



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：工业大麻 EMS 突变体及大麻素合成相关基因表达分析
作者：刘永蓓，张小雨
DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240430002
收稿日期：2024-04-30
网络首发日期：2024-10-11
引用格式：刘永蓓，张小雨. 工业大麻 EMS 突变体及大麻素合成相关基因表达分析 [J/OL]. 植物遗传资源学报. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240430002>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

工业大麻 EMS 突变体及大麻素合成相关基因表达分析

刘永蓓¹, 张小雨²

(¹湖南科技职业学院药学院, 湖南长沙, 410004; ²中国农业科学院麻类研究所, 湖南长沙, 410205)

摘要: 工业大麻 (*Cannabis sativa* L.) 是一种应用在造纸、医疗保健、纺织等领域的高价值经济作物。创制工业大麻新种质是开展品种选育、创新种质资源、开展功能基因组研究的重要基础。本试验利用甲基磺酸乙酯 (EMS) 构建了中大麻资 4 号的突变体群体。通过设置 8 个 EMS 诱变剂浓度梯度处理, 明确了 0.8%EMS 处理浓度对中大麻资 4 号诱变效果最好。对 2000 粒中大麻资 4 号种子进行诱变后, M₁ 共成苗 644 株, 出苗率为 32.2%, 其中包括叶色、花序和株高变异单株 90 株, 突变率为 13.98%。对 M₁ 突变体进行大麻二酚 (CBD) 含量测定, 获得 3 个高 CBD 和 2 个低 CBD 含量突变株; 通过测序发现 CBD 含量突变体中 5 个大麻素关键催化酶基因 (*CsPT4-EXP*, *CsOAC1-EXP*, *CsOLS1-EXP*, *CsCBDAS-EXP* 和 *CsTHCA-EXP*) 及其启动子区域 DNA 序列均未发生突变, 但是 CBD 含量突变体中以上 5 个催化酶的表达水平较对照出现显著变化。由此推断, EMS 处理导致了突变体中影响 CBD 代谢途径的调控基因突变进而调控 CBD 合成途径催化酶的表达, 最终表现为突变体花头中 CBD 含量显著变化。本研究通过创制 EMS 突变体群体为工业大麻育种提供了优异种质资源, 也为进一步解析大麻素合成代谢途径的调控机制及挖掘相关基因提供良好材料和基础。

关键词: 工业大麻; EMS 突变体; 大麻素; 基因表达。

Construction of the EMS Mutant Library for Industrial Hemp and Expression of Genes Related to Cannabinoid Biosynthesis

LIU Yongbei¹, ZHANG Xiaoyu²

(¹School of Pharmacy, Hunan Vocational College of Science and Technology, Changsha 410004; ²Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205)

Abstract: Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is a high-value economic crop used in papermaking, healthcare, textiles, and other fields. Developing new germplasm of industrial hemp is essential for breeding, innovative germplasm resources, and functional genomic research. In this study, a mutant library of ZHONGDAMAZI 4 (ZD4) was constructed using ethyl methanesulfonate (EMS). By setting up gradients of eight concentrations of EMS, it was determined that the 0.8% EMS treatment concentration had the best mutagenic effect on ZD4. After mutagenizing 2000 seeds of ZD4, a total of 644 M₁ seedlings emerged, with an emergence rate of 32.2%. Among them, 90 individual plants exhibited variations in leaf color, inflorescence, and plant height, with a mutation rate of 13.98%. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the cannabidiol (CBD) content of the M₁ plants, resulting in the identification of 3 high-CBD and 2 low-CBD mutants. Sequencing revealed that the DNA sequences as well as the promoter regions of five key cannabinoid biosynthetic enzyme genes (*CsPT4*, *CsOAC1*, *CsOLS1*, *CsCBDAS*, and *CsTHCA*) in the CBD content mutants remained unchanged. However, the expression levels of these five enzymes showed significant changes compared to the control. It is inferred that EMS treatment led to mutations in regulatory genes affecting the CBD metabolic pathway in mutants, thereby regulating the expression of enzymes, ultimately resulting in significant changes in CBD content. This study provides excellent germplasm resources for industrial hemp breeding through the construction of an EMS mutant library and lays a solid foundation for further elucidating the regulatory mechanisms of cannabinoid biosynthesis and related genes.

Key words: *Cannabis sativa* L.; EMS mutant; Cannabinoids; Gene expression.

收稿日期: 2024-04-30

第一作者研究方向为 中药资源、天然药物研究, E-mail: ybliu2018@163.com

通信作者: 张小雨, 研究方向为作物种质资源学, E-mail: zhangxiaoyuyuyuyu@163.com

基金项目: 湖南省自然科学基金部门联合基金 (2023JJ60211); 国家自然科学基金青年基金 (32200219)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Hunan Province China (2023JJ60211); National Natural Science Foundation of China (32200219)

大麻 (*Cannabis sativa* L.) 又称火麻, 是我国传统的纤维植物和药用植物, 属于大麻科大麻属一年生草本植物^[1]。大麻茎秆纤维耐拉能力强且抑菌透气, 可用于服装纺织面料; 其腺毛是合成和储存大麻素和萜类化合物的主要部位, 主要集中于花叶和雌花的苞片表面^[2-3]。工业大麻是指四氢大麻酚 (THC) 小于 0.3% 的大麻品种^[4-5]。近些年临床研究发现, 工业大麻含有的大麻素成分大麻二酚 (CBD) 在抗抑郁、抗炎和缓解疼痛等方面具有重要的药用价值和临床应用前景^[6-8], 且人体对 CBD 不产生成瘾性^[9-11]。工业大麻花叶腺毛中提取药用成分 CBD 进行新药研发成为工业大麻产业发展的新方向, 预计 2025 年市场规模将达到 202 亿美元^[12-13]。工业大麻是我国重要的经济作物, 在我国的广西、云南、黑龙江以及西北等省均有种植, 其中广西以及我国西北等省区以籽用为主, 云南以药用和籽用为主, 黑龙江以纤维用为主^[5]。由于近几年大麻素及其籽蛋白产品的市场规模飞速增长, 市场对于优异工业大麻品种的需求越来越大。

