

汉麻酚类活性物质生物合成调控的研究进展

崔素娟³, 武文博³, 谢 洋¹, 李 鹏¹, 隋 新¹, 张晓臣¹, 郭春景¹, 李广泽⁴, 尹 静^{2,3*}

1. 黑龙江省科学院高技术研究院, 黑龙江 哈尔滨 150020

2. 东北林业大学 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

3. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

4. 深圳诺普信农化股份有限公司, 广东 深圳 518102

摘 要: 汉麻 *Cannabis sativa* 是典型的一年生且雌雄异株的开花植物, 是大麻素的主要来源, 具有多种精神活性和药理作用, 由于对人类疾病的治疗潜力而被广泛关注。除了具有精神活性的主要成分四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC) 外, 还含有非精神活性的酚类化合物如大麻二酚 (cannabidiol, CBD), 作为抗肿瘤的候选药物具有很高的价值。然而在已知的 600 多种大麻素中, 大多数含量较低, 由于其在医学、日化和工业方面具有广泛的用途, 迫切需要应用新的生物技术提高大麻素的生物合成。大麻素的异源生物合成可以实现低成本且快速的生产, 各种组织培养方法, 如微繁殖、细胞悬浮培养、毛状根培养和农杆菌介导的基因转化方法在汉麻育种、新性状开发及规模化繁殖方面具有潜在的应用价值。综述了汉麻酚类化合物药理学、合成积累规律及其生物合成最新进展, 重点探讨了大麻组织培养方面重要的成果, 以期为汉麻酚类物质生物合成及其利用提供科学依据和参考。

关键词: 汉麻; 酚类化合物; 代谢途径; 生物合成; 组织培养

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)04-1240-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.032

Research progress on biosynthesis regulation of phenolic active substances in *Cannabis sativa*

CUI Su-juan³, WU Wen-bo³, XIE Yang¹, LI Peng¹, SUI Xin¹, ZHANG Xiao-chen¹, GUO Chun-jing¹, LI Guang-ze⁴, YIN Jing^{2,3}

1. High Tech Research Institute of Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150020, China

2. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

3. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

4. Shenzhen Noposion Agrochemicals Co., Ltd., Shenzhen 518102, China

Abstract: *Cannabis sativa* L., (hemp is an annual and typically dioecious flowering crop with medicinal and psychoactive properties. It is the main source of phytocannabinoids and getting more attention due to the therapeutic potential for human diseases. Besides the main constituent Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the phenolic compounds with nonpsychoactive effects, such as cannabidiol (CBD), is high value as drug candidate for antitumor. From the more than 600 known cannabinoids reported, most can only be extracted in very low amounts. It is urgent to apply new biotechnologies to improve the efficient synthesis of cannabinoids due to its wide range of medical, daily chemical and industrial applications. Theogenous biosynthesis of cannabinoids can achieve low cost and fast production, culture methods of various tissue, such as microreproduction, cell suspension culture, hair root culture, and *Agrobacterium*-mediated gene transformation, they have the potential application for breeding and novel trait development, as well as mass propagation of cannabis. The pharmacology of cannabiphen compounds, synthesis accumulation rules and the latest progress of cannabiphen biosynthesis have been reviewed, and the important achievements in tissue culture of cannabis were discussed in this paper, in order

收稿日期: 2021-07-21

基金项目: 院企联合横向课题 (YQLH09GJS10); 中央高校基本业务科研基金 (20200522-4)

作者简介: 崔素娟 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为天然产物代谢调控与利用。E-mail: 18742899729@163.com

*通信作者: 尹 静 (1978—), 教授, 博士生导师, 研究方向为天然产物代谢调控与细胞工程利用。E-mail: yinjing20135@163.com

to provide scientific basis and important reference for the biosynthesis and utilization of hemp phenols.

Key words: *Cannabis sativa* L. (hemp); phenolic compounds; metabolic pathway; synthetic biology; tissue culture

汉麻 *Cannabis sativa* L. 又称工业大麻, 属于木兰纲 (Magnoliopsida) 荨麻目 (Urticales) 大麻科 (Cannabinaceae) 大麻属 *Cannabis* Linn. 一年生草本植物^[1], 具有悠久的药用、工业、娱乐和农业用途^[2]。大麻中含有致幻成瘾的毒性成分四氢大麻酚 (tetrahydrocannabinol, THC), 按照国际规定, THC 含量低于 0.3% 的大麻称为工业大麻。虽然数千年来汉麻一直被用于传统药物和纺织纤维材料, 但其越来越多地被认为是药物、调味化合物等多种次级代谢物的来源^[3]。

汉麻中存在大量的活性成分, 迄今为止从汉麻中分离出 600 多种次生代谢物^[4], 主要是汉麻植物特有的萜酚类化合物, 即大麻素^[5]。目前, 已从汉麻中鉴定出超过 115 种大麻素, 主要产生于雌花的腺毛中, 大麻二酚 (cannabidiol, CBD)、THC 和大麻环萜酚 (cannabichromene, CBC) 为汉麻中的主要大麻素^[6], 目前已经对一些标志性大麻素及其类似物的潜在医用价值进行了广泛的研究, 某些大麻素制剂已被一些国家批准为治疗一系列人类疾病的处方药, 研究最多的是 THC 和 CBD^[7], 二者具有治疗多种人类疾病的潜力, 如缓解与癌症相关的慢性疼痛, 降低细胞抑制剂和化疗的不利影响, 改善与厌食症和艾滋病相关的饮食失调、炎症性疾病、癫痫以及多发性硬化症^[8]。

次级代谢物的传统获取方式是从植物中提取或通过化学合成, 但因其结构复杂, 使用化学合成的方法成本高、效益低, 无法成为大量合成大麻素的有效途径。研究表明通过工程微生物菌株生物合成大麻素已成为获得具有成本效益、高质量和可靠大麻素的有效手段^[9]。Zirpel 等^[10]通过四氢大麻酚酸 (tetrahydrocannabinol acid, THCA) 合成酶在酵母 *Komagataella phaffii* 中的表达, 使大麻萜酚酸 (cannabigerolic acid, CBGA) 转化为 Δ^9 -四氢大麻酚酸 (Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid, Δ^9 -THCA)。有研究报道利用合成生物学方法重组酿酒酵母中的橄榄酸生物合成模块, 可以从己酸或半乳糖中生产大麻萜酚酸 (cannabigerolic acid, CBGA), 但大多数代谢物生物合成的量仍有待提高^[11-12]。尽管已经阐明了许多参与大麻素生物合成的基因, 但由于很少有关于汉麻组织稳定转化的报道, 这些基因的功能

尚未得到充分验证, 其生物合成的遗传学仍然未知, 因此, 掌握及利用遗传学及生物工程技术提高大麻素含量及产量是目前研究者的主要目标。体外组织培养技术如愈伤组织培养、细胞培养、植株再生和毛状根培养是大多数生物技术工具的基础^[13-14], 体外培养方法与基因工程技术 (如农杆菌介导的基因转化和基因组编辑) 相结合, 为在汉麻中产生新基因型和调控次级代谢产物的合成提供了机会^[15]。另外, 高效、可靠的体外培养方法是成功进行基因转化、基因组编辑、微繁殖的关键策略。本文综述利用基因工程、细胞工程技术调控汉麻酚类合成研究方面的最新进展, 有助于了解汉麻生物合成途径, 评估组织培养优化技术在汉麻植物繁殖中的潜在应用及价值, 以期对相关领域的深入研究及广泛应用提供重要的参考依据。

