

大麻 THCA 合成酶基因 (*CsTHCA*) RNA 干扰载体的构建及遗传转化

姜颖^{1,2}, 孙宇峰¹, 王晓楠¹, 韩承伟¹, 赵越¹, 韩喜财¹

(¹黑龙江省科学院大庆分院, 大庆 163319; ²黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319)

摘要: 大麻 THCA 合成酶基因 *CsTHCA* 在调控大麻 THC 含量方面起着重要的作用。通过 RT-PCR 方法从大麻中克隆了 *CsTHCA*, 该基因开放阅读框全长 1638 bp, 共编码 545 个氨基酸。通过 pSKint 中间载体, 构建 *CsTHCA* RNA 干扰植物转化载体并转化大麻茎尖, 获得转基因植株, 通过分析大麻中 THCA 合成酶基因的表达并结合薄层色谱法和 SPE-HPLC 法发现, 转基因植株中基因表达量降低且 THC 含量降低, 这表明 *CsTHCA* 通过某种机理正调控 THC 的含量。

关键词: 大麻; *CsTHCA*; RNA 干扰; 遗传转化

The Construction of *CsTHCA* RNA Interference Vector and Its Genetic Transformation in *Cannabis sativa* L.

JIANG Ying^{1,2}, SUN Yu-feng¹, WANG Xiao-nan¹, HAN Cheng-wei¹, ZHAO Yue¹, HAN Xi-cai¹

(¹Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163319; ²Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319)

Abstract: *CsTHCA* plays important role in regulating THC contents. In this study, we isolated the complete coding sequence of *CsTHCA* from *Cannabis Sativa* L., with an open reading frame of 1638 base pair. The deduced *CsTHCA* protein contained 545 amino acids. The *CsTHCA* RNA interference construct was generated through pSKint intermediate vector, which was transformed into the shoot tips of hemp. By analyzing the transcriptional level of *CsTHCA* by semi-quantitative RT-PCR and the THC content by thin-layer chromatography and SPE-HPLC, the reduction of *CsTHCA* expression and THC content was observed in transgenic lines relative to wild type. Thus, our results supported a positive role of *CsTHCA* in modulating THC content in hemp.

Key words: *Cannabis Sativa* L.; THCA synthase gene(*CsTHCA*); RNA interference (RNAi); genetic transformation

收稿日期: 2018-05-24

修回日期: 2018-08-02

网络出版日期:

URL (网络出版地址):

基金项目: 黑龙江省青年科学基金(QC2016037); 国家国际科技合作专项(2015DFR50260)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: bazhujiangying@126.com

大麻 (*Cannabis Sativa* L.) 是大麻科 (Cannabinaceae) 大麻属 (*Cannabis*) 一年生草本植物, 栽培利用历史悠久^[1], 其广泛应用于多个领域^[2-6]。大麻植株中活性物质可分为大麻酚类化合物和非大麻酚类化合物, 现研究最多的是大麻酚类化合物, 主要包括四氢大麻酚(THC)、大麻酚(CBN)、大麻二酚(CBD)等^[7]。四氢大麻酚—一种致幻成瘾的活性成分, 易被不法分子用来非法生产毒品, 造成社会危害, 许多国家把工业大麻也一并列为禁种作物^[8-11]。早在1995年, 人们就已经发现了THC生物合成途径中的关键酶是四氢大麻酸(THCA)合成酶, 这个酶是一个分子量为74 kDa的单体脱氢酶, 它催化由戊基间苯二酚酸到四氢大麻酸A的氧化环化反应^[12], 并于2004年成功克隆了该酶的基因^[13]。采用基因敲除突变(knock-out mutation)的方法使THC生物合成途径中的一个关键酶失活, 可为培育出不含THC的大麻新品系奠定基础^[14]。现广泛应用的基因敲除技术为RNA干扰, RNA干扰(RNA interference, RNAi)其指内源或外源双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)介导的内源靶基因的mRNA发生特异性降解, 进而抑制基因的表达, 使基因沉默的现象, 产生相应的功能表型缺失的现象。目前已报道了苧麻^[15]、红麻^[16]一些麻类作物中的某些基因RNAi载体的构建及验证, 但尚未有大麻这方面的报道。本研究旨在对四氢大麻酚合成酶基因构建RNA干扰载体, 并进行大麻茎尖遗传转化分析, 对该基因在调控THC表达方面的功能进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