相比于欧美等国工业大麻主栽品种, 我国主栽品种 CBD 含量有待提高^[14]。目前工业大麻的主要育种手段有常规杂交育种、系统育种和诱变育种^[15]。相较于杂交育种和系统育种周期长、效率低等特点, 诱变育种具有明显缩短育种进程的特点。目前常用的诱变育种方法以物理诱变和化学诱变为主^[16]。化学诱变突变性状稳定且操作较容易, 已被用于多种作物^[17]。甲基磺酸乙酯 (EMS) 作为常用的化学诱导试剂, 在苦荞^[18]、罗布麻^[19]、水稻^[20]、玉米^[21]、小麦^[22]、大豆^[23]、高粱^[24]等作物的种质创新中得到成功应用, 培育出了矮化玉米、矮化水稻、高抗旱玉米等优良品种。

本试验通过 EMS 诱变中国农业科学院麻类研究所培育品种中大麻资 4 号 (皖品鉴登记字第 2009001), 构建了一个工业大麻突变体群体并分析突变群体的表型变异特点。通过筛选 CBD 含量变异突变体, 我们进一步分析突变体中大麻素代谢途径中 5 个关键催化酶 *CBDAS*、*THCAS*、*CsPT4*、*CsOAC1* 和 *CsOLS1* 的 DNA 序列及表达水平^[25-27], 解析突变体中大麻素含量产生差异的原因, 为大麻素合成途径调控机制的研究提供基础, 也为高 CBD 工业大麻品种的遗传改良提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用中大麻资 4 号 (皖品鉴登记字第 2009001) 为诱变材料。此品种为雌雄异株品种, 生育时期分为出苗期、现蕾期、开花期、种子成熟期; 全生育期为 152 d, 花叶成熟期为 136 d, 平均株高 3.14 m, 花叶产量 2556-2717 kg/ha, CBD 含量 4.84%, THC 含量 0.22%。使用甲基磺酸乙酯 (EMS) 为本试验诱变剂。

1.2 试验方法

1.2.1 工业大麻 EMS 诱变剂浓度梯度 将 EMS 溶液加入磷酸缓冲液中配置 8 个诱变剂浓度：0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%和 1.2%（设置不含 EMS 的磷酸缓冲液为对照）。将健康饱满的中大麻资 4 号种子各 150 粒分别放入不同浓度梯度的 EMS 溶液中，并保持 200 r/min 震荡 13 h。震荡结束后用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.2 mol/L) 中和 EMS 溶液，并使用蒸馏水冲洗种子 3 次后于阴凉处晒干。于 7 d、10 d 和 14 d 分别计算种子发芽率（发芽数量占种子总量的百分比）。

1.2.2 突变体群体构建与性状调查 EMS 处理常以植物种子半致死 (LD_{50}) 浓度为宜^[28]，即保证 EMS 处理后 50%左右植株能够正常出苗。本试验中的中大麻资 4 号的最好 EMS 浓度为 0.8%。挑选健康饱满种子 2000 粒进行 EMS 诱变处理。于 2021 年 5 月 20 日在吉林省延边市犇福农场小区进行播种，选择平整小区 4 个，每个小区面积为 80 m^2 ，小区长 20 m，宽 4 m，行距 0.80 m，株距 0.20 m。每个小区播种 500 粒种子，4 个小区共出苗 644 株，平均出苗率为 32.2%。计算出苗率：统计黄化苗、叶色异常、株型异常植株，计算其发生频率；80~100 d 观察突变体株系变异、花期变异、花型变异的植株；当代植株种子混收，获得 M_1 种子。出苗率(%)以田间实际出苗数量占种子总量的百分比计算；黄化率(%)以黄化苗数量占田间实际出苗数量的百分比计算。同时设置 3 个对照小区种植未经 EMS 处理的中大麻资 4 号植株，种植面积和种植密度与突变体植株区域保持一致。

1.2.3 突变体植株扦插与扩繁保存 工业大麻可通过扦插繁殖。在出苗 2 个月后通过扦插方式对 M_1 代所有植株进行扩繁与保存，每个植株保证 3-4 个扦插苗成活。在对突变体植株进行性状调查后发现，除 27 株黄花苗植株外，本研究在工业大麻 M_1 代中获得了多个性状的突变体植株共计 63 株，包括花头部分糖叶变紫植株、雌花发育出现退化植株、花头生物量显著增加 10%以上植株和不同程度矮化（30cm 以上）突变植株。以上突变体植株种质均通过不断扦插方式保存。

1.2.4 突变体大麻素含量测定 中大麻资 4 号植株进入盛花期后，从对照试验小区中随机选取正常生长的 15 株中大麻资 4 号植株作为对照材料，并选取长势基本一致的突变体材料 322 株，取相同部位花头，参考 Deng 等^[29]方法，采用高效液相色谱法(HPLC)进行大麻素 CBD 含量测定，从中筛选出高 CBD 和低 CBD 含量株系。

1.2.5 基因克隆及突变位点检测 每个材料取新鲜大麻花序 0.20 g，使用 TIANGEN 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP30)提取工业大麻总 DNA。根据 NCBI 网站大麻参考基因组 (Cs10:GCA_900626175.2) 得到 CsPT4、CsOAC1、CsOLS1、CBDAS 和 THCAS 的基因组序列（包括启动子区）信息，使用 Snapgene 软件设计相关基因引物（表 1）。使用 TIANGEN 公司 2×Taq PCR 预混试剂 II (KT211-03) 进行克隆，按试剂盒说明书建议条件进行 PCR 反应。使用 TIANGEN 公司通用型 DNA 纯化回收试剂盒(DP214) 进行 PCR 胶回收，回收产物使用 pGEM®-T Easy 试剂盒连接 T 载体后由北京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测基因表达 取新鲜大麻花序 0.15 g, 使用 TIANGEN 公司植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, TIANGEN 公司 FastKingcDNA 第一链合成试剂盒除基因组 DNA 污染并合成 cDNA 第一链, 每个样品设置 4 个生物学重复。根据 CBDA 合成催化酶 (*CBDAS*)、THCA 合成催化酶 (*THCAS*)、香叶基焦磷酸: 二羟基戊基苯甲酸香叶基转移酶 (*CsPT4*)、橄榄酸环化酶 (*CsOAC1*) 和橄榄醇合成酶 (*CsOLS1*) 的基因序列特点, 使用 PerlPrimer (sourceforge.net) 设计引物 CsCBDAS-EXP、CsTHCA-EXP、CsPT4-EXP、CsOAC1-EXP 和 CsOLS1-EXP 引物 (表 1), 以大麻花序 CDNA 第一链为模板进行 qRT-PCR 分析。