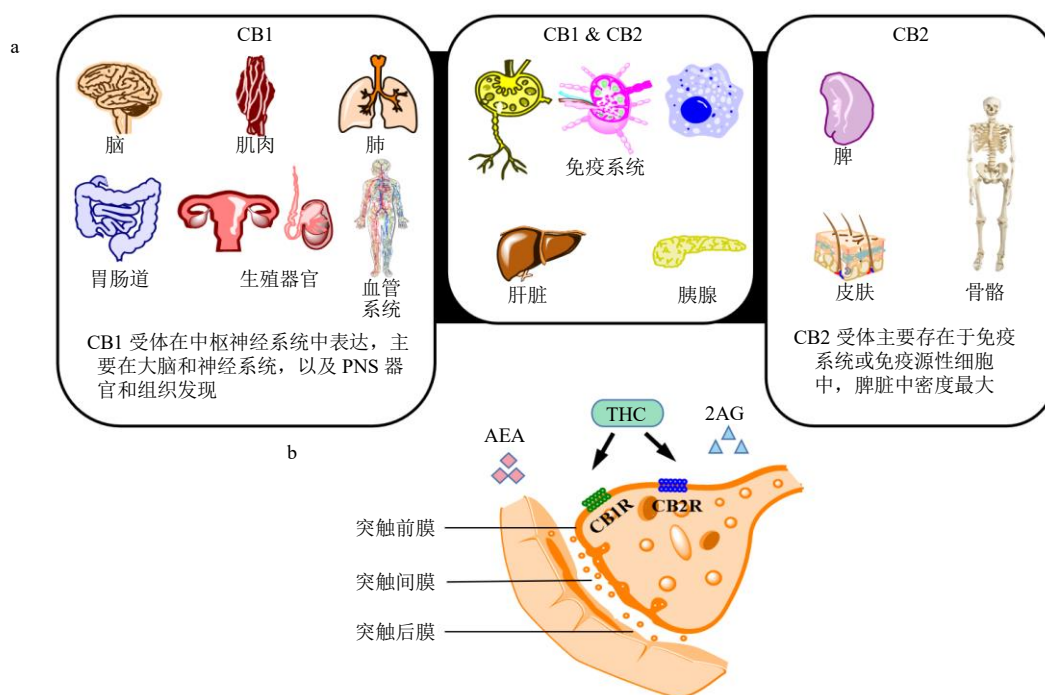
1 汉麻内源性大麻素系统及其抗癌作用

1.1 内源性大麻素系统

大麻素根据其来源可分为 3 类: 植物大麻素、内源性大麻素和合成大麻素^[6], 植物大麻素与分布于全身的特定受体结合, 称为内源性大麻素受体。内源性大麻素受体及其内源性神经递质 *N*-花生四烯酸乙酰胺 (*N*-anandamide, *N*-AEA) 和 2-花生四烯酸甘油酯 (2-arachidonoylsn-glycerol, 2-AG), 以及负责内源性大麻素合成和降解的酶, 形成内源性大麻素系统 (endogenous cannabinoid system)。除此之外, 其他分子也被认为是内源性大麻素, 如 *N*-花生四烯酰多巴胺 (*N*-arachidonoyldopamine, NADA)、2-花生四烯酰甘油醚 (2-arachidonoylsn-glycerol, 2-AGE)、*O*-花生四烯酰乙醇胺 (*O*-virodhamine, *O*-AEA) 和油酸酰胺 (oleic acid amide, OA)^[17]。有 2 种内源性大麻素受体 CB1、CB2 (1 型和 2 型大麻素受体), 它们属于 G 蛋白偶联受体家族, 存在于中枢神经系统 (主要表达 CB1) 和免疫组织 (主要表达 CB2)。两者都在与大麻素相互作用时发挥抑制神经元活动的作用^[18-19]。与 CB2 相比, AEA 对 CB1 的亲和力较高, 而 2-AG 对 CB1 和 CB2 的亲和力中等。外源性 THC 是部分 CB1 和 CB2 激动剂, 而植物大麻素 CBD 对这些受体的亲和力较低^[19-20] (图 1)。

1.2 抗癌作用及机制

大麻素主要用于癌症的姑息治疗, 以减轻疼痛、



a-人体中大麻素受体的分布 b-内源性大麻素受体 *N*-花生四烯酸乙醇胺 (AEA)、2-花生四烯酸甘油酯 (2-AG) 和外源性 Δ^9 -四氢大麻酚 (Δ^9 -THC) 与大麻素受体 1 型 (CB1) 和 2 型 (CB2) 的结合

a-distribution of endocannabinoids receptors through human body b-binding of endogenous anandamide (AEA), 2-arachidonoylsn-glycerol (2-AG), and exogenous Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) with cannabinoid receptors type 1 (CB1) and type 2 (CB2)

图 1 内源性大麻素系统^[16,21]

Fig. 1 Endogenous cannabinoid system^[16,21]

刺激食欲和缓解恶心。近年来, 已经对大麻素作为癌症患者的抗肿瘤和症状缓解剂的潜在用途进行了广泛的研究。内源性大麻素系统在癌症中的作用机制尚不完全清楚, 但一些研究表明, 大麻素受体和内源性配体在肿瘤组织中过度表达^[22]。已发现大麻素可通过激活大麻素受体抑制肿瘤细胞增殖、血管生成、肿瘤侵袭, 并可在体内外诱导细胞凋亡^[23]。Jeong 等^[24]证实了 CBD 通过抑制 IAP 蛋白家族成员 X 连锁凋亡抑制因子 (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 诱导细胞凋亡, 促进了胃癌细胞死亡。Mazuz 等^[25]发现大麻素混合物 THC 和 CBD 以及 CBD 和 CBGA 的组合可诱导皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL) 细胞周期停滞和凋亡而引起细胞死亡。Bachari 等^[26]研究证实大麻素单独或组合使用抑制了肿瘤的生长, 并促进了黑色素瘤细胞的凋亡和自噬。

大麻素诱导细胞凋亡的已知机制是其与 G 蛋白偶联受体 55 (G protein-coupled receptor 55, GPR55)、瞬时受体电位阳离子通道辣椒素受体 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 和瞬时受体电