大麻种子田间种植管理, 待长到开花期, 田间获取叶片、雄花、雌花混合样为材料, 保存于-80℃。

1.2 *CsTHCA* 的克隆

在NCBI上已知的大麻THCA合成酶基因

(GenBank登录号, AB057805.1)的氨基酸序列, 命名为*CsTHCA*。根据开放阅读框序列, 设计扩增引物 (*CsTHCA*-1F : ATGAATTGCTCAGCATTTTCCTT , *CsTHCA*-1638R : TTAATGATGATGCGGTGGAAGA)。用TRizol总RNA提取试剂盒(ProbeGene公司)提取大麻混合样的总RNA, 利用第一链cDNA Synthesis Kit(ProbeGene公司)反转录合成cDNA的第一链, 以第一链cDNA为模板, 用引物*CsTHCA*-1F/*CsTHCA*-1638R进行PCR扩增, 回收目标基因片段并测序。

1.3 *CsTHCA* RNA干扰载体的构建

利用*CsTHCA*开放阅读框的cDNA序列设计*CsTHCA* RNA干扰载体的引物, 正向序列: 酶切位点 *Sal* I 和 *Hind* III, (THCAihp I *Sal* F : 5'-CTAGTCGACCTCAGCATTTTCCTTTTG-3' ; THCAihp I *Hin* R : 5'-GCCCAAGCTTAAACTAAGATTCTCATTC-3')。反向序列: 酶切位点 *Sac* I 和 *Bam* H I, (THCAihp II *Sac* F : 5'-GTAGAGCTCCTCAGCATTTTCCTTTTG-3' ; THCAihp II *Bam* R : 5'-GGCGGATCCAAACTAAGATTCTCATTC-3'), 基因大小: 504bp。

以大麻的第一链cDNA为模板, 用引物对 THCAihp I *Sal* F/ THCAihp I *Hin* R, THCAihp II *Sac* F/ THCAihp II *Bam* R 扩增同一段cDNA序列, 回收纯化PCR产物, 并分别用*Sal* I / *Hind* III, *Sac* I / *Bam* H I 酶切处理, 回收酶切产物, 并依次连接到用*Sal* I / *Hind* III, *Sac* I / *Bam* H I 酶切处理的pSKint上, 构建成中间载体pSKihpTHCA。中间载体pSKihpTHCA质粒DNA经*Sal* I / *Sac* I 酶切处理后, 回收目的片段, 并连接到经相同酶切处理的

植物转化载体pSuperCAMBIA1300(+)上, 转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 进行菌液PCR鉴定, *Sal* I / *Sac* I 双酶切进一步鉴定, 植物表达载体pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA构建成功。

1.4 大麻茎尖转化及鉴定

提取pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA质粒, 农杆菌冻融法转化到农杆菌LBA4404(*Agrobacterium* strain LBA4404)感受态细胞。验证正确后, 将携带pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA的农杆菌, 转接到一定量的LB液体培养基(利福平, Rifampicin, 75 mg/L和卡那霉素, Kanamycin, 60 mg/L)中扩大培养, 28 $^{\circ}$ C振荡培养至OD600为0.5~0.6, 加入2 uL/mL 0.1 mol/L的AS激活菌种。继续振荡, 1h后, 4000 rpm离心10min收集菌体, 去上清, 用相同量的LB液体培养基重新悬浮。

挑选成熟、饱满、有光泽的大麻种子, 在超净台中进行种子消毒, 接种于发芽培养基上, 培养一段时间后, 将发芽培养后的无菌苗茎尖进行转化, 接种到共培养培养基中, 暗培养3d后, 将茎尖接种到再生培养基中, 培养一段时间的茎尖接种到生根培养基中。茎尖再生培养温度为24 \pm 1 $^{\circ}$ C、光照强度1800~2300lux、16h光照/8h黑暗。生根后炼苗, 移栽到温室中, 生长一段时间后, 按单株收获种子。

经过4 $^{\circ}$ C处理的大麻T₀代种子进行盆栽, 并在苗期对筛选得到的转基因植株进行PCR鉴定, 检测Hyg.B抗性基因潮霉素磷酸转移酶基因(Hygromycin B phosphotransferase gene, Hpt)的表达, 所用引物为HptF: 5'-TCTGCTGCTCCATACAAGCCAACC-3', HptR: 5'-GCCCATTCGGACCGCAAGGA-3', 扩增