使用 TIANGEN 公司 SYBRMixture 试剂盒进行 qRT-PCR 实验, PCR 反应体系按照试剂盒说明书进行配制, 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 15s, 60°C 退火 1min, 35 个循环。以内参基因 *Tubulina-1* (表 1) 的 Ct 值作为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[30]。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences mentioned in this study

引物名称	目的基因	Genbank 登录号	序列 (5'-3')	片段长度	用途
Primers	Target Gene	Genbank ID	Sequence (5'-3')	Amplicon Length (bp)	Purpose
CsPT4-GDNA-PART1	<i>CsPT4</i>	<i>LOC115713185</i>	CTAACAAACCTATCTTGGGAGAATAT CAGGTCCAAGTTGGGGTTAG	3666	<i>CsPT4</i> 基因组 DNA 第 1 部分克隆
CsPT4-GDNA-PART2	<i>CsPT4</i>	<i>LOC115713185</i>	GATTCTGACTCTAACTTAGACATTAG AGACCCCAAGTTATATTAGCACTT	6643	<i>CsPT4</i> 基因组 DNA 第 2 部分克隆
CsPT4-GDNA-PART3	<i>CsPT4</i>	<i>LOC115713185</i>	CACAATAGTTAAAGTGCTAATATAACTTG GGTCTTATATAAATACATATACAAAGTATTCAG	7028	<i>CsPT4</i> 基因组 DNA 第 3 部分克隆
CsOAC1-GDNA	<i>CsOAC1</i>	<i>LOC115723438</i>	AACGGAACCTTCTACCCGG TAGTCTACTTTCGTGGTGTGTAG	1408	<i>CsOAC1</i> 基因组 DNA 克隆
CsOLS1-GDNA	<i>CsOLS1</i>	<i>LOC115700696</i>	GTATTTTTACATTAATAATGTAT ATATTTGATGGGAACACTACGC	2620	<i>CsOLS1</i> 基因组 DNA 克隆
CsCBDAS-GDNA	<i>CsCBDAS</i>	<i>LOC115697762</i>	TGGCTTGCTCTTAATTGTTTAGC TTAATGACGATGCCGTGG	2635	<i>CsCBDAS</i> 基因组 DNA 克隆
CsTHCAS-GDNA	<i>CsTHCAS</i>	<i>LOC115697901</i>	GGAGAGCCAACCTTCACTATAA TTTTAAAGATAATTAATGATGATGCGGTGG	2638	<i>CsTHCAS</i> 基因组 DNA 克隆
TUB	<i>Tubulin a-1</i>	<i>JP479709</i>	CTCGGCTGAGAAAGCATACC CCATGCCTAGGGTCACACTT	102	持家基因
CsPT4-EXP	<i>CsPT4</i>	<i>LOC115713185</i>	CAGTGTACCAAAGTTCATAC CACAAATCAAGTCCATTAGG	153 (跨一个内含子)	<i>CsPT4</i> 表达水平
CsOAC1-EXP	<i>CsOAC1</i>	<i>LOC115723438</i>	CTGAAATCATCCCTTTACTGCA CAGCCATGAAAGATGTATACTG	110 (跨一个内含子)	<i>CsOAC1</i> 表达水平
CsOLS1-EXP	<i>CsOLS1</i>	<i>LOC115700696</i>	GTAGTCCTGAATAGTCTCCACACTCT	127 (跨一个内含子)	<i>CsOLS1</i> 表达

			GTGAACACATGACTCAACTCAAAG	子)	水平
CsCBDAS-EXP	<i>CsCBDAS</i>	<i>LOC115697762</i>	ATCTCGTGCTCCACCAATC GATCCGCTGGGCAGAACGGT	188 (编码区无内含子)	<i>CsCBDAS</i> 表达水平
CsTHCAS-EXP	<i>CsTHCAS</i>	<i>LOC115697901</i>	CAGCAATTCATTCCCTCAT TTTCAGAATCAGCAATTC	63 (编码区无内含子)	<i>CsTHCAS</i> 表达水平

1.3 实验数据统计分析

本试验使用 SPSS 统计软件包 (version16.0, SPSS, 2007) 对试验数据进行统计分析, 数据图表使用 Microsoft Excel 软件完成。

2 结果与分析

2.1 突变剂量选择

对 EMS 浓度梯度实验中不同浓度溶液处理下中大麻资 4 号发芽率进行统计分析, EMS 显著抑制工业大麻种子萌发。在对照组中, 中大麻资 4 号萌发率可达 95%。当 EMS 浓度为 0.2%-0.6% 时, 中大麻资 4 号的发芽率从 87% 降低至 62%。当 EMS 浓度提高到 1.0% 时, 中大麻资 4 号种子的发芽率显著下降, 从 41% 降低至 25%。在 1.2% EMS 处理中, 中大麻资 4 号第 14 天种子萌发率仅为 0.05% (图 1)。EMS 浓度为 0.8% 时, 种子萌发率为 41%, 最接近半致死率, 故采用 0.8% EMS 为诱变浓度进行中大麻资 4 号突变体群体构建。

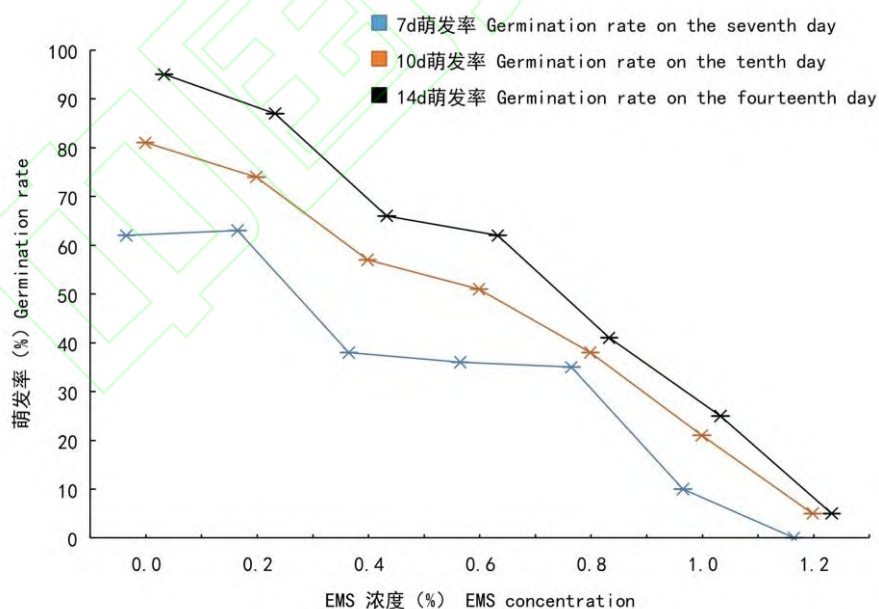


图 1 不同浓度 EMS 处理中大麻资 4 号种子萌发率统计

Fig.1 Seed germination rates of ZHONGDAMAZI 4 treated by EMS with different concentrations