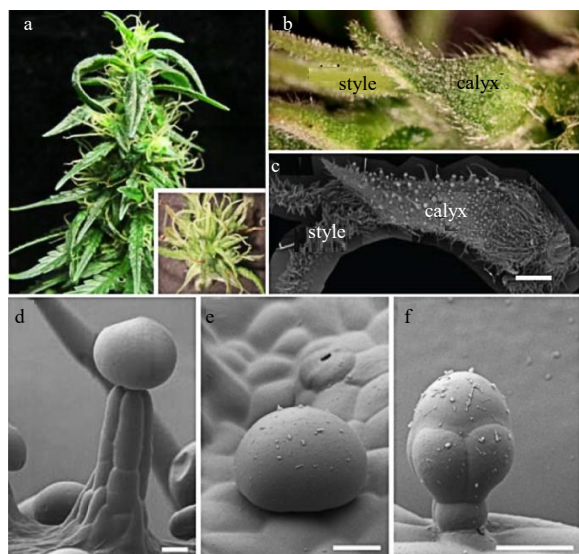
位 M 型 8 (transient receptor potential melastatin 8, TRPM8) 相互作用, 如 CBD 和大麻酚是 TRPM8 受体的有效拮抗剂^[8,27], 从而发挥抗癌作用。此外, CB2 受体 (CB2R) 具有免疫调节作用, 其激活可影响免疫细胞释放细胞因子、抑制 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 产生和 T 细胞增殖^[28]。此外, 大麻素具有阻断血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 通路, 并通过阻断神经酰胺生物合成激活血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 的能力, 从而抑制肿瘤细胞血管再生^[29]。

2 汉麻不同酚类物质的分布特性及含量积累规律

2.1 汉麻不同组织部位酚类物质含量积累规律

陈璇等^[30]研究表明, 汉麻植株顶端叶片中主要大麻素含量在幼苗期和快生期含量接近零, 盛蕾期、盛花期和始果期逐渐上升, 说明大麻素在生殖阶段开始积累, 苞片、花和果外围的变态叶是始果期大麻素含量最高的器官。也有研究表明, 汉麻酚类化合物主要存在于包裹种子的小苞叶中, 其次是植株顶部叶片, 底部叶片中大麻素含量最少^[31]。

研究证明大麻素的生物合成和积累发生在腺毛上^[32],腺毛状体分为有柄毛状体、无柄毛状体和茎状毛状体。茎状毛状体是从无柄毛状体形成的(图2)。腺毛状体在堆积有分泌性囊泡的气球状腔中积聚大麻素^[33-36]。在根表面没有发现腺毛,因此根组织不会积聚植物大麻素^[37]。腺毛不仅分泌大麻素,还可以合成大麻素^[38]。大麻素含量的增加对应于叶片腺毛状体的发育和生长,且叶片发育各阶段的腺体密度与大麻素含量之间存在相关性^[39]。



a-开花的雌花“Finola”(芬兰品种汉麻)植物;孤立的花簇,包含无数的花萼,具密集的腺毛 b-解剖单个雌花的花萼和花柱的显微镜图像 c-使用常规 SEM 观察单个雌花花萼的图像,比例尺 500 μm d~f-3 种类型的汉麻腺毛状体的低温 SEM 图,分为有柄型(d)、无柄型(e)和球茎型(f),比例尺 20 μm
a-flowering female ‘Finola’ plant (Finnish hemp); inset: isolated floral cluster containing numerous calyces bearing densely populated glandular trichomes b-dissecting microscope image of the calyx and styles of an individual female flower c-image of the calyx of an individual female flower using conventional SEM, scale bar 500 μm d-f-cryo-SEM images of the three types of cannabis glandular trichomes, classified as stalked (d), sessile (e), and bulbous (f), scale bars 20 μm

图2 汉麻植株腺毛类型^[33]

Fig. 2 Glandular hair types of hemp^[33]

2.2 不同汉麻酚类物质的合成积累及分布特性

汉麻植株中不同大麻素的分布都有其特性,用于生产大麻素的汉麻植株是雌雄异株,这些化合物在未受精的雌性花序上积累。在雌性植株的叶和花中 THC 含量最高,种子和根中几乎不含有 THC^[40],CBD 的分布特征与 THC 十分相似,因为 THC 和 CBD 是由相同基因位点控制的互为共显性的 2 个性状^[41]。

当干燥后的汉麻长期暴露在紫外线、空气或潮湿的环境中会产生另一种大麻素,即大麻酚(cannabinol, CBN),其在新鲜及阴干的汉麻材料中是不存在的,是 THC 经氧化后得到的产物^[42]。在汉麻幼苗期产生的主要大麻素是大麻环萜酚(cannabichromene, CBC),CBC 的含量随着植株的成熟而降低,以至可以忽略不计^[43-45]。