目的片段长度为336bp。对Hpt检测为阳性的植株, 提取总RNA, 半定量RT-PCR分析*CsTHCA*在转基因植株中的mRNA表达水平, *CsTHCA*的半定量RT-PCR引物为, *CsTHCA*sq F: 5'-AGAGAAATTATGGCCTTGCGG-3', *CsTHCA*sq R: 5'-CGCACTGTAGTCTTATTCTTCCC-3'。内参引物序列为, 18S-F: 5'-CGCTCCTACCGATTGAATGG-3', 18S-R: 5'-CCTTGTTACGACTTCTCCTTCC-3'。另外, 对Hpt检测为阳性的植株在花期取样进行晾干, 混匀, 称取一定量样品装于小玻璃瓶, 120 $^{\circ}$ C烘干0.5h, 取出后研碎, 然后加入无水乙醇, 4 $^{\circ}$ C黑暗放置24h, 取出后用点样器点样于薄层板上, 将点好的薄层板放在展开室中展开, 然后晾干, 用显色剂浸泡显色, 取出后晾干观察结果。根据张旭等^[17]研究, 采用SPE-HPLC法测定大麻提取物中四氢大麻酚(THC)的含量, 液相检测条件: Venusil XBP C18(L): 4.6 \times 150 mm, 5 μ m; 流动相为V(甲醇): V(0.1%甲酸) = 80: 20; 柱温为40 $^{\circ}$ C; 检测波长为220 nm; 流速为1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 *CsTHCA*的克隆

提取大麻混合样的总RNA, 利用第一链cDNA Synthesis Kit反转录合成cDNA的第一链, 以第一链cDNA为模板, 用引物*CsTHCA*-1F/ *CsTHCA*-1638R进行PCR扩增(图1), 将PCR产物回收后进行测序。该基因开放阅读框全长1638 bp, 共编码545个氨基酸^[10]。

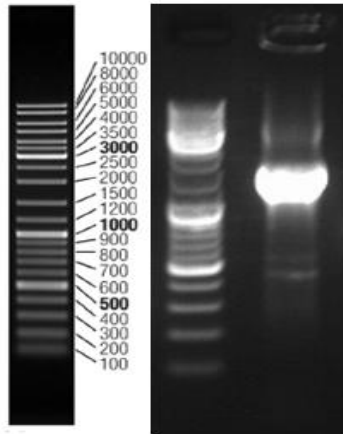


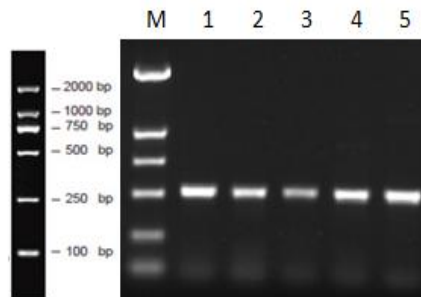
图 1 *CsTHCA* 开放阅读框 cDNA PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of the open reading frame of *CsTHCA*

2.2 *CsTHCA* RNA干扰载体的构建

在*CsTHCA*开放阅读框序列的功能序列中选取一小段序列(504bp)，设计带有不同酶切位点的两对引物。以测序正确的*CsTHCA*开放阅读框cDNA为模板，PCR扩增该目的片段(图2)并回收PCR产物，并分别用*Sal* I / *Hind* III，*Sac* I / *Bam*H I 酶切处理，回收酶切产物，正向片段与*Sal* I / *Hind* III双酶切pSKint载体连接，鉴定得到pSKTHCAihp I (图3)。

pSKTHCAihp I 经*Sac* I / *Bam*H I 双酶切与经*Sac* I / *Bam*H I 双酶切的*CsTHCA*反向片段进行连接，酶切验证正确后构建成中间载体pSKihpTHCA(图4)。中间载体pSKihpTHCA质粒DNA经*Sal* I / *Sac* I 酶切处理后，回收目的片段，并连接到经相同酶切处理的植物转化载体pSuperCAMBIA1300(+)上，酶切鉴定，构建成植物表达载体pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA(图5)。

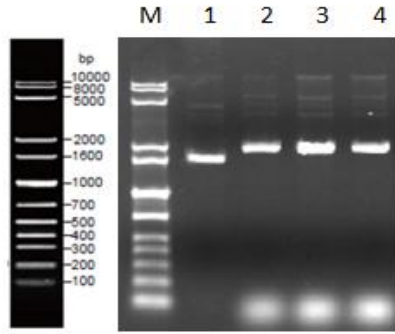


M: 分子量标准 D2000; 1~5: PCR 产物

M: D2000 DNA ladder; 1~5: PCR products

图 2 *CsTHCA*ihp I 和 ihp II PCR 扩增产物

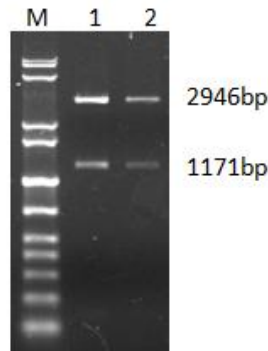
Fig.2 PCR amplification of *CsTHCA* ihp I and ihp II