2.2 突变表型观察

经 EMS 诱变后, 中大麻资 4 号 M₁ 共成苗 644 株, 出苗率为 32.2%。在不同生育阶段开展田间表型调

查及统计发现多种表型变异（表 2）。发现工业大麻花头部分糖叶叶色突变为紫色植株 15 株，占成苗植株的 2.33%（图 2A 和 2B）。雌株花头发育出现退化植株 14 株，占成苗植株的 2.17%（图 2C）。二级分枝花头生物量（干重）显著增加 10% 以上的植株共 10 株，占成苗植株的 1.55%。呈现不同程度矮化植株共有 24 株，其中 19 株相比对照植株的株高降低在 30-100cm 之间，占突变株数的 2.95%（图 2D），5 株相比对照植株株高降低超过 100cm，占突变株数的 0.78%（图 2E）。黄化苗是诱变育种的一个常见表型特征，突变植株中共出现黄化苗 27 株，黄化率为 4.19%（图 2F）。

表 2 中大麻资 4 号突变体表型统计

Table 2 The phenotypic analysis of ZHONGDAMAZI 4 mutations

变异类型	表型	突变株数	突变率
Variation types	Phenotype	Mutant plants	Mutant ratio
叶色	黄化苗	27	4.19%
	突变为紫色	15	2.33%
花序 Inflorescence	雌花发育退化	14	2.17%
	二级分枝花头生物量增加	10	1.55%
株高 Height	植株矮化 50-100cm	19	2.95%
	植株矮化 100cm 以上	5	0.78%
总计 Total		90	13.98%



A-B : 叶色突变为紫色; C : 雌花发育退化 (左侧为正常植株, 右侧为雌花发育退化植株); D : 矮化突变 (左侧为矮化植株, 右侧为正常植株); E : 矮化突变; F : 黄化苗 (左侧为黄化苗, 右侧为正常植株);

A-B: Leaf color changed to purple mutant type; C: Pistillate flower degeneration type (the normal height plant showed in left, the pistillate flower degeneration plant showed in right), D: Dwarf mutant type (the dwarf mutant showed in left, the normal height plant showed in right), E: Dwarf mutant type, F: Etiolated seedling type (the etiolated seedling plant showed in left, the normal height plant showed in right).

图 2 中大麻资 4 号突变体田间表型

Fig. 2 The field phenotype of ZHONGDAMAZI 4 mutant

2.3 突变体大麻素含量测定及成分分析

中大麻资 4 号植株进入盛花期后, 随机选取与对照植株长势基本一致的突变体材料 322 株和对照材料 15 株剪下花头 (长度 10 cm), 每株取 3 个生物学重复, 参考 Deng 等^[29]方法采用高效液相色谱法(HPLC)进行大麻素含量测定, 从中筛选出高 CBD 及低 CBD 含量株系。与对照相比, 突变体花头中 CBD 含量有高低变化。对照组平均 CBD 含量在 4.45%-5.22%之间, 平均含量为 4.84%, 高 CBD 含量株系定义为 CBD 含量高于对照组 CBD 含量 20%的株系; 低 CBD 含量株系定义为 CBD 含量低于对照组 CBD 含量 20%的株系。筛选得到高 CBD 含量材料为 EMS-12、EMS-79、EMS-153; 低 CBD 含量株系为 EMS-58、EMS-211; 其他为中等 CBD 含量材料, 即 $3.87% < \text{CBD 含量} < 5.81%$ 的单株。

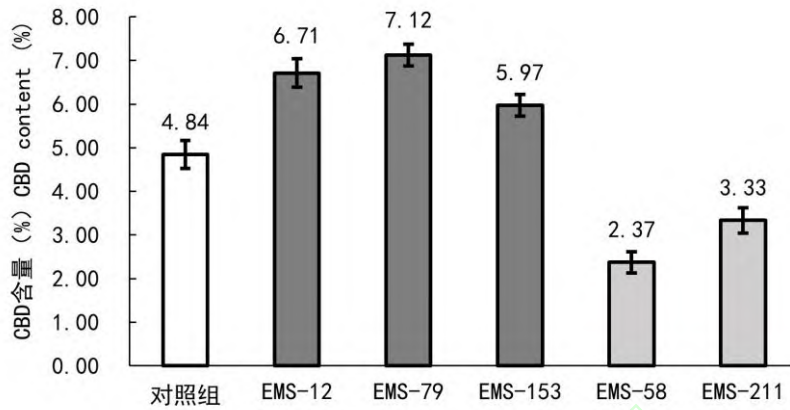


图3 突变体大麻素 CBD 含量 (%) 测定及成分分析

Fig. 3 The detection and analysis of CDB content in mutant lines

2.4 突变体大麻素代谢途径关键催化酶基因克隆及测序分析

大麻素的生物合成途径涉及多条代谢通路。基因 *CsOLS1* 和 *CsOAC1* 编码其中关键催化酶橄榄酸醇合酶 (OLS) 和橄榄酸环化酶 (OAC) 催化合成橄榄酸 (OLA) 和 GPP 等前体物质。*CsPT4* 编码异戊烯基转移酶 (PT) 催化 OLA 和 GPP 缩合生成大麻萜酚酸 (CBGA) 和副产物 5-香叶基橄榄酸酯 (5-geranyl olivetolate)。CBGA 作为 CBD 和 THC 等大麻素的共同前体, 被大麻二酚酸合酶 (CBDAS) 和四氢大麻酸合酶 (THCAS) 分别氧化环化产生 CBDA 和 THCA, 通过非酶脱羧过程转化为 CBD 和 THC。以上大麻素合成代谢途径中涉及 5 个基因 *CsOLS1*、*CsOAC1*、*CsPT4*、*CBDAS* 和 *THCAS*, 在催化大麻素合成过程中起关键作用。根据以上关键催化基因序列特点设计引物进行 PCR 扩增, 引物扩增范围包括以上基因编码区和启动子区序列。本试验在中大麻资 4 号盛花期对 CBD 含量突变体株系 (EMS-12、EMS-79、EMS-153、EMS-58 和 EMS-211) 和对照组花头部分进行取样并制备样品的基因组 DNA。扩增以上 5 个基因的编码区和启动子区 DNA 片段并连入 T 载体后测序。测序结果显示: CBD 含量突变体株系与对照组植株在 5 个关键催化酶基因的编码区内均未发现碱基突变, 其启动子区范围内 DNA 序列也未发生突变。因此 CBD 含量突变体中 CBD 含量显著变异不是由催化酶基因自身序列突变导致。