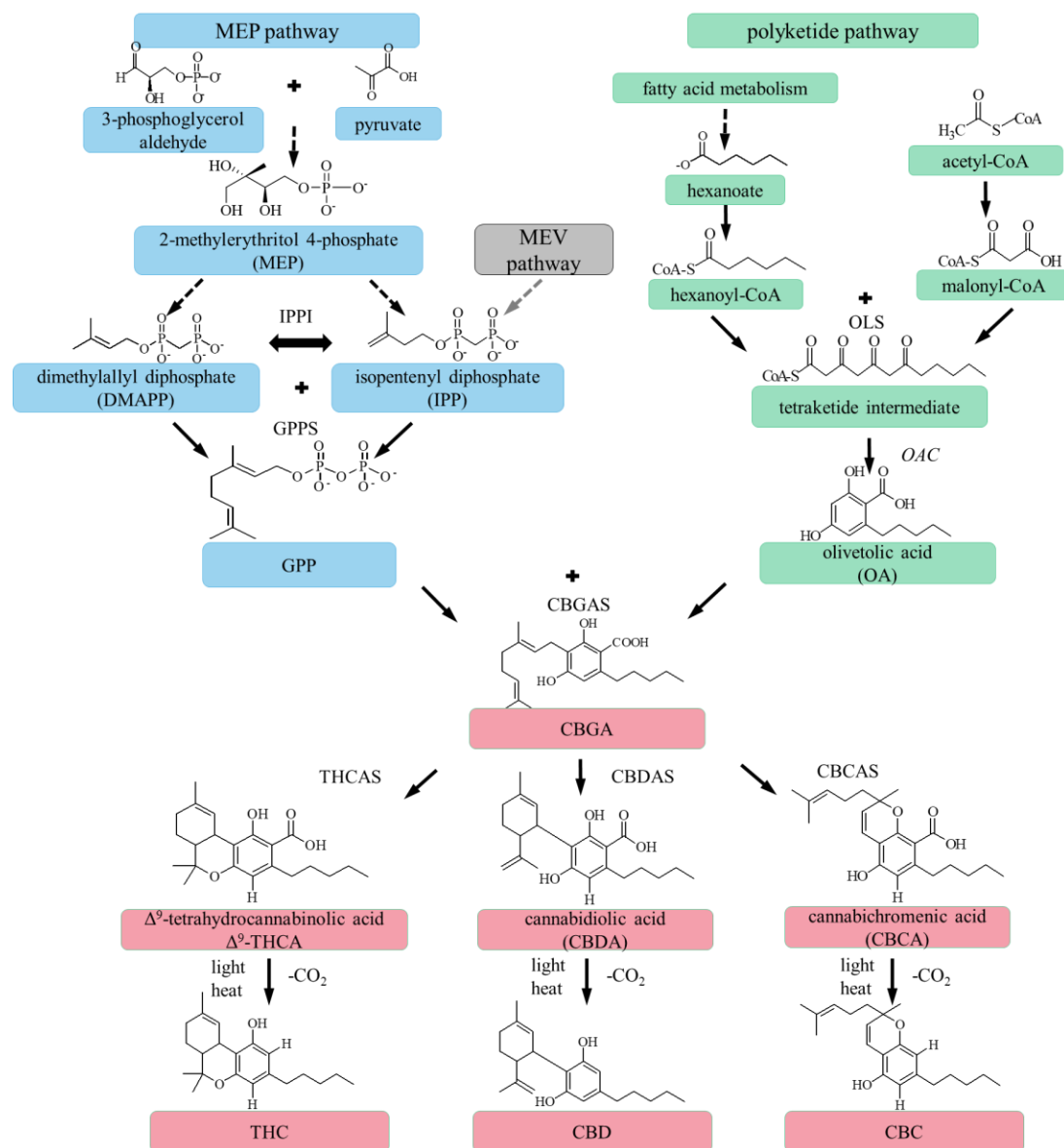
3 大麻素关键途径基因及合成生物学研究进展

3.1 合成途径及关键基因

大麻素合成途径未被完全解析,是一个极其复杂的代谢过程,相关人员根据转录组测序结果,推导出了大麻素生物合成过程,包括 2-甲基赤藓糖醇磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway, MEP)途径、焦磷酸香叶酯(geranyl diphosphate, GPP)途径、己酸途径和以这 3 个途径合成产物为底物的 CBD 途径^[46]。MEP 和 GPP 途径最终合成 GPP,己酸途径最终合成己酰辅酶 A(hexanoyl-CoA),己酰辅酶 A 生成的戊基二羟基苯酸(olivetolic acid, OLA)与 GPP 合成 CBGA(图3)^[47]。

OLA 是由聚酮化合物合酶(polyketide synthase, PKS)和橄榄酸环化酶(olivetolic acid cyclase, OAC)催化下产生的^[49]。产生的 CBGA 是下一阶段 Δ^9 -THCA、CBDA 和大麻环萜酚酸(cannabichromenic acid, CBCA)的主要前体,其中包括 OLA 与 GPP 的烷基化反应,该烷基化是由牻牛儿焦磷酸:橄榄油酸香叶烯基转移酶(cannabis GOT, GOT)催化的。在 MEP 途径中,异戊二烯侧链为 GPP 合成提供底物,从而使芳香异戊二烯基转移酶产生 CBGA^[50]。酶促反应包括 THCA 合成酶、CBDA 合成酶和 CBCA 合成酶,它们分别将 CBGA 转化为 THCA、CBDA 和 CBCA^[51-52]。最后一个阶段包括通过 THCA 和 CBDA 脱羧生成 THC 和 CBD^[53]。

汉麻幼苗不积累大麻素。这一发现表明,大麻素的生物合成与器官和组织的发育有关,并受参与这些过程的基因控制。陈璇等^[30]测定了汉麻不同生长发育时期大麻素含量变化以及大麻素合成途径中相关酶基因表达丰度,对其相关性进行了分析,结果表明,大麻素合成相关酶基因可能通过协同作用来调控大麻素的合成与积累,MEP 和 GPP 途径的酶基因在大麻素合成过程中起着至关重要的作用,而 CBD 途径中 OLS、PT 和 THCA 基因主要对始果期苞片腺毛中的大麻素合成起作用。相关人员对



CBCAS-大麻环酚酸合成酶 CBDAS-大麻二酚酸及其合成酶 CBGAS-大麻萜酚酸合成酶 GPPS-香叶基二磷酸合成酶 IPP-异戊烯二磷酸
MEV-甲羟戊酸 OAC-橄榄油酸环化酶 OLS-橄榄醇合成酶 THCAS-Δ⁹-四氢大麻酚酸合成酶 IPPI-异戊烯二磷酸异构酶
CBCAS-cannabichromenic acid synthase CBDAS-cannabidiolic acid synthase CBGAS-cannabigerolic acid synthase GPPS-geranyl diphosphate synthase
IPP-isopentenyl diphosphate MEV-mevalonic acid OAC-olivetolic acid cyclase OLS-olivetol synthase THCAS-Δ⁹-tetrahydrocannabinolic-Δ⁹-acid
synthase IPPI-isopentenyl diphosphate isomerase

图 3 代表性大麻素合成途径^[48]

Fig. 3 Biosynthetic pathways for cannabinoids in hemp^[48]

汉麻转录组和代谢组进行了分析，大麻素生物合成途径中的关键酶在腺毛体中过度表达^[46,49,54]，大麻素和萜类物质的生物合成和积累发生在腺毛上^[42]。

3.2 汉麻酚类化合物合成生物学研究

合成生物学可用于产生底盘生物，以研究和表征与这些含量较不丰富的大麻素及其衍生物的生物合成有关的酶，并通过可扩大的发酵过程生产这些化合物。此外，通过掺入定制酶，微生物生产可以产

生具有增强特性的新型大麻素。基于植物大麻素生物合成途径，人们可以通过合成生物学的方法实现工业化生产大麻素或合成某些新型大麻素药物^[55]，目前在这方面已经取得了很大的进展（表 1）。

2018 年，美国加州伯克利劳伦斯国家实验室生物能源研究所 Keasling 教授实验室，罗小舟研究员在 *Nature* 发表论文首次报道了利用合成生物学方法在酿酒酵母中合成主要大麻素类成分，通过重组相

表 1 汉麻大麻素类药物异源系统合成研究^[56]

Table 1 Study on synthesis of cannabinoid drugs in hemp by heterologous system^[56]

表达系统	原料	产物	产量
酿酒酵母	橄榄酸	CBGA	216 mg·L ⁻¹
	橄榄酸	CBDA	234 mg·L ⁻¹
	橄榄酸	THCA	320 mg·L ⁻¹
	己酸	THCA	23 mg·L ⁻¹
	己酸	CBGA	73 mg·L ⁻¹
	己酸	CBDA	4.2 mg·L ⁻¹
	葡萄糖	1-甲基-CBG	66 mg·L ⁻¹
	葡萄糖	橄榄醇	76 mg·L ⁻¹
	葡萄糖	1-甲基橄榄醇	42 mg·L ⁻¹
根瘤菌（毕赤酵母）	CBGA	THCA	32.6 mg·L ⁻¹
	CBGA	THCA	3.05 g·L ⁻¹
	橄榄酸	THCA	615 pmol·L ⁻¹
大肠杆菌	橄榄酸/GPP	CBGA	1.2 mg·L ⁻¹
	葡萄糖	己酸	190 mg·L ⁻¹
	葡萄糖	CBGA	N/A
烟草	CBGA	CBDA	34 mg·L ⁻¹
	CBGA	THCA	N/A
	CBDA	CBDA-葡萄糖苷	N/A
	己酸	橄榄酸葡萄糖苷	N/A
	己酸	橄榄酸	N/A
马克斯克鲁维酵母	葡萄糖	CBDA、THCA	0.67 mg·L ⁻¹
维氏假丝酵母	油酸	CBGA	上清液中为 0.67 mg·L ⁻¹ ，裂解液中为 1.51 mg·L ⁻¹
	油酸	橄榄酸	13.1 mg·L ⁻¹
莱茵衣藻	葡萄糖	CBGA	1.25 g·L ⁻¹
无细胞	橄榄酸	CBGA	1.25 g·L ⁻¹