M: 分子量标准 1 kb plus; 1: pSKint 质粒; 2~5: pSKTHCAihp I 质粒
M: 1 kb plus DNA ladder; 1: Plasmid of pSKint; 2~5: Plasmids of pSKTHCAihp I

图 3 pSKTHCAihp I 质粒

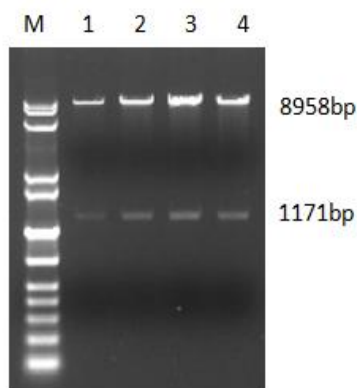
Fig.3 Plasmid of pSKTHCAihp I



M: 分子量标准 1 kb plus; 1~2: pSKihpTHCA 质粒 *Sal* I / *Sac* I 酶切
M: 1 kb plus DNA ladder; 1~2: pSKihpTHCA *Sal* I / *Sac* I enzyme digestion identification

图 4 pSKihpTHCA 质粒 *Sal* I / *Sac* I 酶切鉴定

Fig.4 Construct pSKihpTHCA *Sal* I / *Sac* I enzyme digestion identification



M: 分子量标准 1 kb plus; 1~4: pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA 质粒 *Sal* I / *Sac* I 酶切
M: 1 kb plus DNA ladder; 1~4: pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA *Sal* I / *Sac* I enzyme digestion identification

图 5 pSuperCAMBIA1300 (+) ihpTHCA 质粒 *Sal* I / *Sac* I 酶切鉴定

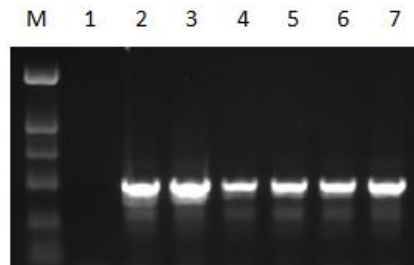
Fig.5 Construct pSuperCAMBIA1300(+)ihpTHCA *Sal* I / *Sac* I enzyme digestion identification

2.3 大麻茎尖转化及转基因植株分析

2.3.1 *CsTHCA* RNA 干扰转基因植株的获得 提取 pSuperCAMBIA1300(+)*ihpTHCA* 质粒, 进行农杆菌 LBA4404 感受态细胞转化, 28℃培养 48-72h, 挑去单菌落进行摇菌, 提取质粒后, 利用引物 THCAihp I SaIF 与 THCAihp I HinR 或 THCAihp II SacF

与 THCAihp II BamR 进行 PCR 扩增验证(图 6)。

消毒的种子在培养瓶中生长一段时间得到大麻幼苗, 根据大麻茎尖转化方法进行茎尖转化, 分别接种到共培养基培养基, 再生培养基和生根培养基, 最后移栽到土中, 收获种子, 如图7所示。