2.5 突变体大麻素代谢途径关键催化酶基因表达分析

在盛花期对 CBD 含量突变体株系和对照组花头部分进行取样提取总 RNA 并通过反转录制备样品的 cDNA。通过 qRT-PCR 对 CBD 含量突变体株系和对照组中 5 个催化酶的基因表达水平进行探究。与对照相比, CBD 含量突变体株系中不同催化酶表达水平发生明显改变: 高 CBD 含量株系 EMS-12 中 *CsPT4* 基因表达水平是对照组的 1.82 倍, 高 CBD 含量株系 EMS-79 中 *CBDAS* 基因表达水平是对照组的 1.60 倍, 高 CBD 含量株系 EMS-153 中 *CsOLS1* 基因表达水平是对照组的 1.51 倍; 低 CBD 含量株系 EMS-58 的 *CsPT4* 基因表达水平相比于对照组下降 61.76%, 低 CBD 含量株系 EMS-211 在 *CsOAC1* 基因表达上相比于对照组

下降 36.26% (表 3)。由于 CBD 含量突变体株系中以上 5 个关键催化基因及其启动子区序列本身并未发生突变, 突变可能影响了相关催化酶调控基因的功能, 进而对大麻素合成代谢相关催化酶基因表达水平产生影响, 最终表现为突变体花头中 CBD 含量显著上升或下降。

表 3 开花期突变体大麻素合成相关途径基因表达分析

Table 3 Expression of genes involved in cannabinoid synthesis in mutants during flowering stage

	<i>CBDAS</i>	<i>THCAS</i>	<i>CsPT4</i>	<i>CsOAC1</i>	<i>CsOLS1</i>
对照	7. 8b	2. 5a	3. 4b	9. 1a	6. 3b
EMS-12	7. 5b	2. 3a	6. 2a	8. 6a	5. 8b
EMS-79	12. 5a	2. 7a	3. 1b	8. 8a	6. 7b
EMS-153	7. 6b	2. 1a	2. 8b	9. 3a	9. 5a
EMS-58	7. 3b	2. 5a	1. 3c	9. 0a	6. 5b
EMS-211	8. 2b	2. 2a	3. 7b	5. 8c	6. 1b

表中数值表示采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量, 字母“a/b/c”表示与对照组表达水平是否具有差异 ($p < 0.05$)

3 讨论

目前全球工业大麻种植、加工和利用的分布总体呈现了欧盟、北美、中国三大主产区的格局, 以上三大产区种植面积占全球一半以上, 仅 2019 年 CBD 产品市场年交易额达 35 亿美元^[33]。目前, 国内外许多研究机构针对该作物生长特点开展分子育种方面的研究, 希望借助基因工程及转基因技术定向培育满足生产需要的工业大麻品种, 由于技术尚不成熟进展缓慢。通过 EMS 诱变剂创制突变体群体, 创制具有优异表型性状的突变体株系已成为种质创新的重要途径^[18]。

本研究在工业大麻中构建了突变体群体, 并对其进行表型分析。当 EMS 溶液浓度上升、诱变时间延长时, 植物组织 DNA 受损程度显著加剧, 导致突变体数量增多, 然而, 过高的损伤可能导致植物无法存活。相反, 诱变剂量和诱变时间不足会降低突变发生频率并降低突变体筛选效率。不同种类作物对 EMS 耐受性存在较大差异, 在利用 EMS 构建植物突变体群体时首先应摸索适合的诱变剂量和诱变时间, 常采用半致死率为标准, 即诱变后能够存活一半植株的 EMS 剂量和时间组合。诱变时间和诱变剂量对突变频率均能产生影响, 本试验参考罗布麻等麻类作物的相关报道^[19], 将诱变时间设定为 13 h, 只通过 EMS 剂量调整达到预期目的。本试验从 0.2% 到 1.2% 共设置 6 个 EMS 浓度梯度, 发现当浓度为 0.8% 时, 种子萌发率为 41%, 最接近半致死率, 故采用 0.8% EMS 为诱变浓度进行中大麻资 4 号突变体群体构建。

目前 EMS 诱变筛选突变体大多应用于一年生自交繁殖作物, 此类作物大多通过自交在 M_2 代或 M_3 代获得纯合突变材料用于后续研究应用。在苦荞品种黑丰 1 号 EMS 突变体库创制中, 研究人员采取种子混收的方式连续种植两代, 到 M_3 代进行突变体性状调查^[18]。在小麦品种济麦 22 的 EMS 突变体库创制中, M_1 代

植株采用单株收获的方式获得 1213 个株系，并在当年秋天采取每个株系种植 40 个单株的方式获得济麦 22 的 M_2 代突变群体并开展性状调查^[22]。工业大麻属于雌雄异株植物，其异花授粉特性决定同一品种子代个体间存在遗传差异^[34]。突变出现后在 M_2 代及以后子代获得纯合突变材料难度较大。通过扦插繁殖方式保存优异工业大麻资源及扩繁，其子代遗传背景与母本相同，可保持母本植株全部优异性状^[35]。在工业大麻突变群体构建中，对 M_1 代进行扦插扩繁并在筛选获得突变体后保存优异突变，是加快工业大麻突变体表型鉴定、提高突变体利用效率的必然选择。本研究在工业大麻 M_1 代中进行突变体筛选，获得了多个性状的突变体植株共计 90 株，包括花头部分糖叶变紫植株 15 株、雌花发育出现退化植株 14 株、花头生物量显著增加 10% 以上植株 10 株、不同程度矮化（30cm 以上）突变植株 24 株，黄花苗 27 株（图 2）。由于工业大麻中调控相关性状的基因尚未见报道，以上突变体植株为相关性状调控机制研究及基因资源挖掘提供了实验材料。