N/A-是否适合大麻素生产尚未报道

N/A-whether suitable for cannabinoid production is yet to be reported

关菌株中的橄榄酸生物合成模块，可以从更简单的前体如己酸或半乳糖中生产 CBGA，从 1 mmol/L 己酸中可合成 7.2 mg/L CBGA，并且可以通过工程菌株提高 CBGA 的表达效率，该菌株可产生 8.0 mg/L THCA 和 4.8 mg/L THCA^[12]。在大麻素合成中，必须考虑毒性作用，因为几种大麻素生物合成途径的代谢物（如 CBGA 和 THCA）会通过宿主植物中的细胞凋亡导致细胞死亡^[38]。Gülck 等^[57]研究使用基于芳香异戊二烯基转移酶的方法以组合方式构建所需的新型植物大麻素结构，将在细胞质中合成的橄榄酸转移到质体中，并将橄榄酸和香叶基焦磷酸转化为 CBGA，最后释放到质外体中，为异源宿主提供贮藏可能性，从而避免自身毒性。

4 利用植物细胞工程技术合成大麻素

由于汉麻几千年来的药用特性，一些大麻素及其类似物因其潜在的医药价值而受到广泛关注。一些大麻素制剂已在某些国家被批准为处方药，用于治疗一系列人类疾病。但汉麻的大规模田间耕种很难控制，同时因受环境、品种、气候、土壤等因素的影响，汉麻中的大麻素含量会发生变化。鉴于此，人们开始研究大麻素替代的生产方法。生物技术是一种有吸引力的替代手段^[9]，使用植物、真菌和细菌在内的不同平台来生产大麻素^[57]。如通过外植体和微繁殖技术生产大麻素，可以持续稳定地获得大麻素，除特定植株外，高生物量作物烟草也被认为是一种很有希望的生产大麻素的异源宿主。体外植

物细胞培养物用于大麻素生产已经取得了一定的进展,包括遗传转化、细胞悬浮培养、多毛/不定根和异源系统等方面^[58],如通过发根农杆菌和根癌农杆菌转化的遗传转化策略合成大麻素,可以加快新品种的开发并稳定旧品种。通过异源系统来产生大麻素合成的相关酶,有望实现大麻素的批量生产。

4.1 汉麻组织体外扩繁

微繁殖技术的发展是遗传修饰的必要步骤,可以对大麻进行基因改造,这可能有助于将来新品种的育

种。微繁殖可以实现植物快速繁殖和大规模生产。微繁殖的最大优势是优良材料的快速再生,并保存有价值的植物基因型,同时建立有效的再生体系^[14]。尽管有多项关于通过微繁殖进行芽增殖的报道(表 2),但通过从头再生获得完整植株的报道较少^[59]。

汉麻微繁殖方式包括直接和间接器官发生,包含腋芽、枝梢、子叶和上胚轴的节段用于直接器官发生^[62-63]。MX 麻醉品种在含有 0.5 $\mu\text{mol/L}$ (相当于 0.11 mg)噻二唑酮(thidiazuron, TDZ)的 MS 培养基上

表 2 汉麻的细胞培养、转化和微繁研究^[59-61]

Table 2 Study on cells culture, transformation and micro reproduction of hemp^[59-61]

基因型	研究类型	外植体	最佳培养基	结果
OSU	细胞悬浮培养	幼苗组织	0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.25 mg·L ⁻¹ KIN+1 mg·L ⁻¹ 酪蛋白水解物	愈伤组织大量形成
C-71、TU-A	愈伤组织形成	幼苗组织	MS+1 mg·L ⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L ⁻¹ KIN	愈伤组织大量形成
C-150、C-152	愈伤组织形成和细胞悬浮培养	苞片、花萼和叶组织	MS+IAA(0.25、1 mg·L ⁻¹)+0.5 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ ; 2,4-D+2 mg·L ⁻¹ KIN+1 mg·L ⁻¹ 酪蛋白水解物	愈伤组织大量形成,但 2,4-D 限制了根的形成
OSU	愈伤组织形成和细胞悬浮培养	幼苗组织	MS+维生素 B5+0.1 mg·L ⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L ⁻¹ KIN	培养 6~8 周后,获得愈伤组织
F56、F77	无性插条的生根和发芽	腋芽	芽增殖: MS+1 mg·L ⁻¹ BAP+0.02 mg·L ⁻¹ IBA 生根: MS+0.2%活性炭+2 mg·L ⁻¹ IBA	2 个芽/外植体, 47.7%响应
未知	细胞悬浮培养	叶组织	B5 培养基+1 mg·L ⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L ⁻¹ KIN+3%葡萄糖	汉麻的细胞悬浮培养能够将 CBD 转化为结合的 CBE, 将 THC 转化为 CBC
MX-1	芽增殖和体外生根	节点段	芽增殖: MS+0.1 mg·L ⁻¹ TDZ 生根: 1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ IBA+0.05%活性炭	芽增殖: 12.6 个芽/外植体 生根: 4.8 个根/外植体
Mexican variety	直接器官发生: 离体根和芽增殖	节点段	芽增殖: MS+0.5 mg·L ⁻¹ mT 生根: MS+0.5 mg·L ⁻¹ mT	芽增殖: 13.4 个芽/外植体 生根: 13.8 个根/外植体
1KG2TF、S1525、H5458	未成熟和成熟花序的芽再生	花卉组织	芽诱导: MS+2 mg·L ⁻¹ TDZ 生根: MS+0.4 mg·L ⁻¹ KIN+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	芽诱导: 4 个芽/花簇 生根: 大多数生根
Bialobrzskie Tygra、Fibrol、Monoica、USO-31	插条直接器官发生	幼苗	芽增殖: IMB4+1.5 mg·L ⁻¹ KIN+0.25 mg·L ⁻¹ BAP9THP+40.5 mg·L ⁻¹ 腺嘌呤半硫酸盐 生根: 1/2MS+0.04 mg·L ⁻¹ NAA	芽增殖: 4.4 个芽/外植体 生根: 未统计
BA-1、BA-2、BA-41、BA-49、BA-61、BA-71	愈伤组织形成, 芽增殖	具有 2 个节点的茎段	芽增殖: DKW+0.11 mg·L ⁻¹ TDZ	芽增殖: 2.23 个芽/外植体
Epsilon 68 的 E1、E4、E40	芽再生和体外生根	腋芽、芽尖的节段	芽增殖: 1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ IAA 生根: 1/2MS+0.5 mg·L ⁻¹ IAA	芽增殖: 2.5 个芽/外植体 生根: 74.6%生根
MX-CBD-11MX-CBD-707	腋芽再生	腋芽	芽增殖: MS+0.5 mg·L ⁻¹ mT	芽增殖: 1.78 个芽/外植体
Sud Italian	愈伤组织和芽再生	叶、下胚轴、子叶和根	愈伤组织/芽再生: MS+维生素 B5+3~10 mg·L ⁻¹ 2,4-D+0.01~0.09 mg·L ⁻¹ BAP	愈伤组织/芽再生: 偶尔会从下胚轴组织产生愈伤组织。
Silesia、Juso-15、Novosadska、Fibrimon-24、Fedrina-74	愈伤组织的完整植株再生	叶柄、腋芽愈伤组织和节间愈伤组织	愈伤组织诱导: MS+麦草畏(2、3 mg·L ⁻¹) 芽诱导: MS+麦草畏(2、3 mg·L ⁻¹) 生根: MS+0.1 mg·L ⁻¹ IAA+0.1 mg·L ⁻¹ NAA	愈伤组织诱导: 52.3%诱导率 芽诱导: 2.5%诱导率 生根: 69.9%的小苗形成根