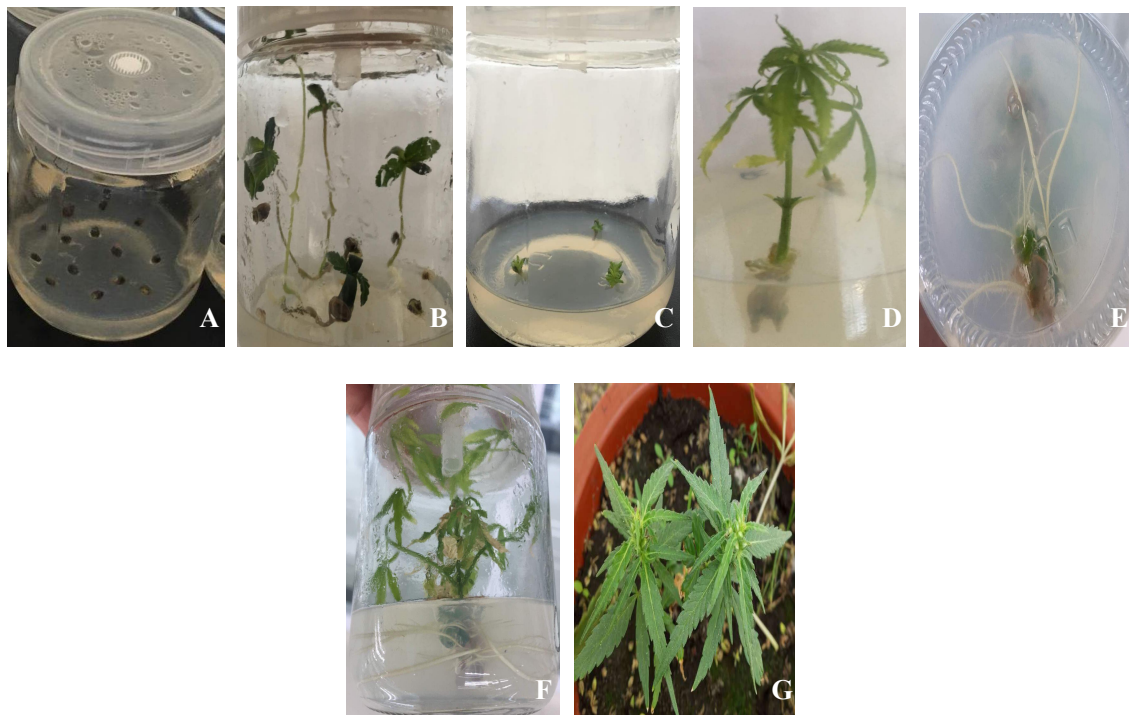


M: 分子量标准 D2000; 1: 阴性对照; 2~7: PCR 产物

M: D2000 DNA ladder; 1: negative control ; 2~7: PCR products

图 6 农杆菌感受态细胞转化后 PCR 扩增产物

Fig.6 PCR amplification after transformation of *Agrobacterium tumefaciens* competent cells



A. 消毒的种子; B. 无菌苗; C. 处于转化培养基的大麻茎尖; D. 茎尖再生植株; E-F. 生根植株; G. 再生植株

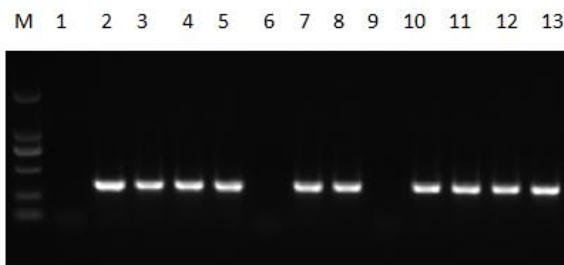
A. sterilized seeds; B. aseptic seedling; C. hemp shoot meristems; D. regeneration plant from hemp shoot meristems; E-F. rooting plant; G. regeneration plant

图 7 大麻芽尖分生组织转化获得再生植株

Fig.7 Regeneration of agro-bacterium infected hemp shoot meristems

2.3.2 *CsTHCA* RNA 干扰转基因植株的检测 通过农杆菌介导的方法,获得的 T₀代转基因种子经 Hyg. B 在 MS 培养基上筛选,对经 Hyg. B 筛选表现抗性的转基因大麻 T₁ 植株,提取其叶片基因组总 DNA,通过特异性引物检测 Hyg. B 抗性基因 Hpt 的表达,扩增 Hpt 基因片段长度为 336bp,同时以未转化大麻植株作为对照。随机选取 12 株 T₁ 代转基因植株进行检测,如图 8 所示,2~13 泳带检测的转基因植株中 2、3、4、5、7、8、10、11、12、13 均能检测出预期大小片段,而未转化植株中不能扩增出目的片段。结果初步表明,获得了阳性的 *CsTHCA* RNA 干扰转基因植株。

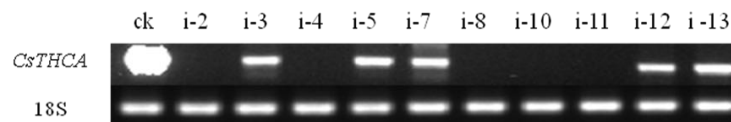
在 *Hpt* 检测为阳性的株系中,随机选取部分株系通过半定量 RT-PCR 检测目的基因 *CsTHCA* 的



M, D2000 DNA ladder; 1, 未转化植株提取的 DNA 为模板 PCR 扩增作对照; 2~13, 转基因植株提取的 DNA 为模板 PCR 扩增检测结果
M, D2000 DNA ladder; 1, PCR amplification using DNA extracted from untransformed plants as control; 2~13, PCR amplification using DNA extracted from transformed plants

图 8 转基因大麻的筛选基因 Hpt 的 PCR 检测

Fig.8 PCR assay of the transgenic hemp for Hpt genes



1, 半定量 RT-PCR 检测未转化植株中 *CsTHCA* mRNA 水平; 2~7, 半定量 RT-PCR 检测转化植株中 *CsTHCA* mRNA 水平

