控制大麻素含量性状位点上的 2 个共显性等位基因,基因型决定化学型,这与本课题组早先在滇南农家大麻品种群体内部的研究结果一致^[27],表明通过选择大麻基因型来选择大麻化学型是可行的。理论上,我国大麻种质资源存在的 3 种化学型均可直接或间接用于工业大麻育种,纤维型(Ⅲ型)可直接用于育种,中间型(Ⅱ型)需要通过近交分离后获得纤维型大麻植株再加以利用,毒品型(I型)虽然不能直接用于工业大麻育种,但可以和纤维型杂交后加以利用。

无论是大麻素绝对含量还是大麻素化学型的鉴定,均是基于大麻素含量本身来进行的,在工业大麻育种过程中可直接转化为对 *THCAS* 基因或 *CBDAS*

基因的选择。S. Thichak 等^[28]开发出了一对 *THCAS* 基因特异引物能够将毒品型(I型)、中间型(II型)两个化学型同纤维型(III型)大麻植株区分开来,但无法区分毒品型(I型)和中间型(II型);D. Pacifico 等^[7]开发出了一个复合 PCR 标记(BI080/B1192)可以将一定范围内的大麻 3 种化学型区分开,但是未考虑到标记结合位点序列的多态性,且 2 条标记条带非常接近,很容易混淆。针对我国大麻种质资源类型多样的现状,本研究在分析我国不同来源地大麻资源中 *THCAS*、*CBDAS* 基因序列多态性的基础上,设计并筛选出了一个共显性 PCR 标记,可以快速、精确地对这 2 个基因进行筛选。但同样需要指出的是,即便是只含 *CBDAS* 标记的资源,仍然会有微量 THC 的存在,这可能是由于 *THCAS* 和 *CBDAS* 编码的蛋白质互为同分异构体(氨基酸相似度为 83.9%),*CBDAS* 酶具有很弱的合成 THC 的能力,这也解释了所有大麻资源中均含有 THC 的现象。因此,要选育出完全不含 THC 的工业大麻,需要找到或者人为构造 THC 合成途径中关键酶基因缺失、失活的原始材料。

M. Kojoma 等^[19]研究结果认为,高毒大麻(THC 含量为 1.19%~7.51%)和低毒大麻(THC 含量为 0~0.12%)资源中均存在 *THCAS* 基因,*THCAS* 基因序列多态性导致了 37 个氨基酸残基的差异,推测这 37 个氨基酸的差异导致了大麻植株中 *THCAS* 酶的活性高低,从而来决定 THC 含量。本文基于我国大麻种质资源的研究结果与上述结果存在矛盾,本研究认为大麻素基因型决定化学型,化学型和大麻素含量有密切关系,纤维型(III型)大麻中不存在 *THCAS* 基因。应试材料中,*CBDAS* 基因虽然存在 4 个变异位点,但均为同义突变,表明 *CBDAS* 基因突变同 CBD 含量差异无相关性;*THCAS* 基因在测试材料中存在 10 处变异,推导的氨基酸序列有 4 处变异,需扩大资源来源地和拓宽资源类别来进一步研究这些变异是否影响 THC 的含量。