续表 2

基因型	研究类型	外植体	最佳培养基	结果
Beniko、Bialobrzescie	植株再生	根、叶和茎	愈伤组织诱导: DARIA(ind ⁺)+NAA+BAP(浓度未知) 体细胞胚胎发生: DARIA(pro ⁺)+NAA+BAP(浓度未知)	愈伤组织诱导: 未统计 体细胞胚胎发生: 未统计
Bialobrzescie、Silesia、Beniko	愈伤组织诱导和植株再生	茎和子叶	愈伤组织诱导: DARIA(ind ⁺)+1 mg·L ⁻¹ KIN+0.05 mg·L ⁻¹ NAA 芽诱导: DARIA(pro ⁺)+0.17 mg·L ⁻¹ BAP+0.03 mg·L ⁻¹ NAA 生根: DARIA(root ⁺)+2 mg·L ⁻¹ IAA	愈伤组织诱导: 最佳形态 愈伤组织诱导: 茎外植体 芽诱导: 15.56%子叶外植体 生根: 未统计
MXE-1	从叶片衍生的愈伤组织再生	叶组织	愈伤组织形成: MS+0.1 mg·L ⁻¹ NAA+0.2 mg·L ⁻¹ TDZ 芽诱导: MS+0.1 mg·L ⁻¹ TDZ	愈伤组织形成: 未统计 芽诱导: 12.3 个芽/外植体
品种不明	愈伤组织诱导和芽再生	子叶和上胚轴	愈伤组织诱导/芽再生: MS+1.7 mg·L ⁻¹ BAP+0.5 mg·L ⁻¹ IBA	愈伤组织/芽再生: 2 个芽/上胚轴
Changsa	愈伤组织的完整植株再生	子叶	愈伤组织诱导/芽再生: MS+0.4 mg·L ⁻¹ TDZ+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	愈伤组织/芽再生: 3 个芽/外植体
Felina32、Ferimon、Fedora17、Finola、USO31	体外植物再生和再生植物的倍性水平	子叶、下胚轴	器官发生: MS+0.4 mg·L ⁻¹ TDZ+0.2 mg·L ⁻¹ NAA 生根: MS+0.4 mg·L ⁻¹ TDZ+0.2 mg·L ⁻¹ NAA	器官发生: 1.49 个芽/下胚轴 生根: 18%生根率

mT-间-托泊林 BAP9THP-6-苄基氨基-9-(四羟基吡喃基)嘌呤 BAP-6-苄基氨基嘌呤 DARIA(ind⁺)、DARIA(pro⁺)、DARIA(root⁺)-3 种不同类型适用于木本植物生长的 Daria 培养基, 分别有助于愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生和生根

mT-meta-topolin BAP9THP-6-N-benzyl-9-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)adenine BAP-6-benzylaminopurine DARIA(ind⁺), DARIA(pro⁺), DARIA(root⁺)-three different types of Daria media suitable for woody plant growth are helpful to callus induction, somatic embryogenesis and rooting, respectively

获得最佳繁殖率(每个外植体 12~14 个芽);可在加入 2.5 μmol/L(0.51 mg)吲哚-3-丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)的半强度 MS 培养基上生根^[63]。

纤维品种的繁殖率比较低, 每个外植体的最大繁殖率在 3~3.2 个芽^[62,64]。中国汉麻品种(Changtu)在添加 0.2 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L α-萘乙酸(1-naphthylacetic acid, NAA)的 MS 培养基上每个外植体可以产生 3.2 个枝梢。在具有 IBA 和 NAA 的半强度 MS 培养基上, 生根率达到 85%, 并且 95% 的植物在进一步驯化后仍然存活^[62]。Feeney 等^[65]使用 4 个纤维麻品种的子叶、茎、叶柄和子叶来获得愈伤组织, 在愈伤组织形成方面, 最有效的培养基是添加了维生素 B5 以及 2,4-二氯苯丙氨酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)和 6-苄基氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, BA)或激动素(kinetin, KIN)的 MS 培养基, 在培养 4 周后生根, 但未实现芽再生。Slusarkiewicz-Jarzina 等^[66]利用不同类型的外植体(幼叶、叶柄、节间和腋芽)的愈伤组织获得再生芽。其中叶柄外植体在含有 2~3 mg/L 麦草畏(dicamba)的 MS 培养基上愈伤组织诱导率最

高, 达到 87%。也有通过从上胚轴诱导愈伤组织再生的报道, 该研究使用伊朗大麻的子叶和上胚轴为外植体, 在含有 2 mg/L BA 和 0.5 mg/L IBA 的 MS 培养基上再生率最高(每个愈伤组织 2 个芽)^[65]。Ioannidis 等^[67]开发了一种有效的体外微繁殖方法, 用于大规模生产 2 种 CBD 和 CBG 高含量的汉麻品种。当全强度和半强度 MS 培养基均添加 4.0 μmol/L BA 时, 可获得最高的平均芽数和芽长。培育高含量 CBD 品种, 全强度培养基中的最高芽数为 3.63 个, 最长为 5.66 cm, 而半强度培养基中的最高芽数为 3.13 个, 最长为 5.09 cm。培育高含量 CBG 品种, 全强度培养基平均植株芽数为 3.38 个, 平均长度为 6.23 cm, 而半强度培养基中的平均芽数为 3.08 个, 平均长度为 5.99 cm。CBG 和 CBD 高含量的 2 个品种都具有较好的生根率, 分别达到了 87.50%和 83.33%, 成活率均达到了 97%。

4.2 汉麻的农杆菌遗传转化及毛状根的诱导

汉麻对农杆菌转化具有相对抗性^[66], 但已有文献报道了基因转化和再生的方法^[65-66,68-70]。由于再生效率低, 对品种、组织、植物年龄的依赖性高以

及缺乏转基因稳定性等原因, 汉麻的基因转化至今仍然是一个挑战。Mackinnon 等^[71]第 1 个报道了汉麻成功转化的实验, 选择芽尖外植体及根癌农杆菌进行转化, 将半乳糖苷酶抑制蛋白基因 (polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIPs) 和除草剂抗性基因成功引入汉麻中。在另 1 项研究中, 利用携带二元 pNOV3635 载体的根瘤菌 (EHA101) 将愈伤组织细胞成功引入编码磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 的基因, 愈伤组织能够表达 PMI 基因, 但不能实现器官和植株的再生^[65]。Wahby 等^[69]报道了使用发根农杆菌和根癌农杆菌品系 (A4、AR10、C58 和 IVIA251) 对汉麻进行基因转化, 研究者使用了 5 d 龄的幼苗, 并发现能在下胚轴和子叶节衍生的外植体上诱导毛状根, 但未能使幼苗再生。Zhang 等^[72]报道了使用农杆菌介导的基因转化方法, 成功生成了 4 株具有白化表型的基因编辑的汉麻幼苗, 且繁殖了转基因植物并验证了 T-DNA 在汉麻基因组中能够稳定遗传给后代。