1, The assay results of relative mRNA level of *CsTHCA* in untransformed plants through semi-quantitative RT-PCR; 2~7, The assay results of relative mRNA level of *CsTHCA* in transgenic plants through semi-quantitative RT-PCR

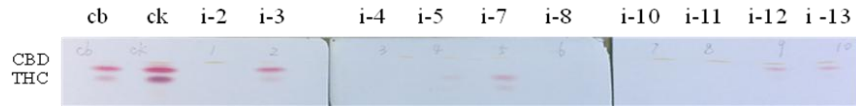
图 9 半定量 RT-PCR 检测转基因植株中 *CsTHCA* mRNA 水平

Fig.9 The assay results of relative mRNA level of *CsTHCA* in transgenic plants through semi-quantitative RT-PCR

mRNA 水平,其中株系 i-3, 5, 7, 12, 13 中 *CsTHCA* 的 mRNA 水平较未转化植株有明显降低,而在株系 i-2, 4, 8, 10, 11 中 *CsTHCA* 的 mRNA 水平未表达(图 9)。

利用薄层色谱法分析 *Hpt* 检测为阳性的株系中 THC 积累情况,图片中 cb 为标准样,其浓度为 0.03%(通过色谱仪测定其具体数值,选择 0.03%的样品作为标准样,ck 为未转化植株中 THC 积累情况。定性分析发现,THC 积累情况在转基因植株均比未转化植株中的低(图 10)。

针对上述薄层色谱法分析的 10 个样进行液相色谱检测定量分析 THC 含量,结果显示,THC 含量在转基因植株均比未转化植株含量低,且 i-2, 4, 8, 10, 11 基本不含有四氢大麻酚类物质(表 1)。



cb, 标准样; ck, 未转化植株中 THC 积累情况; i-2,3,4,5,7,8,10,11,12,13, 转化植株中 THC 积累情况

cb, Standard sample; ck, The accumulation of THC in untransgenic plants; i-2,3,4,5,7,8,10,11,12,13, The accumulation of THC in transgenic plants

图 10 薄层色谱法分析转基因植株中 THC 积累情况

Fig.10 The accumulation of THC in transgenic plants through thin layer chromatography

表 1 SPE-HPLC 法测定转基因植株中的 THC 含量

Table 1 Determination of THC content in transgenic plants by SPE-HPLC method

材料	THC 含量(%)	材料	THC 含量(%)	材料	THC 含量(%)	材料	THC 含量(%)
ck	0.2030	i-4	0.0000	i-8	0.0000	i-12	0.0087
i-2	0.0000	i-5	0.0067	i-10	0.0000	i-13	0.0070
i-3	0.0871	i-7	0.0320	i-11	0.0000		

ck, 未转化植株中 THC 的含量; i-2,3,4,5,7,8,10,11,12,13, 转化植株中 THC 的含量

ck, The content of THC in untransgenic plants; i-2,3,4,5,7,8,10,11,12,13, The content of THC in transgenic plants

3 讨论

THC 的含量特征是区分大麻品种含毒量的唯一标准, THCA 合成酶的分离对于大麻的相关研究具有重要的意义^[9]。Taura F 等^[18]成功地从大麻幼叶中分离出 THCA 合成酶, 且 Sirikantaramas S 等^[19]也从墨西哥大麻中将其克隆出来。Kojoma M. 等^[20]研究认为, 高毒大麻(THC 含量为 1.19%~7.51%)和低毒大麻(THC 含量为 0%~0.12%)资源中均存在四氢大麻酚合成酶基因, 根据 THCA 合成酶的基因序列可以清晰地分为高 THC 含量及低 THC 含量两类, 基因序列多态性导致大麻植株中四氢大麻酚合成酶的活性高低, 从而决定了 THC 含量。本研究通过 RT-PCR 的方法在大麻中克隆了 *CsTHCA* 基因的 cDNA 全长, 该基因开放阅读框全长 1638 bp, 共编码 545 个氨基酸。如果有幸得到不能产生任何有活性的 THC 基因型大麻株系, 则必将结束是否禁种大麻的争论。利用反

义技术(anti-sense)使相应基因失活从而不能指导相关蛋白质的合成, 是基因敲除突变的方法之一^[14]。转录后基因沉默(post transcriptional gene silencing, PTGS)是一种控制四氢大麻酚合成酶基因表达的有效方法, 通过转基因或其他转化方法将目标基因的自身反向重复序列导入植物细胞, 整合到植物基因组中后, 利用编码区序列, 400-800bp 的双链 RNA 长度均可达到稳定和有效的干扰效果, 目的片段被内含子(intron)连接后, 在转录过程中更为稳定, 更能有效的被植物 RNA 干扰机制识别, 该序列的转录产物会形成双链 RNA 或自我互补的发卡状双链 RNA(hairpin RNA, hpRNA), 被植物 RNA 干扰机制识别后引起目标基因的 RNA 干扰, 从而干扰靶基因的正常表达^[21-24]。本研究利用克隆的 *CsTHCA* 部分序列, 序列长度为 504bp, 构建 RNA 干扰载体, 通过中间载体 pSKint 在内含子两端加入尾尾相连被内含子