由于大麻素成分 CBD 在抗抑郁、抗炎和缓解疼痛等方面具有重要的药用价值和临床应用前景^[6-8]，工业大麻花叶腺毛中提取药用成分 CBD 进行新药研发成为工业大麻产业发展的新方向^[12-13]。大麻素的生物合成过程非常复杂，涉及乙酸途径、MEP 途径、GPP 途径和以上 3 条途径产物为反应底物的 Cannabinoid 途径^[36]。己酸途径合成前体物质乙酰辅酶 A，MEP 和 GPP 途径合成前体物质焦磷酸香叶酯 GPP，两者通过聚酮合酶（OLS）和异戊二烯基转移酶（PT）的作用得到多种大麻素的中心前体 CBGA，再由 CBDA 合成酶（CBDAS）和 THC 合成酶（THCAS）分别催化生成 CBDA 和 THCA，经过脱羧最终生成 CBD 和 THC，大麻素 CBD 的生物合成主要受 5 个关键催化酶（*CsPT4*、*CsOAC1*、*CsOLS1*、*CBDAS* 和 *THCAS*）影响^[37]。

工业大麻花叶中含有 120 余种大麻素，其中与 CBD 结构相似的就有 8 种^[38]。高效液相色谱法（HPLC）灵敏度高，能准确区分 CBD 及其相似化合物，且检测后不会对大麻素结构产生影响，已广泛应用于大麻素分析中^[39]。本研究通过 HPLC 技术对突变群体花头中 CBD 含量进行测定并筛选到 5 个 CBD 含量变异株系。其中突变株 EMS-12、EMS-79 和 EMS-153 的 CBD 含量较对照组 CBD 含量分别提高 38.63%、47.11% 和 23.35%；EMS-58 和 EMS-211 的 CBD 含量较对照组 CBD 含量降低 51.03% 和 31.19%。大麻素作为植物次生代谢产物，其含量高低受到大麻个体间遗传差异及田间微环境影响^[40]。本实验在对随机采样的对照组植株 45 份生物学重复进行大麻素检测分析后发现，中大麻资 4 号大麻素含量的个体间差异未超过 8%。本实验将 CBD 含量变异株系的标准定义为 CBD 含量高于或低于对照组 CBD 平均含量 20%，该标准能够有效区分 CBD 含量变异株系与未变异株系。植物大麻素生物合成途径分为 3 个催化步骤：聚酮合成、异戊烯化和氧化环化^[41]。在以上催化步骤中有 5 个关键限速酶：橄榄醇合成酶（OLS）、橄榄酸环化酶（OAC）、异戊烯基转移酶（PT）、大麻二酚合酶（CBDAS）和四氢大麻酸合酶（THCAS）^[42]。任何一个酶的蛋白功能变化都会对最终大麻素含量产生显著影响。本实验首先对 CBD 含量突变体中 5 个关键催化酶基因的编码区及启动子区 DNA 序列进行克隆及测序均未发现序列突变。排除 DNA 序列变异的可能性后，进一步对以上催化酶在盛花期的表达水平进行探究，发现 CBD 含量突变体中以上关键酶表达与对照组存在显著差异：在 CBD

含量升高突变体 EMS-12、EMS-79 和 EMS-153 中分别检测到 *CsPT4*、*CBDAS* 和 *CsOLS1* 表达水平显著上升；在 CBD 含量降低突变体 EMS-58 和 EMS-211 中分别检测到 *CsPT4* 和 *CsOAC1* 表达水平显著下降。以上基因编码 CBD 合成途径中不同阶段前体物质的催化酶，其表达水平直接影响最终 CBD 含量高低。由于在 CBD 含量突变体中均未发现编码关键催化酶基因（包括启动子区）存在序列变异，但是在 CBD 含量突变体中检测到以上 5 个基因表达水平存在显著升高或降低，且变化趋势与大麻素检测结果一致。由此推断 EMS 导致了突变体中某些代谢调控基因突变进而影响 CBD 合成代谢途径关键催化酶的表达，最终表现为突变体花头中 CBD 含量显著变化。尽管有研究显示多个基因家族或与大麻素合成代谢有关联，但其调控 CBD 合成代谢的分子机制尚不清楚，且适用于工业大麻的遗传转化体系的建立及应用尚不成熟，因此无法开展有针对性的分子育种工作^[43-44]。解析 CBD 合成代谢途径的调控机制及相关调控基因的克隆是目前工业大麻分子育种领域急需解决的问题，也是培育优质高产工业大麻品种的理论基础。本研究构建的中大麻资 4 号突变体群体的获得，丰富了工业大麻种质资源。通过扦插扩繁保存的 CBD 含量突变体材料是克隆 CBD 合成调控相关基因及解析其分子作用机制的良好研究对象。关于 EMS 诱变剂使用浓度的摸索也为更多工业大麻品种突变体群体的创制提供了参考。

参考文献

- [1] Laursen L. Botany: The cultivation of weed. *Nature*, 2015, 525(7570): S4-S5
- [2] Livingston S J, Quilichini T D, Booth J K, Wong D C J, Rensing K H, Laflamme Y J, Castellarin S D, Bohlmann J, Page J E, Samuels A L. Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal*, 2020, 101(1): 37-56
- [3] Rodziewicz P, Loroch S, Marczak Ł, Sickmann A, Kayser O. Cannabinoid synthases and osmoprotective metabolites accumulate in the exudates of *Cannabis sativa* L. glandular trichomes. *Plant Science*. 2019, 284:108-116
- [4] 卢延旭, 董鹏, 崔晓光, 郭建书, 汪岩. 工业大麻与毒品大麻的区别及其可利用价值. *中国药理学通报*, 2007, 23(08): 1112-1114
Lu Y X, Dong P, Cui X G, Guo J S. Difference between industrial hemp and marijuana hemp and industrial hems use value. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2007, 23 (08): 1112-1114
- [5] 李秋实, 孟莹, 陈士林. 药用大麻种质资源分类与研究策略. *中国中药杂志*, 2019, 44 (20): 4309-4316
Li Q S, Meng Y, Chen S L. A new Cannabis germplasm classification system and research strategies of non-psychoactive medicinal cannabis. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44 (20): 4309-4316
- [6] Baron E P, Lucas P, Eades J, Hogue O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. *Journal of Headache and Pain*, 2018; 19(1):37
- [7] Hausman-Kedem M, Menascu S, Kramer U. Efficacy of CBD-enriched medical cannabis for treatment of refractory epilepsy in children and adolescents - An observational, longitudinal study. *Brain Development*, 2018; 40(7):544-551.
- [8] Martins A M, Gomes A L, Vilas Boas I, Marto J, Ribeiro H M. Cannabis-Based Products for the Treatment of Skin Inflammatory Diseases: A Timely Review. *Pharmaceuticals*, 2022; 15(2):210
- [9] 成亮, 孔德云. 大麻中非成瘾性成分大麻二酚及其类似物的研究概况. *中草药*, 2008, 39(5): 783-787
Cheng L, Kong DY. Review on non-psychoactive constituent cannabidiol from *Cannabis sativa* and those of cannabidiol analogues. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, 39(5): 783-787
- [10] Bonaccorso S, Ricciardi A, Zangani C, Chiappini S, Schifano F. Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neuro Toxicology*, 2019, 74: 282-298
- [11] Mechoulam R, Hanus L. Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. *Chemistry and Physics of*