只有汉麻毛根被证实易受农杆菌侵染, 从而在很短的时间诱发转化根培养物^[69]。毛状根培养物在无激素的培养基中具有很高的生长速率, 并且具有产生与野生型相当的次生代谢产物的潜力^[73], 是汉麻遗传转化和功能基因组学研究的重要途径之一。毛状根培养物具有诸多优点: 对次生代谢产物的生物合成能力高、生长和生物量积累快、遗传稳定性高、生产成本低等。Sirikantaramas 等^[52]首次报道了在根培养物中产生大麻素的研究。研究者使用烟草毛状根培养物, 从汉麻叶片 (麻醉品种) 中分离出 *THCAS*, 并对其 cDNA 进行克隆和测序。在花椰菜花叶病毒的 pBI121 质粒载体中, 用带有 *THCAS* 的发根农杆菌 (15834 株) 转化烟草的毛状根。转化的根培养物能够表达 *THCAS*, 并将外源添加的 CBGA 转化为 THCA, 最高转化率仅为 8.2%。Farg 等^[74]从愈伤组织培养中建立了不定根。愈伤组织培养 8 周后, 向 B5 固体培养基中添加生长素 (NAA、IBA、IAA), 从愈伤组织中诱导不定根, 在黑暗条件下添加 4 mg/L NAA 的培养基上获得了令人满意的生长和根分化。随后, 将根尖转移至恒定补充生长素 (IAA、IBA、NAA) 的液体培养基 (1/2B5) 中培养。在这项研究中, 大麻素的最大产量为 THCA 1 μg/g (干质量)、CBGA 1.6 μg/g (干质量) 和 CBDA 1.7 μg/g (干质量)。研究结果也显示在黑暗条件下 (28 d 的生长周期), 毛状根培养物中大麻素含量非常低。

5 结语

尽管人们在研究大麻素的生物合成方面付出了大量努力, 但仍存在很多问题。如多种酶的结构及作用机制尚不清楚, 对其他将近 200 种次要大麻素的产生途径和潜在应用价值也知之甚少, 植物中不同毛状体的相互作用及调控机制仍不清楚; 同时对汉麻生理活性的研究只限于 THC 和 CBD, 随着大麻素活性物质的药理作用越来越清晰, 需要更深入地解析合成途径, 以便可以在植物或重组载体中重新设计, 选择性地生产高活性、高价值的大麻素及其衍生物。

用微生物发酵生产主要大麻素与植物竞争将是一项巨大的挑战, 但是, 异源大麻素生产能够产生用于医药用途的稀有或新的大麻素, 除了主要的大麻素 THC 和 CBD 之外, 合成生物学可用于构建一种底盘生物体, 用于研究和表征参与那些含量较少的大麻素或其衍生物的生物合成的酶, 并通过发酵生产活性化合物, 使其达到工业化的生产水平。在植物方面, 可以通过设计新型酶而合成植物大麻素, 如汉麻酚类 CBD 及汉麻萜类精油等, 进一步通过植物育种还可以提高这些稀有且对疾病治疗及健康有益的大麻素的产量。总之, 这些策略将有助于挖掘和利用大麻素作为药物的潜在价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杜军强. 汉麻生长过程中抗真菌活性成分的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [2] Kovalchuk I, Pellino M, Rigault P, et al. The genomics of *Cannabis* and its close relatives [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2020, 71: 713-739.
- [3] Andre C M, Hausman J F, Guerriero G. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 19.
- [4] Namdar D, Voet H, Ajampura V, et al. Terpenoids and phytocannabinoids co-produced in *Cannabis sativa* strains show specific interaction for cell cytotoxic activity [J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3031.
- [5] Mechoulam R, Gaoni Y. Recent advances in the chemistry of hashish [J]. *Fortschr Chem Org Naturst*, 1967, 25: 175-213.
- [6] Romero P, Peris A, Vergara K, et al. Comprehending and improving *Cannabis* specialized metabolism in the systems biology era [J]. *Plant Sci*, 2020, 298: 110571.
- [7] Ferber S G, Namdar D, Hen-Shoval D, et al. The

- “entourage effect”: Terpenes coupled with cannabinoids for the treatment of mood disorders and anxiety disorders [J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2020, 18(2): 87-96.
- [8] Stasiłowicz A, Tomala A, Podolak I, *et al.* *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 778.
- [9] Carvalho Â, Hansen E H, Kayser O, *et al.* Designing microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids [J]. *FEMS Yeast Res*, 2017, 17(4): fox037.
- [10] Zirpel B, Stehle F, Kayser O. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(9): 1869-1875.
- [11] Liu Y Y, Zhu P P, Cai S, *et al.* Three novel transcription factors involved in cannabinoid biosynthesis in *Cannabis sativa* L. [J]. *Plant Mol Biol*, 2021, 106(1/2): 49-65.
- [12] Luo X Z, Reiter M A, d'Espaux L, *et al.* Complete biosynthesis of cannabinoids and their unnatural analogues in yeast [J]. *Nature*, 2019, 567(7746): 123-126.
- [13] Schachtsiek J, Warzecha H, Kayser O, *et al.* Current perspectives on biotechnological cannabinoid production in plants [J]. *Planta Med*, 2018, 84(4): 214-220.
- [14] Wróbel T, Dreger M, Wielgus K, *et al.* The application of plant *in vitro* cultures in cannabinoid production [J]. *Biotechnol Lett*, 2018, 40(3): 445-454.
- [15] Niazian M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants [J]. *Planta*, 2019, 249(4): 953-973.
- [16] Breijyeh Z, Jubeh B, Bufo S A, *et al.* *Cannabis*: A toxin-producing plant with potential therapeutic uses [J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 117.
- [17] Almogi-Hazan O, Or R. *Cannabis*, the endocannabinoid system and immunity-the journey from the bedside to the bench and back [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4448.
- [18] Elphick M R. The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367(1607): 3201-3215.
- [19] Pertwee R G. The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Delta 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(2): 199-215.
- [20] Fernández-Ruiz J, Sagredo O, Pazos M R, *et al.* Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75(2): 323-333.
- [21] Salami S A, Martinelli F, Giovino A, *et al.* It is our turn to get *Cannabis* high: Put cannabinoids in food and health baskets [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4036.
- [22] Dariš B, Tancer Verboten M, Knez Ž, *et al.* Cannabinoids in cancer treatment: Therapeutic potential and legislation [J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2019, 19(1): 14-23.
- [23] Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Anticancer mechanisms of cannabinoids [J]. *Curr Oncol*, 2016, 23(2): S23-S32.
- [24] Jeong S, Jo M J, Yun H K, *et al.* Cannabidiol promotes apoptosis via regulation of XIAP/Smac in gastric cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 846.
- [25] Mazuz M, Tiroler A, Moyal L, *et al.* Synergistic cytotoxic activity of cannabinoids from *Cannabis sativa* against cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(13): 1141-1156.
- [26] Bachari A, Piva T J, Salami S A, *et al.* Roles of cannabinoids in melanoma: Evidence from *in vivo* studies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17): 6040.
- [27] de Almeida D L, Devi L A. Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2020, 8(6): e00682.
- [28] Yuan M, Kiertscher S M, Cheng Q W, *et al.* Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells [J]. *J Neuroimmunol*, 2002, 133(1/2): 124-131.
- [29] Blázquez C, González-Feria L, Alvarez L, *et al.* Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(16): 5617-5623.
- [30] 陈璇, 张庆滢, 郭蓉, 等. 不同发育时期大麻素合成相关酶基因表达特征与大麻素含量的相关分析 [J]. 分子植物育种, 2018, 16(2): 583-590.
- [31] 张建春. 汉麻种植与初加工技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 61-62.
- [32] Aliferis K A, Bernard-Perron D. Cannabinomics: Application of metabolomics in *Cannabis* (*Cannabis sativa* L.) research and development [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 554.
- [33] Livingston S J, Quilichini T D, Booth J K, *et al.* *Cannabis* glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation [J]. *Plant J*, 2020, 101(1): 37-56.
- [34] Mahlberg P G, Kim E S. Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae) [J]. *J Ind Hemp*, 2004, 9(1): 15-36.
- [35] Mahlberg P G, Kim E S. Cuticle development on glandular trichomes of *Cannabis sativa* (Cannabaceae) [J]. *Am J Bot*, 1991, 78(8): 1113-1122.