衔接的(intron-spliced hairpin)*CsTHCA*同一段cDNA序列(ihp*CsTHCA*), 酶切后连接到pSuperCAMBIA1300(+)上, 构建植物表达载体pSuperCAMBIA1300(+)*ihpTHCA*。应用遗传转化技术来验证基因功能或是根据由遗传转化产生的突变体的突变表型分析基因功能来进行功能基因组学研究具有重要的意义^[25]。在大麻植物组织培养方面, 国内外专家做了大量的研究工作, Slusarkiewicz-Jarzina A和K. Wielgus等^[26-27]研究不同组合的植物生长调节剂对大麻不同外植体的愈伤组织诱导和植物再生的影响。刘以福等^[28]首次利用大麻组织培养获得绿苗。研究人员^[29-31]也针对大麻组织培养中的玻璃化苗、快速繁殖方法、大麻再生体系的构建等进行了相关研究。但迄今为止, 国内外关于大麻遗传转化的研究报道甚少, 国内更是未见报道^[32]。Hartsel S C等^[32]于1983年, 通过植物组织培养系统首次对大麻素进行生物转化, 并讨论了转化机制和意义。Loh H T等^[33]也报道了大麻组织培养及体外生物转化。Feeney M等^[34]研究大麻在组织培养中的繁殖, 并建立农杆菌介导的外源基因导入方法, 旨在通过生物技术开发出具有优良性状的大麻新品种, 但该试验没有得到愈伤组织再生苗。本研究通过农杆菌菌液浸染大麻茎尖, 进行大麻茎尖转化, 成功得到成活植株。针对部分T₁代植株进行后代检测, 获得转基因株系, 并分析转基因株系中*CsTHCA*的mRNA水平来研究该基因是否得到有效的沉默, 结果发现, *CsTHCA*在部分转基因株系中的mRNA水平有明显降低, 在这些株系中, 该基因的表达被有效的干扰。利用薄层色谱法和SPE-HPLC法分析发现, 转基因植株的THC含量较未转化植株含量降低。可见, RNA干扰可有效的抑制*CsTHCA*的表达, 进而降低植株中THC含量, 这表明*CsTHCA*可能通过某种机理正调控THC的含量, 其研究机理还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Bouloc P, Allegret S, Arnaud L, Bouloc P, Allegret S, & Arnaud L. Hemp: industrial production and uses. *Hemp Industrial Production & Uses*, 2013
- [2] Radu S, Robu T. Effects and efficiency of dietary hemp seed and flaxseed oils on the human metabolic function. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 2014, 15(1):326-331
- [3] Rodriguezleyva D, Pierce G N. The cardiac and haemostatic effects of dietary hempseed. *Nutrition & Metabolism*, 2010, 7(1):32-32
- [4] Lee M J, Park M S, Hwang S, Hong Y K, Choi G, Suh Y S, Han S Y, Kim D, Jeun J, Oh C T, Lee S J, Han S J, Kim D, Kim E S, Jeong G, Cho K S. Dietary hempseed meal intake increases body growth and shortens the larval stage via the upregulation of cell growth and sterol levels in *Drosophila melanogaster*. *Molecules & Cells*, 2010, 30(1):29-36
- [5] 胡尊红, 郭鸿彦, 胡学礼, 陈璇, 刘旭云, 郭孟壁, 张庆滢, 许艳萍, 郭丽芬, 杨明. 大麻品种遗传多样性的AFLP分析. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(4): 555-561
- [6] 张华, 张建春, 张杰. 汉麻-一种高值特种生物质资源及应用. *高分子通报*, 2011 (8): 1-7
- [7] 常丽, 唐慧娟, 李建军, 黄思齐, 陈安国, 赵立宁, 李德芳. 大麻CBDA1基因的生物信息学分析. *安徽农业科学*, 2017, 45(29):144-148
- [8] 陈建华, 臧巩固, 赵立宁, 李育君, 唐慧娟. 大麻化学成分研究进展与开发我国大麻资源的探讨. *中国麻业科学*, 2003, 25(6) :266-271
- [9] 陈璇, 杨明, 郭鸿彦. 大麻植物中大麻素成分研究进展. *植物学报*, 2011, 46(2):197-205
- [10] 姜颖, 潘冬梅, 李秋芝, 王晓楠, 韩承伟, 曹焜, 韩喜财. 大麻THCA合成酶基因的克隆及生物信息学分析. *山西农业大学学报:自然科学版*, 2017, 37(5):326-329
- [11] 姜颖, 孙宇峰, 李秋芝, 潘冬梅, 韩喜财. 大麻中THCA合成酶基因的表达分析. *中国麻业科学*, 2017, 39(6):278-282
- [12] Taura F, Morimoto S, Shoyama Y, Mechoulam R. First direct evidence for the mechanism of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, 117(38):9766-9767
- [13] Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, Ishikawa Y, Wada Y, Shoyama Y, Taura F. The gene controlling marijuana psychoactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38):39767-39774
- [14] 陈建华, 赵立宁, 臧巩固. 去除大麻中四氢大麻醇(THC)的方法: 四氢大麻酸合成酶基因突变法. *中国麻业*, 2002, 24(4):50-52
- [15] 杨飞, 朱睿, 林娜, 刘飞虎. 苎麻雄性不育相关基因atp6和atp9 RNA干扰载体的构建. *中国农学通报*, 2013, 29 (21) :137-143
- [16] 黄志鹏, 赵艳红, 明庭会, 余明丽, 冉珊敏, 钱景华, 周瑞阳, 陈鹏. 红麻6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PDGH)基因克隆及RNAi载体构建. *南方农业学*