Lipids, 2002, 121(1-2): 35-43

- [12] Russo E B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 163(7): 1344-1364
- [13] Ahmed S, Gao X, Jahan M A, Adams M, Wu N, Kovinich N. Nanoparticle-based genetic transformation of *Cannabis sativa*. *Journal of Biotechnology*, 2021, 48-51
- [14] 薛红芬, 刘胜贵, 孔令羽, 蒋永昌. 影响工业大麻产量的主要因素研究进展. *现代农业科技*, 2021, 24 (24): 34-39
Xue H F, Liu S G, Kong L Y, Jiang Y C. Research Advance on Main Factors Affecting Yields of Industrial Hemp. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021, 24 (24): 34-39
- [15] 苏芳芳, 杨光, 郑玉光. 工业大麻种植及育种现状研究. *中国中药杂志*, 2022, 47 (05): 1190-1195.
Su F F, Yang G, Zheng Y G. Cultivation and breeding of industrial *Cannabis sativa*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47 (05): 1190-1195.
- [16] Till B J, Cooper J, Tai T H, Colowit P, Greene E A, Henikoff S, Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *Bmc Plant Biology*, 2007, 7(1):19
- [17] 彭波, 徐庆国, 李海林, 刘红梅. 农作物化学诱变育种研究进展. *作物研究*, 2007, (S1): 517-519+524
Peng B, Xu Q G, Li H L, Liu H M. Research progress in crop chemical mutagenesis breeding. *Crop Research*, 2007, (S1): 517-519+524
- [18] 孙朝霞, 侯思宇, 郝彦蓉, 王东航, 高豪, 韩渊怀, 李红英, 刘龙龙, 周美亮. 苦荞突变体库构建与突变体中芦丁合成相关基因表达分析. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (02): 402-408
Sun Z X, Hou S Y, Hao Y R, Wang D H, Gao H, Han Y H, Li H Y, Liu L L, Zhou M L. EMS-assisted Mutagenesis of Tartary Buckwheat and Expression Analysis of Rutin Biosynthesis Genes in Selected Mutants. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (02): 402-408
- [19] 任婷婷, 任宏伟, 杜海娜, 张成省, 李义强, 高婷, 徐宗昌. 罗布麻 EMS 突变体库构建及黄酮变异突变体筛选. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (03): 655-662
Ren T T, Ren H W, Du H N, Zhang C S, Li Y Q, Gao T, Xu Z C. Construction of EMS Mutant Library and Screening of Total Flavonoid Content Mutants of *Apocynum venetum* L. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (03): 655-662
- [20] 陈开, 陈宇峰, 封昱均, 唐塘, 杨超, 华夏, 张冬平, 陈云, 吕冰. 水稻 EMS 诱变根系突变体的筛选及其农艺性状分析. *西南农业学报*, 2022, 35 (06): 1233-1242
Chen K, Chen Y F, Feng Y J, Tang T, Yang C, Hua X, Zhang D P, Chen Y, Lv B. Screening of root mutants induced by EMS and analysis of agronomic traits in rice. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 35 (06): 1233-1242.
- [21] 张庆宇, 王光达, 黄初女. EMS 处理玉米自交系花粉对结实率、出苗率和死亡率的影响. *黑龙江农业科学*, 2020, (01): 52-55
Zhang Q Y, Wang G D, Huang C N. Effect of EMS Reagent on Maize Pollen Rate, Seedling Setting Emergence and Mortality. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2020, (01): 52-55.
- [22] 袁凯, 张伟, 温宏伟, 张婷, 杨斌, 史晓芳, 姬虎太, 张明义, 逯腊虎. EMS 诱导济麦 22 突变体库的构建及表型变异分析. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (4): 979-988
Yuan K, Zhang H W, Zhang T, Yang B, Shi X F, Ji H T, Zhang M Y, Lu L H. EMS-induced Mutagenesis and Phenotypic Variation Analysis in Wheat Variety Jimai 22. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 (4): 979-988
- [23] 付小红, 董丽君, 罗佳玉, 赵琳, 孙永媛, 苑会宣, 刘建凤. 干旱胁迫下 EMS 诱变大豆生理生化特性研究. *大豆科学*, 2022, 41 (06): 703-709
Fu X H, Dong L J, Luo J Y, Zhao L, Sun Y Y, Yuan H X, Liu J F. Physiological and Biochemical Characteristics of EMS Mutagenic Soybean under Drought Stress. *Soybean Science*, 2022, 41 (06): 703-709
- [24] 聂萌恩, 柳青山, 范昕琦, 杨慧勇, 张一中, 樊芳芳, 张晓娟, 梁笃, 郭琦. EMS 诱变对高粱种子萌发及农艺性状的影响. *山西农业科学*, 2021, 49 (07): 802-806
Nie M E, Liu Q S, Fan X Q, Yang H Y, Zhang Y Z, Fan F F, Zhang X J, Liang D, Guo Q. Effects of EMS Mutagenesis Inducing Treatment on Seed Germination and Agronomic Traits of Sorghum. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2021, 49 (07): 802-806
- [25] Booth J K, Yuen M M S, Jancsik S, Madilao L L, Page J E, Bohlmann J. Terpene Synthases and Terpene Variation in *Cannabis sativa*. *Plant Physiology*, 2020, 184(1): 130-147
- [26] 李洪超, 王晓楠, 李紫薇, 孙宇峰, 曹焜, 赵越. 工业大麻中全基因组关联分析研究进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24 (05): 1257-1266
Li H C, Wang X N, Li Z W, Sun Y F, Cao K, Zhao Y. Advances in Genome-Wide Association Study in Industrial Hemp. *Journal of Plant Genetic Resources*