参考文献

- [1] 熊和平. 麻类作物育种学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:297-301
- [2] Elsohly M A, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids[J]. Life Sci, 2005, 78(5):539-548
- [3] Backer B D, Maebe K, Verstraete A G, et al. Evolution of the content of THC and other major cannabinoids in drug-type *Cannabis* cuttings and seedlings during growth of plants[J]. J Forensic Sci, 2012, 57(4):918-922
- [4] 郭鸿彦. 旱地工业大麻高产优质栽培技术[M]. 昆明:云南民族出版社,2013:1-2
- [5] United Nations Office on Drugs and Crime(UNODC). Recommended methods for the identification and analysis of *Cannabis* and *Cannabis* products[M]. New York:United Nations Publication, 2009:14
- [6] Small E, Beckstead H D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of *Cannabis*[J]. Lloydia, 1973, 36(2):144-165
- [7] Pacifico D, Miselli F, Micheler M, et al. Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in *Cannabis sativa* L. [J]. Mol Breeding, 2006, 17(3):257-268
- [8] Fournier G, Richez-Dumanois C, Duvezin J, et al. Identification of a new chemotype in *Cannabis sativa*: cannabigerol-dominant plants, biogenetic and agronomic prospects [J]. Planta Med, 1987, 53(3):277-280
- [9] Mandolino G, Carboni A. Potential of marker assisted selection in hemp genetic improvement[J]. Euphytica, 2004, 140:107-120
- [10] de Meijer E P M, Hammond K M. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (II): cannabigerol predominant plants[J]. Euphytica, 2005, 145(1-2):189-198
- [11] 陈璇, 杨明, 郭鸿彦. 大麻植物中大麻素成分研究进展[J]. 植物学报, 2011, 46(2):197-205
- [12] Flores-Sanchez I J. Polyketide Synthases in *Cannabis sativa* L., Chapter III. Polyketide synthase activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *Cannabis sativa* L. plants[M]. Amsterdam:PrintPartners Ipskamp BV, 2008:58-61
- [13] Böcsa I, Mathé P, Hangyel L. Effect of nitrogen on tetrahydrocannabinol(THC) content in hemp(*Cannabis sativa* L.) leaves at different positions[J]. J Int Hemp Assoc, 1997, 4:80-81
- [14] Pacifico D, Miselli F, Carboni A, et al. Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. [J]. Euphytica, 2008, 160(2):231-240
- [15] van Bakel H, Stout J M, Cote A G, et al. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa* [J]. Genome Biol, 2011, 12(10):102
- [16] de Meijer E P M, Hammond K M, Micheler M. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (III): variation in cannabichromene proportion[J]. Euphytica, 2008, 165(2):293-311
- [17] de Meijer E P M, Bagatta M, Carboni A, et al. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. [J]. Genetics, 2003, 163(1):335-346
- [18] 陈璇, 郭蓉, 万睿璇, 等. 云南省 5 个雌雄异株工业大麻群体遗传结构评价[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9):2069-2075
- [19] Kojoma M, Seki H, Yoshida S, et al. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa* L. [J]. Forensic Sci Int, 2006, 159(2-3):132-140
- [20] Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, et al. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*[J]. FEBS Lett, 2007, 581(16):2929-2934
- [21] 刘飞虎. 工业大麻的基础与应用[M]. 北京:科学出版社, 2015:1-5
- [22] 汤志成, 陈璇, 张庆滢, 等. 野生大麻种质表型及其 RAPD 遗传多样性分析[J]. 西部林业科学, 2013, 42(4):61-66
- [23] 胡尊红, 郭鸿彦, 胡学礼, 等. 大麻品种遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4):555-561
- [24] 杨明, 郭鸿彦, 文国松, 等. 大麻新品种云麻 1 号的选育及其栽培技术[J]. 中国麻业, 2003, 25(1):1-3
- [25] 郭鸿彦, 胡学礼, 陈裕, 等. 早熟籽用型工业大麻新品种云麻 2 号的选育[J]. 中国麻业科学, 2009, 31(5):285-287
- [26] 郭鸿彦, 许艳萍, 郭孟璧, 等. 早熟工业大麻杂交新品种云麻 3 号选育[J]. 中国麻业科学, 2014, 36(6):270-274
- [27] 陈璇, 郭孟璧, 张庆滢, 等. 滇南农家大麻品种中大麻素化学型及基因型研究[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9):1817-1822
- [28] Thichak S, Natakankitkul S, Chansakaow S, et al. Identification of drug-type and fiber-type of hemp(*Cannabis sativa* L.) by multiplex PCR[J]. Chiang Mai J Sci, 2011, 38(4):608-618