报,2014,45(12):2110-2116

- [17] 张旭,孙宇峰,田媛,石雨,崔宝玉,高宝昌.SPE-HPLC法同时测定汉麻提取物中3种大麻酚含量.化学试剂,2018,40(6):547-550, 554
- [18] Taura F, Morimoto S Y. Cannabinerolic acid, a cannabinoid from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 1995, 39(2):457-458
- [19] Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, et al. The Gene Controlling Marijuana Psychoactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(38):39767-39774
- [20] Kojoma M, Seki H, Yoshida S, Muranaka T. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in “drug-type” and “fiber-type” *Cannabis sativa* L. *Forensic Science International*, 2006, 159(2-3):132-140
- [21] Chuang C F and Meyerowitz E M. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97 (9): 4985-4990
- [22] Waterhouse P M, Helliwell C A. Exploring plant genomes by RNA induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 2003 (4) : 29-38
- [23] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal*, 2001, 27: 581-590
- [24] 姜颖,曹言勇,路运才,唐保军,王利锋,李会勇等. 拟南芥中RING型E3泛素连接酶基因 *AtGW2* 的克隆和功能分析. 植物遗传资源学报,2011,12(3):448-454
- [25] Kaiser J. Plant genetics. From genome to functional genomics. *Science*, 2000, 288(5472):1715-1715
- [26] Slusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z. Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol Craco Ser Bot. Acta Biologica Cracoviensia*, 2005, 47(2):145-151
- [27] K. Wielgus, A. Luwanska, W. Lassocinski, et al. Estimation of *Cannabis sativa* L. Tissue Culture Conditions Essential for Callus Induction and Plant Regeneration. *Journal of Natural Fibers*, 2008, 5(3):199-207
- [28] 刘以福,唐祥发. 大麻组织培养首次获得绿苗. 中国麻作, 1984(2):29-29
- [29] 尹品训,杨明,郭鸿彦,等. 大麻组织培养中玻璃化苗研究初报. 云南农业科技, 2004(4):12-12
- [30] 夏冰,李凝,佟金凤,等. 工业用途的大麻快速繁殖方法:, CN 1887043 A[P]. 2007
- [31] 姜颖,夏尊民,韩承伟,等. 工业大麻高效再生体系的初步研究. 中国麻业科学, 2015(3):126-129
- [32] 赵越,魏国江,潘冬梅,等. 农杆菌介导的汉麻遗传转化影响因素的研究进展. 黑龙江农业科学, 2015(9):157-160
- [33] Hartsel S C, Loh W H, Robertson L W. Biotransformation of Cannabidiol to Cannabielsoin by Suspension Cultures of *Cannabis sativa* and *Saccharum officinarum*.. *Planta Medica*, 1983, 48(1):17-19
- [34] Loh H T, Hartsel S C, Robertson L W. Tissue Culture of *Cannabis sativa*, L. and in vitro, Biotransformation of Phenolics. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 1983, 111(5):395-400
- [35] Feeney M, Punja Z K. Tissue culture and *Agrobacterium* -mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa*, L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2003, 39(6):578-585