2023, 24 (05): 1257-1266

- [27] Cai S, Zhang Z, Huang S, Bai X, Huang Z Y, Zhang Y J, Huang L K, Tang W Q, Haughn G, You S J, Liu Y Y. Cannabis GDB: a comprehensive genomic database for *Cannabis Sativa* L. *Plant Biotechnology Journal*. 2021;19(5): 857-859
- [28] Jander G, Baerson S R, Hudak J A, Gonzalez K A, Gruys K J, Last R L. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in Arabidopsis to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*, 2003, 131 (1): 139-146
- [29] Deng C, Wu S, Jin X, Yang Z, Tang Q, Dai Z, Cheng C, Xu Y, Zhang X, Su J. Foliar application of kinetin modulates the cannabinoid content and transcriptome of *Cannabis sativa* L. *Australian Journal of Crop Science*, 2023,17(9): 684-692.
- [30] Livak J, Schmittgen D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta CT}$ method. *Methods*. 2001, 25; 402-408
- [31] 陈璇, 郭孟璧, 张庆滢, 许艳萍, 郭鸿彦, 杨明, 杨清辉. 滇南农家大麻品种中大麻素化学型及基因型研究. *西北植物学报*, 2013,33(09): 1817-1822
Chen X, Guo M, Zhang Q, Xu Y, Guo H, Yang M, Yang Q. Chemotype and Genotype of Cannabinoids in Hemp Landrace from Southern Yunnan. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013,33(09): 1817-1822
- [32] 张琳, 杜光辉, 杨阳, 欧阳文静, 牛江龙, 李涛, 刘飞虎, 汤开磊. 云南省花叶用工业大麻种植的经济效益与碳足迹分析. *中国麻业科学*, 2023,45(02): 58-65
Zhang L, Du G, Yang J, Ouyang W, Niu J, Li T, Liu F, Tang K. Economic Benefits and Carbon Footprint Analysis of Industrial Hemp Cultivation for Flowers and Leaves in Yunnan. *Plant Fiber Sciences in China*, 2023,45(02): 58-65
- [33] Zhang X, Xu G, Cheng C, Lei L, Sun J, Xu, Deng C, Dai Z, Yang Z, Chen X, Liu C, Tang Q, Su J. Establishment of an Agrobacterium-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1979 - 1987
- [34] 刘飞虎, 毛敬淞, 汤开磊, 杜光辉, 杨阳. 云南省花叶用工业大麻种植的经济效益与碳足迹分析. *中国麻业科学*, 2023, 45(02): 58-65
Liu F H, Mao J S, Tang K L, Du G H, Yang Y. Superiorities of All-female Industrial Hemp Cultivated using Cuttings Generated from Selected Female Plants. *Plant Fiber Sciences in China*, 2021, 19: 1979 - 1987
- [35] 王晓慧, 胡楠, 李振清, 陈虹廷, 续延国, 张东二. 全雌工业大麻高效育苗研究进展. *特种经济动植物*, 2024,3: 189-192
Wang X H, Hu N, Li Z Q, Chen H T, Xu Y G, Zhang D E. Research Progress on Efficient Seedling Rearing of All-Female Industrial Hemp. *Special Economic Animals and Plants*, 2024,3: 189-192
- [36] Van B H, Stout J M, Cote A G, Tallon C M, Sharpe A G, Hughes T R and Page J E. The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome biology*, 2011, 12(10): 1-18
- [37] Zager J J, Lange I, Sridvidya N, Smith A, Lange B M. Gene networks underlying cannabinoid and terpenoid accumulation in cannabis. *Plant physiology*, 2019, 180(4): 1877-1897
- [38] 李俊, 朱雪雯, 万会花, 米要磊, 王思凡, 孟祥霄, 杜伟, 苏畅, 孙伟, 杨维. 大麻中大麻素类化学成分及其分析方法研究进展. *中草药*, 2020, 51(24): 6414-6425
LI J, ZHU X W, WAN H H, MI Y L, WANG S F, MENG X X, DU W, SU C, SUN W, YANG W. Progress on chemical constituents and analytical methods of cannabinoids in *Cannabis sativa*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(24): 6414-6425
- [39] 祝冬, 范蓓, 孙玉凤, 王凤忠. 大麻二酚检测方法的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(3): 852-858
Zhu D, Fan P, Sun Y F, Wang F Z. Research progress on detection methods of cannabidiol. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(3): 852-858
- [40] 隋新, 杨帆, 付东, 刘佳莹. 影响大麻素含量的主要因素, *黑龙江科学*, 2023, 14(6), 11-22
Sui X, Yang F, Fu D, Liu J Y. Main Factors Affecting Cannabinoid Content, *Heilongjiang Science*, 2023, 14(6), 11-22
- [41] Taura F, Tanaya R, Sirikantaramas S. Recent advances in cannabinoid biochemistry and biotechnology. *Science Asia*, 2019, 45(5): 399-407
- [42] 高萍, 陈宇娴, 柯崇榕, 杨欣伟, 黄建忠. 新型靶向化合物—植物大麻素的生物合成途径及研究进展, *生物工程学报*, 2021, 37(6): 1968-1985
Gao P, Chen Y X, Ke C R, Yang X W, Huang J Z. New targeted compounds—biosynthesis of phytocannabinoids, *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(6): 1968-1985
- [43] Liu Y, Zhu P, Cai S, Haughn G, Page J. Three novel transcription factors involved in cannabinoid biosynthesis in *Cannabis sativa* L. *Plant Molecular Biology*, 2021, 106(1): 49-65
- [44] Lu M, Meng X, Zhang Y, Zhu X, Li J, Chen W, Wan H, Wang S, Cao X, Sun W, Mi Y, Zhai J. Genome-Wide Identification and Expression Profiles of bZIP Genes in *Cannabis sativa* L. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2022, 7(6): 882-895