- [36] Hammond C T, Mahlberg P G. Morphogenesis of capitate glandular hairs of *Cannabis sativa* (Cannabaceae) [J]. *Am J Bot*, 1977, 64(8): 1023-1031.
- [37] Elhendawy M A, Wanas A S, Radwan M M, *et al.* Chemical and biological studies of *Cannabis sativa* roots [J]. *Med Cannabis Cannabinoids*, 2019, 1(2): 104-111.
- [38] Sirikantaramas S, Taura F, Tanaka Y, *et al.* Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(9): 1578-1582.
- [39] Flores-Sanchez I J, Verpoorte R. PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *Cannabis sativa* L. plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(12): 1767-1782.
- [40] Tettey J N A, Crean C, Rodrigues J, *et al.* United nations office on drugs and crime: Recommended methods for the identification and analysis of synthetic cannabinoid receptor agonists in seized materials [J]. *Forensic Sci Int Synerg*, 2021, 3: 100129.
- [41] Borroto Fernandez E, Peterseil V, Hackl G, *et al.* Distribution of chemical phenotypes (chemotypes) in European agricultural hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars [J]. *J Forensic Sci*, 2020, 65(3): 715-721.
- [42] Cole M D. The analysis of controlled substances [J]. *Choice Rev Online*, 2004, 41(05): 41-2835.
- [43] Hillig K W, Mahlberg P G. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae) [J]. *Am J Bot*, 2004, 91(6): 966-975.
- [44] Morimoto S, Komatsu K, Taura F, *et al.* Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(6): 1525-1529.
- [45] Morimoto S, Komatsu K, Taura F, *et al.* Enzymological evidence for cannabichromenic acid biosynthesis [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(8): 854-857.
- [46] 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): R102.
- [47] Sharir H, Abood M E. Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126(3): 301-313.
- [48] Deguchi M, Kane S, Potlakayala S, *et al.* Metabolic engineering strategies of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): A brief review of the advances and challenges [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 580621.
- [49] Gagne S J, Stout J M, Liu E W, *et al.* Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(31): 12811-12816.
- [50] Page J E, Boubakir Z. Aromatic prenyltransferase from *Cannabis*: US, 9765308 [P]. 2017-09-19.
- [51] Taura F, Dono E, Sirikantaramas S, *et al.* Production of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid by the biosynthetic enzyme secreted from transgenic *Pichia pastoris* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3): 675-680.
- [52] Sirikantaramas S, Morimoto S, Shoyama Y, *et al.* The gene controlling marijuana psychoactivity: Molecular cloning and heterologous expression of delta1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(38): 39767-39774.
- [53] Fishedick J T, Hazekamp A, Erkelens T, *et al.* Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(17/18): 2058-2073.
- [54] Morita H, Wong C P, Abe I. How structural subtleties lead to molecular diversity for the type III polyketide synthases [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(41): 15121-15136.
- [55] Blatt-Janmaat K, Qu Y. The biochemistry of phytocannabinoids and metabolic engineering of their production in heterologous systems [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2454.
- [56] Gülck T, Booth J K, Carvalho Â, *et al.* Synthetic biology of cannabinoids and cannabinoid glucosides in *Nicotiana benthamiana* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(10): 2877-2893.
- [57] Gülck T, Möller B L. Phytocannabinoids: Origins and biosynthesis [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25(10): 985-1004.
- [58] Kodym A, Leeb C J. Back to the roots: Protocol for the photoautotrophic micropropagation of medicinal *Cannabis* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2019, 138(2): 399-402.
- [59] Adhikary D, Kulkarni M, El-Mezawy A, *et al.* Medical *Cannabis* and industrial hemp tissue culture: Present status and future potential [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 627240.
- [60] Hesami M, Baiton A, Alizadeh M, *et al.* Advances and perspectives in tissue culture and genetic engineering of *Cannabis* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5671.
- [61] Monthony A S, Page S R, Hesami M, *et al.* The past, present and future of *Cannabis sativa* tissue culture [J]. *Plants* (Basel), 2021, 10(1): 185.
- [62] Wang R, He L S, Xia B, *et al.* A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis sativa* L.) by shoot tip culture [J]. *Pak J Bot*, 2009, 41(2): 603-608.
- [63] Kuzuyama T, Noel J P, Richard S B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products [J]. *Nature*, 2005, 435(7044): 983-987.

- [64] Cheng C H, Zang G G, Zhao L N, *et al.* A rapid shoot regeneration protocol from the cotyledons of hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Ind Crops Prod*, 2016, 83: 61-65.
- [65] Feeney M, Punja Z K. Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2003, 39(6): 578-585.
- [66] 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. [J]. *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 2005, 47(2): 145-151.
- [67] Ioannidis K, Dadiotis E, Mitsis V, *et al.* Biotechnological approaches on two high CBD and CBG *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae) varieties: *In vitro* regeneration and phytochemical consistency evaluation of micropropagated plants using quantitative ¹H-NMR [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5928.
- [68] Schachtsiek J, Hussain T, Azzouhri K, *et al.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Cannabis sativa* L. [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 157.
- [69] Wahby I, Caba J M, Ligero F. *Agrobacterium* infection of hemp (*Cannabis sativa* L.): Establishment of hairy root cultures [J]. *J Plant Interact*, 2013, 8(4): 312-320.
- [70] Sirkowski E E. Marked *Cannabis* for indicating medical marijuana: US, 20120311744 [P]. 2012-12-06.
- [71] Mackinnon L, Mcdougall G, Aziz N, *et al.* Progress towards transformation of fibre hemp [A]. Annual Report of the Scottish Crop Research Institute [R]. Dundee: Scottish Crop Research Institute, 2001: 84-86.
- [72] Zhang X Y, Xu G C, Cheng C H, *et al.* Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(10): 1979-1987.
- [73] Pistelli L, Giovannini A, Ruffoni B, *et al.* Hairy root cultures for secondary metabolites production [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 698: 167-184.
- [74] Farag S, Kayser O. Cannabinoids production by hairy root cultures of *Cannabis sativa* L. [J]. *Am J Plant Sci*, 2015, 6(11): 1874-1884.

[责任编辑 潘明佳]